

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

**Expression des axonalen Lenkungsfaktors Netrin-1 und  
dessen Rezeptors DCC im sich entwickelnden humanen  
Hirnstamm und Kleinhirn**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Benedikt Burchard Max Bunz**

**aus**

**Tübingen**

**2009**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

"As long as our brain is a mystery, the universe, the reflection of the structure of the brain, will also be a mystery" *Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)*

# Inhaltsverzeichnis

**Inhaltsverzeichnis ..... I**

**Abkürzungsverzeichnis ..... IV**

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

1.1 Einleitende Worte ..... 1

1.2 Allgemeine Entwicklung des ZNS.....3

1.2.1 Makroskopische Entwicklung des ZNS .....3

1.2.2 Entwicklung auf zellulärer und subzellulärer Ebene .....7

1.2.3 Migration .....8

1.2.4 Axonale Lenkung.....9

1.3 Entwicklung des Kleinhirns.....22

1.3.1 Charakterisierung des Kleinhirngebiets im Rhombencephalon .....22

1.3.2 Morphogenese des Kleinhirns .....23

1.3.3 Histogenese des Kleinhirns und der präcerebellären Kerngebiete...24

1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung .....27

**2 Material und Methoden ..... 29**

2.1 Definition des normalen fetalen Gehirns .....29

2.2 Klinische Daten zum Untersuchungsmaterial.....30

2.3 Neuropathologische Beurteilung .....31

2.4 Gehirnregionen.....32

2.5 Anfertigung der histologischen Präparate .....34

2.5.1 Immunhistochemie .....34

2.5.2 Die Antikörper .....35

2.5.3 Die Streptavidin-Biotin-Methode.....36

2.5.4 Manuelles Färbeverfahren .....37

2.5.5	Der automatisierte Färbevorgang.....	37
2.5.6	Protokoll .....	38
2.5.7	Experimentkontrollen.....	39
2.6	Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung .....	39
2.7	Statistische Methoden .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1	Expression von DCC im Kleinhirn .....	41
3.1.1	DCC in den Rindenschichten des Kleinhirns.....	41
3.1.2	DCC in den Kleinhirnkernen.....	44
3.2	Expression von Netrin-1 im Kleinhirn .....	45
3.2.1	Netrin-1 in den Rindenschichten des Kleinhirns.....	45
3.2.2	Netrin-1 in den Kleinhirnkernen .....	48
3.3	Expression von Ki-67 im Kleinhirn.....	49
3.3.1	Ki-67 in den Rindenschichten des Kleinhirns .....	49
3.3.2	Ki-67 in den Kleinhirnkernen .....	50
3.4	Altersassoziierte Expression der Wachstumsfaktoren in den Rindenschichten des Kleinhirns .....	51
3.4.1	Altersassoziierte Expression von DCC.....	51
3.4.2	Altersassoziierte Expression von Netrin-1 .....	53
3.4.3	Altersassoziierte Expression von Ki-67 .....	54
3.5	Expression von DCC im Hirnstamm .....	55
3.5.1	DCC im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone .....	55
3.5.2	DCC in den präcerebellären Kerngebieten.....	56
3.5.3	DCC in den Hirnnervenkernen .....	57
3.6	Expression von Netrin-1 im Hirnstamm .....	60
3.6.1	Netrin-1 im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone .....	60
3.6.2	Netrin-1 in den präcerebellären Kerngebieten.....	61
3.6.3	Netrin-1 in den Hirnnervenkernen .....	62
3.7	Expression von Ki-67 im Hirnstamm .....	65
3.7.1	Ki-67 im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone .....	65

3.7.2	Ki-67 in den präcerebellären Kerngebieten .....	65
3.7.3	Ki-67 in den Hirnnervenkernen.....	65
3.8	Expression von Netrin-1 und DCC in Endothelien.....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1	Diskussion der Methodik .....	67
4.2	Sind das Kleinhirn und die präcerebellären Kerngebiete ein geeignetes Modell um die neuronale Migration und die axonale Lenkung zu untersuchen? .....	69
4.3	Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptoren im Kleinhirn .....	70
4.3.1	Expression in den Rindenschichten des Kleinhirns .....	70
4.3.2	Expression in den Kerngebieten des Kleinhirns .....	73
4.4	Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptoren in den präcerebellären Kerngebieten .....	74
4.5	Expression von Netrin-1 und DCC in den Kernen der Hirnnerven ...	77
4.6	Netrin-1 als Überlebensfaktor über den „dependence receptor“ DCC .....	79
4.7	Expression von Netrin-1 in den Endothelien .....	81
4.8	Expression von Ki-67 im fetalen Hirnstamm und Kleinhirn.....	82
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BMPs	bone morphogenetic proteins
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DCC	deleted in colorectal cancer
EGL	äußere Körnerzellschicht (external granule layer)
HN	Hirnnerv
IGL	innere Körnerzellschicht (internal granule layer)
IZ	Intermediärzone
ML	1. Molekularschicht (molecular layer) 2. Mittellinie
NP	Nuclei pontis
PCL	Purkinjezellschicht (Purkinje cell layer)
PDGF	platelet-derived growth factor
SSH	Sonic Hedgehog
SSW	Schwangerschaftswoche
VEGF	vascular endothelial growth factor
WM	Mark (white matter)
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Einleitende Worte

Die Informationsverarbeitung im menschlichen Gehirn basiert auf einem komplexen Netzwerk neuronaler Verbindungen. Die Aufgabe all diese Verbindungen des zentralen Nervensystems zu initiieren ist überwältigend. Im erwachsenen menschlichen Gehirn geht jedes der geschätzten  $10^{12}$  Neurone eine Verbindung mit durchschnittlich 1000 weiteren Zellen ein, um damit die spezifischen Schaltkreise zu schaffen, die für ein korrektes Funktionieren des gesamten Systems von größter Bedeutung sind.

Wie aber kann diese Leistung mit der notwendigen Sorgfalt und Präzision während der Entwicklung des menschlichen Nervensystems erbracht werden?

Während der Morphogenese des ZNS entstehen Neurone in spezialisierten Proliferationszonen und migrieren auf definierten Wegen bis zum Erreichen ihres endgültigen Zielortes. Des Weiteren bildet jedes Neuron im Laufe seiner Entwicklung Dendriten und ein Axon aus um die spezifischen Verbindungen einzugehen.

Der Ablauf dieser Entwicklung lässt sich, grob zusammengefasst, in zwei Schritte einteilen: In der frühen Entwicklungsphase spielen von der neuronalen Aktivität unabhängige Prozesse eine wichtige Rolle, wohingegen in späteren Entwicklungsstadien neuronale Aktivitäten die Differenzierung und Aufrechterhaltung der einzelnen Verbindungen beeinflussen (Goodman und Shatz 1993; Song und Poo 2001; Tessier-Lavigne und Goodman 1996).

Das 1994 von T. Serafini und M. Tessier-Lavigne als axonaler Lenkungsfaktor entdeckte Netrin-1 (Serafini et al. 1994) nimmt bei der Entwicklung des menschlichen Gehirns auf Grund seiner multimodalen Funktionen einen wichtigen Platz ein. So konnten weitere Studien zeigen, dass Netrin-1 nicht nur axonale Lenkungsprozesse steuert, sondern auch bei der Migration (Livesey und Hunt 1997), beim Überleben der jungen Neurone (Mehlen et al. 1998) und bei der Angiogenese (Park et al. 2004) eine wichtige Rolle spielt.



Durch das von Keino-Masu als Netrin-1-Rezeptor identifizierte DCC-Protein (deleted in colorectal cancer) (Keino-Masu et al. 1996) erhält Netrin-1 eine weitere exklusive Eigenschaft gegenüber anderen Lenkungsfaktoren, in dem es über den Rezeptor DCC als einziges Lenkungsmolekül anziehende Signale auf wachsende Axone vermittelt.

Im Bezug auf die Morphogenese des menschlichen Kleinhirns und des Hirnstamms stellt somit dieses Rezeptor-Liganden-Paar einen interessanten Faktor dar, welcher die multiplen Entwicklungsvorgänge beeinflusst und deshalb im Fokus dieser Arbeit steht.

## 1.2 Allgemeine Entwicklung des ZNS

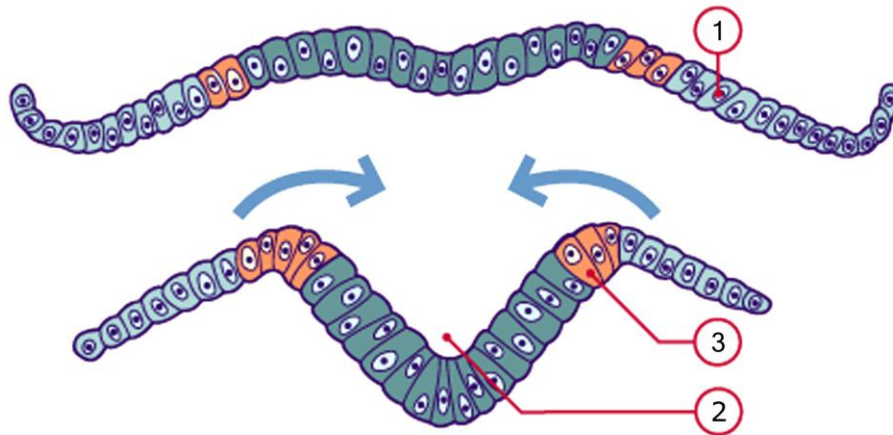
### 1.2.1 Makroskopische Entwicklung des ZNS

Die Entwicklung des Nervensystems während der Embryonalperiode lässt sich in folgende drei Abschnitte einteilen (Jessell und Sanes 2000a; Jessell und Sanes 2000b):

- Induktion
- Neurulation
- Bläschenformation

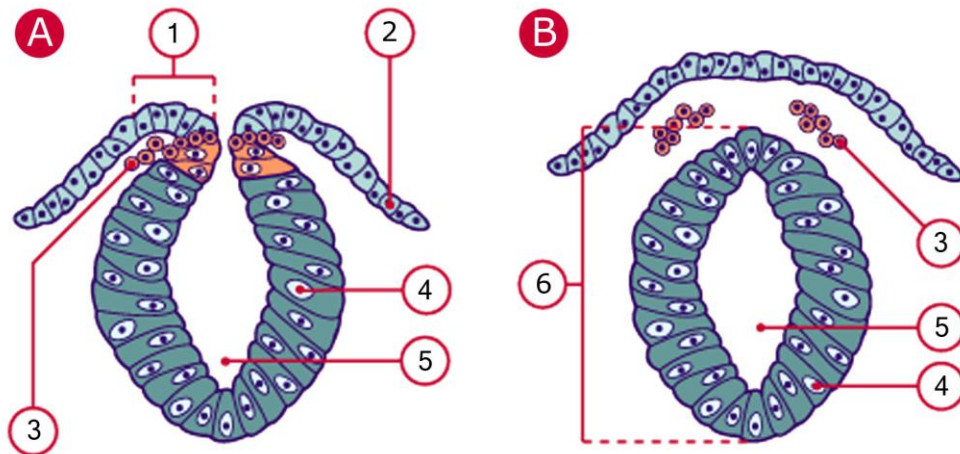
Als Induktionsphase wird die Bildung des Neuroektoderms im sich entwickelnden Embryo bezeichnet. Hierbei kommt es etwa um den 17. Embryonaltag zu einem Induktionsreiz des Mesoderms und der Chorda dorsalis, der das Ektoderm dazu anregt, eine spezialisierte Region aus dem Neuroektoderm, die Neuralplatte, zu bilden.

Dieser Induktionsphase folgt die so genannte Neurulation. Während dieser Entwicklungsphase, die im Normalfall am 18. Embryonaltag beginnt, vertieft sich die Neuralplatte und bildet in ihrer Längsachse die Neuralrinne (Abbildung 1). Diese senkt sich immer weiter in Richtung des Mesoderms ein und schnürt sich letztendlich unter Bildung des Neuralrohres vom Ektoderm ab. Am Rand des neu entstandenen Neuralrohres spaltet sich im weiteren Verlauf die Neuralleiste ab, welche die Zellgrundlage des peripheren Nervensystems darstellt (Abbildung 2). Aus dem vorderen Abschnitt des Neuralrohres bildet sich das spätere Gehirn, der hintere Abschnitt stellt die Grundlage für das Rückenmark dar.



**Abbildung 1 - Sich bildende Neuralleiste:** Beginn der Neurulation in der zervikalen Region. Die Neuralrinne (2) bildet sich. Orange sind die Zellen der zukünftigen Neuralleiste (3) zu erkennen. Die Pfeile weisen auf die Richtung der lateralen Abfaltung hin. (1) Epiblast. (Adé-Damilano et al. 2007)

Nach dem Schluss des Neuralrohres, der zwischen dem 25. und 29. Embryonaltag stattfindet, bilden sich im vorderen, größeren Teil des Neuralrohres die so genannten Hirnbläschen. Im ersten Schritt zu dieser Bläschenformation entstehen die drei Primärbläschen, aus denen in rostrocaudaler Reihenfolge Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon hervorgehen. Am 32. Embryonaltag kommt es zu einer Teilung des Rhombencephalonbläschens, welches sich in Metencephalon- und Myelencephalonbläschen aufspaltet. Auch das Prosencephalonbläschen unterzieht sich mit fortschreitender Entwicklung einer Teilung und differenziert sich in das Diencephalonbläschen und das Telencephalonbläschen. Letzteres spaltet sich im weiteren Verlauf noch einmal in die Hemisphärenbläschen auf. Durch darauf folgendes ungleichmäßiges Wachstum der Hirnbläschen entstehen in der Achse des Neuralrohres Flexuren, die sich im späteren Gehirn als Abwinkelungen der einzelnen Abschnitte darstellen (Abbildung 3).

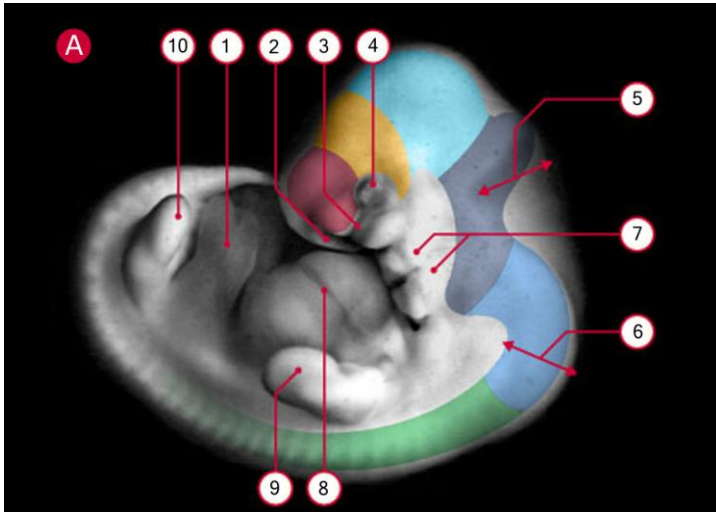


**Abbildung 2 – A) Stadium der Neuralrinne, B) Stadium des Neuralrohrs:**

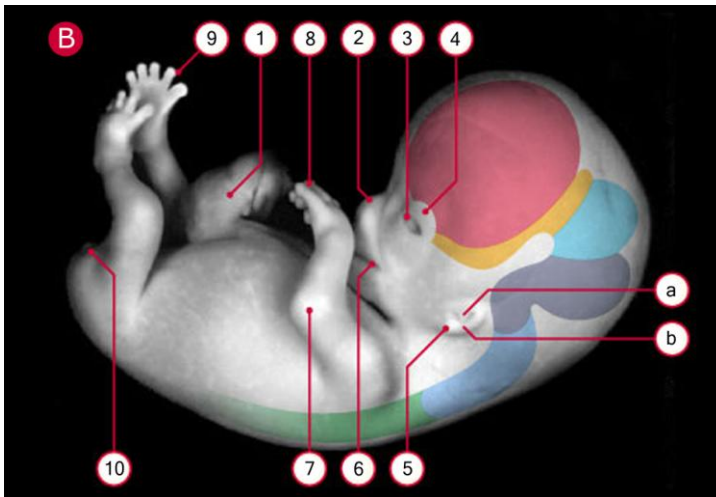
Im Laufe der Neurulation nähern sich die Neuralfalten (1) der Neuralrinne weiter an und verschmelzen unter Abschnürung von Zellen der Neuralleiste (3) und dem Epiblasten (2). Durch diesen Vorgang bildet sich das Neuralrohr (6), welches aus Neuroepithel (4) und Canalis centralis (5) besteht (Adé-Damilano et al. 2007).

Das so entstandene Neuralrohr wird in einen ventral gelegenen, später somatomotorischen Abschnitt, die Grundplatte (Lamina basalis), und einen dorsal gelegenen, später somatosensiblen Abschnitt, die Flügelplatte (Lamina alaris), eingeteilt. Dazwischen findet man Areale, die die späteren viszeromotorischen und viszerosensiblen Abschnitte enthalten. Diese Einteilung des Neuralrohres beeinflusst die gesamte weitere Entwicklung des ZNS. So bilden Grund- und Flügelplatte die Grundlage für das Rückenmark und den Hirnstamm, wohingegen das Cerebellum ebenso wie das Di- und Telencephalon ausschließlich aus der Flügelplatte hervorgehen.

Die weitere Entwicklung der in der Embryonalperiode definierten Hirnabschnitte erfolgt durch Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Maturation (Migration, Axonbildung) des Nervensystems, auf die in folgenden Abschnitten dieser Arbeit weiter eingegangen wird.



- 1 Nabelschnur
- 2 Olfaktorisches Grübchen
- 3 Tränennasenrinne
- 4 Augenanlage
- 5 Flexura pontina
- 6 Flexura cervicalis
- 7 Ohranlage
- 8 Herzwulst
- 9 Handplatte
- 10 Fussplatte



- 1 Nabelschnur
- 2 Nase
- 3 Auge
- 4 Augenlid
- 5 Ohr (a: Tragus, b: Antitragus )
- 6 Mund
- 7 Ellenbogen
- 8 Finger
- 9 Zehen
- 10 Schwanzknospe

- |  |   |
|--|---|
| <span style="color: #d62728;">■</span> Telencephalon | <span style="color: #1f77b4;">■</span> Metencephalon  |
| <span style="color: #ffc107;">■</span> Diencephalon  | <span style="color: #17becf;">■</span> Myelencephalon |
| <span style="color: #17becf;">■</span> Mesencephalon | <span style="color: #2ca02c;">■</span> Rückenmark     |

**Abbildung 3:** A) humaner Embryo, ca. 39. Schwangerschaftstag; B) humaner Embryo, ca. 56. Schwangerschaftstag. (Adé-Damilano et al. 2007)

### 1.2.2 Entwicklung auf zellulärer und subzellulärer Ebene

Jede Gehirnzelle hat eine individuelle Entwicklungsgeschichte, die von der Befruchtung der Eizelle bis zum Status quo verfolgt werden kann. Wie aber kommt es zu dieser Differenzierung und welche Faktoren spielen beim Schicksal der einzelnen neuronalen Zellen eine Rolle? Wie man heute weiß, stehen dem Körper zwei unterschiedliche Arten an Informationen zur Differenzierung einzelner Zellen zu Verfügung.

Erstens die Information aus der Zelllinie, die durch Vererbung bei der Zellteilung weitergegeben wird. Diese Aussage wird durch Beobachtungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gestützt, der auf Grund seines übersichtlichen Nervensystems die Möglichkeit bietet, die Entwicklung eines jeden Neuroblasten zu verfolgen und zu beeinflussen (Anderson 1989). Zweitens die Information von außen, die durch Zell-Zell Kommunikation, zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren oder axonale Lenkungsfaktoren, zustande kommt. In diesem Bereich konnte man durch molekularbiologische Versuche am Auge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) zeigen, dass das Schicksal der einzelnen Sinneszelle von Signalen der Nachbarzellen abhängt (Banerjee und Zipursky 1990; Tomlinson et al. 1988).

In den meisten Fällen bewirkt jedoch ein Zusammenspiel beider Möglichkeiten die Differenzierung der einzelnen Zellen.

Die oben beschriebenen Differenzierungsfaktoren spielen schon in frühen Stadien der Entwicklung eine wichtige Rolle. So konnte durch Transplantationsversuche gezeigt werden, dass Signale aus dem Mesoderm die Ausbildung der Neuralplatte aus ektodermalen Zellen induzieren (Spemann und Mangold 1924).

Auch bei der Gliederung des Gehirns und des Rückenmarks konnten oben genannte Prozesse beobachtet werden. So geht man zum Beispiel davon aus, dass die segmentale Aufteilung des Rückenmarks vor allem durch Signale aus dem benachbarten mesodermalen Gewebe vermittelt wird (Jessell und Melton 1992), wohingegen die Segmentierung des Rautenhirns und wahrscheinlich

auch des Mittel- und Vorderhirns auf Wechselwirkungen von Zellen innerhalb des Neuralrohres zurückzuführen ist.

Auch nach der Festlegung des Keimblattzelltyps spielen Wachstumsfaktoren bei der weiteren Differenzierung der Zelllinien eine entscheidende Rolle. Junge Zellen der Neuralleiste können sich noch zu fast jedem neuronalen Zelltyp entwickeln. Ihre tatsächliche Entwicklung hängt dabei von den Signalen des umliegenden Gewebes ab, durch welches die Zelle migriert.

Am Beispiel von Gliazellen im Sehnerv der Ratte lässt sich gut veranschaulichen, wie die Differenzierung durch Wachstumsfaktoren beeinflusst wird (Hart et al. 1989). Dort lassen sich drei Arten von Gliazellen unterscheiden: Oligodendrozyten, Typ-1- und Typ-2-Astrozyten. Oligodendrozyten und Typ-2-Astrozyten gehen dabei aus der gleichen Vorläuferzelle, der O-2A-Vorläuferzelle, hervor, wohingegen Typ-1-Astrozyten eine eigene Vorläuferzelle haben. Bei der Entscheidung, ob sich aus der O-2A-Vorläuferzelle ein Oligodendrozyt oder ein Typ-2-Astrozyt entwickelt, spielen Wachstumsfaktoren die entscheidende Rolle. Werden O-2A-Vorläuferzellen ohne Wachstumsfaktoren kultiviert, entwickeln sie sich zu Oligodendrozyten. Typ-1-Astrozyten hingegen fördern durch den Blutplättchen-Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) und zum Teil durch den neurotrophen Faktor CNTF (ciliary neurotrophic factor) die Proliferation und Differenzierung von O-2A-Zellen zu Typ-2-Astrozyten.

### 1.2.3 Migration

Ein charakteristisches Merkmal vieler Neuroblasten ist das Auswandern aus der Keimzone in Richtung des späteren Bestimmungsorts. Dabei gibt es Neurone, die zuerst Axone ausbilden und dann wandern, wie zum Beispiel die Körnerzellen des Cerebellums, und andere Neurone, die erst nach Erreichen des Bestimmungsortes mit der Ausbildung des Axons beginnen. Zu letzteren gehören zum Beispiel die Motoneurone des Vorderhorns.

Im Allgemeinen erfüllt die Wanderung der Neuroblasten zwei Funktionen: Zum einen ist sie für die Ausbildung der neuronalen Identität verantwortlich und zum

anderen kann sie die Ausbildung der künftigen neuronalen Verschaltungen beeinflussen.

Der zukünftige Bestimmungsort, in dessen Richtung ein Neuroblast migriert, scheint in großem Ausmaß vom Entstehungszeitpunkt, also dem Zeitpunkt der Teilung der Vorgängerzelle, abhängig zu sein (Hatten 1999). So wandern früh entstandene Zellen zunächst in die ventrikelnahen Schichten des Kortex und bilden dort erste Zellpopulationen. Später entstandene Zellen wandern dann durch die schon bestehenden inneren Schichten des Cortex hindurch und bilden die äußeren Schichten. Der Entstehungszeitpunkt spielt bei Neuronen der Neuralleiste im Gegensatz zu den Cortexneuronen eine eher untergeordnete Rolle. Bei diesen Zellen haben Wanderroute und Endposition größeren Einfluss auf das Schicksal der Neuroblasten.

Neben den oben genannten Faktoren, die die Migration beeinflussen, spielen auch umliegende gliale Fasern eine entscheidende Rolle (Fishman und Hatten 1993). Diese so genannten Radialgliazellen durchziehen das Neuroepithel und dienen den migrierenden Neuroblasten und auch zum Teil den Axonen als Leitstrukturen. Allerdings gibt es auch zahlreiche Regionen im ZNS, in denen keine Radialglia vorhanden ist. Hier, so vermutet man, übernehmen Extrazellulärmatrixmoleküle diese Aufgabe (Hynes und Lander 1992).

### 1.2.4 Axonale Lenkung

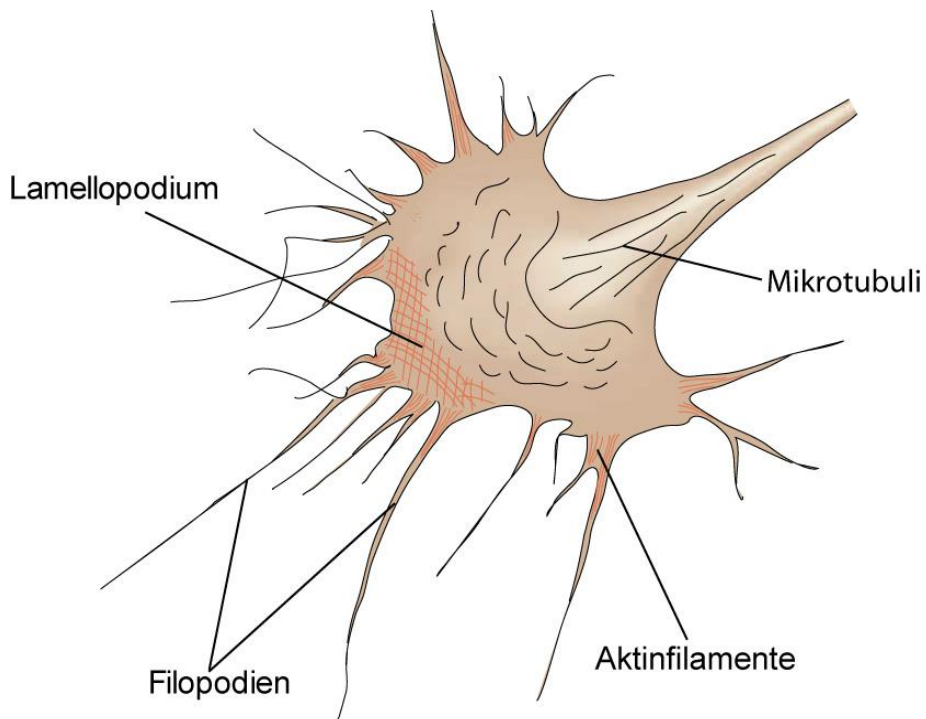
Nach dem Erreichen des Bestimmungsortes und in einigen Fällen auch schon davor, beginnt das Neuron ein Axon auszubilden. Ramón y Cajal beschrieb 1890 zum ersten Mal die wachsenden Enden der Axone und nannte diese Wachstumskegel (Ramón y Cajal 1890). Ein paar Jahrzehnte später entdeckte Harrison die Technik, lebendes Gewebe in Kultur wachsen zu lassen. Damit konnte er Ramón y Cajal Thesen bestätigen. Kurze Zeit später nutzte Speidel die Transparenz von Kaulquappenflossen und konnte dabei die Wachstumskegel in situ lichtmikroskopisch beobachten (Speidel 1933).



