
*Die Transaktivierung
des Neurotrophin-Rezeptors TrkB durch EGF
während der Kortextentwicklung der Maus*

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Dirk Pühringer
aus
Augsburg

Würzburg 2010

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Sendtner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung des zentralen Nervensystems	1
1.1.1 Die Entwicklung des zerebralen Kortex	1
1.1.2 Die Entwicklung des zerebralen Kortex in der Maus	3
1.2 Neurale Stammzellen	5
1.2.1 Neurale Stammzellen im dorsalen Telenzephalon	6
1.3 Die Wanderung postmitotischer Neurone im zerebralen Kortex	9
1.3.1 Radiale Migration	9
1.3.2 Tangentiale Migration	10
1.4 Neurotrophe Faktoren	11
1.4.1 Die Familie der Neurotrophine	11
1.4.2 Der p75 Neurotrophin-Rezeptor	14
1.4.3 Die Familie der Trk-Rezeptoren	14
1.4.4 Die Regulation von Neurotrophin-induzierten Signalwegen	15
1.4.5 Signaltransduktion des p75NTR	16
1.4.6 Signaltransduktion von Trk-Rezeptoren	17
1.4.7 Die Transaktivierung von Trk-Rezeptoren	20
1.4.8 Die Rolle von BDNF/TrkB-Signalwegen in Nervenzellen	21
1.5 Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und sein Rezeptor	22
1.5.1 Die EGF-Rezeptor-Familie	22
1.5.2 Die Liganden der EGFR/ErbB-Familie	23
1.5.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors im zentralen Nervensystem	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Chemikalien	30
2.1.3 Medien und Antibiotikallösungen für mikrobiologische Methoden	30
2.1.4 Material für molekularbiologische Methoden	31
2.1.5 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden	31



2.1.6	Material für proteinbiochemische Methoden	33
2.1.7	Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden	34
2.1.8	Material für Immunfluoreszenz-Methoden	37
2.1.9	Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenz-Methoden	37
2.1.10	Kits	39
2.1.11	Antikörper	40
2.1.12	Synthetische Oligonukleotide	41
2.1.13	Plasmide	43
2.2	Methoden	44
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	44
2.2.1.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	44
2.2.1.3	Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse	45
2.2.1.4	Präparative Isolation von Plasmid-DNA	45
2.2.1.5	Isolation von genomischer DNA	45
2.2.1.6	Restriktionsverdau	46
2.2.1.7	DNA-Gelelektrophorese	46
2.2.1.8	Gelextraktion aufgetrennter DNA-Fragmente	47
2.2.1.9	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	47
2.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	47
2.2.1.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.2.1.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
2.2.1.13	DNA-Sequenzierung	50
2.2.1.14	Isolation von Gesamt-RNA aus kortikalen Vorläuferzellen	51
2.2.1.15	RT-PCR	52
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	53
2.2.2.1	Herstellung von Zell-Lysaten	53
2.2.2.2	Herstellung von Gewebe-Lysaten	54
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	54
2.2.2.4	Immunpräzipitation	55
2.2.2.5	Biotinylierung und Avidin-Pulldown von Zelloberflächenproteinen	56
2.2.2.6	Enzymatische <i>in vitro</i> -Deglykosylierung von Proteinlysaten	57
2.2.2.7	Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen	58
2.2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.2.2.9	Western Blot	59
2.2.2.10	Immundetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	60
2.2.3	Immunfluoreszenz und Mikroskopie	61
2.2.3.1	Immuncytochemie von kultivierten Zellen	61
2.2.3.2	Immunhistochemie von Gefrierschnitten	61
2.2.3.3	TUNEL Assay	62
2.2.4	Zellkultur	63



2.2.4.1	Neurosphärenkultur kortikaler Vorläuferzellen	65
2.2.4.2	Kryokonservierung kortikaler Vorläuferzellen	65
2.2.4.3	Akute Isolierung von Zellen des embryonalen Vorderhirns	66
2.2.4.4	Produktion pseudoviraler Partikel in HEK293TN Zellen	66
2.2.4.5	Lentivirale Infektion kortikaler Vorläuferzellen	67
2.2.4.6	Transfektion kortikaler Vorläuferzellen mit Lipofectamin® 2000	67
2.2.4.7	<i>In vitro</i> -Migrationsassay für kortikale Vorläuferzellen	68
2.2.5	Quantitative Auswertungen	70
2.2.6	Statistische Auswertung	71
2.2.7	Computerprogramme	71
2.2.8	Maushaltung	71
3	Ergebnisse	73
3.1	Die Expression und Aktivierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB im dorsalen Telenzephalon der Maus	73
3.1.1	Die Expression von TrkB im dorsalen Telenzephalon	73
3.1.2	Die Aktivierung von TrkB im dorsalen Telenzephalon	76
3.2	Die Primärkultur kortikaler Vorläuferzellen	79
3.2.1	Die Expression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	81
3.2.2	Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	85
3.2.3	Die Abhängigkeit der TrkB-Aktivierung vom Differenzierungsgrad kortikaler Vorläufer	92
3.2.4	Der Zeitverlauf der EGF-vermittelten TrkB-Aktivierung	94
3.2.5	Die Überexpression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	95
3.2.6	Die pharmakologische Inhibition der TrkB-Aktivierung durch EGF	97
3.2.7	Die Inhibition der TrkB-Aktivierung durch dominant negative Src-Mutanten	98
3.3	Die Identität der durch EGF stimulierten pTrkB-PLCγ-Banden	101
3.3.1	Die Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen	101
3.3.2	Die Immunpräzipitation von pTrkB-Shc/Frs2 aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen	102
3.3.3	Die enzymatische Deglykosylierung von Proteinlysaten kortikaler Vorläuferzellen	103
3.3.4	Die Inhibition von N-Glykosylierung in kortikalen Vorläuferzellen durch Tunicamycin	106
3.4	Die subzelluläre Dynamik des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	107
3.4.1	Die Lokalisation von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	107
3.4.2	Die Lokalisation von TrkB nach Tunicamycin-Behandlung kortikaler Vorläuferzellen	109
3.4.3	Die intrazelluläre Umverteilung von TrkB nach Stimulation kortikaler Vorläuferzellen mit EGF	110
3.4.4	Die Isolation von Zelloberflächenproteinen durch Biotinylierung	113
3.4.5	Die subzelluläre Lokalisation von TrkB im dorsalen Telenzephalon	115
3.5	In vivo Analyse des embryonalen Vorderhirns in Wildtyp-, TrkB/NTRK2 KO- und EGFR KO-Mäusen	116
3.5.1	Das Überleben TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5	117



3.5.2	Die Proliferation TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5	120
3.5.3	Die Quantifizierung TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5	120
3.5.4	Die Phosphorylierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in <i>EGFR KO</i> -Mäusen am Embryonaltag 12,5	123
3.5.5	Die Quantifizierung und Lokalisation TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 15,5	124
3.6	Die TrkB-abhängige Wanderung kortikaler Vorläuferzellen	128
3.6.1	Der Streifentest als <i>in vitro</i> -Migrations-Assay	128
4	Diskussion	131
4.1	Die Expression und Aktivierung von TrkB im embryonalen Telenzephalon	132
4.2	Die funktionelle Interaktion zwischen TrkB- und dem EGF-Rezeptor	135
4.3	Die dynamische Verteilung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	138
4.3.1	Die Glykosylierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB	139
4.3.2	Die induzierte Insertion von TrkB in die Plasmamembran kortikaler Vorläuferzellen durch EGF	141
4.4	Die Bedeutung der TrkB-Transaktivierung durch den EGF-Rezeptor <i>in vivo</i>	142
4.5	Die TrkB-abhängige Migration kortikaler Vorläuferzellen	145
4.6	Die Spezifität des pTrkB-PLC γ -Antikörpers	146
4.7	Ausblick	148
5	Literaturverzeichnis	151
6	Anhang	167
6.1	Sequenzen und Plasmidkarten	167
6.2	Abbildungsverzeichnis	175
6.3	Tabellenverzeichnis	177
6.4	Abkürzungsverzeichnis	178
6.5	Erklärung	181
6.6	Lebenslauf	182
6.7	Publikationsliste	183



Zusammenfassung

Die Rolle der Hirnrinde als Zentrum komplexer Funktionen wie Lernen und Gedächtnis wird nicht zuletzt durch deren komplexe, in Schichten organisierte Architektur ermöglicht. Von entscheidender Bedeutung ist die präzise Positionierung von Nervenzellen, die im Laufe der Embryonalentwicklung in der Ventrikularzone (VZ) geboren werden und anschließend in radialer Richtung zu ihrem Bestimmungsort wandern. Die Funktion des Neurotrophin-Rezeptors TrkB an der Entwicklung des zerebralen Kortex war Gegenstand dieser Arbeit.

Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung konnte die Expression von TrkB sowohl in den Zellen der VZ als auch in neu geborenen Neuronen der Präplatte nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung des Rezeptors erfolgte dabei unabhängig von den beiden Liganden BDNF und NT-3. Ebenso führten BDNF oder NT-3 zu keiner zellulären Antwort in isolierten kortikalen Vorläuferzellen, wohingegen die Stimulation mit EGF eine Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ - und der Shc-Bindungsstelle hervorrief. Durch pharmakologische Inhibition und die Überexpression dominant negativer Src-Mutanten konnte die Beteiligung des EGF-Rezeptors und zweier neuronal exprimierter Src-Kinasen, cSrc und Fyn, an dieser Transaktivierung von TrkB durch EGF gezeigt werden.

Durch die Zugabe von EGF kam es im Zuge der Aktivierung von TrkB auch zur Umverteilung des Rezeptors von intrazellulären Kompartimenten zur Zellmembran. Die Retention des Rezeptors im Zytoplasma wurde über post-translationelle Modifikation reguliert. Die Verhinderung von N-Glykosylierung durch Tunicamycin-Behandlung kortikaler Vorläuferzellen führte zur Exposition von TrkB an der Zelloberfläche und konnte so Responsivität gegenüber BDNF herstellen.

Die physiologische Bedeutung einer Transaktivierung von TrkB durch EGF wurde durch das Fehlen der TrkB-Aktivierung in *EGFR KO*-Mäusen am Embryonaltag 12,5 gezeigt. Dies hatte eine fehlerhafte Positionierung kortikaler Nervenzellen zum Zeitpunkt E15,5 zur Folge. Anhand eines Migrationsassays konnte schließlich gezeigt werden, dass die EGF-induzierte Wanderung kortikaler Vorläuferzellen *in vitro* mit einer asymmetrischen Translokation von TrkB einhergeht.

Über die Transaktivierung von TrkB in frühen Phasen der Kortexentwicklung spielt EGF eine wichtige Rolle bei der Induktion neuronaler Differenzierung und ist an der Regulation der Wanderung postmitotischer Neurone in der Hirnrinde beteiligt.



Summary

The complex layered architecture of the cerebral cortex is a prerequisite for its role as the centre of complex cognitive functions like learning and memory. In this respect, the precise positioning of neurons is a crucial event. During embryogenesis, the majority of cortical neurons is born in the ventricular zone of the forebrain, from where postmitotic cells migrate radially to their specific destinations. The role of the neurotrophin receptor TrkB for the development of the cerebral cortex was studied in this thesis.

At embryonic day 12.5, the expression of TrkB was confined to the proliferative precursor cells in the ventricular zone as well as in the newborn neurons building up the preplate at the pial surface of the developing cortex. Thereby, the phosphorylation of the receptor was independent of the ligands BDNF or NT-3. Likewise, the stimulation of isolated cortical precursor cells with BDNF or NT-3 did not lead to any cellular response, whereas cells challenged with EGF showed a robust increase of phosphorylation at the PLC γ - and Shc-binding sites of TrkB. The contribution of the EGF receptor and the two src family members cSrc and Fyn to this transactivation event could be established via pharmacological inhibition and the overexpression of dominant negative mutants.

Upon EGF stimulation, cortical precursor cells did not only show the activation of TrkB but also the translocation of the receptor from intracellular compartments to the plasma membrane. The retention of TrkB in the cytoplasm was achieved by post-translational modifications. In this respect, the inhibition of N-glycosylation in cortical precursors by treatment with tunicamycin led to the exposition of TrkB at the cell surface and thereby restored responsiveness to BDNF.

The physiological significance of TrkB transactivation by EGF was underlined by the almost complete absence of TrkB phosphorylation in the forebrain of EGF receptor deficient mice at E12.5, leading to the disturbed positioning of cortical neurons at E15.5. Applying the stripe assay, it could be shown, that the migration of cortical precursors *in vitro* is accompanied with an asymmetric translocation of TrkB.

By the transactivation of TrkB, EGF is able to induce neuronal differentiation in early phases of corticogenesis and furthermore takes part in regulating the migration of postmitotic neurons within the cerebral cortex.



1 Einleitung

Höhere Säugetiere haben heutzutage nahezu alle Regionen der Erde besiedelt und sind in die meisten Lebensräume vorgedrungen. Man findet sie in Wüsten und Regenwäldern, im Hochgebirge, in den Polarregionen und auch in allen Ozeanen. Die Grundlage für diesen evolutionären Erfolg ist dabei ihre extreme Anpassungsfähigkeit an die Umwelt, welche nicht zuletzt durch die Entwicklung eines leistungsfähigen, zentralen Nervensystems ermöglicht wurde. Ein Meilenstein der Hirnentwicklung ist dabei die Evolution der Großhirnrinde, des zerebralen Kortex. Es ist die enorme Integrationsleistung dieser Struktur, die bereits Nagetiere zu komplexem Verhalten befähigt. Dabei wird der zerebrale Kortex aber nicht nur als Kommandozentrale, sondern auch als effizienter Informationsspeicher genutzt. Obwohl der geschichtete Aufbau der Großhirnrinde bei allen Säugetieren relativ ähnlich ist, kam es bei höheren Säugetieren zu einer starken Vergrößerung der kortikalen Oberfläche. So findet sich im Gegensatz zur glatten Hirnrinde (Lissenzephalie) bei Nagetieren eine hochgradig gefaltete Struktur des Kortex bei Primaten (Gyrenzephalie) (Kriegstein et al., 2006). Die weitreichenden funktionellen Konsequenzen dieses evolutionären Schrittes unterstreichen die Bedeutung eines umfassenden Verständnisses der Entwicklung dieser zentralen Hirnstruktur.

1.1 Die Entwicklung des zentralen Nervensystems

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems beginnt mit der Einfaltung eines verdickten Teiles des dorsalen Ektoderms (Neuralplatte). Im Laufe der Neurulation schließt sich das Ektoderm durch voranschreitendes Einwölben zum Neuralrohr, aus dessen Innenraum bei Vertebraten das Ventrikelsystem des Gehirns und der Zentralkanal des Rückenmarks entstehen. Der anteriore Abschnitt des embryonalen Neuralrohrs bildet dabei zunächst die drei primären Hirnbläschen aus. Eines davon, das Prosenzephalon, gliedert sich wenig später in das Dienzephalon sowie die beiden Bläschen des Telenzephalons auf.

1.1.1 Die Entwicklung des zerebralen Kortex

Der zerebrale Kortex entstammt diesen telenzephalen Bläschen, die in dieser frühen Phase von einer Schicht undifferenzierter, proliferierender Neuroepithelzellen



gesäumt werden. Die kortikalen Nervenzellen werden im Wesentlichen von zwei germinativen Arealen gebildet. Im ventral gelegenen, lateralen und medialen Ganglionhügel werden Zellen generiert, die in einer tangentialen Art und Weise in die kortikale Platte einwandern und dort hauptsächlich zu inhibitorischen, GABAergen Interneuronen heranreifen. Im Gegensatz dazu entsteht aus der dorsalen, ventrikulären Zone die Population von klassischen, exzitatorischen Kortikalneuronen, bei denen es sich überwiegend um glutamaterge Pyramidenzellen handelt (Abb.: 1-1) (Alvarez-Buylla et al., 2001; Götz and Huttner, 2005; Gupta et al., 2002).

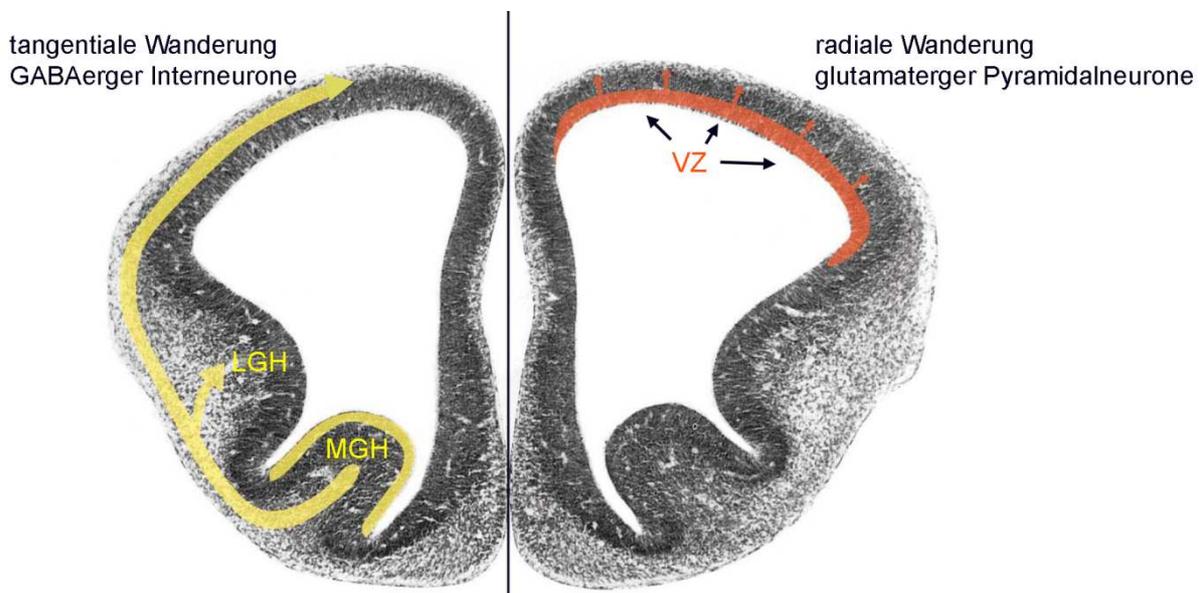


Abbildung 1-1: Die Wanderungsrichtungen von Nervenzellen während der Kortikogenese

Anhand eines koronalen Vorderhirnschnittes bei E12,5 der Maus sind die hauptsächlichsten Wanderungsrichtungen neu geborener Nervenzellen während der Kortikogenese gezeigt. Bei den in den medialen und lateralen Ganglionshügeln generierten Zellen handelt es sich dabei überwiegend um inhibitorische, GABAerge Interneurone, die in tangentialer Art und Weise in die kortikale Platte einwandern (linke Seite). Die klassischen glutamatergen Pyramidalneurone des zerebralen Kortex entstehen dagegen in der Ventrikularzone des dorsalen Telenzephalons und migrieren radial in Richtung der pialen Oberfläche (rechte Seite). LGH: Lateraler Ganglionshügel; MGH: Medialer Ganglionshügel; VZ: Ventrikularzone. Modifiziert nach Goffinet, 2006.



1.1.2 Die Entwicklung des zerebralen Kortex in der Maus

Bei der Maus beginnt die Neurogenese im entstehenden zerebralen Kortex etwa am elften Tag der Embryonalentwicklung (E10,5), wenn aus den Neuroepithelzellen der Ventrikularzone durch asymmetrische Zellteilungen die ersten postmitotischen Zellen hervorgehen. Diese wandern radial in Richtung der pialen Oberfläche aus, um dort die erste unterscheidbare neuronale Struktur zu bilden, die sogenannte Präplatte (preplate) aus Doublecortin exprimierenden Nervenzellen (The Boulder Committee, 1970; Parnavelas, 2002; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001). Nachfolgende Generationen von Nervenzellen wandern in die Präplatte ein, um dort die kortikale Platte auszubilden. Die Präplatte wird dabei in zwei separate Zellschichten aufgeteilt, die an die piale Oberfläche angrenzende Marginalzone und die apikal davon gelegene Subplatte (subplate) (Hatten, 1999). Die Subplatte wird nach innen durch die Intermediärzone von der ventrikulären Zone abgegrenzt. Die Intermediärzone wird von efferenten und afferenten Projektionen unterschiedlichster Herkunft durchsetzt und besitzt daher eine im Vergleich zu den anderen Schichten geringere Zelldichte. Zusätzlich entsteht etwa ab E13,5 eine weitere proliferative Schicht auf der basalen Seite der ventrikulären Zone, die subventrikuläre Zone (The Boulder Committee, 1970; Bayer and Altman, 1991; Smart and McSherry, 1982). Mit zunehmender Zahl einwandernder Zellen nimmt auch die Dicke der kortikalen Platte weiter zu, wobei sich die eingewanderten Neurone in den Schichten II bis VI anordnen (Bayer and Altman, 1991). Die Schichtbildung in der kortikalen Platte erfolgt dabei nach dem „inside first - outside last“-Prinzip, wie unter Anderem durch Markierung mit ^3H -Thymidin gezeigt werden konnte (Angevine and Sidman, 1961; Berry and Rogers, 1965; Rakic, 1974). Dabei wandern spätere Generationen von Nervenzellen durch bereits etablierte Schichten früherer Generationen hindurch, was schließlich dazu führt, dass früh geborene Neurone die tiefer liegenden Schichten des reifen Kortex bilden, wohingegen oberflächlichere Schichten aus später geborenen Nervenzellen bestehen. Die am frühesten geborenen Neurone finden sich folglich später in der Marginalzone und der Subplatte des zerebralen Kortex wieder. Die kortikale Platte selbst zeigt dabei einen Reifegradienten von innen nach außen.

Die Zellen der Marginalzone differenzieren im Laufe der Kortikogenese zu Cajal-Retzius-Zellen, einer transienten Population von Pionierneuronen (Frotscher, 1997; Marin-Padilla, 1998; Garcia-Moreno et al., 2007). Diese Zellen exprimieren das Markerprotein Reelin, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix.



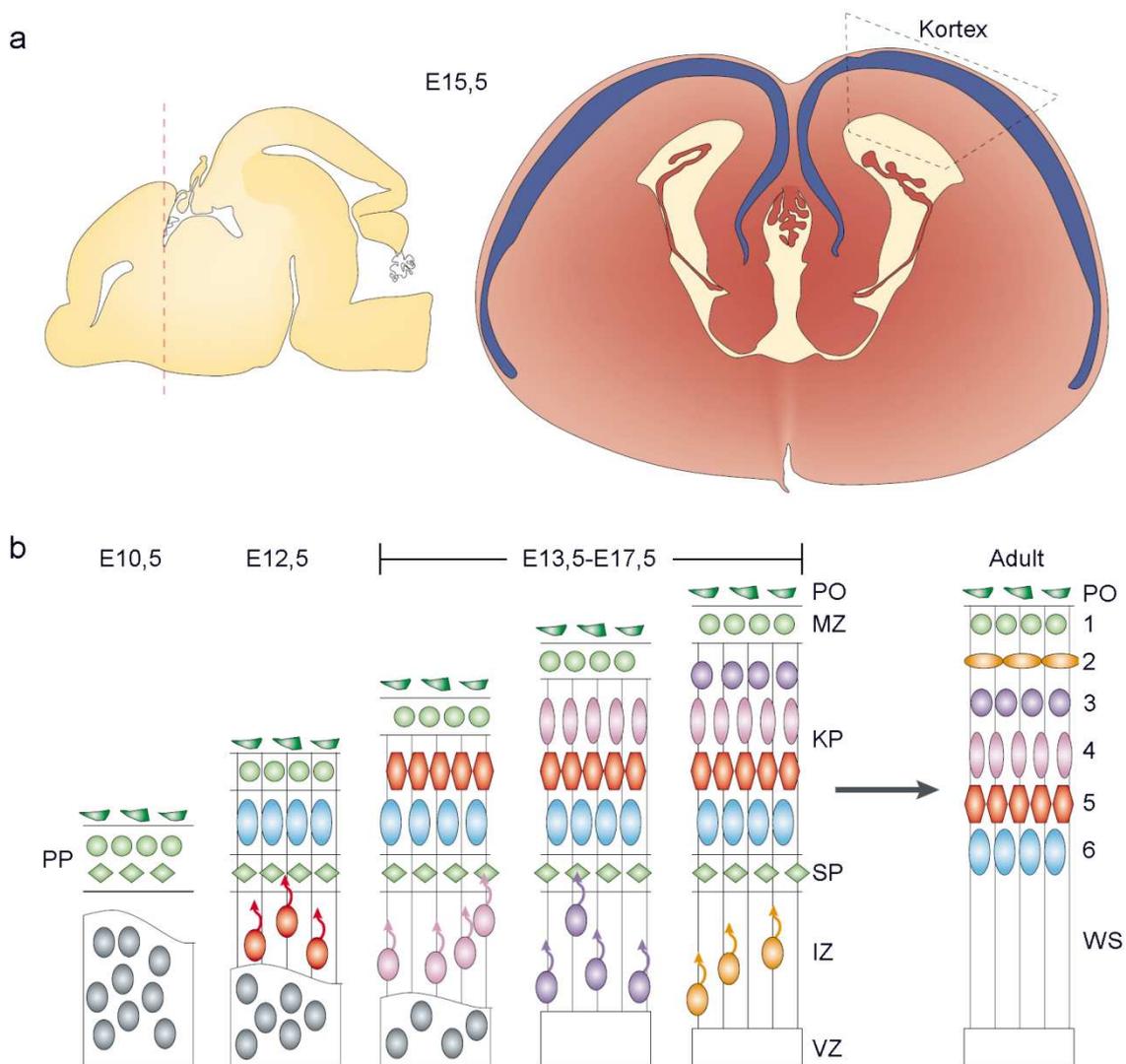


Abbildung 1-2: Die Entstehung des zerebralen Kortex in der Maus

(a) Die Lage des zerebralen Kortex im ZNS. Links: Laterale Ansicht eines Mausgehirns bei E15,5. Die rote Linie kennzeichnet die Schnittebene des rechts gezeigten Koronarschnitts, in dem die Region des Kortex markiert ist. (b) Die Etablierung der Rindenschichten der adulten Großhirnrinde. Durch erste neurogene Zellteilungen der proliferativen Neuroepithelzellen der Ventrikularzone (VZ) entstehen etwa ab E10,5 die ersten postmitotischen Neurone, die zunächst die so genannte Präplatte (PP) an der basalen Oberfläche des entstehenden Kortex ausbilden. Etwa ab E12,5 wandern nachfolgende Generationen von Nervenzellen in die Präplatte ein und teilen diese in zwei separate Zellschichten, die Marginalzone (MZ) und die Subplatte (SP). Die Formierung der kortikalen Platte (KP) erfolgt nun nach dem so genannten „inside first- outside last“-Prinzip, indem später geborene Neurone durch bereits etablierte Schichten von Nervenzellen hindurchwandern und sich oberhalb dieser positionieren. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Entwicklung des Kortex weitgehend abgeschlossen, die Zahl der proliferativen Zellen geht zurück. Während der Entwicklung zum adulten Organismus degeneriert die Subplatte, wodurch die Großhirnrinde mit ihren sechs Schichten und der mit Leitungsbahnen durchsetzten weißen Substanz (WS) zurückbleibt. Modifiziert nach Gupta et al., 2002.



Die Bedeutung dieses Proteins für die reguläre Schichtung der kortikalen Platte konnte anhand von Mäusen beobachtet werden, die eine spontane Mutation im Reelin-Gen besitzen. In dieser so genannten „Reeler“-Maus fehlt neu einwandernden Zellen offensichtlich ein Stopp- bzw. Differenzierungssignal, so dass frühere Generationen von Nervenzellen an der Oberfläche verbleiben, während sich Spätere darunter schieben, was letztendlich zu einer Umkehr der Schichten in der Hirnrinde führt (Caviness and Rakic, 1978; Caviness et al., 1972).

Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Entwicklung des zerebralen Kortex in der Maus weitestgehend abgeschlossen. Es findet sich nur noch ein geringer Anteil proliferierender Zellen in der ventrikulären und subventrikulären Zone wieder (Caviness and Takahashi, 1995). Aus der Intermediärzone entsteht letztendlich die mit Leitungsbahnen durchsetzte weiße Substanz des zerebralen Kortex. Die Abbildung 1-2 zeigt eine Übersicht der oben beschriebenen Phasen der Kortexentwicklung.

1.2 Neurale Stammzellen

Alle Nervenzellen des zentralen Nervensystems entstehen im Laufe der Entwicklung von Säugetieren aus neuralen Stammzellen. Aber auch die Gliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten, gehen aus diesen hervor (Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 1999a; Bedard and Parent, 2004; Sanai, 2004; Alvarez-Buylla et al., 2001). Im Allgemeinen werden zwei Kriterien für die Definition einer Stammzelle herangezogen, nämlich zum Einen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zum Anderen die Eigenschaft der Multipotenz. Selbsterneuerung meint dabei die Fähigkeit der Zelle, eine unbegrenzte Zahl von Zellteilungen zu durchlaufen, ohne dabei irgendwelche Veränderungen zu vollziehen, was der Zelle praktisch Unsterblichkeit verleiht. Multipotenz bedeutet hier, dass zahlreiche unterschiedliche Zelltypen aus der Stammzelle differenzieren können.

Die im Weiteren beschriebenen neuralen Stammzellen weichen von dieser Definition insofern ab, als sich deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung nicht notwendigerweise auf eine unbegrenzte Zahl von Zellteilungen bezieht. Außerdem kann die Differenzierung in postmitotische Zellen auf einige wenige Zelltypen beschränkt sein (Alvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 1999a; Johansson, 1999; Hack et al., 2004; Capela and Temple, 2002; Reynolds and Weiss, 1996; Temple, 2001). Die Selbsterneuerung neuraler Stammzellen kann prinzipiell durch



symmetrische und asymmetrische Zellteilung erfolgen. Symmetrische Zellteilung lässt dabei zwei identische Tochterzellen entstehen, wohingegen asymmetrische Teilung zu einer Tochterzelle führt, die der Mutterzelle entspricht, jedoch auch eine weitere Tochterzelle eines zweiten, unterschiedlichen Zelltyps hervorbringt.

1.2.1 Neurale Stammzellen im dorsalen Telenzephalon

Während der Embryonalentwicklung gibt es im dorsalen Telenzephalon drei verschiedene Grundtypen neurogener neuraler Stammzellen: Neuroepitheliale Zellen, radiale Gliazellen und basale Vorläuferzellen (Abb.: 1-3). Vor dem Einsetzen der Neurogenese durchlaufen die proliferativen Neuroepithelzellen auf der apikalen Seite der ventrikulären Zone eine Reihe symmetrischer Zellteilungen, wodurch zunächst die Population multipotenter Vorläuferzellen amplifiziert wird (Rakic, 1995; McConnell, 1995). Danach anschließend folgen asymmetrische Teilungen, die neben identischen Tochterzellen erste postmitotische Neurone hervorbringen. Es entsteht außerdem ein etwas weiter differenzierter Typ neuraler Stammzellen, die radialen Gliazellen (Götz and Huttner, 2005; Huttner and Brand, 1997; Smart, 1973; Chenn and McConnell, 1995).

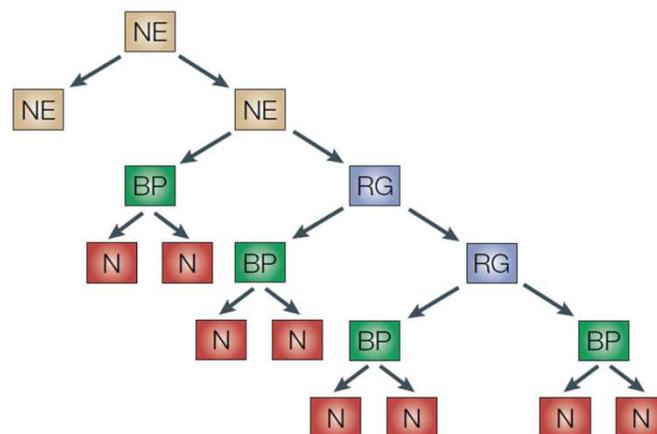


Abbildung 1-3: Stammbaum kortikaler Neurogenese

Im Laufe der Kortikogenese entstehen Nervenzellen durch die Abfolge von symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen aus insgesamt drei unterschiedlichen Typen kortikaler Vorläuferzellen. NE: Neuroepithelzellen; RG: Radiale Gliazellen; BP: Basale Vorläuferzellen; N: Neurone. Aus Götz und Huttner, 2005.



Mit den radialen Gliazellen entsteht ein Zelltyp, der gewisse Eigenschaften der ursprünglichen Neuroepithelzellen beibehält, aber zudem auch astrogliale Merkmale besitzt (Kriegstein and Götz, 2003; Fishell and Kriegstein, 2003; Campbell and Götz, 2002; Götz, 2003). So nimmt zwischen E9,5 und E11,5 unter den Vorläuferzellen der ventrikulären Zone die Zahl radialer Gliazellen, die astrogliale Marker wie den Astrozyten-spezifischen Glutamattransporter (GLAST), das Kalzium bindende Protein S100 β , Vimentin und auch glial fibrillary acidic protein (GFAP) exprimieren, stetig zu. Mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass Abkömmlinge radialer Gliazellen hinsichtlich des Potentials in bestimmte Zelltypen zu differenzieren, im Vergleich zu denen neuroepithelialer Zellen, deutlich eingeschränkter sind (Williams and Price, 1995; Malatesta et al., 2000). So entsteht aus radialen Gliazellen durch symmetrische Zellteilung jeweils nur ein Zelltyp, in den meisten Fällen Neurone, später aber auch Oligodendrozyten und Astrozyten (Noctor et al., 2001; Miyata et al., 2001; Grove et al., 1993; Malatesta et al., 2000; Williams and Price, 1995; Malatesta, 2003; Götz et al., 2002; Noctor, 2002; Noctor et al., 2004; Kriegstein and Noctor, 2004). Neben den beiden Vorläuferzelltypen auf der apikalen Seite der Ventrikularzone taucht im weiteren Verlauf der Kortikogenese, etwa zwischen E12,5 und E13,5, ein weiterer Typ neuraler Stammzellen auf, der sich jedoch auf der basalen Seite der ventrikulären Zone befindet. Diese basalen Vorläuferzellen gehen aus Zellteilung der apikalen Zellen hervor, verlagern ihren Zellkörper jedoch in basaler Richtung, wo sie schließlich die Subventrikularzone bilden (Smart, 1973; Haubensak et al., 2004; Miyata, 2004; Noctor et al., 2004). Auch in den basalen Vorläuferzellen finden sich einige spezifisch exprimierte Gene, beispielsweise die für die Transkriptionsfaktoren Tbr2 (Englund, 2005), CUX1 und CUX2 (Nieto, 2004; Zimmer et al., 2004). Die Nachkommenschaft dieser, sich in der Subventrikularzone befindenden Vorläuferzellen, besteht aus zwei neuronalen Tochterzellen, hervorgehend aus symmetrischer Zellteilung (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004). Tatsächlich wird die Bedeutung der basalen Vorläuferzellen darin gesehen, aus einer gegebenen Anzahl von Vorläuferzellen in der Ventrikularzone die daraus resultierende Anzahl von Nervenzellen durch eine zusätzliche Runde von Zellteilungen erhöhen zu können. Diese ursprünglich von Smart et al. eingeführte Hypothese wird dadurch gestützt, dass die im Laufe der Phylogenese zunehmende Neuronenzahl im zerebralen Kortex ebenfalls mit einer Größenzunahme der Subven-



trikularzone einhergeht (Smart et al., 2002). Die Abbildung 1-4 zeigt eine Übersicht der oben beschriebenen Zellteilungsvorgänge während der Kortikogenese.

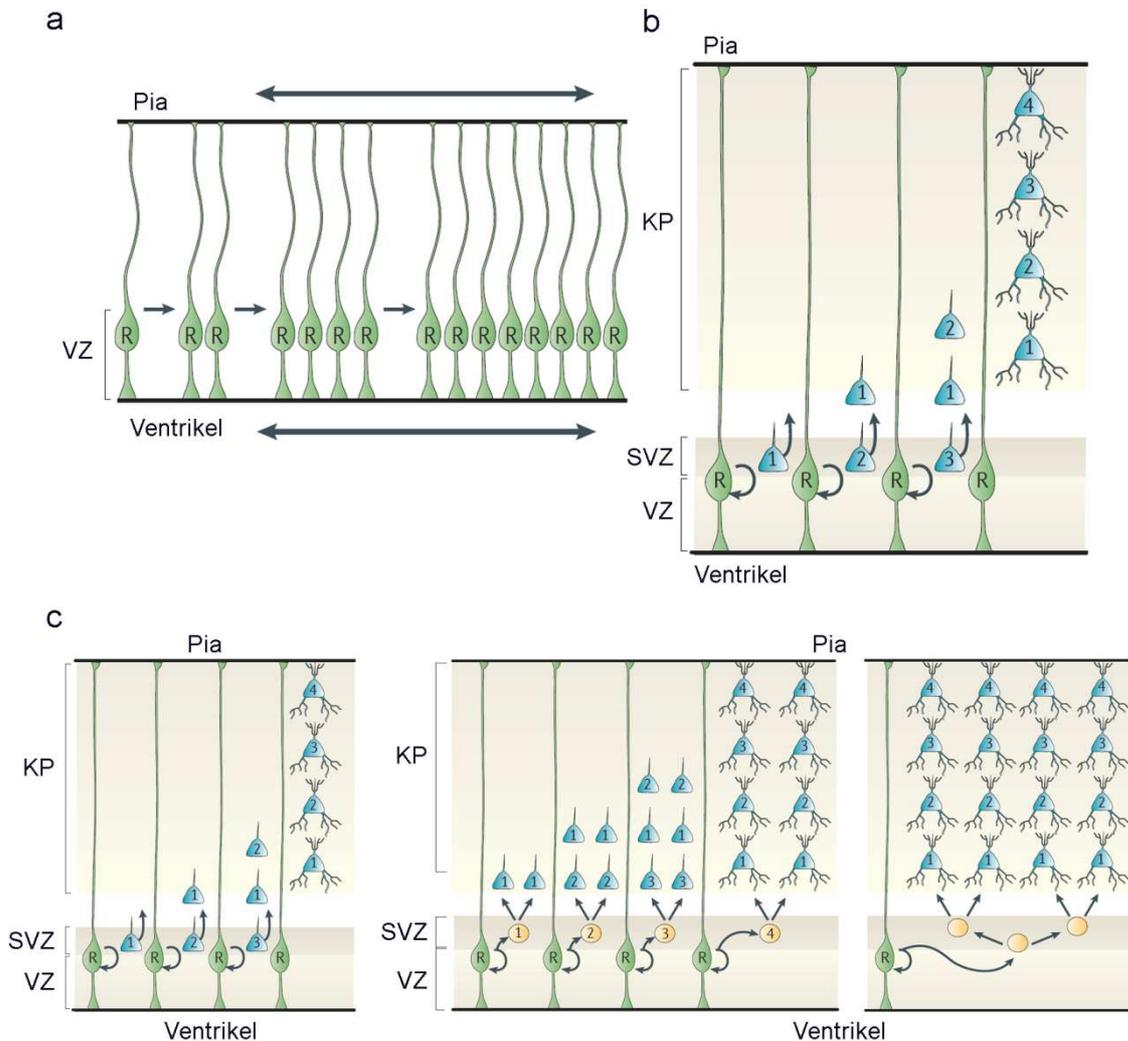


Abbildung 1-4: Zellteilungsvorgänge während der Neurogenese im embryonalen Kortex

(a) Symmetrische Zellteilungen erhöhen in frühen Phasen der Kortikogenese die Anzahl multipotenter Vorläufer in der Ventrikulärzone (VZ). (b) Durch asymmetrische, neurogene Teilungen kommt es nicht nur zur Selbsterneuerung der Vorläuferzellen, sondern auch zur Entstehung von Nervenzellen, die an vorbestimmte Positionen in der kortikalen Platte wandern. (c) In mittleren Phasen der Kortexentwicklung entsteht mit den basalen Vorläuferzellen in der Subventrikulärzone (SVZ) ein Zelltyp, aus dem durch symmetrische Teilungen Nervenzellen hervorgehen können. Durch die Etablierung dieser zusätzlichen Schicht proliferativer Zellen kann die Menge kortikaler Neurone deutlich erhöht werden, ohne dabei eine größere Anzahl an Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone zu benötigen. KP: Korticale Platte. Aus Kriegstein et al., 2006



1.3 Die Wanderung postmitotischer Neurone im zerebralen Kortex

Das korrekte Positionieren von Nervenzellen während der Entwicklung ist eine notwendige Grundlage für eine reguläre Hirnfunktion. Hat eine Zelle den Zellzyklus verlassen, muss sie vom Ort ihrer Entstehung durch gerichtete Wanderung zum endgültigen Zielort im heranreifenden Kortex gelangen. Im Allgemeinen sind bislang zwei Arten von Zellwanderung im embryonalen Vorderhirn beschrieben worden: (1) radiale Wanderung, bei der Zellen sich gemäß der radialen Ausrichtung des Neuralrohrs in Richtung der pialen Hirnoberfläche bewegen; (2) tangentielle Wanderung, bei der Zellen in orthogonaler Richtung zum Radius migrieren (Marin and Rubenstein, 2003).