Die Studien von Ramón y Cajal, Speidel und spätere Arbeiten konnten die Wachstumskegel als zentrale Entscheidungs- und Wegfindungsorgane der Axone identifizieren.

### 1.2.4.1 Form der Wachstumskegel

In kultiviertem Gewebe ähneln die Wachstumskegel Fächern, die sich in breitere, kurze Ausläufer (Lamellopodien) und dünne, lange Ausläufer (Filopodien oder Mikrospiques) aufzweigen. Man geht davon aus, dass langsam wachsende, nach dem Weg suchende Axone eher komplexere Wachstumskegel besitzen, wohingegen schnell an vorgegebenen Bahnen wachsende Axone eher einfachere Wachstumskegel aufweisen.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines Wachstumskegels (Luo 2000).

#### 1.2.4.2 Lenkung der Wachstumskegel

Es gibt mehrere Theorien über den Ablauf der Vernetzung von Neuronen.

Eine Theorie, die schon aus Cayals Entdeckungen hervorgeht, postuliert, dass Axone auf vorgegebenen Bahnen zu ihrem Ziel wachsen.

Im Gegensatz dazu steht die Überlegung, dass es eine randomisierte Wachstumsphase der Axone gibt. Sie bauen willkürliche Vernetzungen auf. Es kommt dann aber nur zu einer Aufrechterhaltung von funktionsfähigen Verbindungen.

In den 30er Jahren schlug Paul Weiss diverse Mechanismen vor, welche die Aufrechterhaltung funktionierender Verbindungen gewährleisten sollten (Weiss 1934).

1963 konnte Sperry diese Theorie widerlegen, in dem er die hochspezifizierte Wegfindung von sich regenerierenden Axonen retinaler Ganglienzellen in das optische Tectum nachwies (Sperry 1963). Weitere Studien der letzten Jahrzehnte, die sich neuerer Techniken zur Beobachtung der Axone bedienen konnten, zeigten, dass es wichtig ist, zwei Phasen der axonalen Wegfindung zu unterscheiden (Goodman und Shatz 1993):

1. Das Auswachsen in die Nachbarschaft des Zielpunktes.
2. Das genaue Finden des Ziels im Zielfeld.

Ersteres geschieht an festgelegten Bahnen. Hierbei kommt es nur zu kleinen und seltenen Fehlern bei der Wegfindung (Caudy und Bentley 1986; Raper et al. 1983).

Die Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass Neurone programmiert sind mit spezifischen Zielen Verbindungen einzugehen, noch ehe das Axon auswächst.

Diese Vermutung wird durch Studien gestützt, bei denen Wirbeltiermotoneurone ihr richtiges Ziel fanden, auch wenn sie nicht vorgesehene Strecken zurücklegen mussten (Lance-Jones und Landmesser 1980)

Der sehr viel kompliziertere zweite Schritt der Wegfindung ist die genaue Zielfindung im Zielbereich. Hier kommt es zunächst zu einer Vielzahl von Verbindungen, von denen im weiteren Verlauf aber nur spezifische aufrechterhalten werden.

### 1.2.4.3 Grundlagen der axonalen Lenkungsfaktoren

Die Leitbahnen vieler Axone scheinen in viele kleine Abschnitte geteilt zu sein. Somit teilt sich die gewaltige Aufgabe der gesamten Wegfindung in viele kleine Schritte. Dieser Prozess lässt sich besonders gut in der Extremität des Grashüpfers beobachten, wo man die Wegstrecke in einzelne, jeweils von spezifischen Zellen begrenzte Teilstücke einteilen kann. Die Ablation dieser Teilstücke führt zu einer Störung bei der axonalen Wegfindung (Bentley und Caudy 1983).

#### 1.2.4.3.1 Wegfindung in den kleinen Abschnitten:

Die Axone werden durch selektiv verteilte, molekulare Signale im sich entwickelnden Embryo geleitet. Dabei lassen sich vier Arten von Lenkungsmechanismen unterscheiden:

Über kurze Distanzen wirkend	↔	über lange Distanzen wirkend
repulsiv	↔	anziehend

In den meisten Fällen arbeiten diese Mechanismen zusammen, um die Axone zu ihrem Ziel zu navigieren (Tessier-Lavigne und Goodman 1996).

Die Identifikation solcher Lenkungsfaktoren geht hauptsächlich auf drei experimentelle Ansätze zurück:

1. Die Kombination von Biochemie und in vitro Gewebe Assays um Proteine zu finden, die anziehende oder abstoßende Wirkung haben (Hedgecock et al. 1985).

2. Die Identifikation von Mutationen, die Auswirkung auf die axonale Wegfindung haben.
3. Untersuchung von Proteinen oder Strukturen, die Kandidaten für Lenkungsfaktoren sein könnten.

Als Ergebnis dieser Suche konnte man vier Familien von Lenkungsfaktoren identifizieren:

- Semaphorine
- Netrine
- Slits
- Ephrine

Die Entdeckung dieser Familien führte zu einigen wichtigen Grundsätzen für die Funktion von Lenkungsmechanismen (Chisholm und Tessier-Lavigne 1999; Tessier-Lavigne und Goodman 1996):

1. Lenkungsfaktoren sind in Familien einteilbar, die die Lenkung des Axons sowohl über lange Strecken wirkende Signale durch diffundierende Faktoren, als auch über kurze Distanzen wirkende Signale durch membrangebundene Faktoren beeinflussen können.
2. Viele Lenkungsfaktoren sind multifunktionell, d.h. sie ziehen manche Axone an und stoßen andere ab. Zudem sind sie in manchen Fällen bei der Morphogenese der Axone beteiligt, z.B. beim Aufzweigen von Axonen.
3. Viele dieser Faktoren sind evolutionell konserviert und existieren in den meisten Organismen. Wobei höhere Organismen über weitaus mehr „Familienmitglieder“ der einzelnen Lenkungsfaktoren verfügen.

#### **1.2.4.4 Die axonalen Lenkungsfaktoren und deren Rezeptoren**

Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung des ZNS müssen die neuronalen Vorläuferzellen zu ihren Bestimmungsorten migrieren. Ihre Axone haben die Aufgabe zu den richtigen Zielen zu navigieren, um dort funktionierende Verbindungen herzustellen.

Die neuronale Migration und die axonale Wegfindung werden von extrazellulären Faktoren beeinflusst, von denen man auf Grund ihrer Bedeutung besonders die Gruppen der Netrine (Colamarino und Tessier-Lavigne 1995; Kennedy et al. 1994; Merz und Culotti 2000), Semaphorine (Kolodkin et al. 1993; Raper 2000), Slits (Wong et al. 2002) und Ephrine (Flanagan und Vanderhaeghen 1998; O'Leary und Wilkinson 1999; Palmer et al. 2002) hervorheben muss (Abbildung 5). Viele der ursprünglich als axonale Lenkungsfaktoren entdeckten Moleküle werden heute auch mit der neuronalen Migration (Wu et al. 1999), der Apoptoseregulation (Arakawa 2004; Mehlen und Bredesen 2004) und sogar der Chemotaxis von Leukozyten (Ly et al. 2005; Wu et al. 2001) in Verbindung gebracht. Durch diese Entdeckung wird angenommen, dass Lenkungsmechanismen in allen somatischen Zellen eine wichtige Rolle spielen (Cirulli und Yebra 2007). Diese Überlegung führt zu der Annahme, dass Chemokine, die ursprünglich als Faktoren der Chemotaxis bei Leukozyten eingeordnet wurden, auch als Faktoren der axonalen Lenkung und der neuronalen Migration eine Rolle spielen. Zudem scheinen Semaphorine, Slits und Netrine sowohl bei der tumorbedingten, als auch normalen Angiogenese beteiligt zu sein (Park et al. 2004; Serini et al. 2003; Wang et al. 2003).

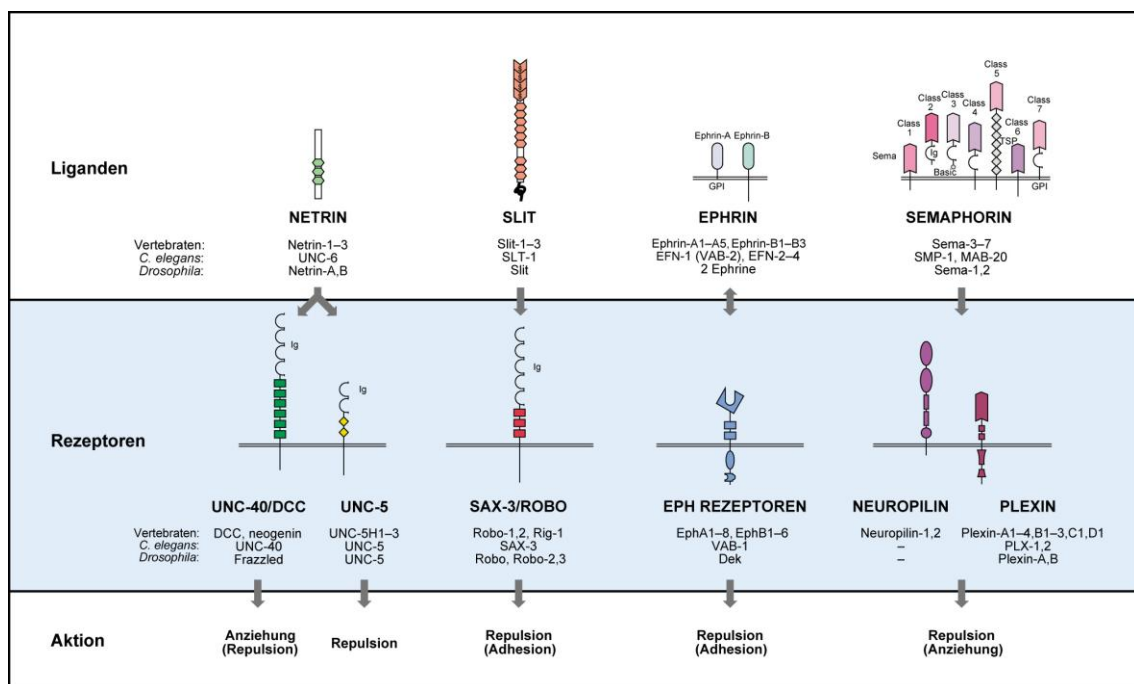
Die meisten der beschriebenen Faktoren sind frei diffundierende Proteine. Eine Ausnahme stellen die Ephrin-A Moleküle und einige der Semaphorine dar, welche durch einen GPI-Link oder durch Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert sind.

Lenkungsfaktoren können, abhängig von der Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptor, entweder Neurone und Axone anziehen oder abstoßen. Außerdem geht man davon aus, dass auch die intrazelluläre Menge an zyklischen

Nukleotiden (Nishiyama et al. 2003; Song et al. 1998) und Kalzium (Hong et al. 2000; Zheng 2000) die jeweilige anziehende oder abstoßende Ligand-Rezeptor-Interaktion beeinflusst.

Weitere Faktoren, die mit der axonalen Lenkung und neuronalen Migration in Verbindung gebracht werden, sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), WNT-Proteine und sonic hedgehog (Shh) (Augsburger et al. 1999; Charron et al. 2003; Colavita et al. 1998; Yoshikawa et al. 2003).

Auch das Nogo-Protein nimmt Einfluss auf das axonale Wachstum (Caroni und Schwab 1988; Chen et al. 2000), wobei es nach heutiger Meinung eine bedeutendere Rolle bei der Neuroregeneration (Bregman et al. 1995) als bei der Entwicklung des ZNS spielt.

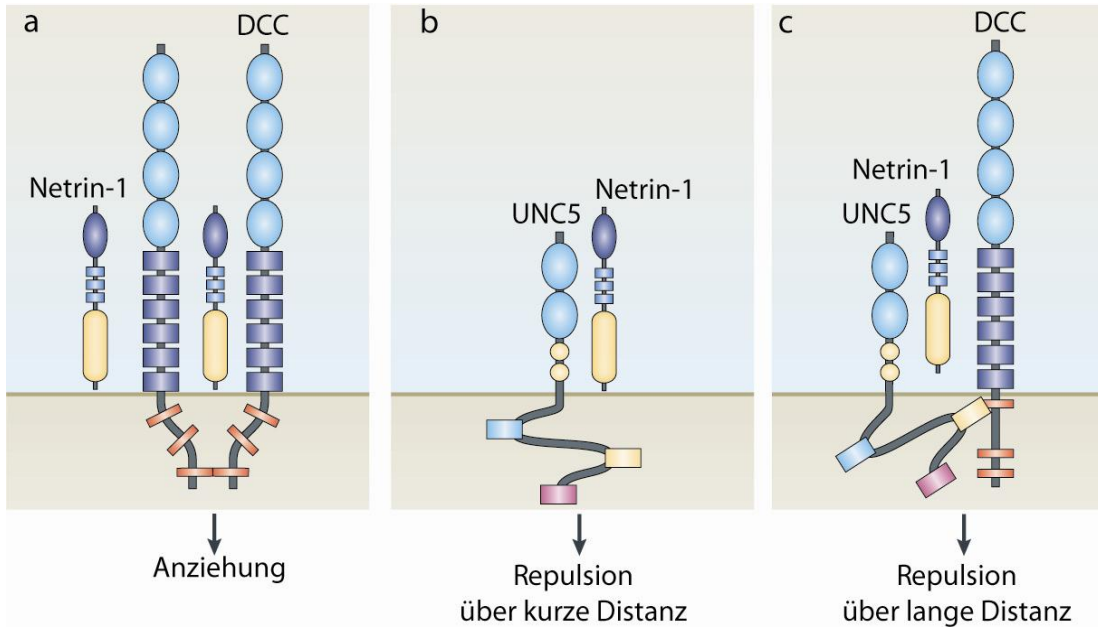


**Abbildung 5:** Übersicht der axonalen Lenkungsfaktoren und ihrer Rezeptoren (Yu und Bargmann 2001).

### 1.2.4.4.1 Netrine

Netrine waren die erste Familie der Lenkungsfaktoren, die sowohl in Wirbeltieren als auch in wirbellosen Tieren (*C.elegans*) nachgewiesen werden konnten (Serafini et al. 1994). Die Gruppe der bisher in Wirbeltieren bekannten Netrine besteht aus Netrin-1, Netrin-2, Netrin-3 und Netrin-4 (Hedgecock et al. 1990; Kennedy et al. 1994; Serafini et al. 1994), sowie aus den erst kürzlich entdeckten Netrin-G1 und Netrin-G2 (Meerabux et al. 2005; Nakashiba et al. 2002). Von allen weiß man, dass ihre Anwesenheit auf Axone sowohl anziehend und wachstumsfördernd als auch abstoßend wirken kann.

Zu den Rezeptoren, über die Netrin als Ligand wirkt, werden die Familie der UNC5-Proteine (in Vertebraten UNC5H1-4) (Hedgecock et al. 1990; Leonardo et al. 1997; Leung-Hagesteijn et al. 1992), DCC (deleted in colorectal cancer) und Neogenin (Fazeli et al. 1997; Keino-Masu et al. 1996) gezählt. Sowohl DCC als auch Neogenin vermitteln die anziehenden und wachstumsfördernden Eigenschaften von Netrinen (Chan et al. 1996; Fazeli et al. 1997; Keino-Masu et al. 1996; Kolodziej et al. 1996), den UNC5-Proteinen werden im Gegensatz dazu, zumindest im Nahbereich, abstoßende Eigenschaften zugeschrieben (de la Torre et al. 1997). Aber auch Kombinationen der verschiedenen Rezeptoren können die Einflussnahme auf das Axon modifizieren. So agiert der eigentlich anziehend wirkende Rezeptor DCC im Komplex mit UNC5-Proteinen als starker, auch über längere Strecken wirkender, abstoßender Faktor (Chan et al. 1996; Hong et al. 1999; Leonardo et al. 1997; Leung-Hagesteijn et al. 1992). Zusammenfassend lässt sich zur Wirkungsweise von Netrinen sagen, dass nicht der Ligand, sondern die Rezeptoren oder deren Komplexe für die vermittelten Signale an den Wachstumskegel verantwortlich sind (Abbildung 6).

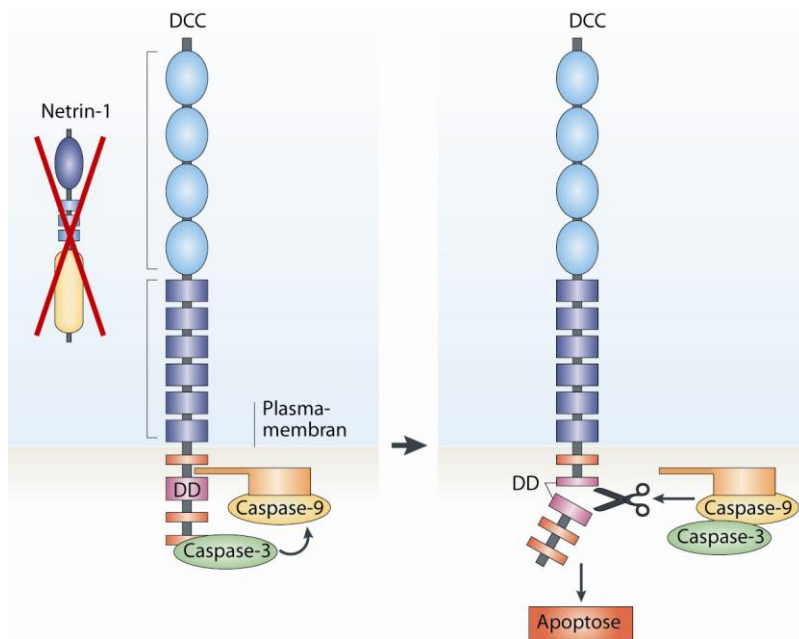


**Abbildung 6 - Die möglichen Wirkungsweisen von Netrin-1:** a) Netrin-1 vermittelt über den Rezeptor DCC Signale die anziehend wirken. b) Beim Binden von Netrin-1 an UNC5-Proteine kommt es zu einem Signal, das in nahem Umfeld abstoßend wirkt. c) Die Co-Expression von DCC und UNC5 bewirkt ein starkes repulsives Signal, welches über weite Distanzen wirkt (Cirulli und Yebra 2007).

#### 1.2.4.4.2 DCC und UNC5H-Proteine sind „Dependence-Rezeptoren“

Neuere Studien zeigten, dass die Netrin Rezeptoren DCC und UNC5H-Proteine nicht nur bei der axonalen Lenkung und neuronalen Migration, sondern auch bei der Apoptoseregulation und damit auch bei der Tumorgenese eine Rolle spielen. Auf Grund dieser dualen Funktion werden oben genannte Proteine auch als so genannte „dependence-receptors“ bezeichnet. Dependence-Rezeptoren erzeugen einen Abhängigkeitszustand der Zelle von dem jeweiligen Liganden. So wird durch Anwesenheit des Liganden (Netrin-1) die Apoptose der Zelle gehemmt und das Überleben gesichert, wohingegen bei Abwesenheit des Liganden der Rezeptor über eine so genannte „death-domain“ eine Apoptosekaskade einleitet (Mehlen et al. 1998; Mehlen und Thibert 2004) (Abbildung 7).





**Abbildung 7 - Der „dependence-receptor“ DCC:** In Abwesenheit von Netrin-1 bildet die mit dem Rezeptor DCC verbundene Caspase-3 einen Komplex mit der Caspase-9 und aktiviert die so genannte „death domain“ (DD). Diese leitet daraufhin eine Apoptosekaskade ein (Cirulli und Yebra 2007).

In den letzten Jahren rückte das ursprünglich als neuronales Lenkungsmolekül entdeckte Netrin-1 nicht nur ins Interesse der Tumorgeneseforschung. In neueren Studien wird die Vermutung geäußert, dass Netrin-1 auch noch in anderen Bereichen eine wichtige Rolle spielt. Hier wäre die Eigenschaft als Zelladhäsionsmolekül im Rahmen der Morphogenese zu nennen (Cirulli und Yebra 2007; Srinivasan et al. 2003). Andere Daten zeigen, dass Netrin-1 auch bei der Angiogenese eine wichtige Aufgabe übernimmt (Park et al. 2004; Wilson et al. 2006).

#### 1.2.4.4.3 Semaphorine

1993 führte Kolodkin (Kolodkin et al. 1993) den Namen Semaphorine für eine Familie aus sezernierten und membranassoziierten Proteinen ein, die erstmals 1987 von Kapfhammer und Raper in Wirbeltieren beschrieben worden sind (Kapfhammer und Raper 1987). Es zeigte sich, dass diese Semaphorine auch

eine entscheidende Rolle bei der axonalen Lenkung spielen (Luo et al. 1993), in dem sie vor allem durch ihre abstoßenden Signale auf Axone und ihre Möglichkeit den Wachstumskegel kollabieren zu lassen (Kolodkin et al. 1993; Luo et al. 1995; Messersmith et al. 1995) wirken. Außerdem fand man heraus, dass Semaphorine auch in anderen Geweben und bei der Immunantwort eine Rolle spielen (Comeau et al. 1998; Hedgecock et al. 1990).

Zu den Rezeptoren der Semaphorine werden sowohl die Neuropiline (He und Tessier-Lavigne 1997; Kolodkin et al. 1993), als auch die Plexine (Pasterkamp und Kolodkin 2003) gerechnet. Neuropiline sind Transmembranproteine mit einer sehr kleinen intrazellulären Domäne, die nur im Komplex mit Plexinen die Möglichkeit haben ein Signal zu übermitteln (Takahashi et al. 1999). Die Plexine, auch Transmembranrezeptoren, haben hingegen eine weitaus größere intrazelluläre Domäne und sind auch alleine fähig, ein Signal auf die intrazellulären Informationskaskaden zu übertragen.

Weitere Transmembranproteine wurden mit der Signalübertragung durch Semaphorine in Verbindung gebracht. Der „Hepatocyte Growth Factor“ kann zum Beispiel beim Binden von Semaphorin 4D an den Plexin-B1-Rezeptor, durch Komplexbildung mit diesem, eine Reaktion im Axon auslösen (Giordano et al. 2002). Wie schon bei den Netrinen erwähnt, lässt sich auch bei dieser Klasse von Signalmolekülen feststellen, dass die Wirkung des jeweiligen Liganden vor allem durch den Rezeptor oder Rezeptorkomplex bestimmt wird. Da allerdings nicht jedes Semaphorin an jeden Rezeptor binden kann, spielen bei dieser Stoffgruppe auch die jeweils beteiligten Liganden eine wichtige Rolle für die Qualität der Einflussnahme auf die axonale Lenkung.

#### **1.2.4.4 Ephrine**

Eine weitere wichtige Klasse der Lenkungsfaktoren stellen die Ephrine und die Eph-Rezeptoren dar. Ephrine sind membranassoziierte Lenkungsfaktoren, die auf Grund ihrer Membranverankerung in die Unterklassen der A- und B-Ephrine aufgeteilt werden können. A-Ephrine sind an der Zellmembran mit einem GPI-Link verankert, wohingegen die B-Ephrine, Typ-1 Transmembranproteine mit

einer cytoplasmatischen Domäne sind. Die Eph-Rezeptoren sind Transmembranproteine mit einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und wurden ursprünglich als Rezeptoren der Ephrine angesehen. Heute weiß man, dass auch die Eph-Rezeptoren an Ephrinen als Liganden wirken können (Flanagan und Vanderhaeghen 1998; Kullander und Klein 2002).

Im sich entwickelnden Nervensystem bewirken Ephrine das Kollabieren und das Abstoßen von Wachstumskegeln. In wenigen Ausnahmefällen kann es aber auch zu einer Anziehung des Axons kommen. Im adulten Nervensystem, wird ihnen eine wichtige Bedeutung in Bezug auf die synaptische Plastizität zugeschrieben (Murai et al. 2003; Penzes et al. 2003).

Wie oben schon erwähnt, besitzt Ephrin im Gegensatz zu den anderen Lenkungsmolekülen die Fähigkeit des so genannten „reverse signalling“. Dadurch können Eph-Rezeptor und Ephrin jeweils sowohl als Ligand wie auch als Rezeptor wirken (Bruckner et al. 1997; Holland et al. 1996).

### **1.2.4.4.5 Slits**

Die jüngste Familie der axonalen Lenkungsfaktoren, die Slit-Proteine, wurde bei genetischen Studien zur Identifikation von Faktoren der embryonalen Segmentierung in der Fruchtfliege (*D.melanogaster*) entdeckt (Wieschaus et al. 1984). Erst einige Jahre später zeigten neuere Studien, dass sowohl die Slits der *D.melanogaster*, als auch die der Vertebraten eine abstoßende Wirkung auf auswachsende Axone haben (Kidd et al. 1999). Weiter zeigte sich, dass diese Faktoren auch bei der neuronalen Migration eine wichtige Rolle spielen (Wu et al. 1999). Bis heute konnten im Vertebraten drei verschiedene Typen der zu den sezernierten Lenkungsfaktoren gehörenden Slits identifiziert werden (Slit1-3).

Der für den abstoßenden Effekt der Slits verantwortliche Rezeptor wird als Robo(Roundabout)-Rezeptor (Kidd et al. 1999) bezeichnet. Dieser Robo-Rezeptor ist ein Transmembranprotein (Kidd et al. 1998) und gehört wie DCC und UNC5H zur Immunoglobinsuperfamilie. Auch bei den Roborezeptoren sind

bis heute sowohl im Vertebraten, als auch in der Fruchtfliege drei Unterklassen bekannt (Robo1-3).

### **1.2.4.4.6 Weitere Faktoren**

Um die Gruppe der bisher bekannten Faktoren, die bei der axonalen Lenkung eine Rolle spielen, zu vervollständigen, müssen an dieser Stelle auch noch die schon länger bekannten Wachstumsfaktoren Sonic Hedgehog (Shh) und die Bone morphogenetic proteins (BMPs) genannt werden. Diesen ursprünglich der frühen embryonalen Entwicklung und der Zelldifferenzierung zugeordneten Proteinen (Hogan 1996) konnte auch ein das axonale Wachstum beeinflussender Effekt nachgewiesen werden (Augsburger et al. 1999; Charron et al. 2003).