1.3.1 Radiale Migration

Radiale Migration spielt bei der Formation der geschichteten Strukturen des zentralen Nervensystems wie Kortex, Rückenmark, Striatum oder auch Thalamus eine zentrale Rolle. Tatsächlich entstehen etwa 80-90 % aller kortikalen Nervenzellen im dorsalen Telenzephalon, wo sie überwiegend entlang eines Gerüsts radialer Gliazellen zum Zielort gelangen. Die Zellkörper der radialen Gliazellen befinden sich dabei in der ventrikulären Zone, wohingegen sich deren Fortsätze über die gesamte Strecke vom Ventrikel bis zur pialen Oberfläche erstrecken, wo sie Kontakte zur Basalmembran ausbilden (Ayala et al., 2007).

Durch die detaillierte Analyse wandernder Nervenzellen in akuten Hirnschnitten konnte gezeigt werden, dass für die radiale Migration von Neuronen zwei unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sind (Nadarajah et al., 2001). Bei der sogenannten Lokomotion bewegt sich die gesamte Zelle. Hier ist ein relativ kurzer Pionierfortsatz zu beobachten, dessen Länge im Verlauf der Zellbewegung verhältnismäßig konstant bleibt. Die Wanderung von kortikalen Neuronen entlang radialer Gliazellen ist dafür ein typisches Beispiel. Im Fall der Nukleokinese (auch: somale Translokation) schicken die Nervenzellen einen Pionierfortsatz in Richtung der pialen Oberfläche aus, wo dieser schließlich fixiert wird. Der Zellkörper wird dann durch die Verkürzung des Fortsatzes zunehmend in die entsprechende Richtung gezogen (Morris et al., 1998; Book and Morest, 1990). Interessanterweise scheint die Art der Fortbewegung nicht zelltypspezifisch zu sein, da ein Umschalten zwischen beiden Mechanismen bei Nervenzellen je nach Wanderungsstadium beobachtet werden konnte (Nadarajah et al., 2001). Außerdem durchlaufen wandernde Nervenzellen



offensichtlich eine Reihe unterschiedlicher Stadien nachdem sie in die kortikale Platte eingewandert sind. Diese Stadien zeichnen sich durch abrupte Veränderungen der Zellpolarität und -morphologie, der Bewegungsrichtung und der Wanderungsgeschwindigkeit aus. Eine mögliche Erklärung für solches Verhalten von Nervenzellen ist deren aktive Suche nach Orientierungsreizen in ihrer unmittelbaren, sich im Laufe der Wanderung ständig verändernden Umgebung. Anschließend setzen die Neurone ihre radiale Wanderung in Richtung der pialen Oberfläche fort (Kriegstein and Noctor, 2004).

1.3.2 Tangentiale Migration

Obwohl radiale Migration für die Hauptmasse kortikaler Nervenzellen verantwortlich ist, konnte gezeigt werden, dass sich gewisse Subpopulation von Neuronen auch in tangentialer Richtung, senkrecht zu den Fasern der radialen Gliazellen, bewegen. Bei diesen Zellen handelt es sich überwiegend um gamma-Aminobuttersäure exprimierende (GABAerge) Interneurone, die dem Subpallium entstammen. Zwei Hauptrouten tangentialer Wanderung sind bekannt: (1) aus dem medialen Ganglionhügel in Richtung Neokortex und Hippokampus; (2) aus dem lateralen Ganglionhügel in Richtung Riechkolben (*bulbus olfactorius*) (Kriegstein and Noctor, 2004; Marin and Rubenstein, 2001; De Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999). Die zuletzt genannte Route bleibt dabei bis ins Erwachsenenalter als rostraler migratorischer Strom (RMS) erhalten. Die tangentielle Einwanderung inhibitorischer Interneurone folgt im Allgemeinen recht komplexen Bahnen, die sich im Laufe der Embryonalentwicklung verändern (Kriegstein and Noctor, 2004). Die kortikale Platte wird dabei im Wesentlichen über zwei Routen erreicht, zum Einen über die Marginalzone, zum Anderen über die intermediäre und subventrikuläre Zone. Nach tangentialer Verteilung entlang der kortikalen Platte, wenden sich die Interneurone in radialer Richtung ihren Bestimmungsorten zu (Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Wichterle et al., 2001; Polleux et al., 2002; Nadarajah et al., 2002; Tanaka et al., 2003; Ang, Jr. et al., 2003). Oft werden diese auf direktem Weg erreicht. Einige Subpopulationen durchlaufen allerdings zunächst eine zum Ventrikel hin gerichtete Migration, von wo sie erst nach einer gewissen Verweilzeit wieder in Richtung kortikaler Platte auswandern (Nadarajah et al., 2002).



In Bezug auf die Regulation der tangentialen Migration GABAerger Interneurone des zerebralen Kortex wurden bislang zahlreiche Moleküle identifiziert, die an der Lenkung des Wanderungsprozesses beteiligt sind. Hier finden sich Semaphorine-Neurophiline, Zelladhäsionsmoleküle wie PSA-NCAM, Neureguline und die anziehenden und abstoßenden Moleküle der slit/robo-Familie (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003; Yau et al., 2003; Jimenez et al., 2002; Zhu et al., 1999).

1.4 Neurotrophe Faktoren

Neurotrophe Faktoren sind eine Gruppe von Molekülen, die ursprünglich als Überlebensfaktoren für embryonale Nervenzellen definiert wurden. Gemäß der „Neurotrophin Hypothese“ werden solche Faktoren im jeweiligen Zielgewebe in verhältnismäßig geringen Mengen ausgeschüttet, was zu einem selektiven Überleben und Absterben von Nervenzellen führt. Durch eine solche gezielte Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) kann die endgültige Anzahl von Neuronen den jeweiligen Bedürfnissen exakt angepasst werden (Thoenen and Barde, 1980; Barde, 1989; Korsching, 1993).

Heutzutage ist außerdem allgemein anerkannt, dass neurotrophe Faktoren eine weit darüber hinausgehende Funktion im Nervensystem haben. Neben der Steuerung von Entwicklung, Überleben und Aufrechterhaltung von Nervenzellen konnte mittlerweile auch eine Beteiligung an funktioneller Modulation nachgewiesen werden. So sind neurotrophe Faktoren ebenso an der Regulation von Synaptogenese und synaptischer Plastizität in reifen Nervenzellen beteiligt (Kaplan and Miller, 2000; Huang and Reichardt, 2001; Poo, 2001; Sofroniew et al., 2001; Dechant and Barde, 2002; Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003). Die Gruppe der neurotrophen Faktoren besteht aus mehreren Familien, die in Tabelle 1-1 zusammengefasst sind.

1.4.1 Die Familie der Neurotrophine

Es gibt in Säugetieren vier Mitglieder der Neurotrophinfamilie. NGF (nerve growth factor) wurde als erster Überlebensfaktor für Nervenzellen überhaupt in den frühen 50er Jahren des 20. Jahrhunderts von Rita Levi-Montalcini und Viktor Hamburger entdeckt (Levi-Montalcini, 1987). Die Familie dieser strukturell nah verwandten Moleküle wurde dann mit der Isolation von BDNF (brain derived neurotrophic



factor) (Barde et al., 1982) begründet. Später kamen durch die Identifizierung von NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) weitere Familienmitglieder hinzu (Reichardt, 2006). Die große Homologie aller vier Mitglieder der Neurotrophinfamilie legt nahe, dass die entsprechenden Gene durch aufeinanderfolgende Genduplikationen aus einem gemeinsamen Urgen hervorgegangen sind (Hallbook, 1999). Alle vier Neurotrophine werden grundsätzlich als Pro-Neurotrophine, bestehend aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und der Sequenz des eigentlichen reifen Proteins, exprimiert.

<i>Familien neurotropher Faktoren</i>	<i>Rezeptoren</i>
Neurotrophin Familie	
Nerve growth factor (NGF)	p75NTR, TrkA
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	p75NTR, TrkB
Neurotrophin-3 (NT-3)	p75NTR, TrkC
Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)	p75NTR, TrkB
LIF/CNTF Familie	
Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	CNTFR α , LIFR β , gp130
Leukemia inhibitory factor (LIF)	LIFR β , gp130
Cardiotrophin-1 (CT-1)	LIFR β , gp130
Cardiotrophin-1-like cytokine (CLC)	LIFR β , gp130
Insulin-like growth factor Familie	
Insulin-like growth factor-I (IGF-I)	IGFR-1
Insulin-like growth factor-II (IGF-II)	IGFR-1
Glial-derived neurotrophic factor Familie	
Glial-derived neurotrophic factor (GDNF)	GFR α 1, c-ret
Neurturin (NTR)	GFR α 2, c-ret
Artemin	GFR α 3, c-ret
Persephin	GFR α 4, c-ret
Hepatocyte growth factor Familie	
Hepatocyte growth factor (HGF)	c-Met

Tabelle 1-1: Die Familien neurotropher Faktoren und ihre Rezeptoren



Das reife Protein wird deshalb erst durch proteolytische Abspaltung erhalten, was gemeinhin als Möglichkeit gilt, die Funktion von Neurotrophinen auf posttranslationeller Ebene weiter zu modifizieren (Lee et al., 2001). Die reifen Neurotrophine besitzen eine Molekülmasse von etwa 13 kDa und lagern sich in wässriger Lösung zu nicht-kovalent gebundenen Homodimeren zusammen (Barde, 1990; Ibanez, 1998). Eine für sezernierte Proteine eher ungewöhnliche Eigenschaft ist der sehr im basischen Bereich liegende isoelektrische Punkt von Neurotrophinen, was aber möglicherweise einen eingeschränkten Wirkungsradius widerspiegelt. Des Weiteren ist die Ausbildung von Disulfidbrücken, formiert zum sogenannten Cystein Knoten, ein charakteristisches Merkmal der Neurotrophin-Protomere (McDonald et al., 1991). Neurotrophine interagieren mit zwei unterschiedlichen Klassen von Transmembranrezeptoren, dem p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR) und den Rezeptoren der Trk-Familie. Die Familie der Neurotrophin-Rezeptoren ist in Abbildung 1-5 gezeigt.

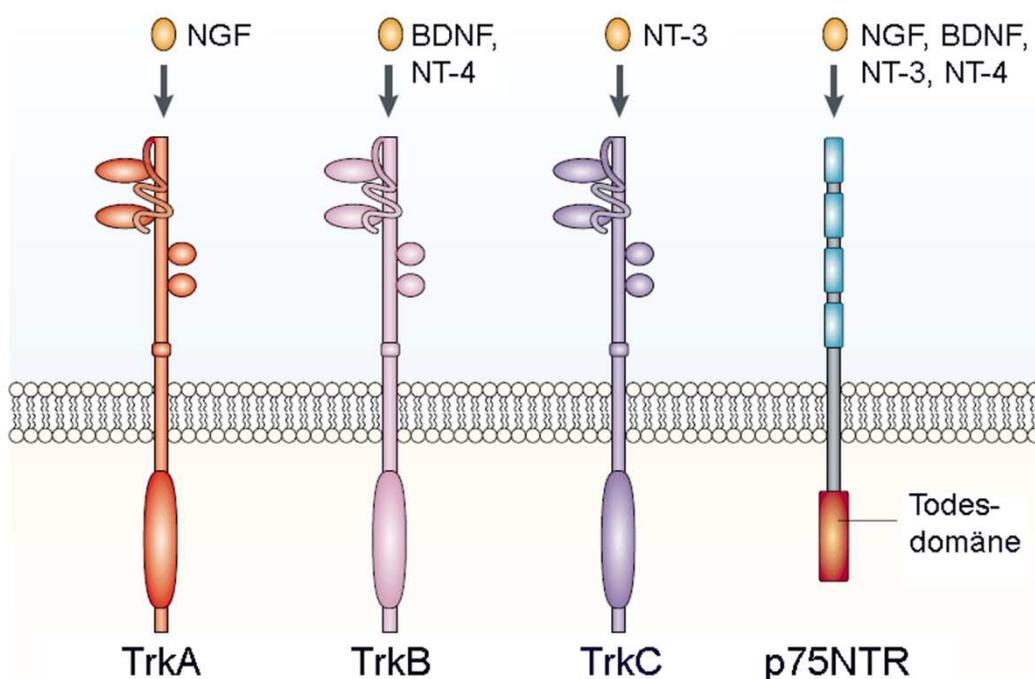


Abbildung 1-5: Die Familie der Neurotrophinrezeptoren

Die drei Mitglieder der Trk-Neurotrophinrezeptor-Familie sind klassische Rezeptor-Tyrosinkinasen und besitzen spezifische Affinitäten gegenüber ihren jeweiligen Liganden. Der p75 Neurotrophinrezeptor (p75NTR) bindet dagegen alle vier Neurotrophine der Säugetiere mit einer vergleichbaren Affinität. Der p75NTR hat keine intrazelluläre Kinasedomäne, rekrutiert aber zur Signalweiterleitung eine Vielzahl von Effektorproteinen. Modifiziert nach Chao, 2003.



1.4.2 Der p75 Neurotrophin-Rezeptor

Der p75NTR wurde zunächst als niedrig affiner Rezeptor für NGF identifiziert. Bald wurde jedoch gezeigt, dass alle vier Familienmitglieder an den p75NTR mit vergleichbarer Affinität binden ($K_{D(p75)} < 10^{-9}$ M) (Frade and Barde, 1998; Rodriguez-Tebar et al., 1990). Der p75NTR gehört zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF-)Rezeptoren, bestehend aus einer extrazellulären Domäne mit vier Cysteinreichen Motiven, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, die eine so genannte Todesdomäne beinhaltet (He and Garcia, 2004; Liepinsh et al., 1997). Obwohl der p75NTR keine eigentliche enzymatisch aktive Domäne besitzt, können an den aktivierten Rezeptor zahlreiche Proteine binden, die ihrerseits Signale weiterleiten, die neuronales Überleben, Differenzierung und Plastizität beeinflussen.

1.4.3 Die Familie der Trk-Rezeptoren

Die drei Mitglieder der Trk- (tropomyosin related kinase-)Rezeptor-Familie TrkA, TrkB und TrkC bilden neben dem p57NTR die Zweite Klasse von Neurotrophin-Rezeptoren in Säugetieren (Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003). Die extrazelluläre Domäne der Trk-Rezeptoren besitzt ein Cystein-reiches Cluster (C1), gefolgt von drei Leucin-reichen Motiven (Leucin rich repeats, LRRs 1-3). Auf ein weiteres Cystein-reiches Cluster (C2) folgen zwei Immunglobulin-artige Domänen (immunoglobulin-like domains Ig1, Ig2). Die intrazelluläre Domäne der Trk-Rezeptoren besteht im Wesentlichen aus einer Tyrosinkinase-Domäne. Im Unterschied zum p75NTR kommt es bei den Trk-Rezeptoren nach der Bindung des Liganden zu einer Dimerisierung zweier Trk-Monomere, die zu einer Autophosphorylierung in den zytosmatischen Domänen führt (Kaplan and Miller, 2000). Die dort zu findenden Tyrosine dienen in Abhängigkeit ihrer Phosphorylierung als Bindungsstellen für zytosmatische Enzyme und Adaptorproteine. Die verschiedenen Neurotrophine binden dabei spezifisch und aktivieren selektiv einzelne Trk-Rezeptoren. NGF bindet an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC, wobei auch die Aktivierung von TrkA und TrkB durch NT-3 beschrieben werden konnte (Farinas et al., 1998; Huang et al., 1999). Die selektiven Interaktionen von Neurotrophinen und Trk-Rezeptoren wurden ursprünglich als hoch affin angesehen ($K_{D(Trk)} < 10^{-12}$ M) (Kaplan and Miller, 2000; Dechant and Barde, 1997; Barbacid, 1994). Tatsächlich binden NGF und BDNF nur mit niedriger Affinität an TrkA bzw. TrkB (Dechant, 1993; Mahadeo et al.,



1994; Schropel et al., 1995). Erst durch Rezeptor-Dimerisierung, strukturelle Modifikationen und Interaktion mit dem p75NTR (vgl. 1.4.4) wird eine hohe Affinität erreicht (Arevalo, 2000; Esposito, 2001).

1.4.4 Die Regulation von Neurotrophin-induzierten Signalwegen

Die generelle Responsivität von Nervenzellen gegenüber Neurotrophinen wird nicht nur durch die bloße Expression ihrer Rezeptoren bestimmt. So wird die Fähigkeit der Trk-Rezeptoren zur Ligandenbindung und nachfolgender Signaltransduktion ebenso durch das alternative Spleißen ihrer Transkripte moduliert. Werden dabei beispielsweise kurze Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domänen von TrkA, TrkB oder TrkC hinzugefügt, verändert sich deren Ligandenbindung (Clary and Reichardt, 1994; Meakin et al., 1992; Shelton et al., 1995; Strohmaier et al., 1996). Im Fall von TrkA und TrkB führt eine solche Veränderung dazu, dass es zur Rezeptoraktivierung nicht nur durch Bindung der spezifischen Liganden NGF und BDNF, sondern auch durch Bindung von NT-3 (Clary and Reichardt, 1994) und NT-4/5 kommt (Strohmaier et al., 1996). Auch werden Neurotrophin-induzierte Signalwege durch das alternative Spleißen von Exonen, die für intrazelluläre Domänen von Trk-Rezeptoren kodieren, modifiziert. Die Expression von Trk-Rezeptoren mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne ohne Kinasedomäne kann dabei zur Inhibition von Neurotrophin-induzierten Signalen führen, da keine funktionsfähigen Rezeptordimere ausgebildet werden können (Eide et al., 1996). Die Bindung von BDNF an derartig trunkierte TrkB-Isoformen kann aber auch spezifische Signalwege auslösen, wie die G-Protein- und Inositol-3-phosphat- (IP3-)abhängige Freisetzung intrazellulären Kalziums (Ca^{2+}) (Rose et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit der Modulation von Neurotrophinbindung und -aktivität besteht in der Lokalisation von Trk-Rezeptoren. In einigen Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) ist beispielsweise TrkB an intrazellulären Membrankompartimenten lokalisiert. Hier kommt es erst nach vorangehenden Stimuli wie dem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Ca^{2+} zum Einbau von TrkB in die Zellmembran, wodurch der Rezeptor erst für extrazelluläre BDNF-Stimuli zugänglich wird (Meyer-Franke et al., 1998). Wie kürzlich gezeigt werden konnte, ist diese Art der Rekrutierung von TrkB an die Zellmembran kortikaler Neurone von einem intakten Zytoskelett abhängig und wird außerdem durch die Phosphorylierung von TrkB an S478 durch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) vermittelt (Zhao et al.,



2009). TrkB wird außerdem nach Ligandenbindung zu cholesterinreichen Zellmembranbereichen (lipid rafts) rekrutiert, was für die weitere Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung zu sein scheint (Du, 2003). Dies wird nicht zuletzt durch eine neuere Arbeit unterstrichen, in der gezeigt werden konnte, dass allein die altersbedingte Abnahme von Cholesterin in kortikalen Nervenzellen zu einem Neurotrophin-unabhängigen Anstieg der Aktivität von TrkB führt, was wiederum zum Überleben dieser Zellen beiträgt (Martin et al., 2009). Zuletzt erfolgt auch die Endozytose von Trk-Rezeptoren in Abhängigkeit von Ligandenbindung genauso wie durch Anstieg intrazellulären Ca^{2+} (Du, 2003).

Trk-Rezeptoren werden funktionell auch durch die Interaktion mit dem p75NTR reguliert. In erster Linie wird die Spezifität von Trk-Rezeptoren für ihre bevorzugten Liganden durch die Assoziation mit dem p75NTR erhöht, wodurch eine selektive Bindung von Neurotrophinen sichergestellt wird (Arevalo, 2000; Esposito, 2001; Bibel et al., 1999). Der p75NTR beeinflusst ebenfalls den retrograden Transport von Neurotrophinen (Curtis et al., 1995) und die Internalisierung und Degradation von Trk-Rezeptoren, wodurch Neurotrophin-induzierte Signale weiter moduliert werden können (Makkerh et al., 2005; Geetha et al., 2005; Arevalo et al., 2006). Die Verfügbarkeit von Neurotrophinen selbst wird insofern reguliert, als der p75NTR das Auswachsen von Axonen und damit die Innervierung von Zielgebieten fördert (Harrison et al., 2000; Bentley and Lee, 2000).

1.4.5 Signaltransduktion des p75NTR

Die Aktivierung des p75NTR hat mittels der Bindung zahlreicher Adaptor- und Effektorproteine im Zytoplasma weitreichende Auswirkungen auf die Biologie einer Nervenzelle (Yamashita et al., 2005). Wie Lee et al. 2001 zeigten, sind es vor allem die unreifen Pro-Neurotrophine, die mit hoher Affinität an den p75NTR binden (Lee et al., 2001). Die dadurch ausgelösten Signalwege konnten seitdem in zahlreichen Zelltypen als Zelltod-auslösend identifiziert werden (Lee et al., 2001; Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005; Harrington et al., 2004; Beattie, 2002; Casaccia-Bonnel et al., 1996; Frade et al., 1996). Der hauptsächliche Vermittler solcher Apoptosesignale ist dabei die Jun N-terminale Kinase (JNK). Ermöglicht wird die Bindung von Pro-Neurotrophinen durch die Assoziation des p75NTR mit Sortilin, welches spezifisch an die Pro-Domänen von Pro-NGF und Pro-BDNF bindet (Nykjaer et al., 2004). Sortilin gehört zur Familie der an der intrazellulären Sortierung von Proteinen beteiligten



Vps10p-Rezeptoren und fungiert als Ko-Rezeptor des p75NTR, der auch die Verteilung des p75NTR zwischen intrazellulären Golgi-Kompartimenten und Zellmembran reguliert (Nielsen et al., 2001; Mazella, 2001).

Über die Aktivierung von NF- κ B ist der p75NTR aber auch in der Lage, überlebensfördernde Signale weiterzuleiten, was beispielsweise, wie in Abschnitt 1.4.5 beschrieben, in Kooperation mit Trk-Rezeptoren ermöglicht wird. Ganz in Abhängigkeit des jeweiligen Bindungspartners kann der p75NTR also sowohl das Überleben (p75NTR/Trk) von Nervenzellen unterstützen, als auch deren Zelltod auslösen (p75NTR/Sortilin).

1.4.6 Signaltransduktion von Trk-Rezeptoren

Trk-Rezeptoren sind typische Mitglieder der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Familie, die nach Neurotrophinbindung dimerisieren und durch eine *trans*-Autophosphorylierung intrazelluläre Tyrosine phosphorylieren. Diese rekrutieren als Bindungsstellen für Proteine mit Phosphotyrosinbindungs-(PTB-) bzw. Src-Homologie-(SH2-) Domänen zahlreiche Effektorproteine. Die dadurch hauptsächlich aktivierten Signalwege sind MAPK, PI3K und PLC γ .

Zu einer transienten Aktivierung von MAPK kommt es dabei über die Rekrutierung und Aktivierung von Shc (Nimnual et al., 1998). Länger anhaltende Aktivierung von Ras und damit des MAPK-Signalwegs wird erst durch die Bindung von Frs2 an die selbe Bindungsstelle ermöglicht (Kao et al., 2001). Durch die Assoziation von Trk-Rezeptoren mit ARMS, einem Ankyrin-reichen Transmembranprotein, kommt es ebenfalls zu einer lang anhaltenden MAPK-Aktivierung (Arevalo, 2001). Hier wird die MAPK-Kaskade über eine Phosphorylierung von Rap1 und B-RAF aktiviert (York, 1998). Wie im Jahr 2000 durch eine Mutationsstudie bei sympathischen Nervenzellen gezeigt werden konnte, wird durch eine Veränderung der Shc-Bindungsstelle von TrkB speziell das Überleben und das Auswachsen von Axonen beeinträchtigt, wobei dafür gleichzeitig die Aktivierung von MEK für beide Effekte als notwendig beschrieben wurde (Atwal et al., 2000). Die physiologische Bedeutung der unterschiedlichen Dauer einer MAPK-Aktivierung konnte ursprünglich in der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 gezeigt werden. Die Stimulation mit EGF führt dort lediglich zu einer transienten Aktivierung der MAPK-Kaskade (< 60 min) und fördert die Proliferation der Zellen. Für eine Differenzierung mit dem Auswachsen von Neuriten ist jedoch eine



lang anhaltende Aktivierung erforderlich (> 90 min), die durch die NGF-vermittelte Aktivierung von TrkA ausgelöst wird (Wixler et al., 1996; Traverse et al., 1992). Je nach Art der Aktivierung führt hier also ein und derselbe Signalweg zu ganz unterschiedlichen Konsequenzen für die einzelne Zelle.

Die Rekrutierung des Adapterproteins Shc an Trk-Rezeptoren führt über Grb2 auch zur Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) (Holgado-Madruga et al., 1997), welche die Phosphorylierung von Inositolphospholipiden katalysiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase B (AKT), die selbst zahlreiche für das Überleben wichtige Substrate phosphoryliert (Brunet et al., 2001).

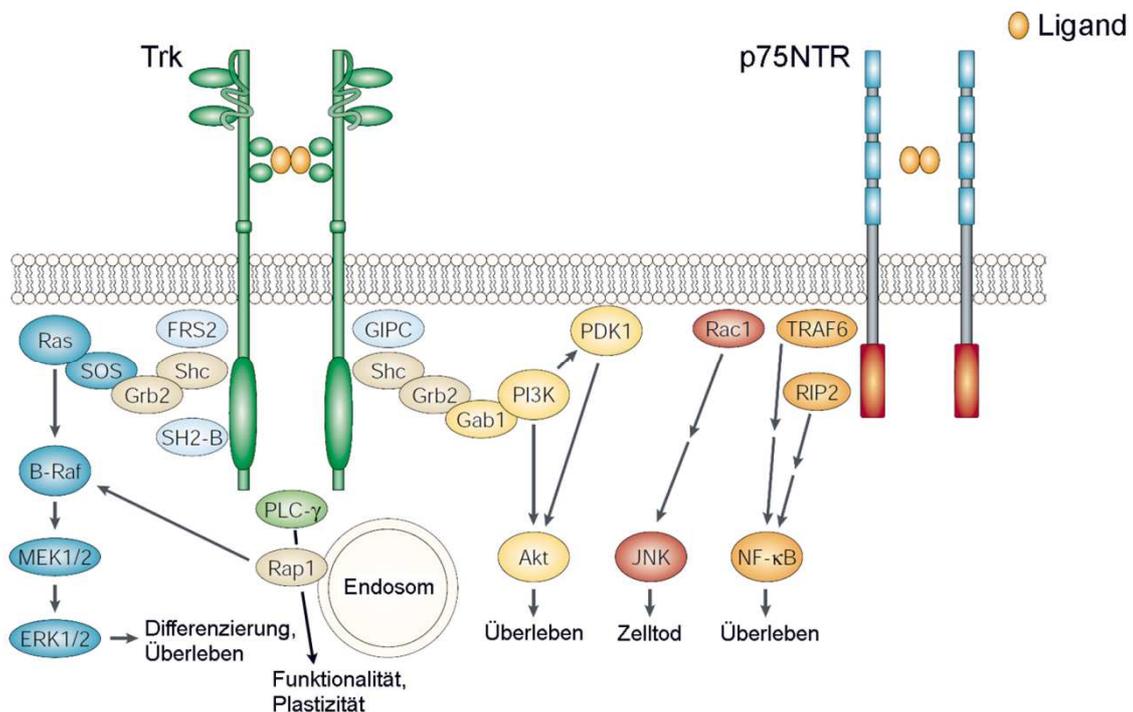


Abbildung1-6: Die Signaltransduktion der Neurotrophin-Rezeptoren

Trk-Rezeptoren unterstützen das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen über die Aktivierung von Raf/MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegen. Die Rekrutierung von PLC γ beeinflusst dagegen deren Funktionalität und Plastizität. Der p75NTR kann je nach den Begleitumständen über die Aktivierung der Jun N-terminalen Kinase (JNK) oder NF- κ B sowohl das Überleben als auch den Zelltod propagieren. Akt: Proteinkinase B; FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2; Gab1: Grb2-associated binder-1; Grb2: growth factor receptor-bound protein 2; GIPC: GAIP interacting protein; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1; SH2B: Src homology 2-B; SOS: Son of Sevenless; TRAF6: tumor necrosis factor receptor associated-factor 6. Modifiziert nach Chao, 2003.



Die Teilnahme von AKT an einem Komplex mit B-Raf, Hsp70 und Bag-1 führt in diesem Zusammenhang zur Phosphorylierung von BAD, einem pro-apoptotischen Protein, das an den Mitochondrien lokalisiert ist. Die Phosphorylierung von BAD führt dabei zur Sequestrierung des Proteins durch 14-3-3-Proteine, wodurch dessen pro-apoptotische Funktion verhindert wird (Götz et al., 2005; Jablonka et al., 2004). Die AKT-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors forkhead (FKHRL1) führt ebenfalls zu dessen Sequestrierung im Zytoplasma, so dass die Aktivierung von pro-apoptotischen Genen unterbleibt (Brunet et al., 2001). Außerdem führt die Phosphorylierung von I κ B zur Freisetzung von NF- κ B, wodurch es zur Aktivierung von Genen kommt, die das Überleben von sensorischen Nervenzellen unterstützen (Hamanoue et al., 1999).

Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs führt außerdem zur Rekrutierung von Proteinen an die Zellmembran, die wichtige Funktionen für die Differenzierung von Neuronen besitzen. Dabei handelt es sich überwiegend um Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) wie Cdc42, Rac und Rho. Diese tragen maßgeblich zur Regulation der Dynamik des F-Aktin-Zytoskeletts bei und werden unter anderem für Neurotrophin-induzierte Bewegungen von Wachstumskegeln verantwortlich gemacht (Yuan et al., 2003). Schließlich konnte 2002 gezeigt werden, dass die tangentielle Migration von Interneuronen während der Kortikogenese der Mitwirkung von TrkB-abhängiger Aktivierung des PI3K-Signalwegs bedarf (Polleux et al., 2002).

Die Rekrutierung der Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC γ) erfolgt an einer Bindungsstelle um ein konserviertes Tyrosin am äußersten C-Terminus aller drei Trk-Rezeptoren. Aktivierte PLC γ führt durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zur Entstehung von Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Die Anwesenheit von IP $_3$ führt zur Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus zytoplasmatischen Speichern. DAG aktiviert spezielle Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Zusammen mit der Aktivierung von Ca $^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) kontrolliert die Rekrutierung von PLC γ durch aktivierte Trk-Rezeptoren insgesamt die Aktivität und/oder Expression einer großen Zahl von Proteinen, einschließlich Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren (Toledo-Aral et al., 1995; Minichiello et al., 2002; Klein et al., 2005). Wie gezeigt werden konnte, ist die PLC γ -Bindungsstelle von Trk-Rezeptoren damit größtenteils an Mechanismen beteiligt, die auf die funktionelle Plastizität von Nervenzellen einwirken (Minichiello et al., 2002; Gartner et al., 2006). Durch die Mutation der PLC γ -Bindungsstelle von TrkB konnte außerdem gezeigt



werden, dass die Effekte der hier ausgelösten Signalwege eine eher untergeordnete Rolle für das Überleben von Nervenzellen spielen dürften, da das Überleben von sympathischen Neuronen mit einer solchen TrkB-Mutation nicht gestört war (Atwal et al., 2000).

1.4.7 Die Transaktivierung von Trk-Rezeptoren

Überraschenderweise wurde in den letzten Jahren deutlich, dass Trk-Rezeptoren auch in Abwesenheit ihrer eigentlichen extrazellulären Liganden aktiviert werden können. Ähnlich wie zahlreiche andere membranständige Rezeptoren (Daub et al., 1996; Luttrell et al., 1999; Fischer et al., 2003) konnte auch für Trk-Rezeptoren eine Transaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) nachgewiesen werden (Lee and Chao, 2001; Lee et al., 2002a). Die physiologische Bedeutung solcher Transaktivierungsereignisse konnte anhand des TrkB-abhängigen Überlebens von Motoneuronen in einem klassischen Nervenläsions-Paradigma gezeigt werden. Ähnlich wie BDNF führt auch die Applikation von CGS21680, eines Agonisten des A_{2A}-Adenosinrezeptors, zu einer TrkB-abhängigen Verhinderung des Absterbens von Motoneuronen nach Läsion des Fazialisnervs (Wiese et al., 2007). Die Transaktivierung findet dabei an intrazellulären Membranen statt (Rajagopal et al., 2004), was nahelegt, dass die gezielte Lokalisation von Trk-Rezeptoren mit darüber bestimmt, ob eine Transaktivierung durch andere Rezeptorsysteme erfolgen kann oder nicht. Als Vermittler der Signalübertragung von GPCRs zu Trk-Rezeptoren konnte FYN, ein Mitglied der Src-Kinase Familie, identifiziert werden. FYN kolokalisiert dabei mit Trk-Rezeptoren an intrazellulären Membranen und transaktiviert diese nach GPCR vermittelter Aktivierung (Rajagopal and Chao, 2006). In der Zwischenzeit konnten solche Transaktivierungsereignisse auch bei weiteren Rezeptorsystemen beobachtet werden. So zeigen beispielsweise Neurone des Striatums eine Dopamin D1-Rezeptor-abhängige TrkB-Aktivierung (Iwakura et al., 2008), und auch neuroprotektive Effekte von Glukokortikoiden konnten auf eine Aktivierung von Trk-Rezeptoren zurück geführt werden (Jeanneteau et al., 2008). Schließlich konnten Huang et al. 2008 zeigen, dass die Funktionalität von Moosfasersynapsen in der CA3-Region des Hippokampus durch die Transaktivierung von TrkB durch Zink-Ionen beeinflusst wird (Huang et al., 2008). Die von Liganden unabhängige Aktivierung bietet offensichtlich eine Möglichkeit der Zusammenführung vielfältiger Signale, so dass Trk-Rezeptoren



in Nervenzellen als integrative Zentren von Stimuli unterschiedlichster Art dienen könnten.

1.4.8 Die Rolle von BDNF/TrkB-Signalwegen in Nervenzellen

Die Aktivierung von TrkB durch BDNF hat in Nervenzellen eine Vielzahl von Auswirkungen. Von der frühen Embryonalentwicklung bis hin zum adulten Organismus finden sich unzählige Ereignisse, in die BDNF/TrkB regulierend eingreift. Wie bereits in den Abschnitten 1.4.6 und 1.4.7 beschrieben, geht das Wirkungsspektrum hierbei von Steuerung des Überlebens, der Proliferation und der Differenzierung von embryonalen Zellen (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994; Schober, 1998; Rohrer et al., 1999; Gates et al., 2000; Turner et al., 2006; Wiese et al., 2007), bis hin zu funktioneller Modulation adulter Nervenzellen (Korte et al., 1995; Minichiello et al., 1999; Minichiello et al., 2002; Gartner et al., 2006). Dabei wird die neuronale Funktionalität nicht nur an bereits bestehenden Synapsen moduliert. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, spielt TrkB auch eine wichtige Rolle in der Etablierung neuronaler Netzwerke, indem speziell die Differenzierung der dendritischen, postsynaptischen Bereiche von Körnerzellen im *Gyrus dentatus* des Hippokampus reguliert wird (Bergami et al., 2008; Li et al., 2008). Die Störung solcher Regulationsprozesse hat damit auch ernste Konsequenzen für das Verhalten eines Organismus. Nicht nur Schwächen in Lernen und Gedächtnis, auch Stimmungsschwankungen mit depressionsartigen Zuständen können die Folge einer mangelhaften BDNF/TrkB Signalübertragung sein (Bergami et al., 2008; Egan, 2003; Sen, 2003; Chen et al., 2006). Außerdem wurde beobachtet, dass die Wirkung verschiedener antidepressiver Therapien von einer regulären BDNF/TrkB-Funktion abhängt (Li et al., 2008; Rantamaki et al., 2007).

Auch für die Entstehung der Hirnrinde scheint TrkB von enormer Wichtigkeit zu sein. Dabei lag der Fokus bisheriger Studien auf der Entwicklung des dorsalen Telenzephalons, aus dem im weiteren Verlauf der zerebrale Kortex hervorgeht (siehe oben). Die Expression von TrkB lässt sich dort bereits ab E9 beobachten (Cheng et al., 2003). Wie in der Ratte gezeigt werden konnte, wird TrkB dabei vor allem in jungen Nervenzellen exprimiert, die aus dem proliferativen Zellpool der Ventrikularzone hervorgehen und in radialer Richtung in die kortikale Platte einwandern (Behar, 1997). Das Fehlen bzw. die Inhibition von TrkB während der Kortikogenese führt zu Störungen der Proliferation neuraler Stammzellen (Bartkowska et al., 2007) und vor



allem zu einer gestörten Migration neugeborener Neurone (Bartkowska et al., 2007; Medina et al., 2004). Durch Mutationsstudien konnte hierbei gezeigt werden, dass für die korrekte Positionierung von kortikalen Neuronen sowohl das Tyrosin der PLC γ - (Y816) als auch das der Shc-Bindungsstelle (Y515) von TrkB benötigt wird. Interessanterweise erfolgt die Expression des TrkB-Liganden BDNF erst mit Verzögerung etwa ab E12,5. Eine maßgebliche Hochregulation ist sogar erst in postnatalen Stadien zu beobachten (Cheng et al., 2003; Visel et al., 2007; Maisonpierre et al., 1990). Diese Diskrepanz in der Expression von Ligand und Rezeptor lässt vermuten, dass TrkB in frühen Phasen der Kortexentwicklung durch alternative Stimuli aktiviert und reguliert werden muss.

Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen in frühen Phasen der Kortikogenese ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Der epidermale Wachstumsfaktor und sein Rezeptor

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) wurde 1962 von Stanley Cohen entdeckt (Cohen, 1962). EGF wird als transmembranes Vorläuferprotein mit 1217 Aminosäuren (AS) exprimiert, welches erst durch proteolytische Spaltung zum reifen EGF-Molekül mit 53 AS wird (Carpenter and Cohen, 1979). Das Vorläuferprotein bindet ebenso wie das reife EGF an den EGF-Rezeptor, wodurch es eine wichtige Funktion bei Zell-Zell-Kontakten spielt und auch bei der Erzeugung lokaler Stimuli notwendig ist, die Zellwanderung, Zellwachstum oder auch lokal begrenzte morphologische Veränderungen einer Zelle regulieren (Yamada et al., 1997; Wong, 2003). Der EGF-Rezeptor gehört zu einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Familie, die des Weiteren noch aus den strukturell verwandten ErbB2, ErbB3 und ErbB4-Rezeptoren besteht (Yarden and Sliwkowski, 2001; Yarden, 2001).

1.5.1 Die EGF-Rezeptor-Familie

Die EGF-Rezeptor-Proteinfamilie besteht aus den vier Transmembranrezeptoren EGFR (ErbB1, HER-1), ErbB2 (Neu, HER-2), ErbB3 (HER-3) und ErbB4 (HER-4) (Schlessinger, 2002) und interagiert mit einer Gruppe von 13 extrazellulären Liganden, die alle über eine konservierte EGF-Domäne verfügen. ErbB-Rezeptoren dimerisieren nach Ligandenbindung, wodurch es zur Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne kommt und spezifische Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domä-



ne phosphoryliert werden (Yarden and Sliwkowski, 2001). Obwohl ErbB-Rezeptoren damit als archetypische Vertreter von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gelten, werden die von ihnen induzierten Signalwege von der Tatsache beeinflusst, dass sich die einzelnen Familienmitglieder zu unterschiedlichen Homo- und Heterodimeren assoziieren können. Sowohl ErbB2 als auch ErbB3 agieren dabei nicht eigenständig. So ist ErbB2 auf der einen Seite nicht fähig, Liganden zu binden (Klapper et al., 1999), auf der anderen Seite besitzt ErbB3 eine nicht funktionelle intrazelluläre Kinasedomäne (Guy et al., 1994). Trotzdem nehmen beide an Liganden-induzierten Signalwegen teil, indem sie als Ko-Rezeptoren der weiteren ErbB-Familienmitglieder deren Fähigkeit zur Ligandenbindung und Signaltransduktion modulieren (Graus-Porta et al., 1997). Die Spezifität der zellulären Signale wird schließlich durch die Natur der an den aktivierten Rezeptor rekrutierten Moleküle bestimmt, wobei es sich hauptsächlich um Proteine mit Src-Homologie 2-Domänen (SH2) handelt wie Shc, Grb2 oder auch PLC γ (Hynes and Lane, 2005; Yarden and Sliwkowski, 2001). Zusammen mit den zahlreichen Liganden der ErbB-Familie ergibt sich somit ein sehr breites Spektrum induzierter Signalkaskaden. Die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben läuft dabei hauptsächlich über MAPK-, STAT3-, STAT5- und PI3K-Signalwege.