## 1.3 Entwicklung des Kleinhirns

Das Kleinhirn ist nicht ohne Grund einer der meist erforschten Teile des menschlichen Gehirns. Sein dreischichtiger Kortex und die gut definierten afferenten und efferenten Verbindungen machen das Kleinhirn zu einem idealen Modell für die Erforschung von Entwicklung und Vernetzung des ZNS. Es spielt nicht nur bei der Kontrolle der Motorik eine wichtige Rolle, sondern ist auch beim Lernen und bei der Kognition motorischer Prozesse von großer Bedeutung (Middleton und Strick 1998).

Zudem gehört das Kleinhirn zu den Strukturen im menschlichen ZNS, die sich als erste differenzieren, es ist aber einer der letzten Bereiche, der seine endgültige Reife erlangt. Auf Grund dieser protrahierten Entwicklungsperiode, die von der frühen embryonalen Phase bis in die ersten postnatalen Jahre verläuft, ist es sehr anfällig für eine große Anzahl an Entwicklungsstörungen, wie zum Beispiel dem Dandy-Walker-Syndrom (Ramaekers et al. 1997).

Im Mausmodell sind die Faktoren, die Proliferation, Migration und axonale Lenkung beeinflussen zunehmend erforscht (Alcantara et al. 2000; Goldowitz und Hamre 1998; Hatten et al. 1997). Die Annahme, dass ähnliche Einflüsse in der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns eine Rolle spielen, soll in dieser Arbeit im Bezug auf den Lenkungsfaktor Netrin-1 und seinen Rezeptor DCC diskutiert werden.

### 1.3.1 Charakterisierung des Kleinhirngebiets im Rhombencephalon

Transplantations- und Genexpressionsstudien haben gezeigt, dass der so genannte „Isthmus Organizer“, ein am Übergang von Mesencephalon zum Rhombencephalon gelegenes Induktionszentrum, die frühe Entwicklung des Mesencephalons und des rostralen Teils des Rhombencephalons reguliert (Rhinn und Brand 2001). Dieses Organisationszentrum stellt eine Fülle von Wachstumsfaktoren bereit, welche für den ordentlichen Aufbau des Mesencephalons und des Rhombencephalons verantwortlich sind.

### 1.3.2 Morphogenese des Kleinhirns

Das Kleinhirn entsteht beidseitig aus der Flügelplatte des ersten Rhombomeres. Ursprünglich wurde angenommen, dass das Kleinhirn aus zwei Kleinhirnanlagen hervorgeht, die sich in der frühen Embryonalperiode dorsal vereinigen und an der Verbindungsstelle den Kleinhirnwurm (Vermis) ausbilden. Sidman und Rakic (Sidman und Rakic 1982) befürworteten demgegenüber die von Hochstetter (Hochstetter 1929) vertretene Meinung, dass eine solche Vereinigung nicht stattfindet. Sie gehen von einer einzigen Uranlage, dem Tuberculum cerebelli aus. Diese Uranlage besteht aus einem Gewebeband im dorsolateralen Bereich der Flügelplatte, welcher die Mittellinie wie ein umgekehrtes „V“ überspannt. In der frühen Entwicklung des Kleinhirns verdicken sich die beiden Schenkel des „V“s. Die Spitze, die auf der Mittellinie liegt, bleibt unauffällig.

Die weitere Morphogenese des Kleinhirns kann in vier Schritten zusammengefasst werden:

1. Die kaudal und lateral gelegenen Teile des Tuberculum cerebelli verdicken sich zunehmend in der sechsten SSW und wölben sich in den vierten Ventrikel, wo sie den inneren Kleinhirnwulst (Hochstetter 1929) bilden, aus dem in der fortschreitenden Entwicklung das Corpus cerebelli hervorgeht.
2. Während der siebten Entwicklungswoche wölbt sich das rapide wachsende Kleinhirn nach dorsolateral und bildet dort den äußeren Kleinhirnwulst, aus dem die späteren Flocculi hervorgehen.
3. Im Laufe des dritten Entwicklungsmonats nimmt das Wachstum der Mittellinienregion zu und füllt unter Bildung des Kleinhirnwurms (Vermis) den Spalt zwischen den Schenkeln des „V“s aus.
4. In der 12. bis 13. SSW haben laterale und rostrale Wachstumsprozesse die Kleinhirnanlage zu einem den vierten Ventrikel überspannenden Gewebestreifen gemacht.

Ab der 12. SSW beginnt die Ausbildung erster Fissuren, die zuerst den Vermis betreffen und sich später lateral auf die Hemisphären ausbreiten. Die erste

Fissur (Fissura posterolateralis) trennt das Corpus cerebelli und den Lobus flocculonodularis. Dieser kaudal gelegene Kleinhirnteil ist der phylogenetisch älteste Teil und wird daher als Archicerebellum oder funktionell als Vestibulocerebellum bezeichnet. Das Corpus cerebelli besteht aus dem medial gelegenen Spinocerebellum (oder Paleocerebellum) und dem lateral gelegenen Pontocerebellum (oder Neocerebellum).

### 1.3.3 Histogenese des Kleinhirns und der präcerebellären Kerngebiete

Die histogenetische Entwicklung des Kleinhirns lässt sich in vier grundlegende Schritte einteilen (Goldowitz und Hamre 1998):

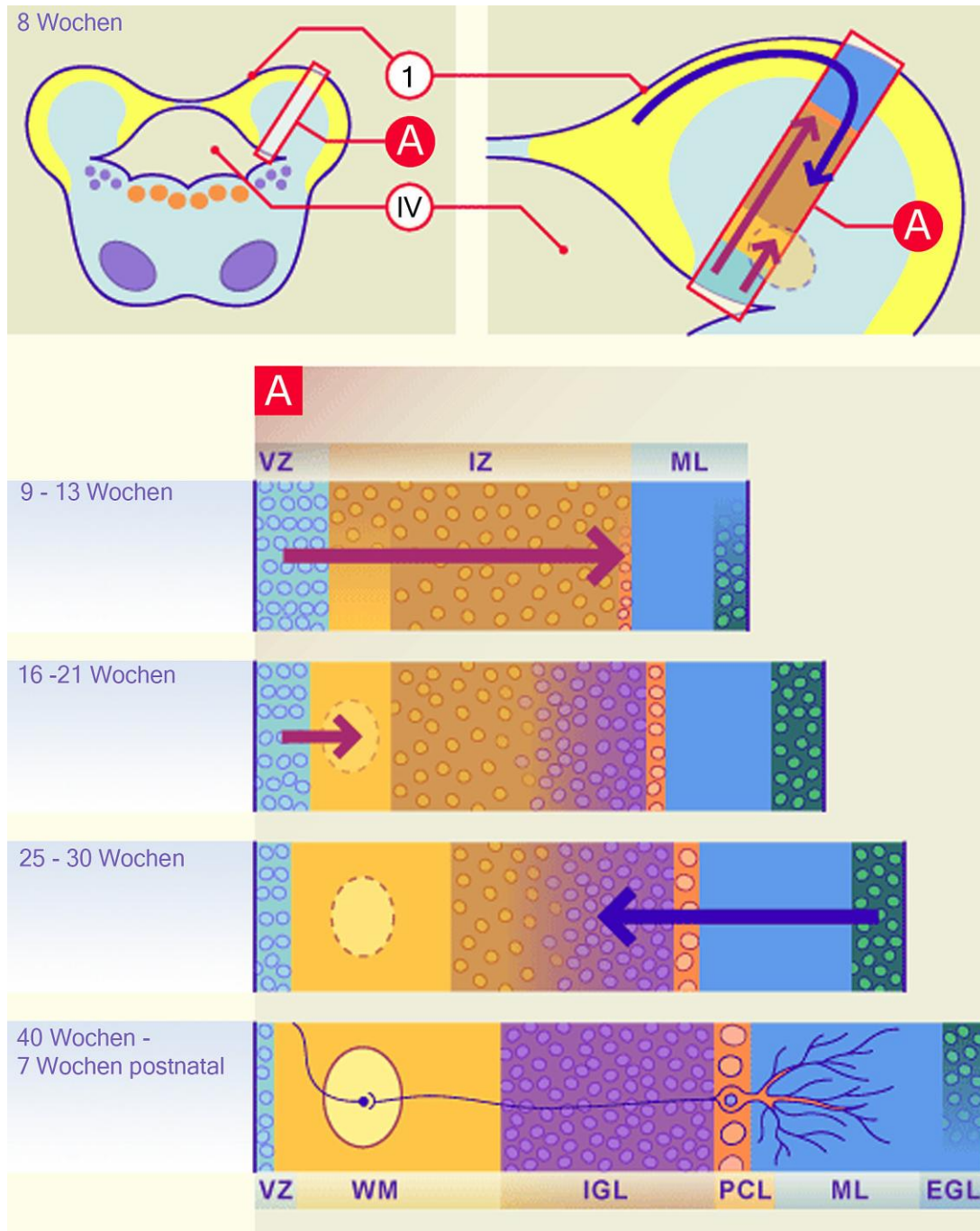
1. Die Charakterisierung des Kleinhirngebiets im Rhombencephalon.
2. Das Formieren von zwei Zellproliferationsgebieten, aus welchen sich die Purkinje-Zellen und die Körnerzellen bilden.
3. Das Einwärtswandern der Körnerzellen aus der äußeren Körnerzellschicht.
4. Die Bildung der Kleinhirnverbindungen und die weitere Differenzierung.

Die Hauptzelltypen des Kleinhirns entstehen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten an verschiedenen Stellen (Hatten und Heintz 1995). Die Purkinje-Zellen, die tiefen Kleinhirnkerne und die späteren Golgi-, Stern- und Korbzellen gehen aus der ventrikulären Zone der Flügelplatte des Metencephalons hervor. Von dort aus migrieren die Purkinje-Zellen geleitet durch Radialglia zu ihren späteren Bestimmungsorten. Bayer und Mitarbeiter nehmen an, dass im Menschen die tiefen Kleinhirnkerne und die Purkinje-Zellen in der fünften bis sechsten Entwicklungswoche entstehen (Bayer et al. 1995). Gegen Ende der Embryonalperiode (ca. 8. SSW) kommen die Vorläuferzellen aus der Rautenleiste hinzu (Abbildung 8). Die Rautenleiste ist eine im dorsolateralen Bereich der Flügelplatte gelegene Proliferationszone, die sich über das gesamte Rhombencephalon erstreckt. Zellen aus der oberen

Rautenleiste erreichen gegen Ende der Embryonalperiode den oberflächlichen Teil des sich entwickelnden Kleinhirns und bilden dort die äußere Körnerzellschicht aus. Aus dieser noch teilungsfähige Vorläuferzellen enthaltenden äußeren Körnerzellschicht entsteht durch Migration und Proliferation ein großer Teil der späteren Rindenschichtung des Kleinhirns. Dieser Prozess unterscheidet sich von der Rindenbildung im Großhirn, bei der nicht mehr teilungsfähige Neuroblasten aus der inneren Matrixzone in die Rinde einwandern und die dortige Schichtung bilden. In dieser äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns entstehen die Körnerzellen, die nach Ausbildung von Axonen (Parallelfasern) an den Fortsätzen der so genannten Bergmann-Glia zu ihrem tiefer gelegenen endgültigen Bestimmungsort, der inneren Körnerzellschicht, migrieren. In der folgenden Fetalperiode gewinnt die innere Körnerzellschicht durch weiteres Einwandern und Proliferation von Zellen der äußeren Körnerzellschicht zunehmend an Reife. Dieser in der Entwicklung als innere Körnerzellschicht bezeichnete Rindenabschnitt liegt unter der Purkinje-Zell-Schicht und bietet die Grundlage für die endgültige Körnerzellschicht der Kleinhirnrinde. Eine vorübergehende Schicht, die so genannte Lamina dissecans, trennt temporär die innere Körnerzellschicht von der Purkinje-Zell-Schicht, wird aber letztendlich von Körnerzellen gefüllt und verschwindet wieder (Rakic und Sidman 1970). Zeitgleich zur Migration der postmitotischen Körnerzellen aus der äußeren Körnerzellschicht (16.-25. SSW) vergrößern sich die Purkinje-Zellen und bilden Dendriten aus. Im Menschen bildet sich die äußere Körnerzellschicht am Ende der Embryonalperiode und bleibt bis zu zwei Jahre postnatal bestehen (Lemire et al. 1975).

Aus dem unteren Teil der Rautenleiste gehen unter anderen die Pontinen Kerne und der untere Olivenkern hervor. Neurone dieser präcerebellären Kerne migrieren auf verschiedensten Bahnen, insbesondere auf dem Corpus pontobulbare, zu ihrer endgültigen Position im Hirnstamm (Essick 1912; Wingate 2001).





**Abbildung 8 – Histogenese des Kleinhirns:** Ab der 8. SSW migrieren Vorläuferzellen aus der oberen Rautenleiste (1) über die sich entwickelnde Kleinhirnanlage und bilden die äußere Körnerzellschicht (EGL). Simultan wandern Neuroblasten aus der Ventrikulärzone (VZ) des IV. Ventrikels (IV) aus und formieren die Intermediärzone (IZ). Im weiteren Verlauf entstehen aus Vorläuferzellen der Ventrikulärzone die Kleinhirnkern und die Purkinjezellschicht (PCL). Die Zellen der äußeren Körnerzellschicht migrieren durch die Molekularschicht (ML) in Richtung Ventrikel und bilden unter der Purkinjezellschicht die innere Körnerzellschicht (IGL). Mit der Entwicklung der inneren Körnerzellschicht und des Kleinhirnmarks (WM) bildet sich die Intermediärschicht zurück und verschwindet. (Adé-Damilano et al. 2007)

## 1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Wachstumsfaktoren beeinflussen und steuern eine große Anzahl an Vorgängen, die für die regelrechte Entwicklung des menschlichen Gehirns verantwortlich sind. Bisher existiert allerdings noch keine Studie, deren Ziel es ist, ein Expressionsmuster dieser Faktoren im sich entwickelnden humanen Nervensystem zu erstellen. Um die Entwicklungsvorgänge im menschlichen Gehirn zu verstehen, ist es aber unumgänglich, ein solches Verteilungsmuster zu kennen.

Das Kleinhirn und die Kerngebiete im Hirnstamm sind auf Grund ihrer langen Entwicklungsperiode und anatomisch gut dokumentierten Morphogenese (Goldowitz und Hamre 1998; Hatten und Heintz 1995; Middleton und Strick 1998) ein ideales Modell, um Abläufe wie axonale Lenkung, Migration und Überleben der jungen Neurone zu untersuchen.

Studien am Tiermodell (Alcantara et al. 2000; Bloch-Gallego et al. 1999; Colamarino und Tessier-Lavigne 1995) und erste eigene Daten (Bunz et al. 2006) geben Grund zu der Annahme, dass der axonale Lenkungsfaktor Netrin-1 und dessen Rezeptor DCC bei den oben genannten Abläufen eine entscheidende Funktion übernehmen. Diese Arbeit konzentriert sich deshalb auf dieses Proteinpaar.

Auf Grund ethischer Problematiken ist es oftmals nicht möglich, humanes Gewebe aus sehr frühen Entwicklungsstufen zu kultivieren und zu untersuchen. Deshalb ist es notwendig, die Übertragbarkeit der in tierexperimentellen Studien gewonnenen Daten auf den Menschen zu prüfen.

Diese Arbeit will ein Expressionsmuster des Wachstumsfaktors Netrin-1 und dessen Rezeptors DCC im humanen fetalen Hirnstamm und Kleinhirn etablieren und versuchen folgende Fragen zu klären:

- Sind die angewandten Methoden geeignet ein Expressionsmuster für Netrin-1 und DCC im humanen fetalen Hirnstamm und Kleinhirn zu erstellen?

- Zur besseren anatomischen Beurteilbarkeit sollen die Proliferationszonen im sich entwickelnden Hirnstamm und Kleinhirn dargestellt werden. Lässt sich dieses mit dem Antikörper MIB-1 gegen das als Proliferationsmarker dienende Kernprotein Ki-67 (Gerdes et al. 1983) realisieren?
- Welchen Einfluss nehmen die Faktoren auf die Entwicklung der Kerngebiete im Hirnstamm?
- Welche Funktion übernehmen Netrin-1 und DCC bei der regelrechten Entwicklung des Kleinhirns?
- Wie ist die Expression von Netrin-1 in den Endothelien und welchen Einfluss hat der Faktor auf die Angiogenese?
- Sind Daten aus tierexperimentellen Studien im Bezug auf Netrin-1 und DCC auf den Menschen übertragbar?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Definition des normalen fetalen Gehirns**

Für diese Studie wurde das Gewebe fetaler Gehirne im Entwicklungsstadium zwischen der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) und der 28. SSW verwendet. Die Gewebelöcke stammen aus dem Archiv des Institutes für Hirnforschung der Universität Tübingen.

Als Studienmaterial wurden ausschließlich fetale Gehirne verwendet, deren neuropathologische Begutachtung einen neuropathologisch unauffälligen Befund zeigte. Sowohl makroskopisch (z.B. dorsale Schlussstörungen) als auch mikroskopisch durften keinerlei Anhaltspunkte für Entwicklungsstörungen des fetalen zentralen Nervensystems gegeben sein. Feten mit Chromosomenaberrationen (z.B. Trisomie 21) wurden dabei ebenso von der Studie ausgeschlossen, wie Feten, die infektiöse Beeinträchtigungen des ZNS zeigten. Als weiteres Ausschlusskriterium galten autolytische Veränderungen, die den Erhaltungszustand des fetalen Gehirns beeinträchtigen.

Das nach oben genannten Kriterien erstellte Kollektiv von 23 Gehirnen (Tabelle 1) stellt das Untersuchungsmaterial für diese Studie zum sich normal entwickelnden fetalen Gehirn dar.

## 2.2 Klinische Daten zum Untersuchungsmaterial

**Tabelle 1:** Alter und Todesursache

Fall Nr.	Alter SSW	Ursache des Aborts
1	26	Nach Sectio bei vorzeitiger Plazentalösung postpartal verstorben
2	13	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
3	18	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis
4	19	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
5	21	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
6	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
7	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
8	17	intrauteriner Fruchttod bei vorzeitiger Plazentalösung
9	13	intrauteriner Fruchttod bei vorzeitiger Plazentalösung
10	14	Interruptio auf Wunsch der Eltern
11	16	Interruptio bei Verdacht auf Potter Syndrom
12	28	intrauteriner Fruchttod bei fetofetalem Transfusionssyndrom
13	28	intrauteriner Fruchttod bei fetofetalem Transfusionssyndrom
14	21	Interruptio bei Anhydramnion und Verdacht auf Nierenagenesie
15	22	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung und Anhydramnion

16	18	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
17	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
18	13	Ausstoßung in 13.SSW
19	22	Frühgeburt postpartal verstorben
20	12	intrauteriner Fruchttod bei rupturierter Gravidität
21	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
22	16	intrauteriner Fruchttod bei kollabierter Fruchtblase
23	20	Interruptio bei schweren cardialen Fehlbildungen

### 2.3 Neuropathologische Beurteilung

Zur neuropathologischen Begutachtung am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen gehörte neben der makroskopischen auch die mikroskopische Beurteilung des zu untersuchenden Gewebes, wobei alle ausgewählten Feten keine Hinweise auf Alterationen des ZNS im Sinne von pathologisch entwicklungsbiologischen Veränderungen zeigten. Leichte präterminal-hypoxische Schädigungen des Gewebes wurden im Rahmen der im Verlauf des Todes eintretenden hypoxischen Ereignisse als natürlich auftretende Prozesse angesehen und somit wurden diese Präparate nicht von der Studie ausgeschlossen.

## 2.4 Gehirnregionen

Als zentraler Punkt der Arbeit gilt die Demonstration eines möglichst genauen Verteilungsmusters von axonalen Lenkungsfaktoren im Bereich des Kleinhirns und des Hirnstamms beziehungsweise in den einzelnen Rindenschichten und Kerngebieten. Dementsprechend wurden die histologischen Präparate mit Fokus auf die Expressionsorte der Moleküle erstellt (Tabelle 2). Soweit sie auf den jeweiligen Präparaten zu beurteilen waren, wurden zusätzlich noch folgende Strukturen betrachtet und in die Auswertung mit aufgenommen:

- Endothelien
- Mittellinie
- Ventrikulärzone
- Nuclei Pontis

**Tabelle 2:** Gehirnregionen

Fall Nr.	Alter SSW	Gehirnregionen
1	26	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VI.HN, VII.HN, VIII.HN
2	13	Cerebellärer Kortex, III.HN
3	18	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, V.HN
4	19	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VII.HN, VIII.HN
5	21	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, V.HN
6	19	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VIII.HN
7	19	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VI.HN, VII.HN, VIII.HN

8	17	Cerebellärer Kortex, Nucl. olivaris, V.HN, VII.HN, VIII.HN
9	13	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, V.HN
10	14	In diesem Fall konnte nur das Endothel und die Ventrikulärzone beurteilt werden
11	16	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris
12	28	Cerebellärer Kortex, Nucl. olivaris, V.HN, VII.HN, VIII.HN
13	28	Nucl. olivaris, III.HN, V.HN
14	21	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, V.HN, VIII.HN
15	22	Cerebellärer Kortex, IV.HN, V.HN
16	18	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VI.HN, VII.HN, VIII.HN
17	14	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, V.HN, VII.HN
18	13	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, VI.HN, VIII.HN
19	22	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VI.HN, VII.HN, VIII.HN
20	12	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, VII.HN
21	14	Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN
22	16	Cerebellärer Kortex, Nucl. dentatus, Nucl. olivaris, V.HN, VII.HN
23	20	Cerebellärer Kortex, III.HN, V.HN, VI.HN, VII.HN



## **2.5 Anfertigung der histologischen Präparate**

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

### **2.5.1 Immunhistochemie**

Die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbeverfahren beruhen allesamt auf dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode (siehe 2.5.3). Die histologischen Präparate für die Untersuchung der Faktoren wurden einem automatisierten Färbeprozess unterzogen.

## 2.5.2 Die Antikörper

### 2.5.2.1 Netrin-1

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

### 2.5.2.2 DCC

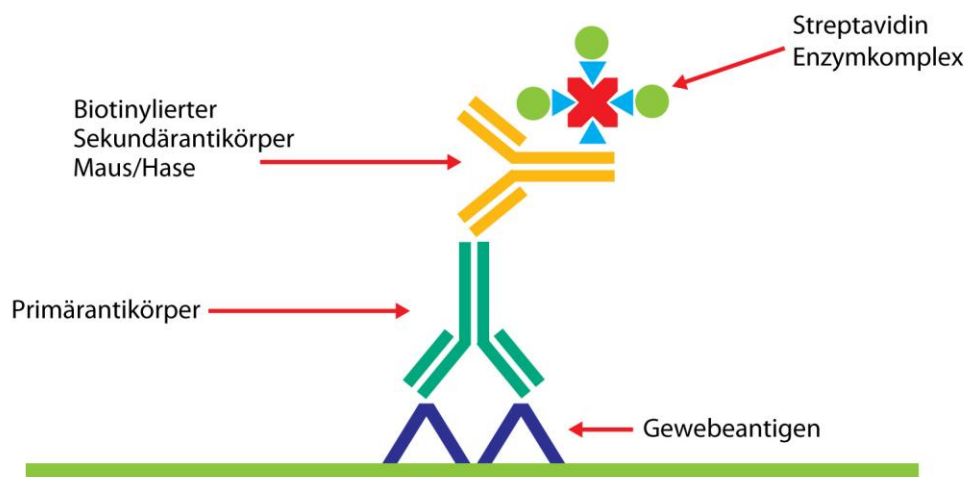
Beim Antikörper gegen DCC handelt es sich um ein monoklonales Immunglobulin aus der Maus, das der Klasse IgG1 kappa zugeordnet ist. Als Primärantikörperlösung wurde eine 1:20 Verdünnung des Antikörpers in TBS angefertigt und entsprechend (des Protokolls) verwendet. Der Antikörper gegen DCC stammt aus dem Klon DM51 der Firma Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom und ist gegen ein 205 Aminosäuren großes Protein der Intrazellulärdomäne des humanen DCC-Moleküls gerichtet.

### 2.5.2.3 Ki-67

Ki-67 als Kernprotein wurde mittels des monoklonalen Antikörpers MIB-1 (DAKO) detektiert. Es handelt sich dabei um ein Immunglobulin der Klasse IgG1 kappa aus der Maus, dass gegen menschliches Ki-67 gerichtet ist. Entsprechend des Protokolls wurde für die Färbung der Schnitte eine 1:100 Verdünnung des Antikörpers in TBS verwendet.

### 2.5.3 Die Streptavidin-Biotin-Methode

Bei dieser Methode wird das zu detektierende Antigen mit dem entsprechenden Antikörper (unkonjugierter Primärantikörper) markiert. Dieser ist entweder gegen verschiedene Epitope (Polyklonalität) oder bestimmte Epitope (Monoklonalität) des Antigens gerichtet. Ein zweiter, biotinmarkierter Sekundärantikörper, dessen Antigene Immunglobulinen der Klasse und Gattung des Primärantikörpers entsprechen, geht nun mit diesem eine chemische Verbindung ein. In einem weiteren Schritt wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugeführt, das sich auf Grund hoher Affinität von Streptavidin für Biotin an biotinmarkierten Sekundärantikörper anlagert. Diese Reaktion ist die Grundlage des immunhistochemischen Verfahrens. Um die so entstandenen Immunglobulin-Enzym-Konjugate farblich darzustellen, wird ein so genanntes Substratchromogen (beispielsweise 3,3'-Diaminobenzidin) zugesetzt, das in einer Oxidationsreaktion mit der Peroxidase zu unlöslichen farbigen Produkten reagiert. Durch die Zugabe von Metallen kann die optische Dichte des Farbniederschlages erhöht werden, was einen Verstärkereffekt erzeugt (Hsu et al. 1981) (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode (Key 2006)

#### 2.5.4 Manuelles Färbeverfahren

Da die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper über ein manuelles Färbeverfahren etabliert wurden, wird dieses im Folgenden beschrieben.