1.5.2 Die Liganden der EGFR/ErbB-Familie

Die Liganden der EGFR/ErbB-Familie bilden eine Gruppe strukturell verwandter Wachstumsfaktoren, die alle eine konservierte EGF-Domäne besitzen. (Riese and Stern, 1998). Neben EGF sind TGF α (transforming growth factor α), Amphiregulin (AR), HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor), BTC (β -cellulin) und NDF/HRG (Heregulin) weitere Mitglieder dieser Gruppe. Alle diese Wachstumsfaktoren besitzen spezifische Bindungseigenschaften. EGF, Amphiregulin und TGF α binden vor allem an den EGFR, während Betacellulin, HB-EGF und Epregeulin gleichermaßen an EGFR und ErbB4 binden (Hynes et al., 2001). Die Neureguline (NRG) stellen eine dritte Ligandenfamilie dar, wobei NRG-1 und NRG-2 an ErbB3 und ErbB4 binden, während NRG-3 und NRG-4 die Liganden für ErbB4 sind, jedoch nicht für ErbB3 (Zhang et al., 1997; Harari et al., 1999). Ein spezifischer Ligand für ErbB2 konnte bislang nicht identifiziert werden. Da ErbB2 jedoch als Bindungspartner in Heterodimeren mit anderen ErbB-Familienmitgliedern identifiziert werden konnte (Graus-Porta et al., 1997), wird dessen hauptsächliche Funktion in der Modulation



der Liganden-vermittelten Signaltransduktion von ErbB-Rezeptoren gesehen (Yamada et al., 1997; Citri et al., 2003; Carpenter, 2003; Spencer et al., 2000; Zhang et al., 2007). Die Abbildung 1-7 gibt einen Überblick über die Familie der EGF Rezeptoren und deren Liganden.

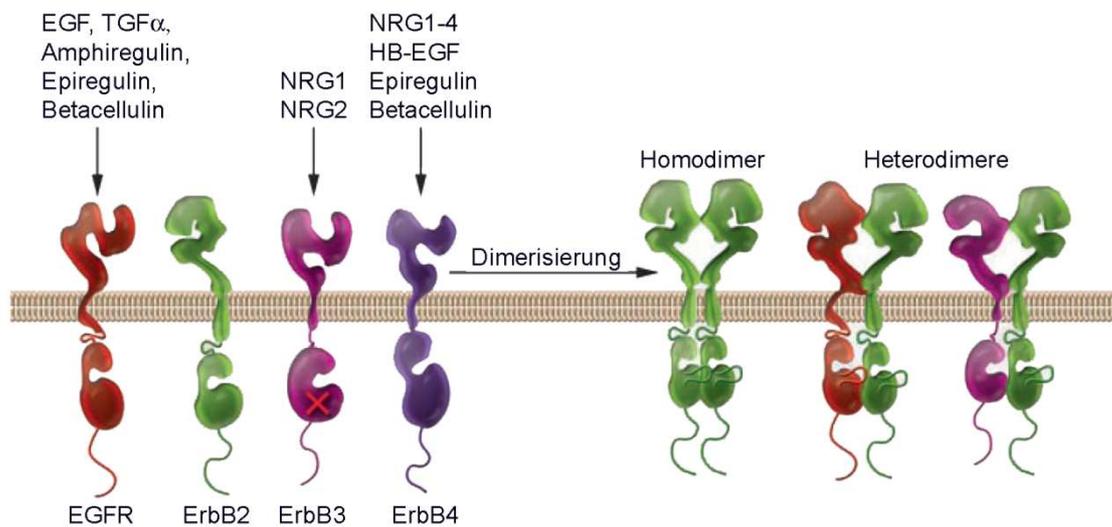


Abbildung 1-7 : Die Familie der EGF-Rezeptoren und ihre Liganden

Die vier Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 sind strukturell eng verwandt, mit umfangreichen Homologien sowohl in den extrazellulären Domänen als auch in den intrazellulären Kinasedomänen. Obwohl ErbB3 als einziges Familienmitglied keine Kinaseaktivität besitzt und für ErbB2 bislang keine Liganden identifiziert werden konnten, nehmen alle EGF-Rezeptoren an der Signalweiterleitung teil, indem sie nach Ligandenbindung zu Homo- und Heterodimeren unterschiedlichster Zusammensetzung dimerisieren können. EGF: epidermal growth factor; HB-EGF: Heparin binding EGF; NRG: Neuregulin. Modifiziert nach Zhang et al., 2007.

1.5.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors im zentralen Nervensystem

Die wichtige Funktion des EGF-Rezeptors für das zentrale Nervensystem zeigt sich in der umfassenden Expression in vielen Hirnarealen. So wird der EGF-Rezeptor beispielsweise in den Purkinjezellen des Kleinhirns, im *Gyrus dentatus* des Hippokampus und in den Schichten IV und V des zerebralen Kortex exprimiert (Yamada et al., 1997; Tucker et al., 1993a; Tucker et al., 1993b). In diesem Zusammenhang hat die Analyse von EGF-Rezeptor knockout Mäusen, in denen der EGF-Rezeptor genetisch deletiert wurde, viel zum Verständnis über die Rolle dieses Rezeptors während der embryonalen und postnatalen Entwicklung beigetragen. Mäuse ohne funktionstfähigen EGF-Rezeptor zeigen dabei eine vom genetischen Hintergrund abhängige



Letalität zwischen E11,5 (129/SV) bis zu etwa 20 Tagen nach der Geburt (MF1, C3H) (Sibilia and Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995; Miettinen et al., 1995). In den überlebenden Mutanten zeigt sich eine voranschreitende Neurodegeneration, die sich unmittelbar nach der Geburt beginnend vom frontalen Kortex und dem Riechkolben bis zum Thalamus ausbreitet, was letztendlich zum umfassenden Verlust von Nervenzellen und Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) im Gehirn führt (Sibilia et al., 1998; Kornblum et al., 1998). Zusätzlich kommt es zu einer Migrationsstörung von postmitotischen Nervenzellen im Hippokampus, wodurch Aggregate ektopischer Neurone entstehen, die schließlich ebenfalls in die Apoptose gehen (Sibilia et al., 1998).

Bereits während der Embryonalentwicklung scheint das Fehlen des EGF-Rezeptors die Entwicklung des zentralen Nervensystems insofern zu beeinträchtigen, als sowohl die radiale als auch die tangentielle Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen gestört ist. In *EGFR KO*-Mäusen kommt es dabei eher zu einer Akkumulation von Vorläuferzellen in den germinativen Zonen, als zu deren Wanderung in Richtung kortikaler Platte (radiale Wanderung) bzw. in Richtung des Riechkolbens (tangentielle Wanderung) (Threadgill et al., 1995). Damit übereinstimmend führt die Überexpression des EGF-Rezeptors im embryonalen Telenzephalon der Ratte zu einer Induktion radialer Einwanderung in die kortikale Platte (Burrows et al., 1997), und die Infusion von EGF in den lateralen Ventrikel zu einer Umlenkung von Zellen des RMS in Richtung des Kortex (Craig et al., 1996).

Ontogenetisch gesehen kommt es zur Expression von EGF-Rezeptor mRNA zuallererst in den germinativen Zonen des zentralen Nervensystems, was darauf hindeutet, dass der EGF-Rezeptor zusammen mit seinen Liganden an der Steuerung von embryonaler Neuroneogenese teilnimmt (Kornblum et al., 1997). Wie gezeigt werden konnte, bestimmt außerdem die zeitlich und räumlich regulierte Expression des EGF-Rezeptors im sich entwickelnden Vorderhirn über das Teilungs- und Migrationsverhalten von kortikalen Vorläuferzellen (Burrows et al., 1997). Unter anderem wird dabei der EGF-Rezeptor bei den asymmetrischen Teilungen in der VZ überwiegend an die Tochterzelle weitergegeben, die schließlich in Richtung der pialen Oberfläche zu wandern beginnt (Sun et al., 2005), was nahe legt, dass EGF-Rezeptor-vermittelte Signalwege über das Schicksal und den Verbleib von kortikalen Vorläuferzellen mitbestimmen. Die wichtige Rolle des EGF-Rezeptors für das Heranreifen kortikaler Nervenzellen konnte weiter unterstrichen werden, als gezeigt wurde,



dass die chemotaktische Steuerung der radialen Wanderung vom EGF-Rezeptor vermittelt wird (Caric et al., 2001). Auf diese Weise können Neurone letztlich eine exakt definierte Position im zerebralen Kortex erreichen, was als notwendige Voraussetzung für eine reguläre Differenzierung und die Integration in neuronale Netzwerke zu sehen ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Migration von postmitotischen Neuronen während der Entwicklung des zerebralen Kortex ist ein notwendigerweise strikt regulierter Prozess, um eine korrekte Positionierung von Nervenzellen und die damit verbundene Integration in neuronale Netzwerke zu gewährleisten. Das Fehlen oder die Inhibition des Neurotrophin-Rezeptors TrkB führt bereits in frühen Phasen der Kortikogenese zu Störungen, die zu einer fehlerhaften Positionierung von kortikalen Nervenzellen in späteren Stadien führen (Bartkowska et al., 2007; Medina et al., 2004). Durch eine stadien- und zelltypspezifische Deletion von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen auf der einen Seite und die Expression von punktmutierten TrkB-Isoformen auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass TrkB an der gerichteten Schichtbildung im zerebralen Kortex beteiligt ist und dabei die Bindungsstellen für sowohl Shc/Frs2 als auch PLC γ von entscheidender Bedeutung sind (Medina et al., 2004).

Die Aktivierung von TrkB erfolgt klassischerweise durch Liganden-vermittelte Rezeptordimerisierung, kann aber auch durch Transaktivierung über andere Rezeptorsysteme zustande kommen (Lee and Chao, 2001). Bisher konnten zahlreiche Rezeptorsysteme identifiziert werden, die funktionell mit TrkB interagieren, darunter G-Protein gekoppelte Rezeptoren, der Dopaminrezeptor D1 oder auch Glukokortikoid-Rezeptoren (Lee and Chao, 2001; Jeanneteau et al., 2008; Iwakura et al., 2008). In Motoneuronen wurde die physiologische Bedeutung der Transaktivierung von TrkB über den Adenosinrezeptor A2A deutlich. Hier kommt es nach Läsion des Fazialisnervs zu einer TrkB-abhängigen Erhaltung von Motoneuronen, nicht nur durch die Applikation von BDNF, sondern auch nach der Gabe eines Adenosinrezeptor-Agonisten, der über die Transaktivierung von TrkB zum Überleben von Motoneuronen beitragen kann (Wiese et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Mechanismen der TrkB-Aktivierung im dorsalen Telenzephalon aufgeklärt werden, wobei frühere Stadien der Kortexentwick-



lung (E10,5-E15,5) im Fokus stehen. Vor dem Hintergrund der verzögerten Expression des TrkB-Liganden BDNF sind dabei speziell Mechanismen der Transaktivierung, die von anderen Rezeptorsystemen ausgehen, von Interesse. Es soll des Weiteren untersucht werden, wie die Aktivierung von TrkB die Proliferation, Differenzierung und Migration von kortikalen Vorläuferzellen und frühen postmitotischen Nervenzellen reguliert. Dazu soll die Lokalisation von TrkB in Bezug auf Zelltyp-Spezifität und intrazelluläre Verteilung und Dynamik aufgeklärt werden. Außerdem sollen anhand genetischer Mausmodelle die durch fehlende TrkB-Signalübertragung entstehenden Störungen in der Kortexentwicklung charakterisiert werden.





2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Geräte

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	Mini Protean® Tetra Cell BioRad, München
Semi-Dry Western Blot-Kammer	EBU-4000 C.B.S. Scientific CO. Del Mar, CA 92014, USA
Netzgerät	Standard Power Pack P25 Biometra, München
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Centrifuge 5804R Centrifuge 5810R Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermomixer 5437 Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Thermocycler personal Thermocycler gradient Eppendorf, Hamburg
Horizontal-Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotech. GmbH Erlangen
Zellkultur-Inkubatoren	Hera cell 240 Hera cell 150 Thermo scientific, Braunschweig
Steril-Werkbank	LaminAir Heraeus, Hanau
Kryotom	Modell CM 1950 Leica, Wetzlar



Konfokales Mikroskop	TCS SP2
	Leica, Wetzlar
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	X-Omat 2000
	Kodak, Stuttgart

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) in Analysequalität bezogen.

2.1.3 Medien und Antibiotikallösungen für mikrobiologische Methoden

LB (Luria Bertani)-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)

10 g/l Bacto-Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 pH 7,0

LB-Agar (Sambrook et al., 1989)

10 g/l Bacto-Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 7,5 g/l Select Agar
 pH 7,0

Medien und Agar wurden für 20 Minuten bei 121 °C im Dampfsterilisator autoklaviert.

Ampicilin (1000X)

50 mg/ml
 in ddH₂O



Kanamycin (1000X)

30 mg/ml

in ddH₂O

Antibiotikallösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

2.1.4 Material für molekularbiologische Methoden

DNA-Größenstandards	GeneRuler™ 100 bp DNA ladder GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, MBI-Fermentas, St.Leon-Roth
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, St.Leon-Roth
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)	MBI-Fermentas, St.Leon-Roth
T4-Ligase	MBI-Fermentas, St.Leon-Roth
dNTPs (PCR grade)	MBI-Fermentas, St.Leon-Roth
iProof™ High Fidelity DNA Polymerase	BioRad, München
Sequenzierkit	Big Dye® terminator v3.1 Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.5 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden***Herstellung chemisch kompetenter Bakterien*****RF1**

100mM Rubidiumchlorid
50 mM Manganchlorid
30 mM Kaliumacetat
10 mM Kalziumchlorid-Dihydrat
15 % Glycerin
pH 5,8
sterilfiltriert



RF2

10 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
10 mM Rubidiumchlorid
75 mM Kalziumchlorid-Dihydrat
15 % Glyzerin
pH 6,8
sterilfiltriert

Alkalische Lyse

Lösung I

50 mM Glukose
25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 8,0
10 mM Ethylendiamintetraacetat
10 µg/ml RNase

Lösung II

0,2 M Natriumhydroxid
1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

Lösung III

60 ml 5 M Kaliumacetat
11,5 ml Eisessig
28,5 ml H₂O
→ 3 M Kalium, 5 M Acetat

Agarosegelelektrophorese

50X TAE

2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
25 mM Natriumacetat
50 mM Ethylendiamintetraacetat



6X Ladepuffer

30 % Glycerin
 0,15 % Bromphenolblau
 0,15 % Xylencyanol
 1X TAE

Ethidiumbromidlösung

10 µg/ml

Isolation genomischer DNA aus Gewebe**Tail-Lysispuffer**

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
 100 mM Ethylendiamintetraacetat
 150 mM Natriumchlorid
 0,5 % SDS
 10 mg/ml Proteinase K

TE-Puffer

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
 1 mM Ethylendiamintetraacetat

Isolation von RNA aus kortikalen Vorläuferzellen

TRizol[®] Reagent

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.6 Material für proteinbiochemische Methoden

Molekulargewichtsmarker

PageRuler™

Prestained Protein Ladder

Fermentas

Protein-G-Agarose

Roche Diagnostics, Mannheim

Protease-Inhibitoren

Complete Mini[®]

Roche Diagnostics, Mannheim



Phosphatase-Inhibitoren	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 Sigma
Nitrocellulose Transfer Membran	Protran® Schleicher & Schüll
Filterpapier	Gel Blotting Papier 190 g/m ² Schleicher & Schüll
Detektionslösung	Amersham™ ECL™ Western blotting detection reagents GE Healthcare UK Limited
Röntgenkassette	Suprema 13 x 18 cm Dr. Goos
Röntgenfilme	Super RX 13 x 18 cm Fuji Film

2.1.7 Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden

TBST für Western Blot 10X

100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
1,5 M NaCl
0,5 % v/v TWEEN20

SDS-PAGE-Trenngelpuffer 4X

1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 8,8
0,4 % SDS

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer 4X

0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 6,8
0,4 % SDS



SDS-PAGE-Gellaufpuffer 5X

125 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
1 M Glycin
0,5 % SDS

Laemmli-SDS-PAGE-Ladepuffer 2X

100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 6,8
10 % 2-β-Mercapto-Ethanol
4 % SDS
20 % Glycerin
0,2 % Bromphenolblau

Transferpuffer für Western Blot 1X

25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 8,3
150 mM Glycin
10 % Methanol

Lysispuffer (Protein) 1X

25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
2 mM Ethylendiamintetraacetat
2 mM Ethylenbis(oxyethylnitrilo)-tetraacetat
10 % Glycerin
0,1 % Nonidet P40

Waschpuffer Hochsalz

50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
500 mM NaCl
0,1 % Nonidet P40
0,05 % Natriumdesoxycholat



Waschpuffer Niedrigsalz

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,5
0,1 % Nonidet P40
0,05 % Natriumdesoxycholat

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 6,8
2 % SDS
0,7 % 2-β-Mercapto-Ethanol

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Fixierer

40 % v/v Ethanol absolut
10 % v/v Acetat
in ddH₂O

Waschlösung

30 % v/v Ethanol
in ddH₂O

Sensibilisierungslösung

0,02 % w/v Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃)
in ddH₂O

Silbernitratlösung

0,2 % w/v Silbernitrat (AgNO₃)
0,02 % v/v Formaldehyd
in ddH₂O

Entwickler

3 % w/v Natriumkarbonat (Na₂CO₃)
0,05 % v/v Formaldehyd
in ddH₂O



Abstopper

5 % v/v Acetat
in ddH₂O

Entfärbelösung A

30 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) (K₃Fe(CN)₆)
in ddH₂O

Entfärbelösung B

100 mM Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃)
in ddH₂O

2.1.8 Material für Immunfluoreszenz-Methoden

Objektträger	76 x 26 mm R. Langenbrinck Emmendingen
Deckgläschen	No. 1, 10 mm Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen
Fettstift	Liquid Blocker Super Pap-Pen-Mini SCI Science Services, München

2.1.9 Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenz-Methoden**Gefrierschnitte****O.C.T.[™] Einbettmedium**

Tissue Tek[®]



Phosphatpuffer

2 M Na₂HPO₄-Dihydrat
2 M NaH₂PO₄-Dihydrat
pH 7,4

PBS 1X

PAA Laboratories, A-Pasching
pH 7,4

Fixierlösung

4 % w/v Paraformaldehyd
0,15 M Phosphatpuffer

Entwässerungslösung

30 % w/v Saccharose
0,15 M Phosphatpuffer

TBS 10X

100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 7,4
1,5 M Natriumchlorid

Blockpuffer (IHC)

1X TBS pH 7,4
7,5 % v/v Serum
1 % w/v BSA
0,3 % v/v TritonX-100

Waschpuffer

1X TBS pH 7,4
0,1 % v/v TWEEN20

Kernfarbstoff

4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)
Stock: 1 mg/ml



Einbettmedium

100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl pH 8,0
 10 % w/v Mowiol® 40-88
 25 % v/v Glycerin

2.1.10 Kits

Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Cell Surface Protein Isolation Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim
Enzymatic Protein Deglycosylation Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Immunoprecipitation Kit (Protein G)	Roche, Mannheim
Catch and Release v2.0	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche, Mannheim



2.1.11 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper/Antigen	Referenz	Wirtsorganismus	Anwendung	Verdünnung
Akt	Cell Signaling # 9272	Kaninchen	WB	1:1000
pAkt (S473)	Cell Signaling # 9271	Kaninchen	WB	1:1000
panCadherin	Abcam #ab6528	Maus	WB	1:1000
Doublecortin (DcX)	Chemicon # AB5910	Meerschweinchen	ICC	1:4000
			IHC	1:4000
EGFR	Santa Cruz # sc-81449	Maus	IP	1:100 (5 µg/ml)
EGFR	Santa Cruz # sc-03	Kaninchen	WB	1:1000
EGFR	R&D Systems # AF1280	Ziege	IHC	1:500
pEGFR (Y992)	Cell Signaling # 2235	Kaninchen	WB	1:1000
ERK1	Santa Cruz # sc-153	Kaninchen	WB	1:1000
ERK2	Santa Cruz # sc-94	Kaninchen	WB	1:1000
pERK1/2 (Y202/Y204)	Cell Signaling # 9106	Maus	WB	1:1000
GAPDH	Calbiochem # CB1001	Maus	WB	1:1000
GFAP	Chemicon # MAB3402	Maus	ICC	1:1000
GFP	Santa Cruz #sc-8334	Kaninchen	WB	1:500
HA	Covance # HA.11 16B12	Maus	WB	1:1000
			IP	1:150
pHistone H3 (S10)	Abcam # ab14955	Kaninchen	IHC	1:500
Map2	Chemicon # AB5622	Kaninchen	ICC	1:1000
Nestin	Millipore # MAB353	Maus	ICC	1:1000
Pax6	Developmental Studies Hybridoma Bank Pax6	Maus	IHC	1:10
			ICC	1:10
RFP	Abcam # ab28664	Kaninchen	WB	1:500
TrkB	Santa Cruz # sc8316	Kaninchen	ICC	1:500
TrkB	BD Bioscience # 610101	Maus	WB	1:1000
pTrkA/B-SHC (Y490/Y515)	Cell Signaling # 9141	Kaninchen	WB	1:500
			IHC	1:500
pTrkB-PLCγ (Y816)	Labor M. V. Chao # 18664 11/01/07 Fraktion # 6	Kaninchen	WB	1:1000
			ICC	1:1000
			IHC	1:1000
β-III-Tubulin	Developmental Studies Hybridoma Bank E7	Maus	WB	1:1000
pTyrosin	Santa Cruz # sc-7020	Maus	WB	1:1000

Tabelle 2-1: Übersicht verwendeter Primärantikörper



Sekundärantikörper

Antikörper/Antigen	Referenz	Wirtsorganismus	Anwendung	Verdünnung
α -Kaninchen-POD	JacksonImmunoResearch # 111-035-003	Ziege	WB	1:10000
α -Maus-POD	JacksonImmunoResearch # 115-035-003	Ziege	WB	1:10000
α -Maus-Cy2	JacksonImmunoResearch # 115-225-003	Ziege	IF	1:400
α -Maus-Cy3	JacksonImmunoResearch # 115-165-003	Ziege	IF	1:400
α -Maus-Cy5	JacksonImmunoResearch # 115-175-003	Ziege	IF	1:400
α -Kaninchen-Cy2	JacksonImmunoResearch # 111-225-003	Ziege	IF	1:400
α -Kaninchen-Cy3	JacksonImmunoResearch # 111-165-003	Ziege	IF	1:400
α -Kaninchen-Cy5	JacksonImmunoResearch # 111-175-003	Ziege	IF	1:400
α -Meerschweinchen-Cy3	JacksonImmunoResearch # 115-035-166	Ziege	IF	1:400
α -Meerschweinchen-Cy2	Abcam # ab6964	Ziege	IF	1:400
			Streifentest	1:200
α -Ziege-Cy2	JacksonImmunoResearch # 705-225-003	Esel	IF	1:400
α -Kaninchen-Cy3	JacksonImmunoResearch # 711-165-152	Esel	IF	1:400
α -Kaninchen-Atto647N	Sigma-Aldrich # 50185	Ziege	IF-STED	1:100

Tabelle 2-2: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper

2.1.12 Synthetische Oligonukleotide**Oligonukleotide für Klonierungen**

Name	Sequenz	Zweck
EcoRI-Forward	5'-GGA CGA ATT CGA TGT CGC CCT GG-3'	Amplifikation von NTRK2 für pCR2.1
BamHI-Reverse	5'-GCG TGG ATC CCT AGC CTA GGA TAT CCA GG-3'	
XHOI-FD-2	5'-CGT TAA CTC GAG CCA TGG GCA GCA ACA AGA GC-3'	Amplifikation von cSRC für pLVX
BAMHI-REV-2	5'-GTA TCA GGA TCC TGC GCA CAC AGT CCG TAT AGG-3'	
FYN XHOI-FD-2	5'-CGT TAA CTC GAG CCA TGG GCT GTG TGC AAT G-3'	Amplifikation von FYN für pLVX
FYN BAMHI-REV-2	5'-GTA TCA GGA TCC CCT GAC AGG TTT TCA CCA GGT TGG-3'	

Tabelle 2-3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide



Oligonukleotide für die Genotypisierung

Name	Sequenz	Linie
TrkB sense	5'-TCG CGT AAA GAC GGA ACA TGA TCC-3'	# 95 NTRK2 KO
TrkB wt	5'-AGA CCA TGA TGA GTG GGT CGC C-3'	
TrkB ko	5'-GAT GTG GAA TGT GTG CGA GGC C-3'	
R4	5'-GCC TGT GTC CGG GTC TCG TCG-3'	# 96 EGFR KO
R6	5'-CAA CCA GTG CAC CTA GCC TGG C-3'	
LacZ100	5'-GGA TAA TGC GAA CAG CGC ACG GCG-3'	
BD2A	5'-GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC C-3'	# 74 BDNF KO
BKO-1	5'-ATA AGG ACG CGG ACT TGT ACA-3'	
3'NEO	5'-GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT-3'	
oIMR 130	5'-CCT GGC TTC TTT ACA TCT CG-3'	# 62 NT-3 KO
oIMR 131	5'-TGG AGG ATT ATG TGG GCA AC-3'	
oIMR 132	5'-GGG AAC TTC CTG ACT AGG GG-3'	

Tabelle 2-4: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide für RT-PCR

Name	Sequenz	Zweck
β -actin sense	5'-TGC CCA TCT ACG AGG GCT-3'	Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge
β -actin antisense	5'-TAG AAG CAC TTG CGG TGC-3'	
NTRK2ISO-FD	5'-AGC CTT CTC CAG GCA TCG TGG-3'	Unterscheidung von TrkB-Isoformen mit N-terminaler Deletion
NTRK2ISO-REV	5'-GTG TGT GGC TTG TTT CAT TCA TGT GC-3'	
Rekbrev	5'-CAA TCA CCA CCA CGG CAT AGA CC-3'	Unterscheidung von TrkB-Isoformen mit und ohne Tyrosinkinase-Domäne
NTRK2-1TK-	5'-CCT TTA TCT CAG CTA CCC ATC-3'	
NTRK2-2TK-	5'-CCA GTG GGA TCT TAT GAA ACA-3'	
NTRK2-1TK+	5'-TGC TCT GGG CAG AGG TTG T-3'	
NTRK2-2TK+	5'-AAC TTT CCC GAA GGC TCC TT-3'	
NTRK2-FD	5'-GAA GAT GAC GTT GAA GCT TAC G-3'	
TrkBvor	5'-TGA AAC AAG CCA CAC ACA GGG C-3'	

Tabelle 2-5: Für RT-PCR verwendete Oligonukleotide



Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz	Zweck
M13 forward	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Sequenzierung von NTRK2-Linkerfragment in pCR2.1
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	
mNTRK2_Seq1	5'-CAA GCT GAC GAG TTT GTC CA-3'	
mNTRK2_Seq2	5'-TTT GGT TTC CAA GCA CAT GA-3'	
mNTRK2_Seq3	5'-ACT ACA CCC TGA TGG CCA AG-3'	
mNTRK2_Seq4	5'-GAA GAG GGA ACT TGG GGA AG-3'	
mNTRK2_Seq5	5'-AAA TCG CAG CAG GTA TGG TC-3'	
mNTRK2_Seq6	5'-ACA CCC GGA AGA ACA TCA AG-3'	
DsRed F	5'-CCA CTA CAC CTG CGA CTT CAA GAC C-3'	Sequenzierung von pLVX-DsRed bzw. pLVX-AcGFP aus 5' in jeweiliges Insert
AcGFP F	5'-GCA AAT GGG CGG TAG GCG TGT ACG-3'	
cSRC 1R	5'-GGA GTT GAA GCC TCC GAA GAG CTT GG-3'	Sequenzierung der kodierenden Region von cSRC
cSRC 1F	5'-GCT CTG GCA GGT GGG GTG ACC-3'	
cSRC 2F	5'-CCT ACT GCC TCT CTG TAT CCG ACT TCG-3'	
cSRC 3F	5'-CAT GTC CCC AGA GGC CTT CCT GC-3'	
cSRC 4F	5'-CAA GGT GCC AAA TTC CCC ATC AAG TGG-3'	
FYN-3'	5'-CTA TAG GAT GCC CTG CCC ACA GG-3'	Sequenzierung der kodierenden Region von FYN
FYN-5'	5'-GCT GCG TGG AAG TTG TTG TAG TTC G-3'	
FYN_SEQ_F1	5'-CCA CCC CAT TGA CGT CAA TGG-3'	
FYN_SEQ_F2	5'-CGT CTC ATA CGG GGA CCT TGC-3'	
FYN_SEQ_F3	5'-CCC AGT TTG AAA CAC TTC AGC AG-3'	
FYN_SEQ_F4	5'-GGA CAT GGC AGC ACA GGT GG-3'	

Tabelle 2-6: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

2.1.13 Plasmide

Name	Zweck	Herkunft
pRc-HA-TrkB	Überexpression von HA-TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	Y.A. Barde (Bibel et al., 1999)
pLV-X-DsRed-dncSRC	Überexpression von dncSRC in kortikalen Vorläuferzellen	diese Arbeit
pLV-X-dnFYN-AcGFP	Überexpression von dnFYN in kortikalen Vorläuferzellen	diese Arbeit

Tabelle 2-7: Übersicht verwendeter Plasmide



2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde zunächst 25 ml einer Übernachtskultur des Stammes HB101 angesetzt, die dann in einer Verdünnung von 1:20 für das Animpfen einer weiteren Kultur von 200 ml benutzt wurde. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C inkubiert und nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,45-0,5 für 15 min auf Eis gelagert. Die Kultur wurde dann in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 2250 g für 15 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 68 ml eiskaltem RF1 resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis gelagert. Danach erfolgte das Sedimentieren der Bakteriensuspension bei 1800 g für 15 min bei 4 °C und die Resuspension des Pellets in 16 ml eiskaltem RF2. Nach 15 minütiger Lagerung auf Eis wurde die Suspension zu je 100 und 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und schließlich bei -80 °C eingelagert.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurde mittels der chemischen Transformation erreicht. Dazu wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes HB101 mit 1-50 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sek und die erneute Lagerung der Bakteriensuspension auf Eis für 1 min. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (RT) wurden die Proben für 1 h bei 750 rpm und 37 °C im Thermomixer (Eppendorf) geschüttelt. Für das Ausplattieren der Kulturen wurden Agarplatten (LB + Antibiotikum) benutzt, auf die je 10 und 90 % der gesamten Bakteriensuspension ausgestrichen wurden. Die Agarplatten wurden anschließend übernacht bei 37 °C inkubiert. Das Ansetzen von klonalen Übernachtskulturen wurde am folgenden Tag durch das Picken einzelner Bakterienkolonien und deren Überführung in ein entsprechendes Selektionsmedium erreicht.



2.2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Im analytischen Maßstab wurde die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mittels der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Dazu wurden 3 ml einer Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) bei 12000 g für 30 sek sedimentiert und anschließend der Überstand durch Absaugen entfernt. Das Pellet wurde dann in 100 µl eiskalter Lösung I durch Vortexen resuspendiert, woraufhin 200 µl Lösung II hinzugegeben wurden. Nach Mischen der Proben durch Invertieren erfolgte das Ausfällen von Proteinen mittels Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung III. Nach 5-minütiger Lagerung der Proben auf Eis wurden die Präzipitate durch Zentrifugation bei 12000 g für 5 min bei 4 °C pelletiert. Nach dem Überführen des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die alkoholische Fällung der Plasmid-DNA durch die Zugabe von 900 µl 100 % Ethanol. Die ausgefallene DNA wurde dann bei 12000 g für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 12000 g für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Nach der Lufttrocknung des Pellets wurde je nach zu erwartender DNA-Menge zwischen 30 und 100 µl H₂O für die Resuspendierung des Pellets verwendet. Die Reinheit und die Konzentration der DNA-Lösungen konnten anschließend am Photometer (Eppendorf) bestimmt werden.

2.2.1.4 Präparative Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 100 bis 200 ml einer Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) bei 6000 g für 15 min bei 4 °C sedimentiert und mittels des Endofree Plasmid Maxi Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden schließlich in 200-400 µl H₂O aufgenommen. Sowohl Reinheit als auch Konzentration der DNA-Lösung wurden am Photometer (Eppendorf) bestimmt.

2.2.1.5 Isolation von genomischer DNA

Zum Zweck der Genotypisierung von Mausembryonen wurde genomische DNA aus Gewebestücken isoliert. Dazu wurde den Mausembryonen zum Präparationszeitpunkt das Schwänzchen abgetrennt und in 200 µl Tail-Lysispuffer überführt und übernacht bei 60 °C unter Schütteln im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Der



Probe wurden dann 170 µl einer 5 %igen SDS- und 70 µl einer 3 M Natriumchlorid-lösung zugegeben und unter sorgfältigem Vortexen vermischt. Die Abtrennung von Proteinen erfolgte durch die Zugabe von 750 µl Chloroform und dem anschließenden Vortexen zur kompletten Durchmischung der Probe. Die Trennung der Phasen wurde durch die Zentrifugation bei 20000 g für 10 min bei 4 °C erreicht. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 750 µl Chloroform versetzt, wie oben beschrieben vermischt und durch Zentrifugation getrennt. Die DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol gefällt und bei 20000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert. Die endgültige Aufnahme des Pellets erfolgte in 100 µl TE-Puffer.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Der enzymatische Restriktionsverdau von DNA wurde unter der Verwendung entsprechender Restriktionsendonukleasen und Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden für analytische Zwecke je 1 µg, für präparative Zwecke bis zu 5 µg Plasmid-DNA verdaut. Der Einzelverdau von Plasmid-DNA erfolgte in einem Standardvolumen von 20 µl, der Doppelverdau mit Benutzung zweier Restriktionsendonukleasen in bis zu 40 µl Endvolumen. Dabei überschritt der Anteil an Restriktionsenzym nie 1/10 des Gesamtvolumens. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 37 °C (oder entsprechend abweichender, Enzym-abhängiger Inkubationstemperatur) inkubiert und der Verdau durch Zugabe von Ladepuffer abgestoppt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden schließlich durch Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

2.2.1.7 DNA-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in Agarose-Flachbett-Gelen. Die Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und bewegte sich zwischen 0,8 und 1,2 % Agarose in 1X TAE. Die Gelelektrophorese wurde in 1X TAE bei einer Spannung von 15 V/cm² durchgeführt. Die Zugabe des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (0,4 mg/ml) erlaubte schließlich die fotografische Dokumentation der Fragmente an einem UV-Transilluminator.



2.2.1.8 Gelextraktion aufgetrennter DNA-Fragmente

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA beziehungsweise PCR-Produkten gegenüber Bestandteilen vorausgegangener Reaktionen wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung der entsprechenden Ansätze erreicht. Aus dem Agarosegel wurden dafür die jeweiligen DNA-Fragmente heraus geschnitten und anschließend mit Hilfe des Qiaex Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird die Abtrennung von Salzen, Proteinen, Farbstoffen, Nucleotiden und Agarose durch das selektive und reversible Binden der DNA an eine Kieselgel-Matrix erreicht. Nach der Elution in alkalischem Milieu konnte die so gereinigte DNA direkt für Ligationen eingesetzt werden.

2.2.1.9 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um die Religation von kompatiblen DNA-Enden eines linearisierten Vektors in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurde die Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen durchgeführt. Dazu wurde der Verdaureaktion für abschließende 30 min 1 µl alkalische Phosphatase (Calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP) hinzugefügt und bei 37 °C inkubiert. Durch die anschließende Inkubation bei 85 °C für 15 min wurde das Enzym thermisch inaktiviert. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde letztlich wie oben beschrieben gelelektrophoretisch aufgereinigt und konnte dann für Ligationen eingesetzt werden.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Kompatible DNA-Enden wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Dieses Enzym katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Moleküls und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines Anderen. Als Energiequelle für diese endergonische Reaktion dient in eukaryotischen Zellen ATP. Bei der Ligation eines linearisierten Vektors mit einem entsprechenden Insertfragment wurde stets ein molares Verhältnis von 1:3 eingehalten, wobei zwischen 25 und 50 µg des Vektors verwendet wurden. Die Inkubation der Ligationsreaktion erfolgte übernacht bei 16 °C.



Bestandteil	Menge
Linearisierter Vektor	x μ l (25-50 ng)
Insert	y μ l
T4-Ligase	1 μ l
10X Ligationspuffer	2 μ l
ATP [10 mM]	1 μ l
ddH ₂ O	add 20 μ l

Tabelle 2-8: Ligationsansatz

2.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von isolierter DNA oder RNA in wässriger Lösung wurde photometrisch mit dem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dort besitzen die Basen der Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Gelöste Nukleinsäuren wurden in einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:20 gegen den entsprechenden Leerwert gemessen. Im Falle von DNA entspricht dabei eine OD₂₆₀ von 1 einer etwaigen Konzentration von 50 μ g/ml, bei RNA von 40 μ g/ml. Zusätzlich können durch die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ Informationen über die Reinheit der Probe gewonnen werden. Die Absorption bei 280 nm zeigt die Verunreinigungen durch Proteine, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In Tabelle 2-9 ist zusammengefasst, wie von der OD auf die Konzentration geschlossen werden kann, und welchen Wert die Quotienten 260/280 bzw. 260/230 bei reinen Proben annehmen sollten.

Art der Nukleinsäure	Konzentration bei OD ₂₆₀ = 1	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀
dsDNA	50 μ g/ml	1,8	2,2
ssDNA	37 μ g/ml	1,8	2,2
RNA	40 μ g/ml	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 μ g/ml	1,8	2,2

Tabelle 2-9: Photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren



2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1985 von Kary Mullis eingeführte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985) erlaubt die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz, die durch die Wahl der jeweiligen Lage von so genannten Primer-DNA-Sequenzen festgelegt werden kann. Die klassische PCR-Reaktion besteht aus drei grundlegenden Schritten, der Denaturierung, der Primerhybridisierung (Annealing) und der Elongation.

Zur Trennung des DNA-Doppelstrangs wurde die anfängliche Denaturierung von Plasmid-DNA oder genomischer DNA bei 95 °C durchgeführt, wonach ein Absenken der Temperatur im nächsten Schritt die Anlagerung der Primersequenzen ermöglichte. Die Annealingtemperatur richtete sich dabei nach der jeweiligen Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Im darauf folgenden Elongationsschritt wurden komplementäre DNA-Stränge ausgehend von den Primern von der hitzestabilen DNA-Polymerase bei 68 °C synthetisiert. Durch die mehrmalige Wiederholung dieses Ablaufs konnte so die Template-DNA in exponentiell vervielfältigt werden. Die Analyse der jeweils erhaltenen PCR-Produkte erfolgte durch deren Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Standard PCR Ansatz

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
Template-DNA	10-500 µg	
DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,5-1 µl	0,05-0,1 Units
10X PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Betain [5M]	10 µl	1 M
dNTP-Mix [10 mM]	1 µl	200 µM
Forward-Primer [10 µM]	1 µl	200 nM
Reverse-Primer [10µM]	1 µl	200 nM
ddH ₂ O	add 50 µl	

Tabelle 2-10: Standard-PCR-Ansatz

PCR-Programme Genotypisierung

PCR-Programm NTRK2			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	30
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Primer-Annealing	60 °C	30 sek	
Elongation	68 °C	60 sek	
Terminale Elongation	68 °C	5 min	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-11: PCR-Programm NTRK2



PCR-Programm EGFR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	35
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Primer-Annealing	55 °C	40 sek	
Elongation	68 °C	90 sek	
Terminale Elongation	68 °C	5 min	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-12: PCR-Programm EGFR

PCR-Programm BDNF

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	35
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Primer-Annealing	60 °C	45 sek	
Elongation	68 °C	2 min	
Terminale Elongation	68 °C	10 min	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-13: PCR-Programm BDNF

PCR-Programm NT-3

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	35
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Primer-Annealing	56 °C	30 sek	
Elongation	68 °C	30 sek	
Terminale Elongation	68 °C	7 min	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-14: PCR-Programm NT-3

2.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Dideoxy-Kettenterminationsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dazu wurde die betreffende DNA zunächst unter Verwendung von entsprechenden Primern durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert, wobei spezielle Nukleotide verwendet wurden, die in zufälliger Art und Weise zu Kettenabbrüchen führen und somit ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten entstehen lassen. Durch Fluoreszenz-kopplung der verwendeten Nukleotide kann anschließend mit Hilfe einer Gelelektro-



phorese und entsprechender Analyse am Sequenziergerät Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer die ursprüngliche Sequenz des DNA-Teilstücks ermittelt werden.