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

Die Vorbehandlung zur Freilegung der Antigene – das „demasking“ - erfolgte durch 20-minütiges Erhitzen in Zitratpuffer (pH 6,0) in einem Mikrowellenofen bei 750 Watt. Die endogene Peroxidase wurde mit 6ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) in 250 ml 100% Methanol geblockt (15 Min.). Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Gewebe für 15 Min. mit einem in Tris-gepufferter Salzlösung 1:10 verdünnten Standardschweineserum inkubiert. Darauf folgte die Inkubation des mit TBS verdünnten Primärantikörpers über Nacht in einer Kühlkammer bei 6°C. Nach dem Spülen mit TBS-Lösung inkubierten die Gewebe für weitere 30 Minuten mit biotinierten anti-Hase F(ab)<sub>2</sub> bzw. anti-Ziege F(ab')<sub>2</sub>- Brückenantikörper (DAKO) je nach Klonalität des Primärantikörpers. Nach einem Spülgang wurden die Gewebe mit dem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO) für 30 Minuten inkubiert und nach einem weiterem Spülgang mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich, Germany) als Chromogen entwickelt (Hsu et al. 1981). Eine Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 Minuten Xylol und wurden anschließend mit einem Deckglas versehen.

#### 2.5.5 Der automatisierte Färbevorgang

Dem automatisierten immunhistochemischen Färbesystem Benchmark (Ventana, Strasbourg, France) wurden alle histologischen Präparate unterzogen. Negativkontrollen, die sowohl als Kontrolle monoklonaler Antikörper dienten als auch Kontrollfunktion der Färbeprozedur mit polyklonalen

Antikörpern erfüllten, erfuhren ebenso den automatisierten Färbeprozess, wie auch Isotypenkontrollen, deren Einsatz im Gebrauch von monoklonalen Antikörpern notwendig ist (siehe 2.5.7 Experimentkontrollen). Die Entparaffinierung der histologischen Präparate erfolgte mittels Wärmebehandlungen maschinell. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 Minuten Xylol. Sie wurden anschließend mit einem Deckglas versehen.

### 2.5.6 Protokoll

Die Entparaffinierungsphase bestand aus abwechselndem Erwärmen und Spülen der Gewebepreparate, dem so genannten „cell-conditioning“. Hierbei wurden die Objektträger zunächst für 4 Min. auf 75°C, dann für 8 Min. auf 95°C erwärmt und letztendlich 4 Min. bei 100°C inkubiert. Die Zellvorbehandlungen wurden durch 8 Min. (standard) und 30 Min. (mild) andauernde Inkubationszyklen umgesetzt.

Die Blockierung endogener Peroxidase erfolgte mittels Vorbehandlung der Gewebepreparate durch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% Methanol über 14 Minuten. Der Blockierung folgte die manuelle Auftragung des entsprechenden Primärantikörpers, der 30 Min. bei 37°C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Präparate zwei Waschvorgängen sowie zwei Verstärkerzyklen unterzogen. Nach dem Auftragen des Avidin-Biotin-Blockersystems (A-B-Block) für jeweils 4 Min. wurde das Gewebe 8 Min. mit einem Tropfen I-View-Biotin Ig (Ventana, Strasbourg, France) inkubiert. Darauf folgte im ersten Schritt zur Visualisierung der Reaktionsprodukte die Zugabe eines Tropfens I-View SA-HRP (Ventana, Strasbourg, France), der 8 Min. inkubiert. Danach wurde das eigentliche Farbchromogen 3,3'-Diaminobenzidin (I-View DAB, Ventana, Strasbourg, France), parallel mit I-View H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ventana, Strasbourg, France) aufgetragen und weitere 8 Min. inkubiert. Abschließend wurde durch die vierminütige Behandlung mit einem Kupferverstärkersystem (I-View Copper, Ventana, Strasbourg, France) die Signalintensität erhöht.

### 2.5.7 Experimentkontrollen

Bei Negativkontrollen ersetzte eine Pufferlösung den primären Antikörper. Bei Isotypenkontrollen wurde der Primärantikörper durch ein Immunglobulin der gleichen Spezies und Klasse ersetzt, dessen variable Region jedoch ein nicht im Menschen vorkommendes Epitop erkennt. Hiermit können unspezifische Bindungen des Fc-Teils der jeweiligen Antikörperklasse ausgeschlossen werden.

Als Positivkontrolle wurde adultes Colon mit Antikörpern gegen Netrin-1 und DCC immunhistochemisch gefärbt.

## 2.6 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland).

Als positive Farbreaktion im Bezug auf Netrin-1 und DCC wurden Zellen gewertet, die das jeweilige Antigen mit dazugehörigem Farbniederschlag entweder im Zytoplasma oder auf der Zellmembran erscheinen ließen.

Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde im Zellkern detektiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Scores, wobei die Intensität der Zellfärbung und die Frequenz, d.h. der Anteil positiv gewerteter Zellen an der Gesamtheit der ausgewerteten Zellpopulation, auswertbare Größen darstellten (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Histologischer Score

	0	1	2	3	4
Intensität	Keine Färbung	schwach	Mittel	stark	
Frequenz	Keine Färbung	1% - 10%	10% - 25%	25% - 50%	> 50%

**Tabelle 3:** Die Intensität gibt die Stärke der Färbereaktion einer einzelnen Zelle an, wohingegen die Frequenz den Prozentsatz der gefärbten Zellen in Relation zur Gesamtzahl darstellt.

Die Auszählung wurde an ausgewählten Regionen der fetalen Gewebeschnitte vorgenommen. Es konnte dabei nicht eindeutig erkannt werden, ob die positiv erscheinenden Zellen neuronalen, glialen oder mikroglialen Ursprungs waren, da keine spezifischen Antikörper gegen deren Strukturen oder Expressionsprodukte eingesetzt wurden. Auch die Zellmorphologie gibt in diesen fetalen Stadien keinen sicheren Aufschluss über die zukünftige Rolle der Zelle im zerebralen Gefüge. Lymphozytäre, monozytäre und granulozytäre Gewebefiltrate wurden aufgrund ihrer charakteristischen Kernmorphologie erkannt und bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

### **2.7 Statistische Methoden**

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

### 3 Ergebnisse

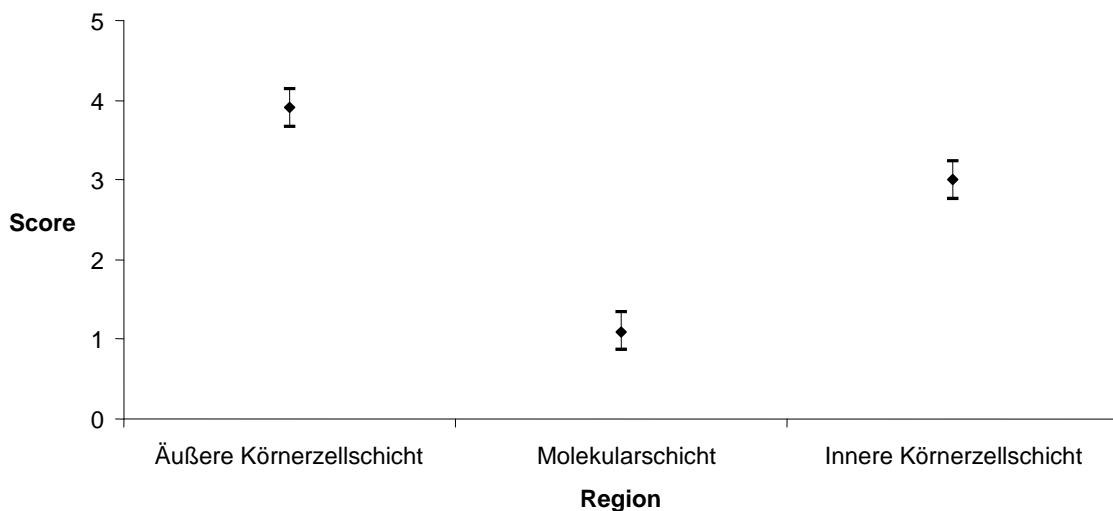
#### 3.1 Expression von DCC im Kleinhirn

##### 3.1.1 DCC in den Rindenschichten des Kleinhirns

Die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen den Rezeptor DCC zeigte in allen drei cerebellären Rindenschichten jeweils ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster (Abbildung 16).

In Bezug auf die Frequenz der DCC Expression zeigten alle Vergleiche der einzelnen Rindenschichten des Kleinhirns untereinander mit jeweils p-Werten von  $<0,0001$  einen hochsignifikanten Unterschied.

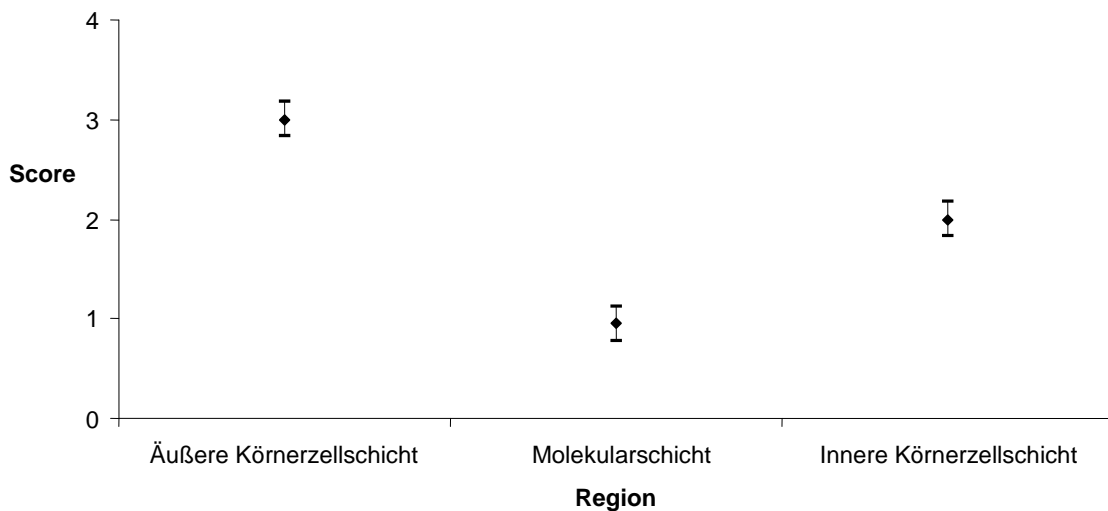
Auch in Bezug auf die Intensität der DCC Expression zeigten sich in allen Vergleichen der einzelnen Rindenschichten hochsignifikante Unterschiede mit p-Werten von  $<0,0001$ .



**Diagramm 1:** Frequenz der Expression von DCC in den Schichten des cerebellären Cortex. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall dar.

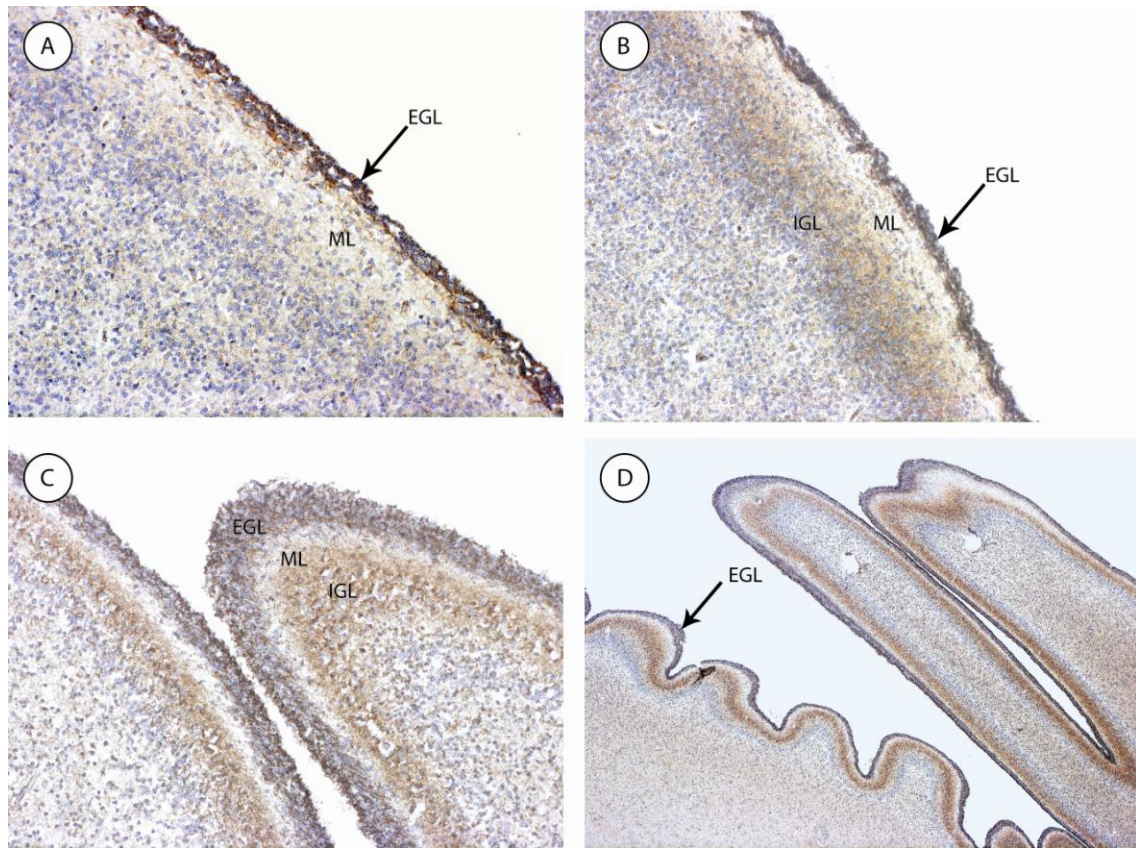


Die Frequenz der DCC-exprimierenden Zellen (Diagramm 1) war mit einem Mittelwert von 3,9 (95%-CI: 3,66-4,13) in der äußeren Körnerzellschicht am stärksten. Die innere Körnerzellschicht zeigte mit einem Mittelwert von 3,0 (95%-CI: 2,76-3,23) in der Frequenz eine etwas geringere Expression von DCC. In der Molekularschicht hingegen konnte mit einem Mittelwert von 1,1 (95%-CI: 0,86-1,33) nur eine verhältnismäßig schwache Expression des DCC-Proteins nachgewiesen werden.



**Diagramm 2:** Intensität der Expression von DCC in den Schichten des cerebellären Cortex. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall dar.

Analog zur Frequenz der immunhistologisch gefärbten Zellen zeigte auch die Intensität der Färbung (Diagramm 2) ein ähnliches Verteilungsmuster in den drei cerebellären Rindenschichten. So wurde mit einem Mittelwert von 3,0 (95%-CI: 2,83-3,17) die intensivste Färbung in der äußeren Körnerzellschicht nachgewiesen. Mit einem Mittelwert von 2,0 (95%-CI: 1,83-2,17) konnte in der inneren Körnerzellschicht eine signifikant niedrigere Intensität der Färbung beobachtet werden. Die Molekularschicht zeigte, wie schon bei der Frequenz beobachtet, auch in der Intensität mit einem Mittelwert von 0,95 (95%-CI: 0,78-1,12) die geringste Ausprägung.

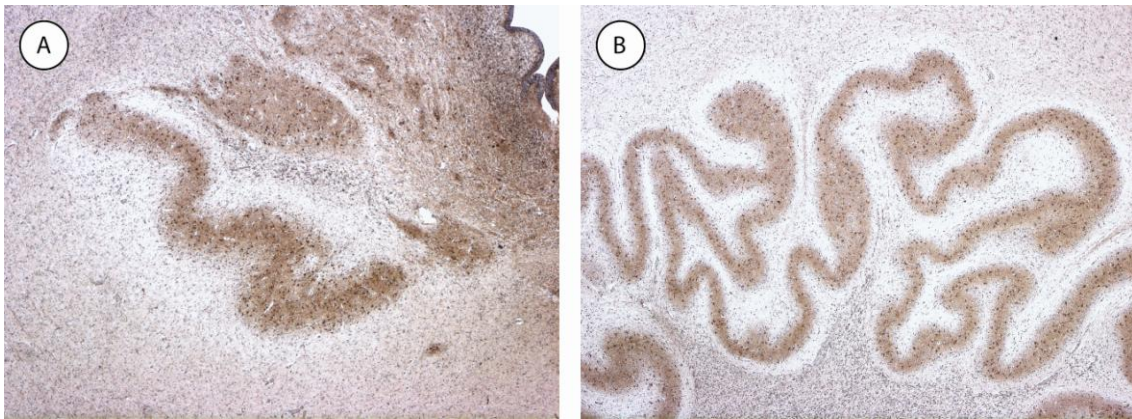


**Abbildung 16:** Expression von DCC im cerebellären Cortex. (A) 13. SSW; (B) 14. SSW; (C) 28. SSW; (D) 26. SSW. *EGL* äußere Körnerzellschicht; *ML* Molekularschicht; *IGL* innere Körnerzellschicht. ((A)-(C) 100-fache Vergrößerung; (D) 20-fache Vergrößerung)

### 3.1.2 DCC in den Kleinhirnkernen

Der in 16 von insgesamt 22 Kleinhirnschnitten identifizierbare Nucleus dentatus exprimiert mit einer durchschnittlichen Färbefrequenz von 2,1 und einer Intensität von 1,8 den Rezeptor DCC in nicht unerheblichem Maße (Abbildung 17).

Auch in den sporadisch vorhandenen anderen Kleinhirnkernen (Nucl. fastigii, Nucl. embiliformis und Nucl. globosus) ließ sich eine Anfärbung mit Antikörpern gegen DCC feststellen.



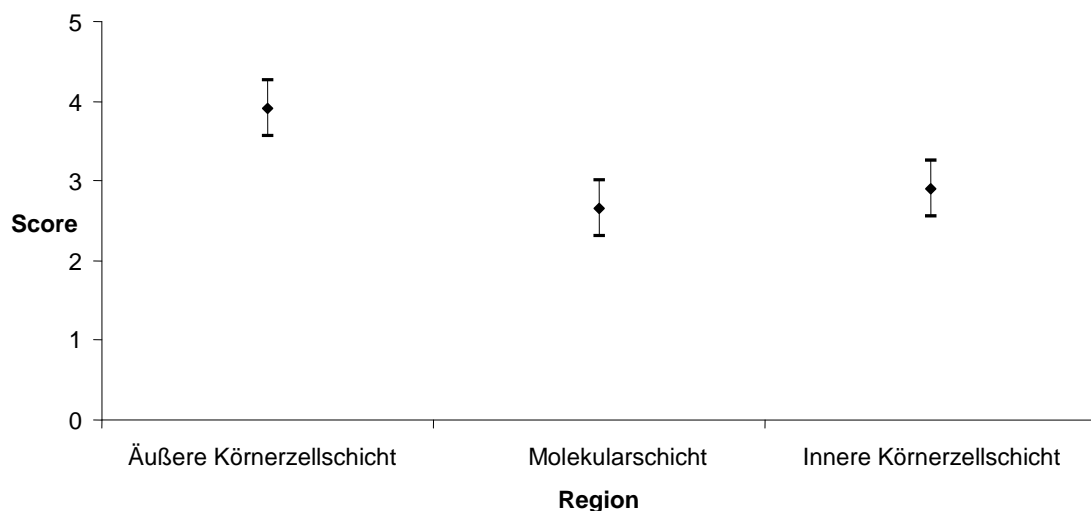
**Abbildung 17:** DCC-Expression im Nucl. dentatus. (A) 16. SSW; (B) 26. SSW. (Je 20-fache Vergrößerung)

## 3.2 Expression von Netrin-1 im Kleinhirn

### 3.2.1 Netrin-1 in den Rindenschichten des Kleinhirns

Auch die Expression von Netrin-1 in den Rindenschichten des Kleinhirns zeigte beim Vergleich der einzelnen Schichten signifikante Unterschiede (Abbildung 18).

So zeigte in Bezug auf die Frequenz der Netrin-1 Expression sowohl der Vergleich zwischen äußerer und innerer Körnerzellschicht ( $p=0,0001$ ), als auch der Vergleich zwischen äußerer Körnerzellschicht und Molekularschicht ( $p<0,0001$ ) einen hochsignifikanten Unterschied. Der Vergleich zwischen Molekularschicht und innerer Körnerzellschicht ergab mit einem p-Wert von 0,31 keine Signifikanz.

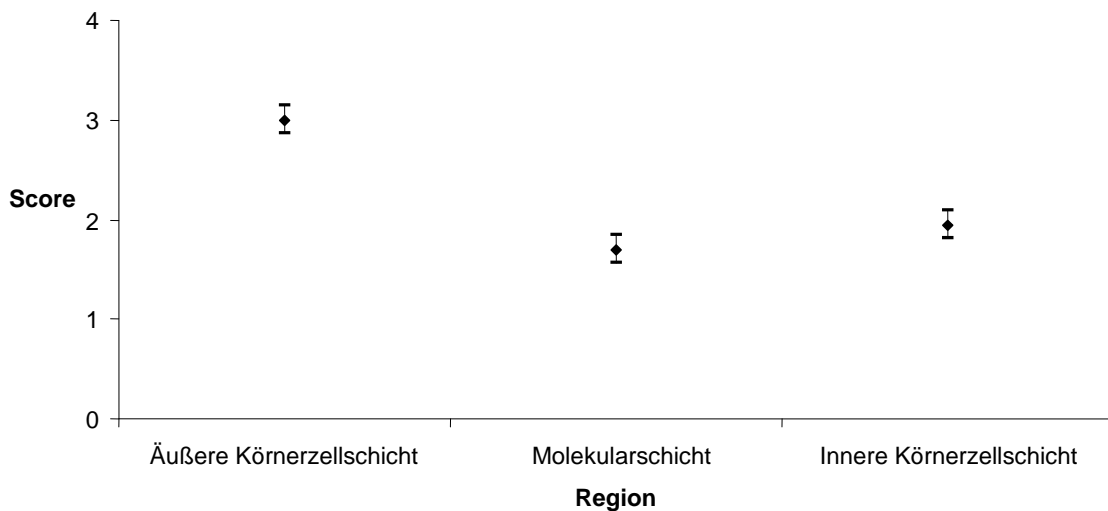


**Diagramm 3:** Frequenz der Expression von Netrin-1 in den Schichten des cerebellären Cortex. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall dar.

In Bezug auf die Intensität der Netrin-1 Expression zeigten sich sowohl beim Vergleich der äußeren zur inneren Körnerzellschicht ( $p<0,0001$ ) als auch beim Vergleich der äußeren Körnerzellschicht zur Molekularschicht ( $p<0,0001$ ) hochsignifikante Unterschiede. Der Vergleich zwischen Molekularschicht und

innerer Körnerzellschicht ergab einen p-Wert von 0,03 und kann nach Tukey-Kramer wegen multiplem Testen nicht als signifikant gewertet werden.

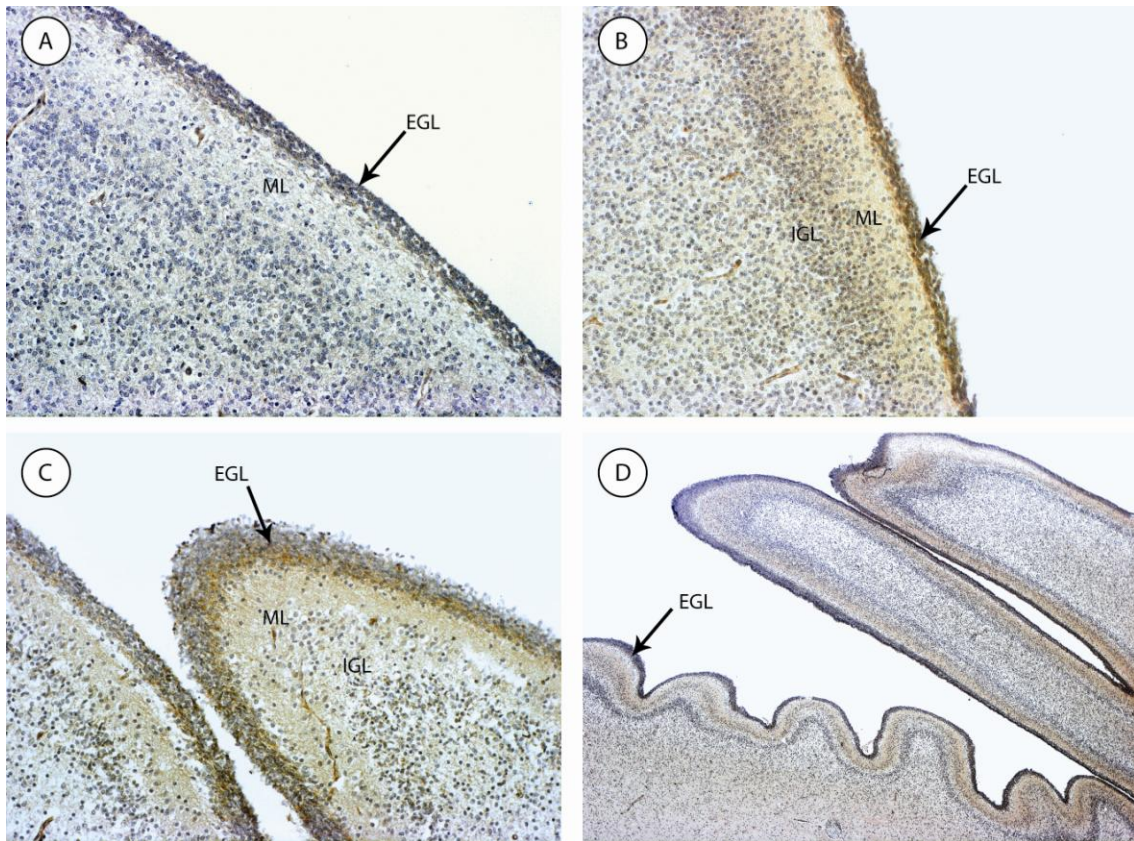
Die stärkste Frequenz der Netrin-1 Expression konnte mit einem Mittelwert von 3,9 (95%-CI: 3,55-4,25) in der äußeren Körnerzellschicht nachgewiesen werden. Die innere Körnerzellschicht zeigte homolog zum DCC-Protein mit einem Mittelwert von 2,9 (95%-CI: 2,55-3,25) eine etwas geringere Expression. Im Bereich der Molekularschicht war auch bei Netrin-1 die Frequenz am geringsten und hatte einen Mittelwert von 2,65 (95%-CI: 2,3-3,0) (Diagramm 3).



**Diagramm 4:** Intensität der Expression von Netrin-1 in den Schichten des cerebellären Cortex. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall dar.

Die Intensität der Färbung (Diagramm 4) war wie schon bei der Frequenz beobachtet in der äußeren Körnerzellschicht mit einem Mittelwert von 3,0 (95%-CI: 2,86-3,14) am stärksten ausgeprägt. Hingegen war in der inneren Körnerzellschicht mit einem Mittelwert von 1,95 (95%-CI: 1,81-2,09) und in der Molekularschicht mit einem Mittelwert von 1,7 (95%-CI: 1,56-1,84) die Intensität der Färbung weniger stark ausgeprägt.



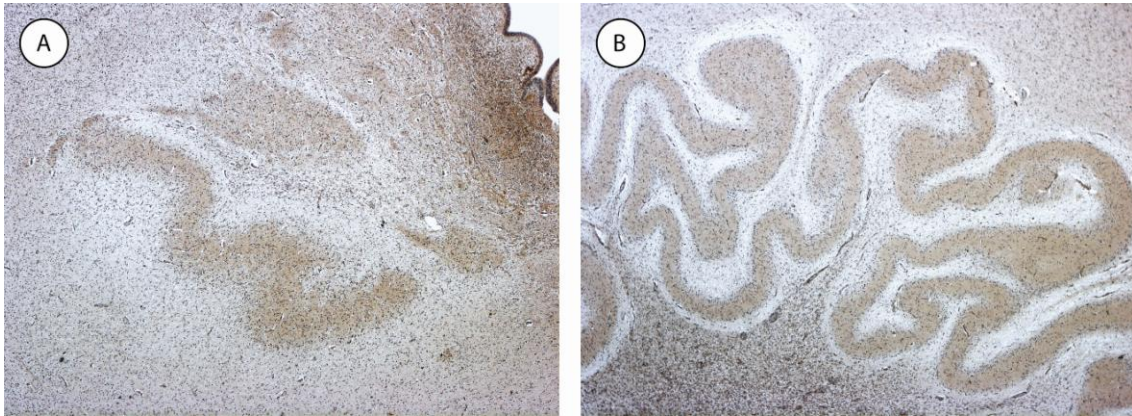


**Abbildung 18:** Expression von Netrin-1 im cerebellären Cortex. (A) 13. SSW; (B) 14. SSW; (C) 28. SSW; (D) 26. SSW. *EGL* äußere Körnerzellschicht; *ML* Molekularschicht; *IGL* innere Körnerzellschicht. ((A)-(C) 100-fache Vergrößerung; (D) 20-fache Vergrößerung)

### 3.2.2 Netrin-1 in den Kleinhirnkernen

Mit einer durchschnittlichen Färbefrequenz von 1,9 und einer Intensität von 1,5 war die Expression von Netrin-1 im Nucleus dentatus ein wenig geringer als die des DCC-Proteins (Abbildung 19).

Auch hier ließ sich in den weiteren Kleinhirnkernen eine Anfärbung mit Antikörpern gegen Netrin-1 feststellen.



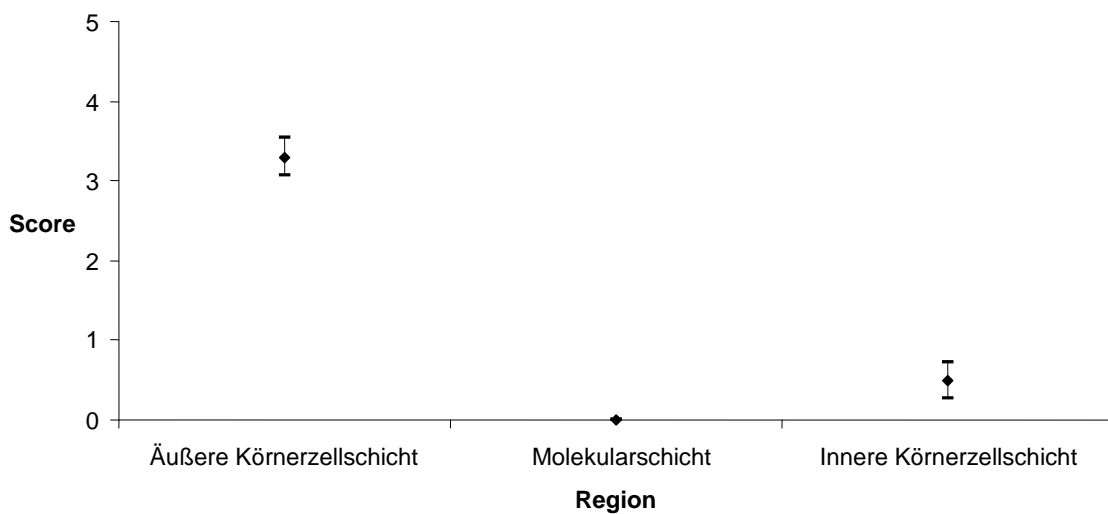
**Abbildung 19:** Netrin-1-Expression im Nucl. dentatus. (A) 16. SSW; (B) 26. SSW. (Je 20-fache Vergrößerung)

### 3.3 Expression von Ki-67 im Kleinhirn

#### 3.3.1 Ki-67 in den Rindenschichten des Kleinhirns

Auch die Frequenz der mit dem Antikörper gegen das als Proliferationsmarker dienende Kernprotein Ki-67 gefärbten Zellen, zeigte signifikante Unterschiede in den einzelnen Rindenschichten des Kleinhirns (Abbildung 20).

Sowohl der Vergleich zwischen äußerer Körnerzellschicht und Molekularschicht, als auch der Vergleich zwischen äußerer und innerer Körnerzellschicht zeigten mit jeweils p-Werten von  $<0,0001$  hochsignifikante Unterschiede. Auch der Unterschied zwischen Molekularschicht und innerer Körnerzellschicht liegt mit einem p-Wert von 0,0017 im signifikanten Bereich (Diagramm 5).

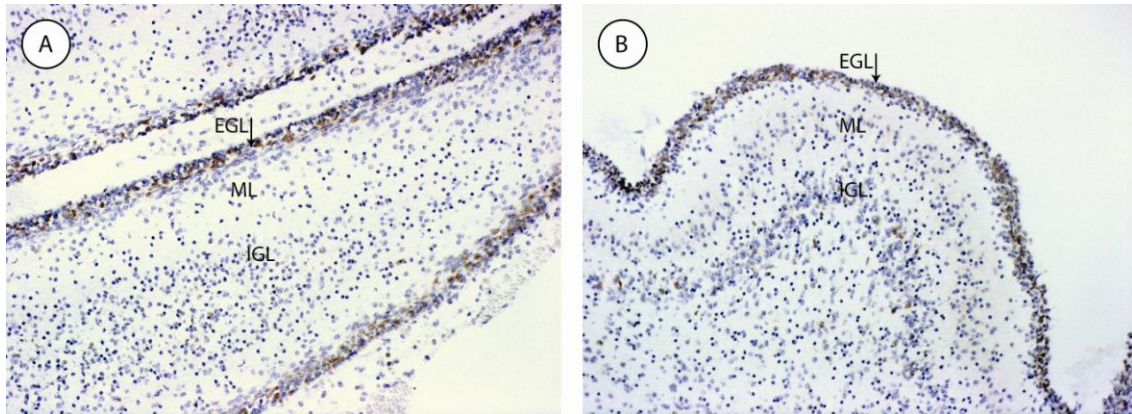


**Diagramm 5:** Intensität der Expression von Ki-67 in den Schichten des cerebellären Cortex. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall dar.

Hier konnte mit einem mittleren Score von 3,3 (95%-CI: 3,07-3,53) ebenfalls die weitaus höchste Expression in der äußeren Körnerzellschicht festgestellt werden. Mit einem Mittelwert von 0,5 (95%-CI: 0,27-0,73) scheinen in der inneren Körnerzellschicht sehr viel weniger proliferierende Zellen vorhanden zu



sein. In der Molekularschicht konnten keine MIB-1 exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 20:** Expression des Ki-67 Antigens im cerebellären Cortex.

(A) 19. SSW; (B) 26. SSW. *EGL* äußere Körnerzellschicht; *ML* Molekularschicht; *IGL* innere Körnerzellschicht. (Je 100-fache Vergrößerung)

### 3.3.2 Ki-67 in den Kleinhirnkernen

In den Kleinhirnkernen konnte keine Expression von MIB-1 nachgewiesen werden.

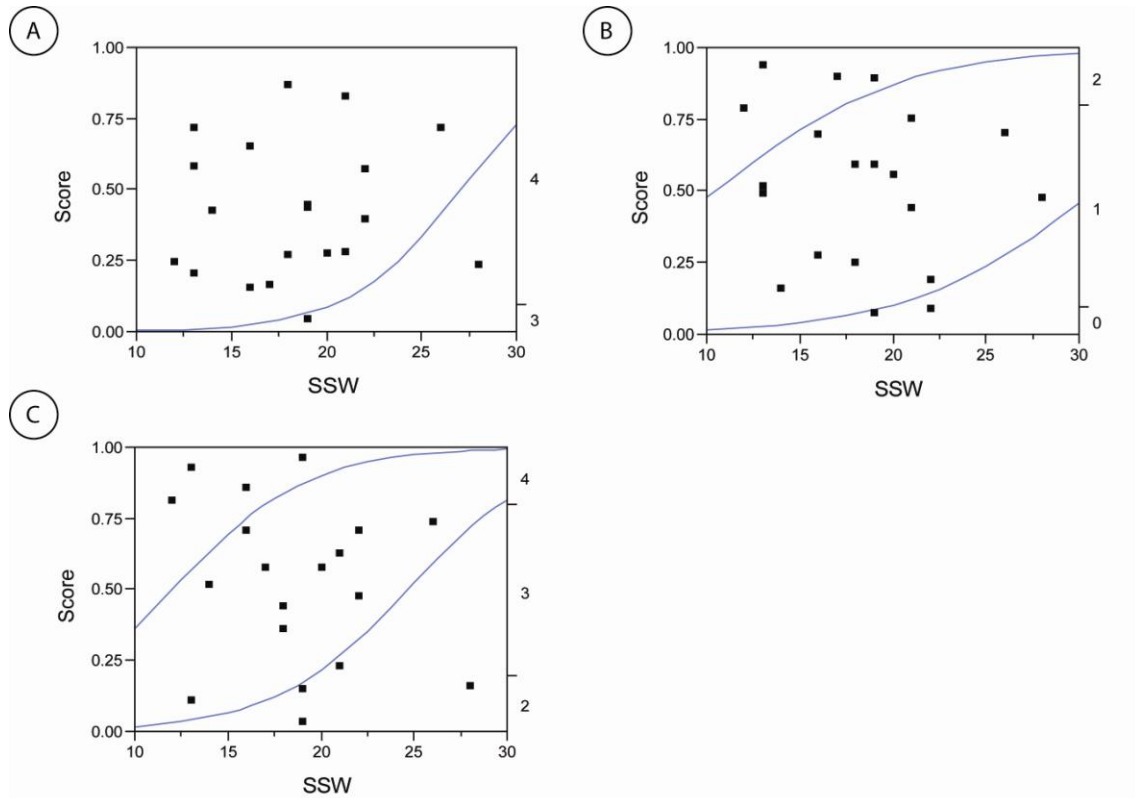
### **3.4 Altersassoziierte Expression der Wachstumsfaktoren in den Rindenschichten des Kleinhirns**

#### **3.4.1 Altersassoziierte Expression von DCC**

In allen drei Rindenschichten des Kleinhirns war mit zunehmender Reife der Feten eine Abnahme der DCC Expression zu beobachten (Diagramm 6). Statistisch zeigte sich allerdings nur für die innere Körnerzellschicht mit einem p-Wert von 0,017 ein signifikantes Ergebnis. Die Abnahme der Expression von DCC im Bezug auf die SSW in der äußeren Körnerzellschicht war mit einem p-Wert von 0,071 nicht signifikant, es zeigten sich aber Tendenzen, dass mit zunehmendem Alter auch die Expression abnimmt. Die Molekularschicht tendiert mit einem p-Wert von 0,093 ebenfalls in diese Richtung.

*Text zur Erklärung der Diagramme 6, 7 und 8 :*

Die folgenden Diagramme 6, 7 und 8 stellen die kumulative logistische Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche Score-Werte in Bezug auf das Alter für die Rindenschichten des Kleinhirns und Antikörper dar. Um die logistische Regression darzustellen, wurde der Score als nominale und das Alter als kontinuierliche Variable gewählt. Die linke y-Achse stellt die Wahrscheinlichkeit dar, der rechte y-Achsenabschnitt die relativen Anteile der Scores in Bezug auf die Gesamtpopulation. Für jeden x-Wert teilt sich die Wahrscheinlichkeitsskala (y-Achse) in die verschiedenen Wahrscheinlichkeiten für jeden einzelnen Score Wert. Die vertikalen Abstände zwischen den einzelnen Kurven summieren sich für jeden x-Wert zu einer Gesamtwahrscheinlichkeit von 1.

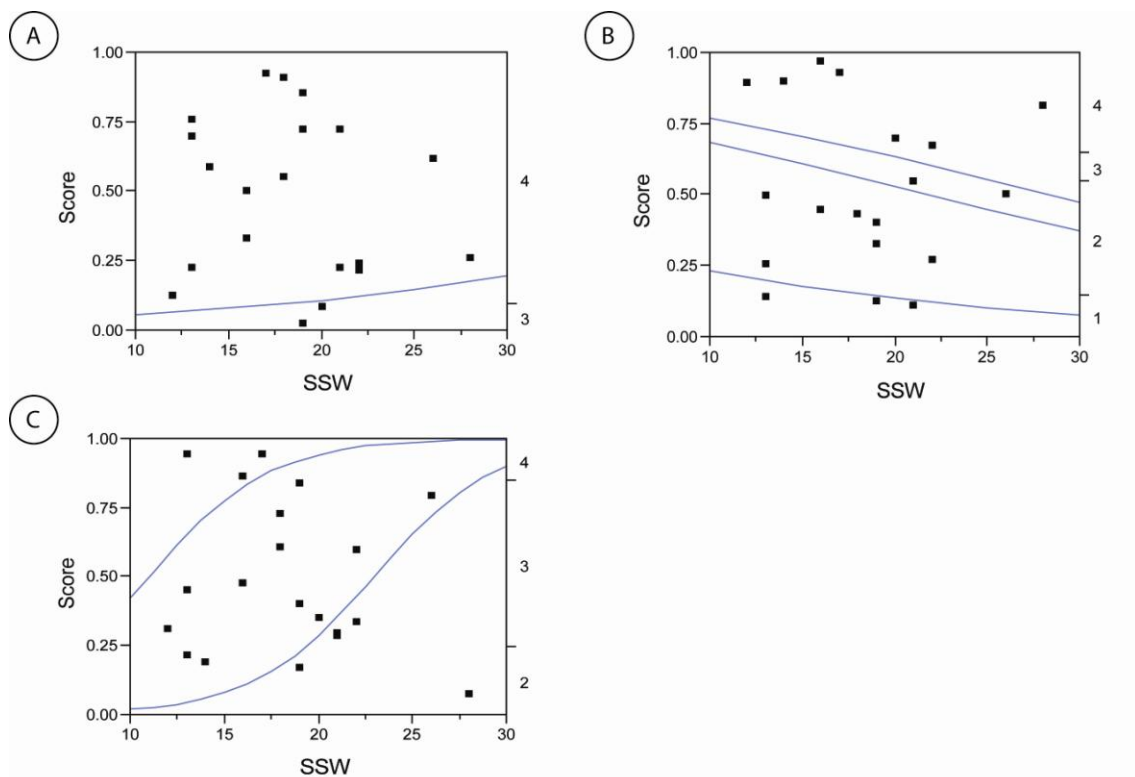


**Diagramm 6:** Frequenz der Expression von DCC im fetalen cerebellären Cortex: Mit zunehmendem Alter der Feten zeigt sich eine Abnahme hoher Score-Werte zugunsten einer Zunahme niedriger Score-Werte bezogen auf den Bestand. Weitere Erläuterung siehe Text zur Erklärung der Diagramme. (A) äußere Körnerzellschicht; (B) Molekularschicht; (C) innere Körnerzellschicht.

### 3.4.2 Altersassoziierte Expression von Netrin-1

Analog zur Beobachtung bei der DCC Expression findet sich in der inneren Körnerzellschicht eine mit dem Alter abnehmende Netrin-1 Expression, welche mit einem p-Wert von 0,011 im signifikanten Bereich liegt (Diagramm 7).

In den anderen Schichten lässt sich keine signifikante Assoziation vom Alter des Feten und der Netrin-1 Expression erkennen.



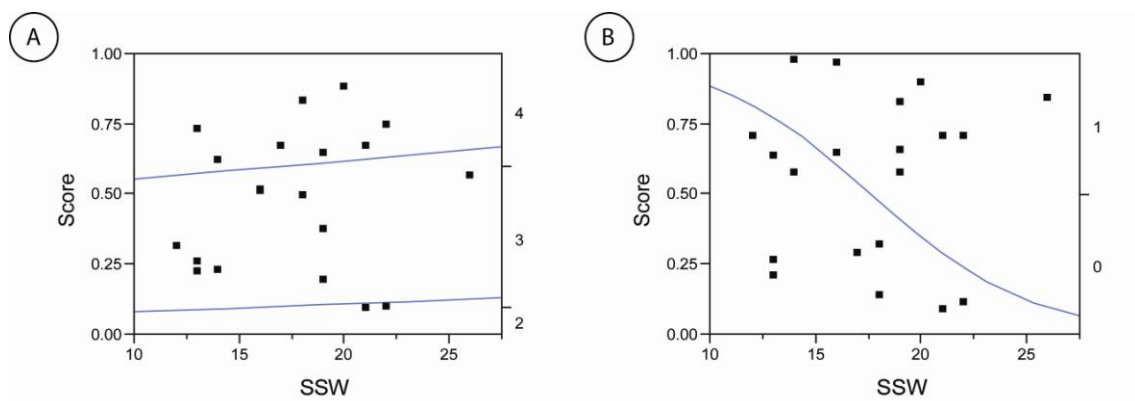
**Diagramm 7:** Frequenz der Expression von Netrin-1 im fetalen cerebellären Cortex: Mit zunehmendem Alter der Feten zeigt sich vor allem in der inneren Körnerzellschicht eine Abnahme hoher Score-Werte zugunsten einer Zunahme niedriger Score-Werte bezogen auf den Bestand. Weitere Erläuterung siehe Text zur Erklärung der Diagramme. (A) äußere Körnerzellschicht; (B) Molekularschicht; (C) innere Körnerzellschicht.

### 3.4.3 Altersassoziierte Expression von Ki-67

Die Expression von Ki-67 scheint in der inneren Körnerzellschicht mit der Reife der Feten zuzunehmen, wobei auch hier die statistische Auswertung mit einem p-Wert von 0,05 nicht im signifikanten Bereich liegt, aber eine Tendenz erkennen lässt (Diagramm 8).

In der äußeren Körnerzellschicht konnte keine Assoziation von Ki-67 Expression und Entwicklungsstufe der Feten beobachtet werden.

In der Molekularschicht konnte in keiner Entwicklungsstufe eine Expression von Ki-67 nachgewiesen werden.

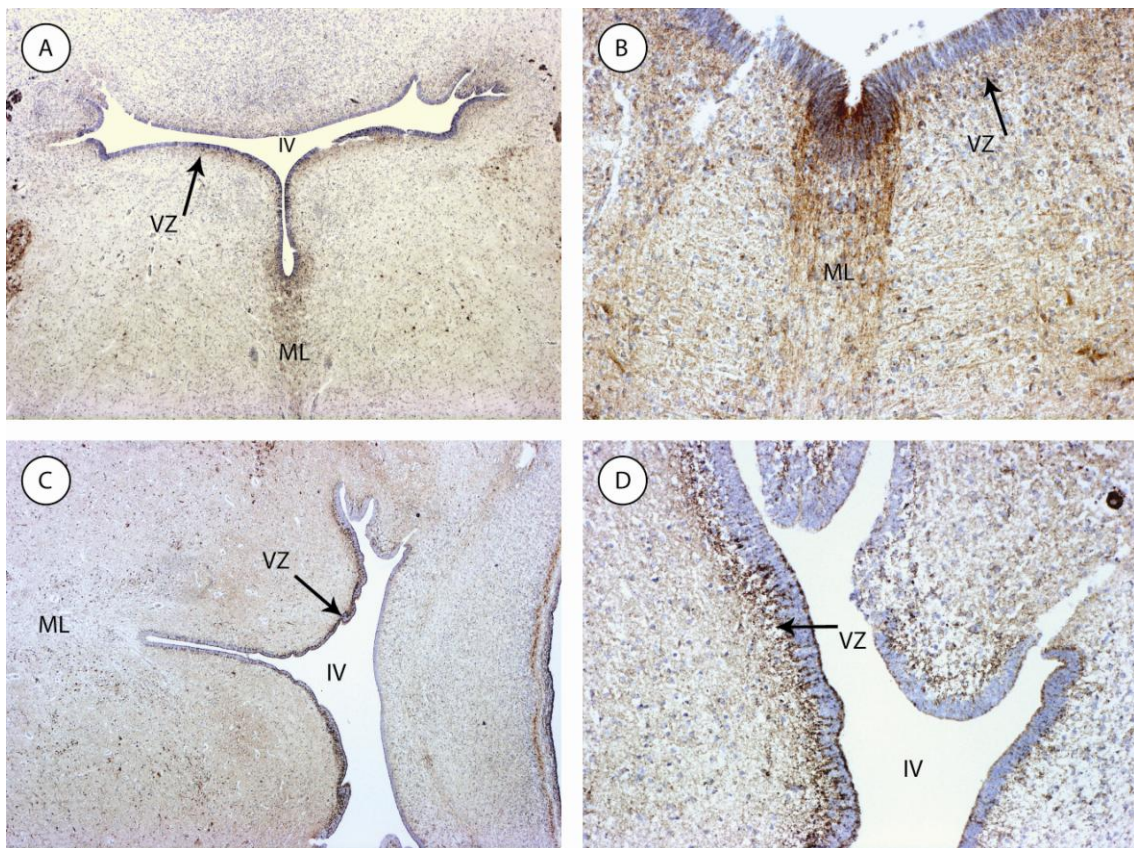


**Diagramm 8:** Frequenz der Expression von Ki-67 im fetalen cerebellären Cortex: In der inneren Körnerzellschicht zeigt sich mit zunehmendem Alter der Feten eine Abnahme hoher Score-Werte zugunsten einer Zunahme niedriger Score-Werte bezogen auf den Bestand. Weitere Erläuterung siehe Text zu Erklärung der Diagramme. (A) äußere Körnerzellschicht; (B) innere Körnerzellschicht.

### 3.5 Expression von DCC im Hirnstamm

#### 3.5.1 DCC im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone

Im Bereich der Ventrikulärzone konnte eine Expression von DCC nachgewiesen werden, wobei die Expressionsstärke von frontomedial nach dorsolateral beziehungsweise von der Grundplatte zur Flügelplatte zunimmt (Abbildung 10). Im Bereich der Mittellinie lässt sich verglichen mit dem umliegenden Gewebe keine stärkere DCC-Expression beobachten.



**Abbildung 10:** DCC im Bereich der Ventrikulärzone und der Mittellinie. (A) 14. SSW; (B) 12. SSW; (C)+(D) 20. SSW. *ML* Mittellinie; *VZ* Ventrikulärzone; *IV* IV. Ventrikel. (A+C 20-fache; B+D 100-fache Vergrößerung)



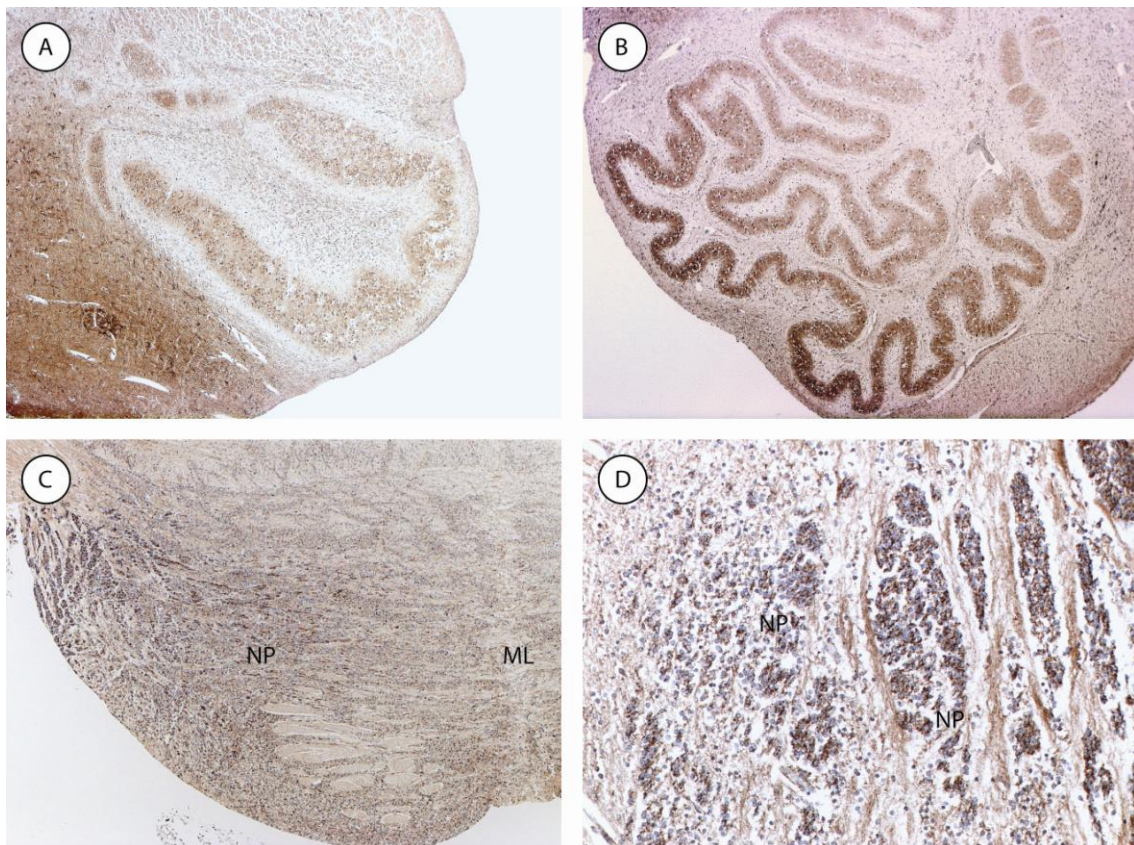
### 3.5.2 DCC in den präcerebellären Kerngebieten

#### 3.5.2.1 Nucleus olivaris inferior

Der in 12 der untersuchten Fälle vorhandene untere Olivenkern färbte sich mit einer mittleren Frequenz von 2,6 und einer Intensität von 2,0 an. Somit lässt sich auch in diesem Kerngebiet eine deutliche Expression des DCC-Proteins feststellen (Abbildung 12 (A)+(B)).