PCR-Ansatz Sequenzierung

500 ng Plasmid-DNA	x μ l
BigDye® Terminator Mix	2 μ l
Sequenzierpuffer	4 μ l
10 μ M Primer	1 μ l
ddH ₂ O	13-x μ l
Gesamtvolumen	20 μl

Tabelle 2-15: PCR-Ansatz für Sequenzierungen

PCR-Programm Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	60 sek	25
Denaturierung	94 °C	15 sek	
Primer-Annealing	54-58 °C	15 sek	
Elongation	60 °C	4 min	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-16: PCR-Programm für Sequenzierungen

2.2.1.14 Isolation von Gesamt-RNA aus kortikalen Vorläuferzellen

Die Isolation von RNA aus kortikalen Vorläuferzellen wurde mit der so genannten Guanidin Schwefelcyanat-Phenol-Chloroform Extraktion nach Chomczynski und Sacchi durchgeführt (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dafür wurde das Reagenz TRIzol® von Invitrogen benutzt, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden. Die gewaschenen kortikalen Vorläuferzellen wurden dabei direkt in je 1 ml TRIzol® aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Vortexen der Proben wurde pro 1 ml TRIzol® je 200 μ l Chloroform zugegeben, durch Vortexen sorgfältig vermischt und erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation der Proben bei 12000 g für 15 min bei 4 °C wurde die Phasentrennung in eine untere Phenol/Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase erreicht. Nach dem Überführen der wässrigen Phase wurde die dort enthaltene RNA mit 500 μ l 100 % Isopropanol ausgefällt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde schließlich durch



Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert und zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Zuletzt wurde der RNA-Gehalt der Proben photometrisch bestimmt.

2.2.1.15 RT-PCR

Die Technik der RT-PCR wurde benutzt, um Informationen über das Expressionsmuster des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in kortikalen Vorläuferzellen zu erhalten. Dabei wurde zunächst die wie oben isolierte Gesamt-RNA der kultivierten Zellen mit Hilfe des Enzyms AMV Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann als Template für eine PCR mit spezifisch ausgewählten Primern benutzt, so dass das Vorkommen unterschiedlicher TrkB-Isoformen untersucht werden konnte.

Für die cDNA-Synthese und anschließende RT-PCR wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche verwendet.

cDNA-Synthese

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
Gesamt-RNA	variabel	20 ng/µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	≥ 20 Units
10X Reaktionspuffer	2,0 µl	1X
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl	5 mM
Primer, random Hexamer	2,0 µl	0,08 A ₂₆₀ Units
dNTP-Mix	2,0 µl	1 mM
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 Units
ddH ₂ O	add 20 µl	

Tabelle 2-17: Ansatz zur cDNA-Synthese aus isolierter Total-RNA

Inkubation

Temperatur	Dauer
25 °C	10 min
42 °C	60 min
95 °C	5 min
4 °C	∞

Tabelle 2-18: Inkubationszeiten der Reaktion zur cDNA-Synthese aus isolierter Total-RNA



RT-PCR

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
Template-cDNA	2 µl	
DNA-Polymerase [5 U/µl]	1 µl	0,1 Units
10X PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Betain [5M]	10 µl	1 M
dNTP-Mix [10 mM]	1 µl	200 µM
Forward-Primer [10 µM]	1 µl	200 nM
Reverse-Primer [10µM]	1 µl	200 nM
ddH ₂ O	add 50 µl	

Tabelle 2-19: RT-PCR-Ansatz zur Unterscheidung von TrkB-Isoformen

RT-PCR-Programm

PCR-Programm „Seq“			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 sek	25
Primer-Annealing	57 °C	30 sek	
Elongation	68 °C	110 sek	
Haltestellung	4 °C	∞	

Tabelle 2-20: PCR-Programm der RT-PCR zur Unterscheidung von TrkB-Isoformen

Die abschließende Analyse der erhaltenen PCR-Fragmente erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung der Proben in 0,8-1-%igen Agarosegelen.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**2.2.2.1 Herstellung von Zell-Lysaten**

Zur Herstellung von Lysaten wurden primäre Zellen auf 60 mm bzw. 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und in Proliferationsmedium bis zu einer Konfluenz von etwa 70-80 % bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es folgten ein Mediumswechsel zu Differenzierungsmedium und eine weitere Inkubation für 24 h. Die Zellen wurden dann wie angegeben behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellkulturschalen in PBS (eiskalt) gewaschen und die Zellen in Lysispuf-



fer auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis mit mehrfachen Vortexschritten wurden die kruden Lysate bei einer Intensität von 50 % und einem Zyklus von 50/50 je zehn Mal in drei Wiederholungen sonifiziert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße übertragen. Aus den geklärten Lysaten wurden je 2 µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen, die restlichen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung von Gewebe-Lysaten

Zur Herstellung von Lysaten aus embryonalem und postnatalem Gewebe wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten die Vorderhirnbläschen entnommen und in Reaktionsgefäßen direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Wenn notwendig, wurden die restlichen Köpfe der entsprechenden Embryonen zur späteren Genotypisierung in Lysispuffer (DNA) überführt. Die tief gefrorenen Gewebeproben wurden in 100 bis 300 µl Lysispuffer (Protein) aufgenommen und mit einem Kunststoffstößel im Reaktionsgefäß homogenisiert. Nach Vortexen und Pipettieren wurden die Lysate bei einer Intensität von 50 % und einem Zyklus von 50/50 je zehn Mal in drei Wiederholungen sonifiziert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße übertragen. Aus den geklärten Lysaten wurden je 1-2 µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen, die restlichen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlysaten wurde der Bio-Rad Protein Assay basierend auf der Bradford-Methode benutzt (Bradford, 1976). Dabei wird der Farbumschlag des Farbstoffes Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung nach Proteinbindung genutzt, um anhand einer Eichgeraden die Proteinkonzentration im Lysat festzustellen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte durch eine photometrische Messung bei 600 nm bestimmt, die Ausgleichsgerade berechnet und die Konzentrationen der einzelnen Proben entsprechend kalkuliert.



Eichgerade	0 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg	12 µg
BSA (100 ng/ml) [µl]	0	20	40	60	80	100	120
Lysispuffer [µl]	x	x	x	x	x	x	x
H ₂ O [µl]	100-x	80-x	60-x	40-x	20-x	0	0
1X Bio-Rad Protein Assay	900	900	900	900	900	900	900

Tabelle 2-21: Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford

Probe	
Lysat [µl]	x
H ₂ O	100-x
1X Bio-Rad Protein Assay	900

Tabelle 2-22: Probenzusammensetzung für die Proteinbestimmung nach Bradford

2.2.2.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von endogenen und überexprimierten Proteinen wurde zwischen 100 und 250 µg Gesamtprotein aus Total-Lysaten eingesetzt. Das Probenvolumen wurde hierzu auf 500 µl mit IP-Puffer (eiskalt) aufgefüllt und die Lysate zur Vorreinigung mit 20 µl Protein-G-Agarose versetzt und für 60 min bei 4 °C rotiert. Durch Zentrifugation für 1 min bei 12000 g und 4 °C wurden unspezifisch an die Protein-G-Agarose-Matrix bindende Proteine entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Es wurden 2-4 µg antigenspezifischer Primärantikörper hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C rotiert. Schließlich wurden 40 µl der Protein-G-Agarose-Matrix hinzugefügt und die Probe übernacht bei 4 °C rotiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die weitere Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet, bestehend aus dem Immunpräzipitat, wurde zweimal mit IP-Puffer gewaschen, wobei der Überstand mit Hilfe von Kanülen entfernt wurde. Weitere zwei Waschschrte wurden analog mit dem Waschpuffer Hochsalz durchgeführt. Nach einem letzten Waschschrte mit Waschpuffer Niedrigsalz konnte der Überstand durch Eintauchen der Kanüle (27 GA $\frac{3}{4}$; 0,4 x 19 mm) in das Pellet quantitativ abgesaugt werden. Zur Resuspension des Sediments wurden 50 µl 2X-Laemmli-Probenpuffer



verwendet. Durch Erhitzen der Proben für 5 min auf 95 °C wurden gebundene Proteine von der Protein-G-Agarose-Matrix gelöst. Nach Zentrifugation für 20 min bei 20000 g und 4 °C wurden die Überstände mit SDS-PAGE und Western Blot entsprechend analysiert.

2.2.2.5 Biotinylierung und Avidin-Pulldown von Zelloberflächenproteinen

Um den Einfluss der EGF-Stimulation kortikaler Vorläuferzellen auf die Exposition von TrkB an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde das Cell surface Protein Isolation Kit von Fisher Scientific benutzt. Das Kit ermöglicht die spezifische Isolation von Proteinen an der Zelloberfläche durch deren gezielte Biotinylierung und den anschließenden Pulldown der biotinylierten Proteine durch die hochaffine Wechselwirkung mit Avidin. Durch die Western Blot-Analyse solcher Proben konnte die Menge der sich an der Zelloberfläche befindenden TrkB-Rezeptoren mit und ohne Stimulation der Zellen mit EGF verglichen werden.

Die kortikalen Vorläuferzellen wurden auf 100 mm Kulturschalen ausplattiert und vor dem Versuch für 24 h ohne die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF gehalten. Wie angegeben, erfolgte zunächst die Vorbehandlung der Zellen mit dem EGF-Rezeptor Inhibitor PD153035 für 30 min bei einer Konzentration von 100 nM. Dann wurden die Zellen mit EGF in einer Konzentration von 20 ng/ml für 5 min stimuliert und anschließend zweimal mit je 8 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Inkubation mit 8 ml der Biotinylierungslösung erfolgte für 30 min bei 4 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Quenching Solution abgestoppt, woraufhin die Zellkulturschalen zweimal mit je 8 ml TBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden in je 100 µl Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert, wonach die Lysate durch die Zentrifugation bei 20000 g für 5 min bei 4 °C von unlöslichen Bestandteilen befreit wurden. Für die Isolation der biotinylierten Proteine wurden je 100 µl des immobilisierten Neutr-Avidin™ in den im Kit enthaltenen Säulchen benutzt. Zunächst wurden die mit Avidin beschickten Säulchen dreimal mit je 100 µl Waschpuffer bei 1000 g für 1 min bei 4 °C gewaschen. Nach Zugabe des geklärten Lysats wurden die Proben für 60 min bei Raumtemperatur rotiert und bei 1000 g für 1 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Proben wurden vier Mal mit je 100 µl Waschpuffer und bei 1000 g für 1 min bei 4 °C gewaschen und schließlich in Anwesenheit von 50 mM 1,4-Dithiothreitol in je 100 µl Elutionspuffer bei 1000 g für 2 min eluiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.



2.2.2.6 Enzymatische *in vitro*-Deglykosylierung von Proteinlysaten

Aufgrund des ungewöhnlichen Laufverhaltens von TrkB im SDS-Gel, wurde überprüft, inwieweit dieser Neurotrophin-Rezeptor in kortikalen Vorläuferzellen als Glykoprotein vorlag. Dazu wurde der Enzymatic Protein Deglycosylation Kit von Sigma-Aldrich gemäß den Angaben des Herstellers benutzt. Dieses Kit beinhaltet fünf unterschiedliche deglykosylierende Enzyme, welche *in vitro* die Entfernung von sowohl N- als auch O-verknüpfter Kohlenhydratseitenketten bewerkstelligen konnten. Das Reaktionsvolumen wurde dabei jeweils auf 10 μl begrenzt, so dass im Anschluss an die Deglykosylierung die gesamte eingesetzte Proteinmenge im SDS-Gel analysiert werden konnte. Je nach Konzentration der verwendeten Proteinlysate konnte so zwischen 10 und 20 μg Gesamtprotein eingesetzt werden.

Deglykosylierungsansatz

Bestandteil	Menge
Proteinlysat	6 μl
5X Reaktionspuffer	2 μl
Denaturierungspuffer	0,5 μl
TritonX-100	0,5 μl
PNGase F	0,2 μl
Endo-O-Glykosidase	0,2 μl
α -2(3,6,8,9)-Neuraminidase	0,2 μl
β -1,4-Galaktosidase	0,2 μl
β -N-Acetylglukosaminidase	0,2 μl
Gesamtvolumen	10 μl

Tabelle 2-23: Zusammensetzung des *in vitro*-Deglykosylierungsansatzes

Das Proteinlysate wurde dabei zunächst mit Reaktionspuffer und Denaturierungspuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Darauf erfolgte die Zugabe von TritonX-100 und den fünf Enzymen zusammen oder auch im Einzelansatz wie angegeben. Zu den Kontrollproben wurde hier die entsprechende Menge H₂O gegeben. Die enzymatische Deglykosylierung erfolgte dann bei 37 °C für 3 h. Abschließend wurden die Proben mit je 2,5 μl 5X Laemmli-Probenpuffer versetzt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.



2.2.2.7 Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen

Tunicamycin ist eine Mischung homologer Antibiotika, die als Inhibitoren von sowohl pro- als auch eukaryotischen N-Acetylglukosamin Transferasen fungieren. Es verhindert die Ausbildung von N-glykosidischen Bindungen in neu synthetisierten Glykoproteinen, indem die Übertragung von N-Acetylglukosamin-1-phosphat auf Dolichol-Monophosphat blockiert wird. Durch die Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen konnte so jede N-Glykosylierung von neu synthetisierten TrkB-Rezeptoren verhindert werden, wodurch die anschließende Analyse in Bezug auf Lokalisation und Funktionalität des Rezeptors möglich wurde.

Tunicamycin wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml für 12 h zu den kultivierten kortikalen Vorläuferzellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen entsprechend stimuliert, gewaschen und für die Western Blot-Analyse wie oben beschrieben prozessiert.

2.2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt. Dabei wurde unter denaturierenden Bedingungen und in einem diskontinuierlichen Puffersystem gearbeitet. Die Proteine werden durch Vorbehandlung mit SDS denaturiert und dabei zu Polyanionen mit negativen Ladungen. Des Weiteren werden vorhandene Disulfidbrücken durch im Probenpuffer anwesendes β -Mercapto-Ethanol reduziert. Im elektrischen Feld hängt damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zum Pluspol allein von deren Molekulargewicht ab. Dazu wurden die Polyacrylamidgele in der Regel als Schichtgele mit einer Dicke von 1 mm gegossen, mit jeweils 5 Zonen unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration. Die Polyacrylamid-Lösungen wurden dazu direkt nacheinander in den Hohlraum zwischen beiden Glasplatten gefüllt, beginnend mit der höchsten Konzentration. Das noch flüssige Gel wurde mit H₂O überschichtet und für mindestens 45 min zur Polymerisierung bei RT gelassen. Vor dem Einfüllen des Sammelgels wurde das H₂O quantitativ entfernt und nach Einsetzen der Kämme erneut 45 min polymerisiert. Nach einer Einlaufphase von 15-30 min mit 10 mA pro Gel wurde für die Elektrophorese 17,5 mA pro Gel angelegt.



Schichtgel 5-15 %

Konzentration [%]	15	12,5	10	7,5	5
40% PAA (37,5:1) [μ l]	750	625	500	375	250
H ₂ O [μ l]	730	855	980	1105	1230
Tris-SDS, pH 8,8 [μ l]	520	520	520	520	520
Quervernetzer: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) [μ l]	1	1	1	1	1
Radikalbildner: 10 % Ammoniumpersulfat [μ l]	10	10	10	10	10

Tabelle 2-24: Zusammensetzung des Trenngels für die SDS-PAGE

Sammelgel 5 %

Konzentration [%]	5
40 % PAA (37,5:1) [μ l]	625
H ₂ O [μ l]	3700
Tris-SDS, pH 8,8 [μ l]	625
Quervernetzer: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) [μ l]	10
Radikalbildner: 10 % Ammoniumpersulfat [μ l]	50

Tabelle 2-25: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE

2.2.2.9 Western Blot

Die Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte im Semi-Dry-Verfahren nach Kyshe-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984). Dabei wurden zur Vorbereitung je sechs Blatt Filterpapier und ein Blatt Nitrocellulosemembran für mindestens 5 min in Western Transfer Puffer getränkt. Auf die Anode der Apparatur wurden nacheinander drei Lagen Filterpapier, die Nitrocellulosemembran und das Gel passgenau aufgelegt. Schließlich folgten drei Lagen Filterpapier zur Kathode hin. Die Proteine wurden für 2 h bei 2,5 mA/cm² auf die Membran übertragen. Zur Kontrolle des vollständigen Transfers erfolgte eine anschließende reversible Proteinfärbung durch eine einminütige Inkubation mit Ponceau S-Lösung. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde mit H₂O gewaschen, zur kompletten Entfernung der Proteinfärbung schließlich mit TBST.



2.2.2.10 Immundetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Zur Immundetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurden zunächst unspezifische Protein-Bindungsstellen auf der Membran durch die Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST oder 5 % BSA in TBST für 1 h bei Raumtemperatur abgeblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in der Block-Lösung verdünnten Primärantikörper übernacht unter Schwenken bei 4 °C. Überschüssige Antikörperlösung wurde danach in drei Waschschritten für je 5 min in TBST abgewaschen, woraufhin die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in TBST für 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur folgte. Erneut wurde dreimal für je 5 min in TBST gewaschen, worauf die Membran in eine trockene Schale überführt wurde. Die auf der Membran immobilisierten Immunkomplexe aus Antigen, Primär- und Sekundärantikörper wurden durch eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit der Reaktionslösung gemäß den Angaben des Herstellers für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach vollständigem Entfernen der Flüssigkeit von Klarsichtfolie bedeckt in eine Röntgenkassette gegeben. Das durch die Oxidation des Substrats Luminol emittierte Licht wurde dann unter Verwendung von Röntgenfilmen mit unterschiedlichen Expositionszeiten detektiert, die Entwicklung erfolgte in einer X-Omat 2000 Entwicklermaschine von Kodak.

Die Nitrocellulosemembranen wurden danach zur Aufbewahrung getrocknet oder für einen erneuten Antigen-Nachweis prozessiert. Dazu erfolgte die Inkubation in Stripping-Puffer für 30 min bei 60 °C. Die Membranen wurden dann für je 30 min zweimal in H₂O und schließlich für 30 min in TBST gewaschen. Die erneute Immundetektion konnte dann wie oben beschrieben wiederholt werden.