#### 3.5.2.2 Nuclei pontis

Im Bereich der pontinen Kerne zeigte sich eine deutliche Expression des Rezeptors DCC, deren Gradient von lateral nach medial abnahm und somit im Bereich der Mittellinie am geringsten war (Abbildung 12 (C)+(D)).



**Abbildung 12:** (A)+(B) DCC-Expression im Nucl. olivaris inferior. (A) 16. SSW; (B) 28. SSW. (C)+(D) DCC-Expression in den Nuclei pontis (NP) und der Mittellinie (ML). (C) 16. SSW; (D) 13. SSW ((A)-(C) je 20-fache, (D) 100-fache Vergrößerung).

### 3.5.3 DCC in den Hirnnervenkernen

#### **3.5.3.1 Nucleus n. oculomotorii**

Der Kern des dritten Hirnnervs war in drei der untersuchten Hirnstammschnitte vorhanden. In diesen Fällen zeigte sich eine sehr ausgeprägte Anfärbung mit Antikörpern gegen den Rezeptor DCC, die auf dem Auswertungsscore eine Frequenz von 3,0 ergab.

#### **3.5.3.2 Nucleus n . trochlearis**

Der nur in einem der untersuchten Hirnstammschnitte identifizierbare Kern des vierten Hirnnervs zeigte mit einer Frequenz von 2,0 eine etwas geringere Expression des DCC-Proteins als im Kerngebiet des dritten Hirnnervs.

#### **3.5.3.3 Nucleus motorius n. trigemini**

Der motorische Kern des fünften Hirnnervs war in sieben Hirnstammschnitten vorhanden und zeigte mit einer mittleren Färbefrequenz von 3,0 und einer Intensität von 2,5 eine deutliche Expression des DCC-Proteins (Abbildung 11 (A)).

#### **3.5.3.4 Nucleus tractus mesencephalicus n. trigemini**

Der sensible Kern des fünften Hirnnervs konnte in zehn der 22 histologischen Schnitte identifiziert werden und zeigte mit einem mittleren Score von 1,9 in der Frequenz und 3,0 in der Intensität der Anfärbung eine geringere Expression des DCC-Proteins als im Bereich des motorischen Kerns.

#### **3.5.3.5 Nucleus tractus spinalis n. trigemini**

Der zweite sensible Kern des fünften Hirnnervs konnte in drei Fällen beobachtet werden und zeigte mit einer mittleren Frequenz von 2,3 und einer mittleren Intensität der Färbung von 1,6 eine etwas schwächere Expression des DCC-Proteins als im Nucleus tractus mesencephalicus.

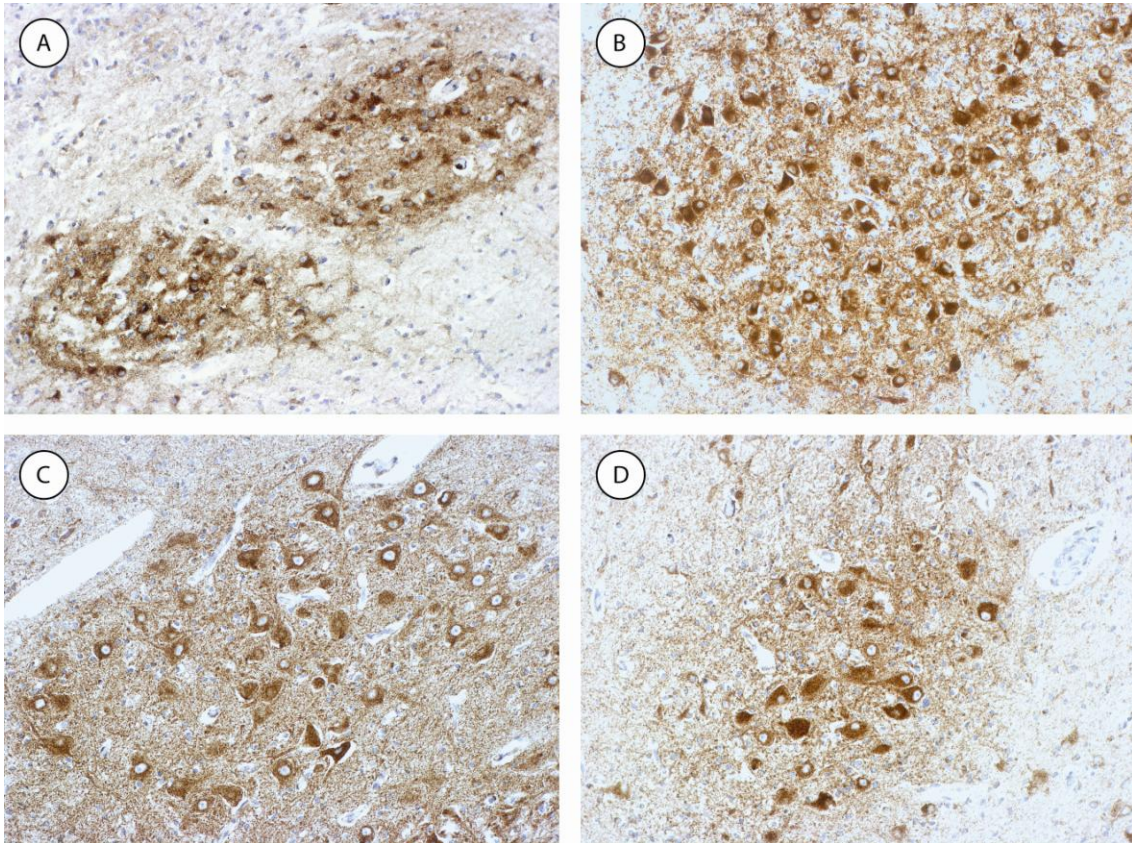


### 3.5.3.6 Nucleus sensorius principalis n. trigemini

Der in 13 der untersuchten Fälle vorhandene sensorische Kern des fünften Hirnnervs zeigte mit einem mittleren Score von 2,8 in der Frequenz und einem mittleren Score von 1,8 in der Intensität auch eine deutliche Expression des DCC-Proteins.

### 3.5.3.7 Nucleus n. abducentis

Der Kern des sechsten Hirnnervs konnte in sechs der 22 Gewebeproben identifiziert werden und zeigte mit einer mittleren Frequenz von 3,1 und einer Intensität von 2,8 eine deutliche DCC Expression (Abbildung 11 (B)).



**Abbildung 11:** Expression von DCC in den Kerngebieten der Hirnnerven (je 100-fache Vergrößerung). (A) Nucl. n. trigemi, 14. SSW; (B) Nucl. n. abducentis, 22. SSW; (C) Nucl. n. facialis, 28. SSW; (D) Nucl. n. hypoglossi, 28. SSW.

#### **3.5.3.8 Nucleus n. facialis**

Der in elf histologischen Präparate vorhandene Kern des siebten Hirnnervs zeigte mit einer mittleren Frequenz von 3,1 und eine Färbeintensität von 3,0 eine starke Expression des DCC-Proteins (Abbildung 11 (C)).

#### **3.5.3.9 Nuclei n. vestibularis**

Die vier Vestibulariskerne exprimieren DCC unterschiedlich stark. So zeigten der Ncl. vestibularis inferior (n=3; Ø Frequenz: 1,0; Ø Intensität 2,6) und der Ncl. vestibularis lateralis (n=5; Ø Frequenz: 1,6; Ø Intensität 3,0) eine etwas geringere Expression als der Ncl. vestibularis superior (n=4; Ø Frequenz: 2,2; Ø Intensität 2,7) und der Ncl. vestibularis medialis (n=8; Ø Frequenz: 2,0; Ø Intensität 2,1).

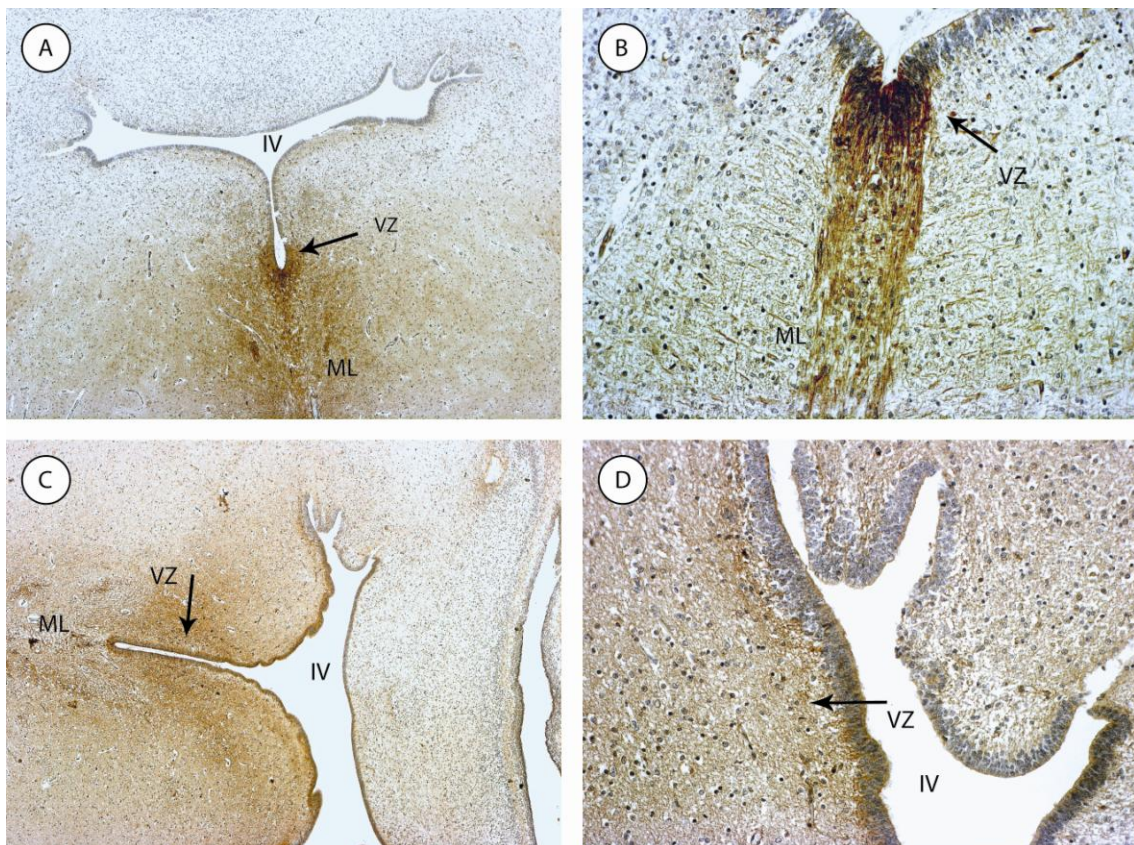


### 3.6 Expression von Netrin-1 im Hirnstamm

#### 3.6.1 Netrin-1 im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone

Die Expression des Lenkungsfaktors Netrin-1 in der Ventrikulärzone konnte in dem in dieser Studie untersuchten Gewebe deutlich nachgewiesen werden. Dabei unterscheidet sich die lokale Expression von der des Rezeptors DCC und nimmt von mediofrontal nach laterodorsal, also vom Bereich der Grundplatte zur Flügelplatte hin ab (Abbildung 13 (C)+(D)).

Im Bereich der Mittellinie lässt sich eine im Vergleich zum umliegenden Gewebe deutlich stärkere Expression feststellen, deren Gradient ebenfalls nach lateral abnimmt (Abbildung (A)+(B)).



**Abbildung 13:** Netrin-1 im Bereich der Ventrikulärzone und der Mittellinie. (A) 14. SSW; (B) 12. SSW; (C)+(D) 20. SSW. *ML* Mittellinie; *VZ* Ventrikulärzone; *IV* IV. Ventrikel. (A+C 20-fache; B+D 100-fache Vergrößerung)

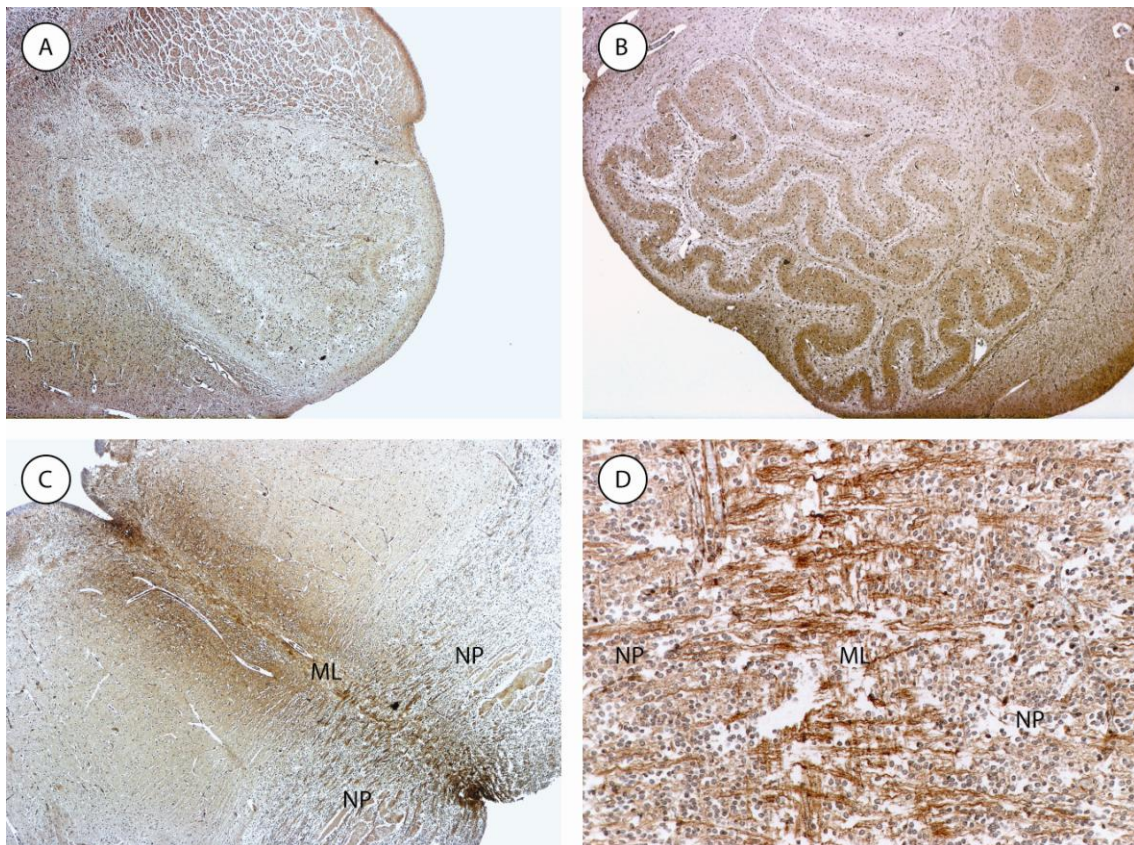
### 3.6.2 Netrin-1 in den präcerebellären Kerngebieten

#### 3.6.2.1 Nucleus olivaris inferior

Der in 12 der untersuchten Fälle vorhandene untere Olivenkern zeigte mit einer mittleren Frequenz von 2,3 und einer Intensität von 1,9 eine nachweisbare Expression von Netrin-1. Die Stärke der Expression ist analog zu der des DCC-Proteins (Abbildung 15 (A)+(B)).

#### 3.6.2.2 Nuclei pontis

Im Bereich der pontinen Kerne zeigte sich eine deutliche Expression von Netrin-1, deren Gradient von lateral nach medial zunimmt und somit im Bereich der Mittellinie am stärksten ist (Abbildung 15 (C)+(D)).



**Abbildung 15:** (A)+(B) Netrin-1-Expression im Nucl. olivaris inferior. (A) 16. SSW; (B) 28. SSW. (C)+(D) Netrin-1-Expression in den Nuclei pontis (NP) und der Mittellinie (ML). (C) 13. SSW; (D) 14. SSW ((A)-(C) je 20-fache, (D) 100-fache Vergrößerung).



### 3.6.3 Netrin-1 in den Hirnnervenkernen

#### **3.6.3.1 Nucleus n. oculomotorii**

Analog zur DCC Expression zeigte auch die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen Netrin-1 eine Frequenz der Zellanfärbung von 3,0 und somit eine deutliche Expression von Netrin-1 in diesem Kerngebiet.

#### **3.6.3.2 Nucleus n . trochlearis**

Auch der nur in einem Gewebeschnitt vorhandene Kern des vierten Hirnnervs zeigte mit einer Frequenz von 2,0 ein gleiches Expressionsmuster von Netrin-1 wie das des DCC-Proteins.

#### **3.6.3.3 Nucleus motorius n. trigemini**

Im motorischen Kern des fünften Hirnnervs war die Expression von Netrin-1 mit einer mittleren Färbefrequenz von 2,7 und einer Intensität von durchschnittlich 2,1 Punkten auf dem verwendeten Score etwas geringer als die Expression des DCC-Proteins.

#### **3.6.3.4 Nucleus tractus mesencephalicus n. trigemini**

Im Bereich dieses sensiblen Kerns des fünften Hirnnervs war das Expressionsmuster von Netrin mit einem Score von 1,9 in der Frequenz und 3,0 in der Intensität der Anfärbung gleich dem des DCC-Proteins (Abbildung 14 (A)).

#### **3.6.3.5 Nucleus tractus spinalis n. trigemini**

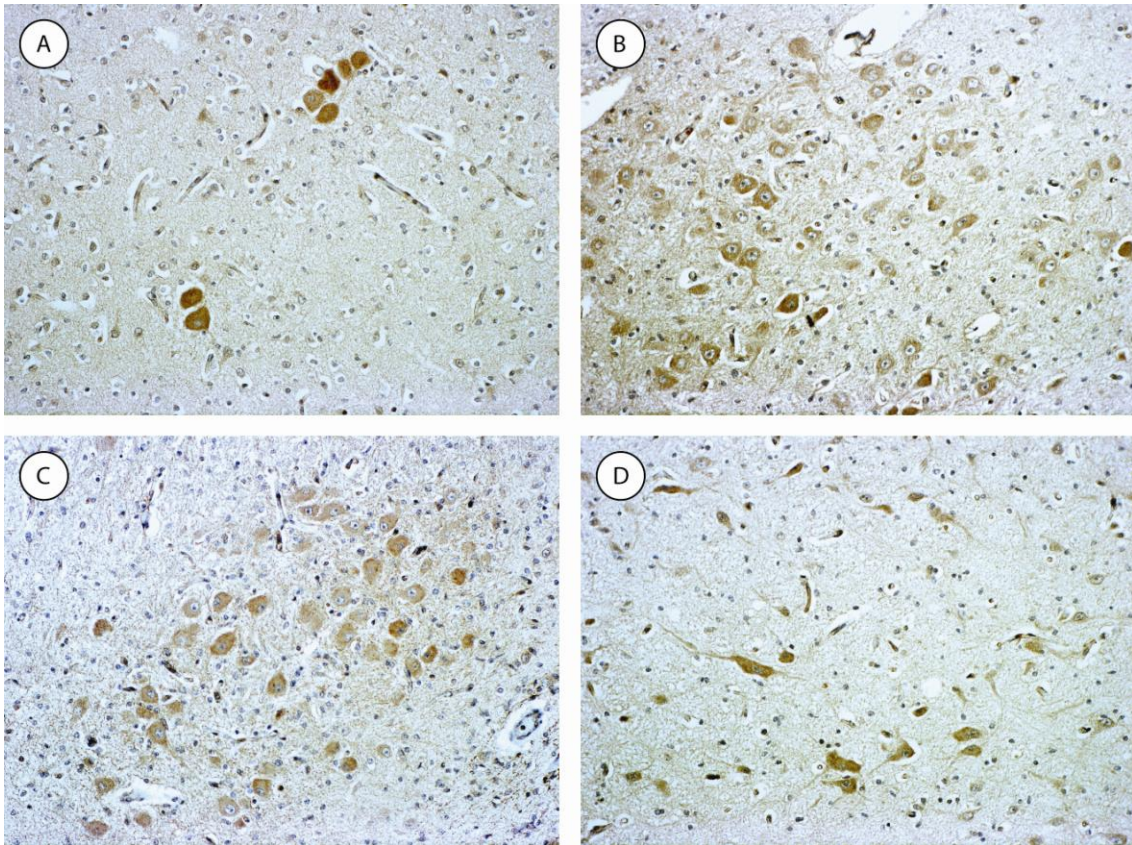
Auch der zweite sensible Kern des fünften Hirnnervs zeigte mit einer mittleren Frequenz von 2,3 und einer mittleren Intensität der Färbung von 1,3 ein dem Rezeptor DCC sehr ähnliches Expressionsmuster von Netrin-1.

### 3.6.3.6 Nucleus sensorius principalis n. trigemini

Wie schon bei den vorangegangenen Kernen des fünften Hirnnervs wies auch dieser sensorische Kern ein dem Rezeptor DCC analoges Expressionsmuster auf ( $\emptyset$  Frequenz: 2,7;  $\emptyset$  Intensität 1,6).

### 3.6.3.7 Nucleus n. abducentis

Der Kern des sechsten Hirnnervs zeigte mit einer mittleren Frequenz von 2,8 und einer Intensität von 2,6 eine deutliche Netrin-1 Expression. Auch hier konnte die Analogie zur DCC-Expression beobachtet werden.



**Abbildung 14:** Expression von Netrin-1 in den Kerngebieten der Hirnnerven (je 100-fache Vergrößerung). (A) Nucl. mesencephalicus n. trigemi, 28. SSW; (B) Nucl. nervi facialis, 28. SSW; (C) Nucl. n. hypoglossi, 28. SSW; (D) Raphekerne, 28. SSW.

#### **3.6.3.8 Nucleus n. facialis**

Mit einer mittleren Frequenz von 2,5 und einer Intensität von 2,4 war im Kern des siebten Hirnnervs die Netrin-1 Expression geringer als die des DCC-Rezeptors (Abbildung 14 (B)).

#### **3.6.3.9 Nuclei n. vestibularis**

Die vier Vestibulariskerne exprimieren auch Netrin-1 unterschiedlich stark aber insgesamt weniger als den Rezeptor DCC. So zeigten der Ncl. vestibularis inferior (n=3; Ø Frequenz: 1,3; Ø Intensität 1,6) und der Ncl. vestibularis lateralis (n=5; Ø Frequenz: 1,0; Ø Intensität 2,2) auch bei Netrin-1 eine etwas geringere Expression als der Ncl. vestibularis superior (n=4; Ø Frequenz: 1,7; Ø Intensität 1,5) und der Ncl. vestibularis medialis (n=8; Ø Frequenz: 1,7; Ø Intensität 1,8).

### **3.7 Expression von Ki-67 im Hirnstamm**

#### 3.7.1 Ki-67 im Bereich der Mittellinie und in der Ventrikulärzone

Der Proliferationsmarker Ki-67 zeigte in der Ventrikulärzone eine deutliche Expression.

Im Bereich der Mittellinie konnte keine Expression festgestellt werden.

#### 3.7.2 Ki-67 in den präcerebellären Kerngebieten

Sowohl in den Nuclei pontis als auch im Nucleus olivaris inferior konnte keine Expression von Ki-67 detektiert werden.

#### 3.7.3 Ki-67 in den Hirnnervenkernen

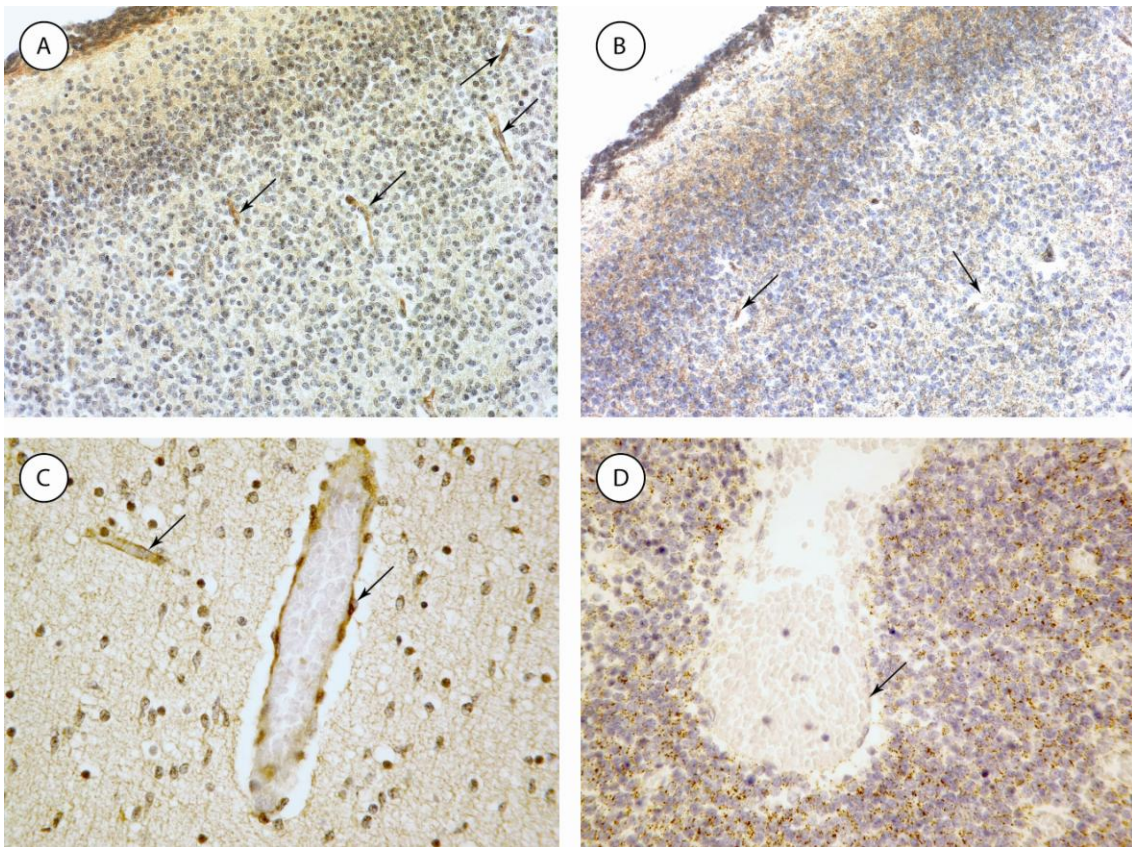
In den Kerngebieten der Hirnnerven konnte in keinem der untersuchten Fälle eine immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 beobachtet werden.



### 3.8 Expression von Netrin-1 und DCC in Endothelien

Die Expression von Netrin-1 in den Endothelien des untersuchten Gewebes ist mit einer durchschnittlichen Färbefrequenz von über 50% der Zellen (Score = 4) und einer Färbeintensität von 3,0 sehr ausgeprägt (Abbildung 21 (A)+(C)).

Im Gegensatz dazu konnte DCC in den Epithelien nicht nachgewiesen werden (Abbildung 21 (B)+(D)).



**Abbildung 21:** Expression von Netrin-1 und DCC in den Gefäßendothelien (mit Pfeilen markiert). (A) Netrin-1, 14. SSW; (B) DCC, 14. SSW; (C) Netrin-1, 21. SSW; (D) DCC, 20. SSW.

## 4 Diskussion

Um die Entwicklung des menschlichen Gehirns und in diesem Falle besonders die Entwicklung des Kleinhirns und der präcerebellären Kerngebiete zu verstehen, ist es wichtig das Verteilungsmuster von Wachstumsfaktoren zu kennen, welches für die neuronale Migration, axonale Lenkung und das Überleben von sich entwickelnden Neuronen verantwortlich ist. Die bisherigen Daten zu den in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren DCC und Netrin-1 entstammen ausschließlich tierexperimentellen Studien (Alcantara et al. 2000; Bloch-Gallego et al. 1999). Da sich aber immer wieder zeigt, wie vorsichtig man mit Analogieschlüssen zwischen tierexperimentellen Studien und humanen Modellen sein muss, soll diese Arbeit ein Expressionsmuster der oben genannten Proteine im humanen Gewebe aufstellen und eine Übertragbarkeit von Daten aus tierexperimentellen Studien auf den Menschen prüfen. Darüber hinaus sollen die möglichen Funktionen diskutiert werden, die Netrin-1 und der Rezeptor DCC in Bezug auf die Entwicklung des menschlichen Gehirns haben. Im Fokus stehen hier vor allem die präcerebellären Kerngebiete und das Kleinhirn, wobei aber auch mögliche Einflüsse auf die Genese der Hirnnerven und der Gefäße besprochen werden sollen.

### 4.1 Diskussion der Methodik

Das oben erwähnte Ziel, ein Expressionsmuster für Netrin-1 und DCC im humanen, fetalen Gehirn zu erstellen, konnte erreicht werden. Dabei stellt sich die Frage, in wie weit die in dieser Studie angewandten Methoden dem Vorhaben angemessen sind.

Bei der Untersuchung der Entwicklungsvorgänge im menschlichen Gehirn ergeben sich mehrere Probleme. Zum einen ist die Verfügbarkeit von menschlichem fetalen, oder gar embryonalen Gewebe sehr begrenzt und es entspricht dem Ethos des Mediziners, dass dieses nicht für Forschungszwecke „gezüchtet“ werden kann. Auf Grund dieser ethischen Problematik ist es somit

auch nicht möglich, lebendes menschliches Gewebe oder einzelne Zellen aus der Entwicklungszeit des menschlichen Fetus zu untersuchen oder gar Entwicklungsvorgänge zu modifizieren. Das heißt, in vitro Studien sind ausgeschlossen.

Nicht nur das Untersuchungsmaterial, auch die zur Verfügung stehenden Werkzeuge bedürfen der Diskussion und müssen auf ihre Tauglichkeit untersucht werden. So war die Auswahl von immunhistologischen Antikörpern gegen die in dieser Arbeit untersuchten Proteine im humanen Gewebe sehr begrenzt, und auch die wenigen vorhandenen lieferten erst nach längerer Modifikation des Färbevorgangs adäquate Ergebnisse.

Einen weiteren Diskussionspunkt stellt die Methode der Immunhistochemie dar, die zwar ein gutes Distributionsmuster der in dieser Studie untersuchten Faktoren liefert, aber bei Fragen der Quantität molekularbiologischen Techniken, wie zum Beispiel dem Western Blot, unterlegen ist.

Im Hinblick auf die Problematik der Verfügbarkeit von humanem Gewebe in den verschiedenen pränatalen Entwicklungsstufen kann festgestellt werden, dass das in dieser Arbeit untersuchte Material (im Rahmen des Möglichen) einen sehr guten Überblick über die humane Entwicklung liefert.

Darüber hinaus stellt auch die immunhistochemische Färbung eine Technik dar, die zwar, wie schon erwähnt, gewisse Schwachpunkte bei der Quantifizierung aufweist, sich aber zur genauen Lokalisation der untersuchten Faktoren und zur Darstellung eines Expressionsmusters bestens eignet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl das in dieser Studie verwendete Gewebe als auch die Techniken ein im Rahmen der gegenwärtigen Möglichkeiten geeignetes Instrument zur Untersuchung des Expressionsmusters von Netrin-1 und DCC im humanen fetalen ZNS-Gewebe darstellen.

## **4.2 Sind das Kleinhirn und die präcerebellären Kerngebiete ein geeignetes Modell um die neuronale Migration und die axonale Lenkung zu untersuchen?**

In diesem Abschnitt soll geklärt werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten ZNS-Areale Aussagen zur Funktion der untersuchten Faktoren erlauben. Eine Grundvoraussetzung für die regelrechte Entwicklung des menschlichen Nervensystems ist die Fähigkeit unreifer Neurone, von ihren Entstehungsorten in den Proliferationszonen des sich entwickelnden Gehirns zu ihrer endgültigen Position im adulten Gehirn zu migrieren und die richtigen axonalen Verbindungen herzustellen.

Dem präcerebellären System entspringen die Haupteintrittsbahnen ins Kleinhirn und es ist essentiell für die koordinierte Motorik. Junge postmitotische Neurone migrieren von der Rautenleiste tangential in Richtung der Grundplatte, um ihre spätere Position im adulten Hirnstamm einzunehmen. Diese Neurone entsenden Fortsätze, in denen der Zellkern in Richtung seines Ziels migriert.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, entstehen aus den Derivaten der oberen und unteren Rautenlippe sehr unterschiedliche Kerngebiete. So differenzieren sich die Neuroblasten aus der oberen Rautenleiste nicht nur zu den Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht und bilden damit die Kleinhirnrinde, sie sind auch der Ursprung des Locus coeruleus, der Nuclei reticulares pontis und anderen Neuronen des rostralen Rhombencephalons. Die präcerebellären Neurone entstehen aus dem unteren Teil der Rautenlippe und beinhalten unter anderem die Nuclei pontis und den Nucleus olivaris inferior.

Da die Neurone der Rautenlippe eindeutige Migrationswege aufweisen und ihre Zielregionen anatomisch gut dokumentiert sind (Altman und Bayer 1987; Bourrat und Sotelo 1990; Harkmark 1954), ist diese Region bestens geeignet um die neuronale Migration und axonale Lenkung zu untersuchen.

### **4.3 Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptoren im Kleinhirn**

#### 4.3.1 Expression in den Rindenschichten des Kleinhirns

Bis heute gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem Expressionsmuster von Netrin-1 und DCC im Hirnstamm und dem Kleinhirn befassen. Da die Ergebnisse der bisher publizierten Arbeiten ausnahmslos dem Tiermodell entstammen, ist es in dieser Arbeit nicht möglich, die eigenen Ergebnisse mit anderen Daten aus humanem Gewebe zu vergleichen.

S. Alcantara und Kollegen zeigten, dass es im jungen embryonalen Mausgehirn mit Ausnahme der tiefen Kleinhirnerne keine Netrin-1 Expression in der Kleinhirnanlage gibt (Alcantara et al. 2000). DCC mRNA konnte hingegen im Bereich des primären Neuroepithels und in der äußeren Körnerzellschicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Entwicklung änderte sich die Expression von Netrin-1 und seiner Rezeptoren. So zeigte sich am 5. postnatalen Tag eine starke Expression von Netrin-1 in der äußeren Körnerzellschicht, wohingegen Netrin-1 in der inneren Körnerzellschicht kaum vorhanden war. DCC mRNA konnte in der gesamten äußeren Körnerzellschicht und in der inneren Körnerzellschicht detektiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine weitgehende Übereinstimmung des Expressionsmusters von Netrin-1 und DCC im humanen Gewebe mit der Datenlage aus tierexperimentellen Studien.

So konnte auch in dieser Arbeit eine deutliche Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptor DCC in den sich entwickelnden Kleinhirnschichten festgestellt werden. Da es leider nicht möglich war, Gewebe von sehr frühen humanen Entwicklungsstadien zu untersuchen, kann über die geringe Expression von Netrin-1 am Anfang der Kleinhirnentwicklung (Alcantara et al. 2000) keine Aussage gemacht werden. In den untersuchten Entwicklungsstadien (ab der 12. SSW) zeigte sich eine konstante Expression von Netrin-1 und DCC in der äußeren Körnerzellschicht und in der Molekularschicht. In der inneren

Körnerzellschicht hingegen nahm die Expression in beiden Fällen mit zunehmendem Alter ab, wobei dieser Effekt bei Netrin-1 deutlicher war als bei dessen Rezeptor.

Auch diese Ergebnisse sind vereinbar mit Daten aus oben erwähnten tierexperimentellen Studien, die am fünften postnatalen Tag nur eine sehr geringe Expression von Netrin-1 in der inneren Körnerzellschicht feststellen konnten (Alcantara et al. 2000).

Als mögliche Funktion von Netrin-1 und DCC in den sich entwickelnden Schichten der Kleinhirnrinde ist die Bedeutung bei der neuronalen Migration, axonalen Lenkung und beim Überleben beziehungsweise bei der Apoptoseinduktion der Neuroblasten zu diskutieren.

Eine nahe liegende Überlegung gilt der Bedeutung der Faktoren für die Formation der äußeren Körnerzellschicht. Diese entsteht durch tangentielle Migration von Vorläuferzellen aus der oberen Rautenleiste, welche sich sukzessive über die Kleinhirnanlage ausbreiten. Hier konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, dass Vorläufer der Körnerzellen, obwohl sie Netrin-1 und DCC exprimieren, nicht auf Netrin-1 reagieren (Alcantara et al. 2000). Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus einer Studie, welche bei Mäusen mit mangelnder Netrin-1-Expression eine intakte äußere Körnerzellschicht nachweisen konnte (Bloch-Gallego et al. 1999). Somit ist anzunehmen, dass Vorläuferzellen der äußeren Körnerzellschicht einen Netrin-1 unabhängigen Weg wählen, um an den Ort der Bestimmung zu wandern. In diesem Fall ist denkbar, dass die Vorläuferzellen entlang schon existierender axonaler Bahnen migrieren (Hynes et al. 1986).

Auch können andere Rezeptoren oder Lenkungsfaktoren eine Rolle spielen. So zeigte sich zum Beispiel, dass tangential migrierende Neuroblasten im cerebralen Cortex und in anderen Bereichen von den Slit-Proteinen beeinflusst werden, Lenkungsfaktoren, die auf weite Strecken abstoßend wirken (Hu 1999; Wu et al. 1999).

Es ist anzunehmen, dass Netrin-1 über den Rezeptor DCC im menschlichen embryonalen Cerebellum eine von der Migration und axonalen Lenkung

unabhängige Aufgabe übernimmt. So ist es denkbar, dass die oben genannten Faktoren durch die Funktion von DCC als „dependence-receptor“ für das Überleben der Neuroblasten in äußeren Körnerzellschicht verantwortlich sind (Llambi et al. 2001; Mehlen et al. 1998). Auf die Bedeutung von Netrin-1 und DCC in Bezug auf die Apoptoseregulation und das Überleben der Neuroblasten wird im Verlauf dieses Kapitels noch umfassender eingegangen.

Im Gegensatz zu den Daten, die zeigen, dass Netrin-1 bei der Formation der äußeren Körnerzellschicht in frühen Entwicklungsstadien eine eher untergeordnete Rolle spielt (Bloch-Gallego et al. 1999), geben Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien am Mausmodell Grund zu der Annahme, dass sowohl Netrin-1 als auch dessen Rezeptor DCC bei der Bildung der inneren Körnerzellschicht durch migrierende Zellen aus der äußeren Körnerzellschicht eine wichtige Rolle spielen (Alcantara et al. 2000).

Bei der Maus deszendieren nach der Geburt (beim menschlichen Fetus zwischen 16. und 22. SSW) die postmitotischen Körnerzellen in die tiefe äußere Körnerzellschicht, während ihre Axone aussprossen und die späteren Parallelfasern bilden (Miale und Sidman 1961). Im Anschluss daran migrieren die Zellkörper an spezialisierten glialen Fasern, der Bergmannglia, orthogonal zu ihren Axonen durch die Molekularschicht und bilden die innere Körnerzellschicht (Hatten und Liem 1981; Rakic 1971; Rakic 1990). In diesem Entwicklungsstadium wirkt Netrin-1 als starker abstoßender Faktor auf Axone von Explantaten der äußeren Körnerzellschicht (Alcantara et al. 2000). Diese Axone konnten auf Grund ihrer Expression von L1 und TAG-1 Proteinen als Parallelfasern identifiziert werden (Persohn und Schachner 1987; Yamamoto et al. 1990).

Im Mausmodell zeigte sich ein altersabhängiger abstoßender Effekt auf diese Axone, der am 5. postnatalen Tag stärker ausgeprägt ist als bei Geburt (Alcantara et al. 2000), was wiederum mit der Formation der Parallelfasern in vivo korreliert (Altman und Bayer 1997).

Im entsprechenden humanen Entwicklungsstadium wird Netrin-1 von den Zellen der äußeren Körnerzellschicht und von Interneuronen der Molekularschicht

exprimiert. Somit kann hypothetisiert werden, dass Netrin-1 für das regelrechte Aussprossen von Parallelfasern verantwortlich ist, welches wiederum eine Voraussetzung für die geordnete Migration von Körnerzellen aus der äußeren Körnerzellschicht sein könnte (Engelkamp et al. 1999).

Die in dieser Arbeit beschriebene DCC-Expression in humanen Zellen der äußeren Körnerzellschicht und die im Mausmodell beschriebene Co-Expression von DCC- und UNC5H-Rezeptoren (Alcantara et al. 2000) stützen die These, dass das Zusammenwirken von DCC und UNC5H mit dem Liganden Netrin-1 zu einer abstoßenden Reaktion führt (Hong et al. 1999). Dass Netrin-1 auch auf die Zellkörper der Körnerzellen einen abstoßenden Effekt hat, konnte in einer weiteren Studie am Mausmodell gezeigt werden (Alcantara et al. 2000).

Diese Daten sind vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass die Netrin-1-Expression mit zunehmender Reife des Feten in der inneren Körnerzellschicht signifikant zurückgeht. Das würde für die postmitotischen Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht bedeuten, dass ein repulsives Signal aus der inneren Körnerzellschicht nachlässt, während das abstoßende Signal der äußeren Körnerzellschicht mit zunehmender Entwicklung an Intensität gewinnt. Somit gibt es Grund zu der Annahme, dass Netrin-1 und dessen Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der regelrechten Formation der inneren Körnerzellschicht durch migrierende Zellen der äußeren Körnerzellschicht spielen. Gestützt wird diese Annahme durch Daten, die zeigen, dass es bei Mutationen im Netrin-1-Rezeptor UNC5H zu einer fehlerhaften Migration und späteren Lage der Körnerzellen kommt (Ackerman et al. 1997).

### 4.3.2 Expression in den Kerngebieten des Kleinhirns

In dieser Arbeit kann zum ersten Mal an humanem Gewebe gezeigt werden, dass es in den Kerngebieten des Kleinhirns eine deutliche Expression sowohl des Netrin-1-Proteins als auch des Rezeptors DCC gibt.

Die Existenz dieser Faktoren lässt auch in diesem Bereich vermuten, dass sie die regelrechte Migration von Vorläuferzellen aus der Ventrikulärzone und die



Formation der Kleinhirnkerne beeinflussen. Weiter ist anzunehmen, dass sie für das Auswachsen von Axonen der Kleinhirnkerne und den richtigen Verlauf der Projektionsfasern mit verantwortlich sind. Zudem könnten die oben genannten Proteine beim Überleben der jungen Neurone eine Rolle spielen (Mehlen et al. 1998).

Um diese Vermutungen zu prüfen sind weitere Studien notwendig, welche sich explizit mit diesem Gebiet beschäftigen.

#### **4.4 Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptoren in den präcerebellären Kerngebieten**

Die Daten dieser Arbeit zeigen eine ausgeprägte Expression von Netrin-1 und DCC im Bereich der Grundplatte, in den Brückenkernen und im Gebiet des unteren Olivenkerns. Im Bereich der Grundplatte konnte im humanen fetalen Gewebe eine besonders ausgeprägte Expression von Netrin-1 im Bereich der Mittellinie und in der medialen Ventrikulärzone nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen Daten aus tierexperimentellen Studien an Mausembryonen, die auch in diesen Bereichen eine starke Expression feststellen konnten (Alcantara et al. 2000; Bloch-Gallego et al. 1999).

Der Rezeptor DCC wurde in dem in dieser Arbeit untersuchten Gewebe primär in den Neuronen des sich entwickelnden unteren Olivenkerns und den Brückenkernen detektiert. Im Bereich der Ventrikulärzone und der Subventrikulärzone konnte eine Expression mit Zunahme nach lateral festgestellt werden. Auch diese Daten decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der oben genannten Studien.

Dass die Netrin-1 Expression der Bodenplatte eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Hirnstamms und der Projektionen in das Kleinhirn spielt, belegen mehrere Studien am Tiermodell mit Netrin-1-Mangel (Kennedy et al. 1994; Serafini et al. 1996). Welche Qualität der Einfluss von Netrin-1 auf die Neuronen und Axone der präcerebellären Kerne hat und welche Rezeptoren dabei die entscheidende Rolle spielen, konnte jedoch noch nicht endgültig geklärt werden.

E. Bloch-Gallego zeigte am Mausmodell, dass Neuroblasten in der Ventrikulärzone der Flügelplatte sowohl DCC- als auch UNC5H-Proteine exprimieren (Bloch-Gallego et al. 1999). Diese Koexpression der Rezeptoren könnte einen abstoßenden Effekt von Netrin-1 (Hong et al. 1999) auf die Vorläuferzellen der precerebellären Kerne vermitteln und somit die Migration dieser Zellen aus den Rautenleisten initiieren. Im weiteren Verlauf der tangentialen Migration nimmt die Expression der UNC5H-Proteine ab und es wird ausschließlich DCC exprimiert. In dieser Entwicklungsstufe wäre denkbar, dass der repulsive Effekt von Netrin-1 auf die Vorläuferzellen aus der Rautenleiste durch ein anziehendes Signal aus der Grundplatte abgelöst wird und somit die Axone und Zellkörper in Richtung Mittellinie geleitet werden.

Warum allerdings die Axone der Vorläuferzellen des unteren Olivenkerns die Mittellinie überqueren, wohingegen die anziehende Wirkung von Netrin-1 auf die Zellkerne unmittelbar vor Überqueren der Mittellinie aussetzt, bleibt unklar und bedarf weiterer Studien.

Es gibt Anhaltspunkte, dass Abkömmlinge des UNC5H-Rezeptors in Koexpression mit DCC zu einem repulsiven Effekt führen und dass auch andere Lenkungsfaktoren wie Slit-Proteine eine Rolle spielen (Kidd et al. 1999; Kidd et al. 1998).

Im weiter fortgeschrittenen Entwicklungsstadium, in dem sich die lamellenförmige Struktur des unteren Olivenkerns ausbildet, exprimieren die Zellen sowohl Rezeptoren der DCC-, als auch Rezeptoren der UNC5H-Klasse (Bloch-Gallego et al. 1999). Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass Netrin-1 bei der Formation von topographischen Projektionen eine Rolle spielt. Außerdem sind bei der lamellenförmigen Organisation des unteren Olivenkerns Zellbewegungen wichtig, die von der Mittellinie nach lateral gerichtet sind und somit abstoßende Signale der Mittellinie benötigen (Bourrat und Sotelo 1991). Diese wären wiederum durch das Zusammenwirken von DCC und UNC5H-Proteinen möglich.

Neben den Mustern in den unteren Olivenkernen wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster von Netrin-1 und DCC in den pontinen Kernen untersucht,

welche ein weiteres Derivat der unteren Rautenlippe darstellen. Sowohl die in diesem Bereich starke Expression von Netrin-1 mit einem von medial nach lateral abnehmenden Gradienten als auch die Expression von DCC mit gegensätzlichem Expressiongradienten konnten eine Analogie zum Tiermodell aufzeigen (Alcantara et al. 2000). So konnte die oben genannte Studie im zum Menschen vergleichbaren Entwicklungsstadium der Maus eine starke Expression von DCC in Koexpression mit UNC5H-Proteinen im Bereich der Brückenkerne nachweisen. Bemerkenswert sind weitere Ergebnisse der Arbeit, welche feststellen, dass in frühen Entwicklungsstadien kaum DCC in Vorläuferzellen der Brückenkerne exprimiert wird, wohingegen Mitglieder der UNC5H-Familie in ausgeprägtem Maße vorhanden sind. Diese Ergebnisse lassen auf einen wie auch schon bei den Neuroblasten der unteren Olivenkerne beobachteten repulsiven Effekt schließen, der die Migration der Vorläuferzellen aus der unteren Rautenleiste initiiert (Bloch-Gallego et al. 1999).

Im Verlauf der Migration wechselt das Expressionsmuster und es kommt zu einer fast ausschließlichen DCC-Expression auf den Vorläuferzellen (Alcantara et al. 2000). Es ist anzunehmen, dass in diesem Entwicklungsstadium über DCC der anziehende Effekt von Netrin-1 vermittelt wird und somit die Axone und Zellkerne nach ventral in den Bereich der späteren Brückenkerne gelenkt werden. Beim Erreichen des Zielgebiets werden erneut Rezeptoren der UNC5H-Klasse exprimiert (Alcantara et al. 2000). Dabei ist davon auszugehen, dass die Co-Expression von DCC und UNC5H-Proteinen ein repulsives Signal vermittelt, welches die Neurone davon abhält die Mittellinie zu überqueren.

Ferner gibt es Grund zu der Annahme, dass Netrin-1 über DCC auch bei der Entwicklung der präcerebellären Kerngebiete eine wichtige Rolle in Bezug auf das Überleben und die Apoptoseinduktion der Vorläuferzellen aus der unteren Rautenleiste spielt (Llambi et al. 2001). Die Funktion von DCC als „dependence-receptor“ soll in einem späteren Abschnitt umfassender diskutiert werden.

Auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, die eine weitgehende Analogie der Expression von Netrin-1 und DCC im sich entwickelnden humanen

und im Mausgehirn zeigen, ist anzunehmen, dass die im Mausmodell gewonnen Erkenntnisse in Bezug auf die Entwicklung der präcerebellären Kerngebiete auf den Menschen übertragbar sein könnten. Um endgültige Klarheit dieser Analogie zu schaffen, müsste man weitere Studien in früheren humanen Entwicklungsstufen durchführen und die Expressionmuster weiterer Netrin-1-Rezeptoren darstellen. Letzteres war in dieser Studie nicht möglich, da zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Antikörper gegen Rezeptoren der UNC5H-Klasse in humanem Gewebe verfügbar sind. Ein größeres Problem ist jedoch die Verfügbarkeit von embryonalem humanem Gewebe aus den wichtigen frühen Entwicklungsstadien, welches auf Grund ethischer Problematik selbstverständlich nicht kultiviert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass man zu Studien der frühen Entwicklungsphasen des menschlichen Gehirns in den meisten Fällen auf Daten aus tierexperimentellen Studien angewiesen sein wird.

### **4.5 Expression von Netrin-1 und DCC in den Kernen der Hirnnerven**

Neben den Derivaten aus der Rautenlippe sind auch die Kerngebiete der Hirnnerven, welche aus Neuroblasten der Ventrikulärzone hervorgehen, im Fokus dieser Arbeit. Die Hirnnervenkerne entstehen durch radiale Migration von Neuroblasten aus den ventrikelnahen Proliferationszonen (Hatten 1999). Sie lassen sich in sensible und motorische Kerne einteilen. Die für die axonale Lenkung besonders interessanten motorischen Kerne werden je nach Innervation als somatisch-, brachiogen- oder viszeral-efferente Kerne bezeichnet. Schon während der Migration kommt es zum Aussprossen von Axonen, die je nach Kerngebiet in unterschiedlichen Bereichen den Hirnstamm verlassen.

Die meisten Axone der motorischen Kerne verlassen den Hirnstamm im ventrolateralen Bereich der Grundplatte. Eine Ausnahme dabei stellt der Nervus Trochlearis dar, dessen Austrittspunkt im dorsalen Bereich der Flügelplatte lokalisiert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen sowohl in den sensiblen als auch in den motorischen Kerngebieten eine Expression des Lenkungsfaktors Netrin-1 und des Rezeptors DCC. Allerdings scheint das Expressionsmuster in den motorischen Gebieten etwas stärker zu sein als in den sensiblen. Auf Grund der starken Expression der in dieser Studie untersuchten Faktoren ist auch in Bezug auf die Hirnnerven anzunehmen, dass diese bei der Migration, der axonalen Lenkung und beim Überleben der Zellen eine Rolle spielen.

Durch die in vorherigen Abschnitten schon erwähnte Expression von Netrin-1 im Bereich der Mittellinie liegt die Vermutung nahe, dass auch die Zellkörper und Axone der Hirnnervenkerne durch anziehende oder abstoßenden Signale der Mittellinie zu ihrem vorhergesehenen Ziel geleitet werden. So konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass Axone des Nervus trochlearis durch Netrin-1 abgestoßen werden und somit von der Mittellinie weg in Richtung der dorsalen Flügelplatte aussprossen (Colamarino und Tessier-Lavigne 1995).

Eine weitere Studie stellte fest, dass Explantate aus dem Rhomencephalon der Ratte ein vermindertes Axonwachstum in Gegenwart von Netrin-1 zeigten (Varela-Echavarria et al. 1997). Da über den in dieser Arbeit detektierten Rezeptor DCC die anziehende Wirkung von Netrin-1 auf die Wachstumskegel vermittelt wird, ist davon auszugehen, dass es durch die Co-Expression eines UNC5H-Rezeptors zu einer Konversion des anziehenden in ein repulsives Signal kommt (Hong et al. 1999). Diese Vermutung kann durch eine Studie am Tiermodell gestützt werden, die eine mit dem Auswachsen der Axone synchrone UNC5H-Expression in den Axonen der motorischen Hirnnervenkerne feststellt (Barrett und Guthrie 2001).

Neben der Expression in den motorischen Kernen der Hirnnerven zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch in den sensiblen Kernen, die Signale der afferenten Fasern empfangen, eine etwas schwächere aber dennoch deutliche Expression von Netrin-1 und DCC. Auch für diesen Bereich gibt es mehrere Anhaltspunkte, dass die in dieser Studie untersuchten Faktoren eine Rolle in Bezug auf die Migration und axonale Lenkung spielen (Watanabe et al. 2006).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Lenkungsfaktor Netrin-1 und dessen Rezeptoren auch bei der Entwicklung der Hirnnerven neben anderen Faktoren (Varela-Echavarria et al. 1997) von essentieller Bedeutung sind.

#### **4.6 Netrin-1 als Überlebensfaktor über den „dependence receptor“ DCC**

Im Verlauf dieser Arbeit wurde mehrfach die mögliche Funktion von Netrin-1 diskutiert über den Rezeptor DCC das Überleben und die Apoptoseinduktion von sich entwickelnden neuronalen Zellen zu beeinflussen. Ob diese Funktion auch bei der Entwicklung des menschlichen Nervensystems eine Rolle spielt, soll in diesem Abschnitt diskutiert werden.

Die Beobachtung, dass ein großer Teil der Netrin-1-Rezeptoren in Abwesenheit ihres Liganden eine Apoptosekaskade initiieren, wurde in mehreren Arbeiten festgestellt (Mehlen und Bredesen 2004; Mehlen und Mazelin 2003; Mehlen et al. 1998; Williams et al. 2003). E contrario lässt sich daraus ableiten, dass Netrin-1 für das Überleben von neuronalen Vorläuferzellen, die dessen Rezeptoren exprimieren, verantwortlich sein könnte und somit eine weitere wichtige Funktion in Bezug auf die regelrechte Entwicklung des humanen Nervensystems erfüllt (Llambi et al. 2001).

Zusammengefasst heißt dies, dass die Netrin-1 induzierte Lenkung von neuronalen Vorläuferzellen das Resultat aus zwei Mechanismen ist. Zum einen lenkt Netrin-1 durch anziehende oder abstoßende Signale die Zellen und Axone in Richtung ihres Bestimmungsortes, zum anderen ist es aber auch indirekt dafür verantwortlich, dass fehlgeleitete Zellen und Axone, die in Gebiete mit fehlender Netrin-1 Konzentration einwachsen, durch Apoptoseinduktion ausgeschaltet werden.

Wie in vorhergegangenen Abschnitten schon erwähnt, geben die Ergebnisse dieser Arbeit in den verschiedensten Regionen des sich entwickelnden menschlichen Hirnstamms und des Kleinhirns Grund zu der Annahme, dass dieser Mechanismus auch im humanen Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Ein

Beispiel ist die Expression von Netrin-1 und DCC in der äußeren Körnerzellschicht. Diese ist beim Menschen während der gesamten in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsperiode stark ausgeprägt. Studien am Tiermodell konnten allerdings zeigen, dass Netrin-1 auf die Migration von Derivaten der oberen Rautenleiste, welche die Vorläufer der äußeren Körnerzellen darstellen, keinen Einfluss hat (Alcantara et al. 2000). Es ist also anzunehmen, dass hier andere Eigenschaften von Netrin-1, z.B. die Funktion als Überlebensfaktor eine Rolle spielen.

Mehrere Studien am Tiermodell stützen diese These. Einen weiteren Anhaltspunkt liefern Analysen der präcerbellären Kerngebiete von Mäusen mit Netrin-1-Mangel, bei denen ein Fehlen des unteren Olivenkerns festgestellt werden konnte (Bloch-Gallego et al. 1999). Interessanterweise kommt es nicht nur zu einer fehlgesteuerten Migration der Vorläuferzellen, sondern auch zu einem regelrechten Absterben der Neuroblasten in frühen Entwicklungsstadien (Llambi et al. 2001).

Auch das in dieser Arbeit dargestellte Expressionsmuster von Netrin-1 und DCC in Bezug auf die Apoptoseregulation zeigt Analogien zu den oben genannten Studien. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch in diesem Bereich Erkenntnisse aus tierexperimentellen Arbeiten auf den Menschen übertragbar sind.

## 4.7 Expression von Netrin-1 in den Endothelien

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine deutliche Expression von Netrin-1 in den Endothelien, wohingegen DCC dort nicht nachweisbar ist.

In den letzten Jahren kamen immer mehr Studien zu dem Schluss, dass Netrin-1 nicht nur bei der Migration und axonalen Lenkung von neuronalen Zellen eine Rolle spielt, sondern auch Einfluss auf die Angiogenese hat (Lu et al. 2004; Park et al. 2004; Wilson et al. 2006). Lu und Le Noble konnten zum Beispiel zeigen, dass Netrin-1 über den UNC5B-Rezeptor einen repulsiven Effekt auf wachsende Blutgefäße im Fadenwurm (*C.elegans*) hat (Lu et al. 2004) und somit durch abstoßende Signale die sich entwickelnden Blutgefäße leitet.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer anderen Arbeit, die einen stimulierenden Effekt von Netrin-1 auf die Proliferation und die Migration von Endothelzellen beobachten konnte (Park et al. 2004). Diese Studie fand keine bekannten Netrin-1-Rezeptoren, die für den beobachteten anziehenden Effekt verantwortlich sein sollen.

Gestützt werden diese Ergebnisse durch eine Arbeit, die zeigen konnte, dass verstärkte Expression von Netrin-1 in ischämischem Gewebe die Einwanderung von Endothelzellen intensiviert und somit die Neovaskularisation fördert (Wilson et al. 2006). Auch hier gab es in den Endothelien keine relevante Expression der bekannten Netrin-1-Rezeptoren.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Netrin-1 über einen bisher noch unbekanntem Weg der Signaltransduktion Einfluss auf die Angiogenese nimmt. Es gibt Vermutungen, dass Integrine, ein möglicher Netrin-1-Rezeptor, in Bezug auf die Angiogenese von Bedeutung sein könnten (Yebra et al. 2003). Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) die Netrin-1 induzierte Migration der Endothelzellen verstärkt (Park et al. 2004) und gleichzeitig aktivierend auf Integrine wirkt (Byzova et al. 2000).

Anders als die erwähnten Studien kommt eine neuere Arbeit zu dem Ergebnis, dass DCC in arteriellen Endothelzellen doch nachweisbar ist (Nguyen und Cai 2006). Die Autoren dieser Studie behaupten, dass Netrin-1 über einen DCC-



abhängigen Weg die endotheliale NO-Produktion beeinflusst und somit durch Stimulation des VEGF die Angiogenese fördert.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit geben Grund zu der Annahme, dass Netrin-1 auch im humanen fetalen Gehirn eine Rolle in Bezug auf die Angiogenese spielt. Sie stützen die These, dass der angiogenetische Effekt von Netrin-1 im sich entwickelnden Gehirn nicht über den Rezeptor DCC vermittelt wird.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass methodisch gesehen in manchen immunhistologischen Präparaten zwischen Hintergrundfärbung und geringer Expression kaum differenziert unterschieden werden konnte.

#### **4.8 Expression von Ki-67 im fetalen Hirnstamm und Kleinhirn**

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper MIB-1 gegen das als Proliferationsmarker dienende Kernprotein Ki-67 (Gerdes et al. 1983) zeigte sowohl im Kleinhirn als auch im Hirnstamm die erwartete Färbung der Proliferationszonen. So konnte im Hirnstamm eine Expression in der Ventrikulärzone nachgewiesen werden, wohingegen sich die Expression im Kleinhirn auf die zwei Körnerzellschichten verteilt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit andern Studien überein, die eine signifikant höchste Expression in der äußeren Körnerzellschicht darstellen konnten (Abraham et al. 2001). Sowohl die hohe Expression in der äußeren Körnerzellschicht als auch die schwächere Expression in der inneren Körnerzellschicht stimmen mit den Proliferationsvorgängen in den jeweiligen Entwicklungsstadien der Kleinhirnrinde überein.

## 5 Schlussfolgerungen

Wichtige Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind:

1. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die ein Expressionsmuster des Lenkungsfaktors Netrin-1 sowie dessen Rezeptors DCC im humanen fetalen Kleinhirn und Hirnstamm beschreibt.
2. Die in dieser Studie verwendeten Gewebeproben und die angewandte immunhistologische Färbetechnik sind geeignet, die Expression von Netrin-1 und DCC im sich entwickelnden humanen Gehirn darzustellen. Diese Momentaufnahmen erlauben einen guten Vergleich mit den aus Tiermodellen vermuteten Funktionskaskaden.
3. Es gibt die begründete Annahme, dass Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien in Bezug auf die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren in vielen Bereichen auf das humane Gewebe übertragbar sind.
4. Der Lenkungsfaktor Netrin-1 scheint über den Rezeptor DCC Signale zu vermitteln, die bei der Entwicklung des menschlichen ZNS Einfluss auf die Migration, die axonale Lenkung und das Überleben der Neuroblasten haben.
5. Es ist anzunehmen, dass die Expression von Netrin-1 im Bereich der Mittellinie eine entscheidende Rolle bei der Formation der präcerebellären Kerngebiete und der Hirnnerven spielt.
6. Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Annahme, dass die regelrechte Rindenschichtung des Kleinhirns von Netrin-1 und dessen Rezeptoren beeinflusst wird.

7. Die Angiogenese im humanen fetalen Gehirn scheint über einen bisher noch unbekanntem Rezeptor unter dem Einfluss der Netrin-1-Expression zu stehen.
  
8. Netrin-1 nimmt mit großer Wahrscheinlichkeit über den „dependence-receptor“ DCC Einfluss auf das Überleben und die Apoptoseinduktion der sich entwickelnden neuronalen Zellen.

## 6 **Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anregungen und werfen neue Fragen auf, die es in weiteren Studien zu klären gilt:

1. Lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit durch Studien mit einer höheren Fallzahl und/oder anderen Detektionstechniken, wie Western Blot oder PCR, validieren?
2. Mit welchem Muster werden die anderen Netrin-1 Rezeptoren (UNC5H-Proteine und Neogenin) im humanen fetalen Gehirn exprimiert? Gibt es dabei ähnliche Analogien zum Tiermodell?
3. Nach welchem Muster werden andere, vor allem repulsive Wachstumsfaktoren, wie Semaphorine, Slits und Ephrine im sich entwickelnden humanen Gehirn exprimiert?
4. Wie sieht das Expressionsmuster der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren im pathologisch alterierten Gehirn aus? Beziehungsweise zu welchen Störungen führt ein Netrin-1-Mangel im humanen ZNS?
5. Besteht durch den therapeutischen Einsatz von Wachstumsfaktoren die Möglichkeit, neurodegenerative Prozesse zu stoppen oder Neuroregeneration anzuregen?
6. Wie ist das Expressionsmuster der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren in Gliomen und welchen Einfluss haben sie auf Entstehung und Progression? Ergeben sich durch weitere Forschung Möglichkeiten für die Tumorthherapie?

## 7 Zusammenfassung

Um die Entwicklung des menschlichen Gehirns und insbesondere die Entwicklung des Kleinhirns und der präcerebellären Kerngebiete zu verstehen, ist es wichtig, das Verteilungsmuster von Wachstumsfaktoren zu kennen, welche für die neuronale Migration, die axonale Lenkung und das Überleben von sich entwickelnden Neuronen verantwortlich sind. Die bisherigen Daten zu diesen Faktoren entstammen ausschließlich Arbeiten am Tiermodell.

Weil Netrin-1 und der Rezeptor DCC zwei der wichtigsten Vertreter dieser Faktoren sind, wurde in der vorliegenden Studie das Expressionsmuster des Wachstumsfaktors Netrin-1, dessen Rezeptors DCC und des Proliferationsmarkers Ki-67 im Hirnstamm und Kleinhirn von 23 humanen Feten im Zeitraum von der 13. bis zur 28. SSW untersucht. Gewebe mit neuropathologischen Alterationen war von der Studie ausgeschlossen. Das Expressionsmuster wurde mit immunhistochemischen Methoden visualisiert, wobei Antikörper gegen die untersuchten Faktoren eingesetzt wurden.

Im Hirnstamm konnte Netrin-1 in hohen Konzentrationen im Bereich der Ventrikulärzone und der Mittellinie, sowie in den Kerngebieten der Hirnnerven und den präcerebellären Kernen festgestellt werden. Die Expression im Kleinhirn war in den Kleinhirnkernen und in den Körnerzellschichten am stärksten, wobei eine mit zunehmendem Alter signifikante Abnahme der Netrin-1-Expression in der inneren Körnerzellschicht beobachtet wurde.

Der Rezeptor DCC zeigte im Bereich der Mittellinie ein schwaches Expressionsmuster im Vergleich zu Netrin-1, wohingegen die Expression in den Hirnnervenkernen deutlich ausgeprägt war. In den Kleinhirnschichten konnte ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster gezeigt werden.

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigte sich wie erwartet in der ventrikulären Proliferationszone und in der äußeren Körnerzellschicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Grund zu der Annahme, dass Netrin-1 über seinen Rezeptor DCC sowohl bei der Entwicklung der präcerebellären Kerngebiete und der Hirnnerven, als auch bei der regelrechten Entwicklung des cerebellären Kortex eine entscheidende Rolle spielt.

Alle Ergebnisse im humanen Gewebe weisen Analogien zu Daten aus tierexperimentellen Studien auf, was zu der These führt, dass Tiermodelle in diesem ethisch schwierigen Bereich ein geeignetes Mittel sind, um auch die menschliche Entwicklung zu verstehen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Abraham H, Tornoczky T, Kosztolanyi G, Seress L. Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19 (1):53-62.
2. Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 1997; 386 (6627):838-42.
3. Adé-Damilano M, Schöni-Affolter F, Dubuis-Grieder C, Strauch E. Embryologie - Organogenese - Nervensystem. In., Series Embryologie - Organogenese - Nervensystem. 2007.
4. Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 2000; 127 (7):1359-72.
5. Altman J, Bayer SA. Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure and functions.: Boca Raton, FL; CRC Press; 1997.
6. Altman J, Bayer SA. Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J Comp Neurol* 1987; 257 (4):490-512.
7. Anderson DJ. The neural crest cell lineage problem: neuropoiesis? *Neuron* 1989; 3 (1):1-12.
8. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4 (12):978-87.
9. Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* 1999; 24 (1):127-41.
10. Banerjee U, Zipursky SL. The role of cell-cell interaction in the development of the *Drosophila* visual system. *Neuron* 1990; 4 (2):177-87.
11. Barrett C, Guthrie S. Expression patterns of the netrin receptor UNC5H1 among developing motor neurons in the embryonic rat hindbrain. *Mech Dev* 2001; 106 (1-2):163-6.
12. Bayer S, Altman J, Russo R, Zhang X. Embryology. S Duckett, editor. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. 54–107 p. (S Duckett editor. Pediatric neuropathology).

13. Bentley D, Caudy M. Pioneer axons lose directed growth after selective killing of guidepost cells. *Nature* 1983; 304 (5921):62-5.
14. Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 1999; 19 (11):4407-20.
15. Bourrat F, Sotelo C. Early development of the rat precerebellar system: migratory routes, selective aggregation and neuritic differentiation of the inferior olive and lateral reticular nucleus neurons. An overview. *Arch Ital Biol* 1990; 128 (2-4):151-70.
16. Bourrat F, Sotelo C. Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J Comp Neurol* 1991; 313 (3):509-21.
17. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995; 378 (6556):498-501.
18. Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275 (5306):1640-3.
19. Bunz B, Harter P, Schlaszus H, Meyermann R, Mittelbronn M. Expression of the axonal attractant molecule netrin-1 and its receptor DCC in human fetal telencephalon development. *Acta Neuropathol* 2006; 112:368.
20. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 2000; 6 (4):851-60.
21. Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 1988; 106 (4):1281-8.
22. Caudy M, Bentley D. Pioneer growth cone steering along a series of neuronal and non-neuronal cues of different affinities. *J Neurosci* 1986; 6 (6):1781-95.
23. Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996; 87 (2):187-95.
24. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 2003; 113 (1):11-23.



25. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000; 403 (6768):434-9.
26. Chisholm A, Tessier-Lavigne M. Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9 (5):603-15.
27. Cirulli V, Yebra M. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8 (4):296-306.
28. Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 1995; 81 (4):621-9.
29. Colavita A, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, Culotti JG. Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* 1998; 281 (5377):706-9.
30. Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, Park L, Farrah T, Buller RM, Cohen JI, Strockbine LD, Rauch C, Spriggs MK. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998; 8 (4):473-82.
31. de la Torre JR, Hopker VH, Ming GL, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt CE. Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 1997; 19 (6):1211-24.
32. Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 1999; 126 (16):3585-96.
33. Essick C. The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *Am J Anat* 1912; 13:25-54.
34. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. *Nature* 1997; 386 (6627):796-804.
35. Fishman RB, Hatten ME. Multiple receptor systems promote CNS neural migration. *J Neurosci* 1993; 13 (8):3485-95.
36. Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21:309-45.

37. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31 (1):13-20.
38. Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 2002; 4 (9):720-4.
39. Goldowitz D, Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 1998; 21 (9):375-82.
40. Goodman CS, Shatz CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 1993; 72 Suppl:77-98.
41. Harkmark W. Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J Comp Neurol* 1954; 100 (1):115-209.
42. Hart IK, Richardson WD, Heldin CH, Westermark B, Raff MC. PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development* 1989; 105 (3):595-603.
43. Hatten ME. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:511-39.
44. Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N. Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7 (1):40-7.
45. Hatten ME, Heintz N. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:385-408.
46. Hatten ME, Liem RK. Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J Cell Biol* 1981; 90 (3):622-30.
47. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90 (4):739-51.
48. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 1990; 4 (1):61-85.
49. Hedgecock EM, Culotti JG, Thomson JN, Perkins LA. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev Biol* 1985; 111 (1):158-70.

50. Hochstetter F. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirns. II. Teil, Die Entwicklung des Mittel- und Rautenhirns.: Deuticke, Wien, Leipzig; 1929.
51. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6 (4):432-8.
52. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 1996; 383 (6602):722-5.
53. Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 1999; 97 (7):927-41.
54. Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier-Lavigne M, Poo M. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature* 2000; 403 (6765):93-8.
55. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981; 75 (6):816-21.
56. Hu H. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 1999; 23 (4):703-11.
57. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 1992; 68 (2):303-22.
58. Hynes RO, Patel R, Miller RH. Migration of neuroblasts along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *J Neurosci* 1986; 6 (3):867-76.
59. Jessell TM, Melton DA. Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* 1992; 68 (2):257-70.
60. Jessell TM, Sanes JR. The Development of the Nervous System. ER Kandel; JH Schwartz; TM Jessel, editors: Appleton and Lange; 2000a. (ER Kandel; JH Schwartz; TM Jessel editors. Principles of Neural Science).
61. Jessell TM, Sanes JR. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 2000b; 10 (5):599-611.
62. Kapfhammer JP, Raper JA. Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *J Neurosci* 1987; 7 (1):201-12.

63. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87 (2):175-85.
64. Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 1994; 78 (3):425-35.
65. Key M. Immunohistochemistry Staining Methods. M Key, editor: Dako; 2006. 47-53 p. (M Key editor. Immunohistochemical Staining Methods).
66. Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 1999; 96 (6):785-94.
67. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 1998; 92 (2):205-15.
68. Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75 (7):1389-99.
69. Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN. frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 1996; 87 (2):197-204.
70. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3 (7):475-86.
71. Lance-Jones C, Landmesser L. Motoneurone projection patterns in embryonic chick limbs following partial deletions of the spinal cord. *J Physiol* 1980; 302:559-80.
72. Lemire RJ, Loeser JD, Leech RW, Alvord BC. Normal and abnormal development of the human nervous system: Harper & Row, Hagerstown, Maryland; 1975.
73. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 1997; 386 (6627):833-8.
74. Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM, Culotti JG. UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 1992; 71 (2):289-99.
75. Livesey FJ, Hunt SP. Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal,

- striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 1997; 8 (6):417-29.
76. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* 2001; 20 (11):2715-22.
77. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 2004; 432 (7014):179-86.
78. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1 (3):173-80.
79. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75 (2):217-27.
80. Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi MJ, Chang S, Raper JA. A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 1995; 14 (6):1131-40.
81. Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prophan P, Moore KJ, Kinane TB. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (41):14729-34.
82. Meerabux JM, Ohba H, Fukasawa M, Suto Y, Aoki-Suzuki M, Nakashiba T, Nishimura S, Itohara S, Yoshikawa T. Human netrin-G1 isoforms show evidence of differential expression. *Genomics* 2005; 86 (1):112-6.
83. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 2004; 9 (1):37-49.
84. Mehlen P, Mazelin L. The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival. *Biol Cell* 2003; 95 (7):425-36.
85. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; 395 (6704):801-4.
86. Mehlen P, Thibert C. Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (15):1854-66.
87. Merz DC, Culotti JG. Genetic analysis of growth cone migrations in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 2000; 44 (2):281-8.

88. Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995; 14 (5):949-59.
89. Miale IL, Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 1961; 4:277-96.
90. Middleton FA, Strick PL. The cerebellum: an overview. *Trends Neurosci* 1998; 21 (9):367-9.
91. Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 2003; 6 (2):153-60.
92. Nakashiba T, Nishimura S, Ikeda T, Itohara S. Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. *Mech Dev* 2002; 111 (1-2):47-60.
93. Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (17):6530-5.
94. Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Hong K. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 2003; 423 (6943):990-5.
95. O'Leary DD, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9 (1):65-73.
96. Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, Deutsch U, Klein R. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 2002; 9 (4):725-37.
97. Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (46):16210-5.
98. Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13 (1):79-89.
99. Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 2003; 37 (2):263-74.
100. Persohn E, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal

- development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol* 1987; 105 (1):569-76.
101. Rakic P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 1971; 141 (3):283-312.
102. Rakic P. Principles of neural cell migration. *Experientia* 1990; 46 (9):882-91.
103. Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol* 1970; 139 (4):473-500.
104. Ramaekers VT, Heimann G, Reul J, Thron A, Jaeken J. Genetic disorders and cerebellar structural abnormalities in childhood. *Brain* 1997; 120 ( Pt 10):1739-51.
105. Ramón y Cajal S. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. . *Gaceta Sanataria de Barcelona* 1890; 12:413-9.
106. Raper JA. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10 (1):88-94.
107. Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS. Guidance of neuronal growth cones: selective fasciculation in the grasshopper embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; 48 Pt 2:587-98.
108. Rhinn M, Brand M. The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11 (1):34-42.
109. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996; 87 (6):1001-14.
110. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; 78 (3):409-24.
111. Serini G, Valdembrì D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Puschel AW, Bussolino F. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003; 424 (6947):391-7.
112. Sidman RL, Rakic P. Development of the human central nervous System. W Haymaker; A R.D., editors. Springfield, IL: Thomas; 1982.

- 3-145 p. (W Haymaker; A R.D. editors. Histology and histopathology of the nervous system).
113. Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, Poo M. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 1998; 281 (5382):1515-8.
114. Song H, Poo M. The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 2001; 3 (3):E81-8.
115. Speidel CC. Studies of living nerves. II. Activities of ameboid growth cones, sheath cells, and myelin segments, as revealed by prolonged observation of individual nerve fibers in frog tadpoles. *Am J Anat* 1933; 52:1-79.
116. Spemann H, Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. f. mikr. Anat. u. Entw. mech.* 1924; 100:599-638.
117. Sperry RW. Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963; 50:703-10.
118. Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 2003; 4 (3):371-82.
119. Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999; 99 (1):59-69.
120. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274 (5290):1123-33.
121. Tomlinson A, Kimmel BE, Rubin GM. rough, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye. *Cell* 1988; 55 (5):771-84.
122. Varela-Echavarria A, Tucker A, Puschel AW, Guthrie S. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 1997; 18 (2):193-207.
123. Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, Qian KX, Duan S, Chen Z, Rao Y, Geng JG. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 2003; 4 (1):19-29.
124. Watanabe K, Tamamaki N, Furuta T, Ackerman SL, Ikenaka K, Ono K. Dorsally derived netrin 1 provides an inhibitory cue and elaborates the



- 'waiting period' for primary sensory axons in the developing spinal cord. *Development* 2006; 133 (7):1379-87.
125. Weiss P. In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J Exp Zool* 1934; 68:393–448.
126. Wieschaus E, Nusslein-Volhard C, Kluding H. Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Dev Biol* 1984; 104 (1):172-86.
127. Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem* 2003; 278 (19):17483-90.
128. Wilson BD, li M, Park KW, Suli A, Sorensen LK, Larrieu-Lahargue F, Urness LD, Suh W, Asai J, Kock GA, Thorne T, Silver M, Thomas KR, Chien CB, Losordo DW, Li DY. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* 2006; 313 (5787):640-4.
129. Wingate RJ. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11 (1):82-8.
130. Wong K, Park HT, Wu JY, Rao Y. Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12 (5):583-91.
131. Wu JY, Feng L, Park HT, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Z, Zhang X, Rao Y. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 2001; 410 (6831):948-52.
132. Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999; 400 (6742):331-6.
133. Yamamoto M, Hassinger L, Crandall JE. Ultrastructural localization of stage-specific neurite-associated proteins in the developing rat cerebral and cerebellar cortices. *J Neurocytol* 1990; 19 (5):619-27.
134. Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 2003; 5 (5):695-707.
135. Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* 2003; 422 (6932):583-8.

136. Yu TW, Bargmann CI. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* 2001; 4 Suppl:1169-76.
137. Zheng JQ. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature* 2000; 403 (6765):89-93.

## 9 Danksagungen

Für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich im Folgenden herzlich bedanken bei...

...meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

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

...allen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen für die nette Aufnahme und Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Frau Ott, Frau Trautmann und Herrn Schlaszus für die sehr gute und geduldige Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbeverfahren.

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

...allen Doktoranden des Instituts für Hirnforschung, für gute Seminare und interessante Diskussionen.

...Herrn Professor Dietz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michel Mittelbronn.

## 10 Lebenslauf

### **Benedikt Burchard Max Bunz**

Geboren am 9. Juli 1979 in Tübingen

#### **Schulbildung**

1990 - 1999 Kepler-Gymnasium Tübingen

#### **Zivildienst**

1999 - 2000 Deutsches Rotes Kreuz Tübingen

#### **Studium**

2001 - 2008 Studium der Humanmedizin  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2006 - 2007

Praktisches Jahr

Chirurgie

Baylor College of Medicine, Houston, USA

Anästhesie

Kantonsspital Baden, Schweiz

Innere Medizin

Universitätsklinikum Tübingen

20. Mai 2008

Ärztliche Prüfung

#### **Promotion**

2005 – 2008

Bei Prof. Dr. R. Meyermann, Institut für Hirnforschung,  
Universität Tübingen

„Expression des axonalen Lenkungsfaktors Netrin-1 und dessen  
Rezeptors DCC im sich entwickelnden humanen Hirnstamm und  
Kleinhirn“

#### **Beruf**

Seit Juli 2008

Assistenzarzt im Klinikum München-Bogenhausen, Klinik für  
Kardiologie