2.2.3 Immunfluoreszenz und Mikroskopie

2.2.3.1 Immunzytochemie von kultivierten Zellen

Für die immunzytochemische Analyse von kortikalen Vorläufern wurden die als Neurosphären kultivierten Zellen zunächst durch Trituration vereinzelt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Aussaat erfolgte dann auf mit poly-D,L-Ornithin und Laminin1 beschichteten Deckgläschen in einer Dichte von 2000-5000 Zellen in einem Mediumsvolumen von je 100 μ l. Nach entsprechender Kultivierungsdauer und/oder Behandlung wurde das Medium durch Absaugen entfernt und die Zellen durch die Zugabe von je 100 μ l 4 %-igem Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (37 °C) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate wurden dreimal mit 100 μ l 1X TBS für je 5 min gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit je 80 μ l Blocklösung geblockt. Das in der Blocklösung enthaltene Serum wurde dabei aus dem Organismus gewählt, aus dem auch die später verwendeten Sekundärantikörper stammten, um eine möglichst geringe Immunreaktivität zu gewährleisten. Die Inkubation der in je 65 μ l Blocklösung verdünnten Primärantikörper wurde übernacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach erneutem dreimaligen Waschen in 100 μ l 1X TBS für je 5 min wurden die Deckgläschen in je 65 μ l mit den in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Zusätzlich enthielt die Sekundärantikörperlösung den Kernfarbstoff DAPI in der Endkonzentration von 5 μ g/ml. Die Präparate wurden dreimal in 100 μ l 1X TBS für je 5 min und abschließend in ddH₂O gewaschen bevor sie auf mit einem Tropfen MOWIOL versehenen Objektträger gestürzt wurden. Die Lagerung der so eingedeckelten Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.2.3.2 Immunhistochemie von Gefrierschnitten

Herstellung von Gefrierschnitten

Für immunhistochemische Untersuchungen des embryonalen Vorderhirns wurden Köpfe von Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien entfernt und direkt in 4 % PFA übernacht bei 4 °C nachfixiert. Die Köpfe wurden dreimal in PBS für je 5 min gewaschen und zur Entwässerung des Gewebes in eine 30 %-ige Saccharoselösung überführt und übernacht bei 4 °C inkubiert. Ein ausreichender



Wasserentzug im Gewebe wurde anhand des Absinkens in der Flüssigkeit festgestellt, woraufhin die Überführung in Einbettmedium und das Einfrieren des Präparats im 2-Methylbutan-Bad erfolgte, welches zuvor in flüssigem Stickstoff auf etwa -140 °C herunter gekühlt worden war. Die Präparate wurden bis zur Verwendung, mindestens aber übernacht, bei -20 °C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden in koronaler Orientierung in einer Dicke von $25\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Objekttemperatur von -20 °C und einer Kammertemperatur von -18 °C am Kryotom angefertigt, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, und bei -20 °C gelagert.

Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Vor Beginn der Färbung wurden die entsprechenden Gefrierschnitte für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und einzeln mit einem Fettstift umrandet, um eine hydrophobe Barriere zu erhalten. Einzelne Schnitte wurden dann mit $50\text{-}75\text{ }\mu\text{l}$ Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur in Bezug auf unspezifische Protein-Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation des in Blocklösung verdünnten Primärantikörpers fand übernacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer statt, wobei bis zu drei Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies in derselben Lösung benutzt werden konnten. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörper hinzugegeben. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Farbstoffes 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$) angefärbt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde dreimal mit TBS gewaschen und jeder Schnitt einzeln mit einem 10 mm Deckgläschen und einem Tropfen Einbettmedium eingedeckelt. Die Gefrierschnitte wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 TUNEL Assay

Zur Ermittlung des apoptotischen Zelltods in koronalen Gefrierschnitten embryonaler Vorderhirne wurde der TUNEL Assay herangezogen. Im Verlauf des apoptotischen Zelltods kommt es zu charakteristischen strukturellen Veränderungen der Zelle, die sowohl das Zytoplasma als auch den Zellkern betreffen. Die Aktivierung einer Kalzium-abhängigen endogenen Endonuklease führt dabei zur Fragmentierung des Chromatins in oligonukleosomale Bruchstücke. Die DNA apoptotischer Zellen zeigt daher ein charakteristisches Leiter-Muster nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel. Durch die enzymatische *in situ* Markierung von



apoptotisch induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen kann der Zelltod jedoch auch auf der Ebene einzelner Zellen dokumentiert und lokalisiert werden. Beim so genannten TUNEL Assay wird das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) dazu verwendet, DNA-Einzelstrangbrüche *in situ* durch das Anfügen von dUTP zu markieren. Das hier benutzte TUNEL Kit von Roche stellt dabei Tetra-Methyl-Rhodamin-(TMR-)gekoppelte dUTP-Moleküle zur Verfügung, was die Detektion positiver Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht.

Der Nachweis von apoptotischem Zelltod in koronalen Gefrierschnitten von E13 Vorderhirngewebe wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und mit einer zusätzlichen immuncytochemischen Färbung kombiniert. Als Positivkontrolle erfolgte zunächst ein DNase-Verdau der Schnitte mit 100 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 1 mg/ml BSA für 10 min bei Raumtemperatur. Die Gefrierschnitte wurden dann mit 0,1 % TritonX-100 in 0,1 % Natriumcitrat für 2 min auf Eis permeabilisiert und zweimal mit 1X TBS für je 5 min gewaschen. Die TUNEL-Reaktion wurde durch Zugabe der Labeling-Solution bei 37 °C für 60 min durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit 1X TBS für je 5 min gewaschen. Für die darauffolgende immuncytochemische Färbung wurden die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung, und danach übernacht bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1X TBS für je 5 min wurde die Sekundärantikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten gelassen, wonach das abschließende Waschen in 1X TBS für je 5 min und in H₂O erfolgte. Die Präparate wurden in MOWIOL eingedeckelt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Zellkultur

Die Medien, Zusätze und Faktoren stammen, wenn nicht anders angegeben, von Gibco-Invitrogen, Linaris, PAA Laboratories, Cell Concepts und Sigma-Aldrich.

Wachstumsfaktoren

bFGF	50 µg/ml Cell Concepts, Umkirch
mEGF	50 µg/ml Cell Concepts, Umkirch



Substrate zur Beschichtung

poly-D,L-Ornithin f.c. 0,1 mg/ml
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Laminin1 f.c. 2,5 µg/ml
Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Proteolytischer Verdau

0,5 % Trypsin/EDTA Gibco-Invitrogen GmbH, Karlsruhe

1 % Trypsin Worthington, Lakewood, USA

1 % Trypsin-Inhibitor Sigma, München

Kulturmedien

Primärkultur kortikaler Vorläuferzellen

Neurobasal-Medium (NB)

2 % B27

1 % Glutamax™

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

HEK293T Zell-Linie

DMEM + L-Glutamin

5 % FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin



2.2.4.1 Neurosphärenkultur kortikaler Vorläuferzellen

Zur Isolation kortikaler Vorläuferzellen wurden schwangere Mäuse am Embryonaltag 12 (E11,5) durch Genickbruch getötet. Nach Entnahme der Embryonen wurde der dorsale Bereich der Vorderhirnbläschen präpariert und in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl HBSS auf Eis überführt. Für die spätere Genotypisierung der Embryonen wurde das Schwänzchen in 200 µl Tail-Lysispuffer gegeben. Durch den Verdau mit 0,1 % Trypsin bei 37 °C für 10 min wurde das Vorderhirngewebe dissoziiert, wonach die enzymatische Reaktion mit 0,1 % Trypsin-Inhibitor für 5 min bei Raumtemperatur abgestoppt wurde. Durch Trituration wurden die Zellen des Gewebeverbandes komplett vereinzelt und in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt, die bereits mit je 5 ml vorgewärmtem Neurobasal Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und den mitogenen Wachstumsfaktoren bFGF und EGF in einer jeweiligen Endkonzentration von 20 ng/ml, befüllt waren. Die Zellen wurden in Zellkulturinkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, wozu die Zellsuspension in einem 15 ml Röhrchen bei 400 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Nach Entfernen des Überstands wurden die sedimentierten Zellen in 1 ml frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.4.2 Kryokonservierung kortikaler Vorläuferzellen

Die Kryokonservierung von kortikalen Vorläuferzellen erlaubt die Lagerung der primären Zellen als junge Neurosphären, die zur späteren Verwendung erneut in Kultur genommen werden können. Dazu werden die Zellen einer Neurosphärenkultur bei 400 g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Neurobasal-Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF resuspendiert. Zusätzlich wird dem Kultivierungsmedium für den Einfrierprozess 10 % steriles DMSO hinzugefügt. Nach Überführen der Zellsuspensionen in Cryo Tube™ Röhrchen von Nunc erfolgte das Einfrieren übernacht bei -80 °C in einem Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container. Dieser Behälter gewährleistet eine konstante Temperaturerniedrigung der Zellsuspension um 1 °C pro min durch das Einbetten der Röhrchen in 100 % Isopropanol. Die endgültige Lagerung erfolgt dann durch die Überführung der Proben in flüssigen



Stickstoff am darauf folgenden Tag. Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, wurden sie zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde 1 ml frisches 37 °C warmes Kulturmedium zugegeben und bei 400 g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Neurobasal-Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF resuspendiert und in Zellkulturflaschen entsprechender Größe überführt. Die Kultivierung erfolgte dann standardmäßig bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.4.3 Akute Isolierung von Zellen des embryonalen Vorderhirns

Neben der Kultivierung als Neurosphären wurden kortikale Vorläuferzellen zu den angegebenen embryonalen Zeitpunkten auch akut isoliert und direkt auf ein entsprechendes Substrat ausgesät. Dazu wurden die dorsalen Bereiche des Vorderhirns präpariert und in 100 µl HBSS auf Eis überführt. Die Dissoziation des Gewebeverbands erfolgte durch den Verdau mit 0,1 % Trypsin bei 37 °C für 10 min. Nach dem Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 0,1 % Trypsin-Inhibitor für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mechanisch vereinzelt und direkt im Anschluss ausplattiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 30 mm Zellkulturschalen für die spätere Analyse mit Western Blot-Techniken und auf 10 mm Deckgläschen für die immunzytochemische Färbung in Neurobasal-Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin. In beiden Fällen wurden die jeweiligen Oberflächen mit poly-D,L-Ornithin und Laminin1 beschichtet. Nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen wie angegeben behandelt und für die entsprechenden Analysen weiter verarbeitet.

2.2.4.4 Produktion pseudoviraler Partikel in HEK293TN Zellen

Der lentivirale Gentransfer bietet die Möglichkeit, genetisches Material in stabiler, vererbbarer Art und Weise in das Genom nahezu jeden Zelltyps einzubringen. Die Methode basiert auf der Kotransfektion eines lentiviralen Expressionsvektors mit dem entsprechenden Gen des Interesses zusammen mit Helfer-Plasmiden, die Komponenten für ein effizientes Verpacken in pseudovirale Partikel zur Verfügung stellen, in eine Produktions-Zelllinie wie HEK293TN. Die infektiösen Virionen im Überstand



dieser Zellen können dann geerntet und zur Transduktion von Zielzellen verwendet werden.

Zur Produktion von VSV-G pseudotypisierten Partikeln wurde das LentiX™ Lentiviral Expression System von Clontech benutzt. Zellen der HEK293TN-Linie wurden dafür in einer Dichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen auf 100 mm Zellkulturschalen in MEM Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 5 % FCS ausplattiert. Nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Transfektion der Zellen mit den jeweiligen pLVX-Expressionsvektoren für dncSRC und dnFYN zusammen mit den Helfer-Plasmiden des Lenti-X HT-Packaging Systems. Dazu wurden je 6 µg der Expressionsvektoren mit 30 µl des HT-Mixes auf insgesamt 438 µl Endvolumen verdünnt, mit 62 µl Lentiphos 1 versetzt und durch Vortexen vermischt. Nach der tropfenweise Zugabe von 500 µl Lentiphos 2 unter Schütteln wurde die Transfektionslösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde unter Schwenken in die jeweiligen Zellkulturschalen getropft. Die Ernte des Überstands erfolgte nach einer Inkubation der Zellen für 48 h. Dazu wurde der Überstand zunächst mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und anschließend durch Ultrazentrifugation bei 28000 g für 90 min bei 4 °C sedimentiert. Das die pseudoviralen Partikel enthaltene Pellet wurde in 200 µl Neurobasal-Medium auf Eis resuspendiert, zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.5 Lentivirale Infektion kortikaler Vorläuferzellen

Die Transduktion kortikaler Vorläuferzellen mit Expressionskonstrukten für dncSRC und dnFYN wurde mit Hilfe pseudoviraler Partikel erreicht, die wie oben beschrieben produziert wurden. Die Infektion erfolgte dabei in 60 mm Zellkulturschalen bei einer Konfluenz der kortikalen Vorläuferzellen von 50-60 % mit jeweils 20 µl des pseudoviralen Überstands. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert, woraufhin die Zellen für die Western Blot-Analyse oder für die immunzytochemische Färbung prozessiert wurden.

2.2.4.6 Transfektion kortikaler Vorläuferzellen mit Lipofectamin® 2000

Für die Transfektion kortikaler Vorläuferzellen mit Lipofectamin® 2000 wurden die Zellen auf 100 mm Zellkulturschalen in Neurobasal Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 ng/ml bFGF und



20 ng/ml EGF ausplattiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80-90 % wurden 24 µg des Expressionsvektors und 60 µl Lipofectamin® 2000 in je 1,5 ml Opti-mem verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vermischt. Die Bildung der DNA-Präzipitate erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Die Transfektionslösung wurde dann unter Schwenken in die jeweiligen Zellkulturschalen getropft. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte nach 24 h.

2.2.4.7 *In vitro*-Migrationsassay für kortikale Vorläuferzellen

Um das Wanderungsverhalten kortikaler Vorläuferzellen *in vitro* untersuchen zu können, wurde der von Friedrich Bonhoeffer und Kollegen in den späten 80er Jahren des letzten Jahrhunderts etablierte Streifentest (Vielmetter et al., 1990; Knoll et al., 2007) adaptiert. Mit Hilfe von speziell angefertigten Silikonmatrizen lässt sich dabei über ein Kanalsystem ein Substratteppich von alternierenden Streifen auf eine Oberfläche nach Wahl aufbringen. Die dabei benutzten Substrate können auf diese Weise auf ihre attraktiven oder auch repulsiven Eigenschaften in Bezug auf die Wanderung kortikaler Vorläuferzellen untersucht werden.

Die in dieser Studie verwendeten Matrizen besaßen Kanäle mit einer Breite von 90 µm und wurden zunächst auf getrocknete, mit poly-D,L-Ornithin beschichtete 20 mm Deckgläschen plaziert. Die jeweiligen Ecken des Kanalsystems wurden auf der anderen Seite des Deckgläschens mit Textmarker markiert, so dass die Grenzen des Substratteppichs im weiteren Verlauf des Experiments auch nach Abnahme der Matrix noch zu erkennen waren. Um den ersten Satz von Substratstreifen auf die Deckgläschen aufzubringen wurde das Kanalsystem mit Hilfe fein zulaufender Gel-Lade-Spitzen mit 150 µl der Substratlösung 1 beschickt, so dass die Matrix vollständig befüllt war. Die Beschichtung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach dem dreimaligen Waschen des Kanalsystems mit je 200 µl HBSS für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Matrix vom Deckgläschen entfernt. Die Beschichtung mit dem zweiten Satz von Substratstreifen wurde dann durch das Auftragen von 150 µl der Substratlösung 2 auf dem markierten Bereich und der anschließenden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank erreicht. Nach dreimaligem Waschen des markierten Bereichs mit je 200 µl HBSS für 5 min bei Raumtemperatur wurden die kortikalen Vorläuferzellen in einer Dichte von 5000 Zellen pro 100 µl in Neurobasal-Medium mit 2 % B27, 1 % Glutamax™, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. In den jeweiligen Sub-



stratlösungen wurden in dieser Arbeit die Effekte von EGF mit dem neutralen Substrat BSA verglichen. Beide Substrate wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Zusätzlich wurde der Substratlösung 1 ein Fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben, so dass die Streifen später mittels Fluoreszenzmikroskopie voneinander unterschieden werden konnten.

Außerdem enthielten beide Substratlösungen Laminin1 in einer Konzentration von 2,5 µg/ml, um den kortikalen Vorläuferzellen ein entsprechendes Substrat für eine optimale Interaktion mit der Oberfläche zu bieten. Insgesamt wurden pro Experiment vier verschiedene Substrateppiche produziert, die in Tabelle 2-26 dargestellt sind.

Substrateppich #	Beschichtung	Bestandteile
I	Substratlösung 1	100 µg/ml EGF 2,5 µg/ml Laminin1 IgG Ziege α-Meerschweinchen-Cy2
	Substratlösung 2	100 µg/ml BSA 2,5 µg/ml Laminin1
II	Substratlösung 1	100 µg/ml BSA 2,5 µg/ml Laminin1 IgG Ziege α-Meerschweinchen-Cy2
	Substratlösung 2	100 µg/ml EGF 2,5 µg/ml Laminin1
III	Substratlösung 1	100 µg/ml EGF 2,5 µg/ml Laminin1 IgG Ziege α-Meerschweinchen-Cy2
	Substratlösung 2	100 µg/ml EGF 2,5 µg/ml Laminin1
IV	Substratlösung 1	100 µg/ml BSA 2,5 µg/ml Laminin1 IgG Ziege α-Meerschweinchen-Cy2
	Substratlösung 2	100 µg/ml BSA 2,5 µg/ml Laminin1

Tabelle 2-26: Beschreibung der vier im Migrationsassay benutzten Substrateppiche



Auf diese Weise konnten in den beiden ersten Situationen (Substrateppich I und II) die beiden Substrate EGF und BSA unabhängig von der Beschichtungsreihenfolge miteinander verglichen werden. Die Substrateppiche III und IV dienten dabei als Kontrollansätze. Zur Analyse wurden die Präparate wie angegeben nach 6 und 20 h mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und wie im Experiment angegeben immunzytochemisch gefärbt.

2.2.5 Quantitative Auswertungen

Western Blot

Für die Quantifizierung von Western Blots wurden die exponierten Röntgenfilme zunächst mit Hilfe eines Flachbettscanners eingescannt. Die Erfassung der densitometrischen Intensität einzelner Banden erfolgte dann mit der AIDA Software von Raytest. Zur Normalisierung der Werte wurden die erhaltenen Intensitäten jeweils mit den Intensitätswerten entsprechender Ladekontrollen in Beziehung gesetzt. Um die Resultate verschiedener Experimente zusammenfassen zu können, wurden die normalisierten Intensitätswerte einzelner Spuren als Prozentwerte angegeben, wobei den jeweiligen Kontrollsituationen der Wert 100 % zugewiesen wurde.

Intensitätsmessung von immunzytochemischen Färbungen

Die Intensitätsmessung immunzytochemischer Färbungen erfolgte mit Hilfe der Leica Confocal Software. Zur Erfassung der mittleren Pixelintensitäten wurden dabei übereinandergelagerte Stapelaufnahmen (Stacks) benutzt, die mit dem konfokalen Mikroskop Leica TCS SP2 aufgenommen worden waren. So konnte auch die dreidimensionale Ausdehnung der fixierten und entsprechend behandelten kortikalen Vorläuferzellen in der Z-Ebene berücksichtigt werden. Um verschiedene unabhängige Experimente zu vereinen, wurden die jeweiligen Mittelwerte der einzelnen Versuche zusammengestellt und für die statistische Analyse herangezogen.

Quantifizierung markierter Zellen in koronalen Gefrierschnitten des embryonalen Vorderhirns

Die Quantifizierung markierter Zellen in koronalen Gefrierschnitten des embryonalen Vorderhirns erfolgte durch das Auszählen entsprechender Zellen im dorsalen Telenzephalon. Dabei wurden je nach Experiment 4 bzw. 6 Schnitte pro Tier, die



von rostral nach caudal über das Vorderhirnbläschen verteilt waren, zur Auswertung verwendet. Die Zahlenwerte für einzelne Schichten wurden dabei in Prozentwerte in Relation zur Gesamtzellzahl umgewandelt, so dass die Daten mehrerer Tiere vereint werden konnten.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung der erhobenen Datensätze wurde mit der Graph Pad Software von Prism durchgeführt. Zur Analyse parametrischer, nicht verbundener Daten wurden zwei statistische Tests benutzt. Sollten Mittelwerte zweier Datensätze verglichen werden, wurde der Students-t-Test verwendet. Beim Vergleich mehrerer Datensätze wurde die einfache Varianzanalyse mit dem Einweg-ANOVA Test herangezogen. Sollten im letzteren Fall einzelne Datensätze auf signifikante Unterschiede untersucht werden, wurde der Bonferroni post-hoc Test angewandt. Die Nullhypothese wurde jeweils auf einer 5 % Basis verworfen.

2.2.7 Computerprogramme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Computerprogramme verwendet: Adobe Photoshop, ImageJ, Microsoft Powerpoint, Microsoft Word, Microsoft Excel, Prism Graph Pad, Raytest AIDA, Redasoft Visual Cloning und Leica Confocal Software.

2.2.8 Maushaltung

Alle Versuchstiere wurden gemäß den geltenden Richtlinien in einem künstlichen 12 h / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einer kontrollierten Temperatur von 21 ± 1 °C und 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten.





3 Ergebnisse

3.1 Die Expression und Aktivierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB im dorsalen Telenzephalon der Maus

3.1.1 Die Expression von TrkB im dorsalen Telenzephalon

Um Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Expression von TrkB während der Entwicklung des zerebralen Kortex zu bekommen, wurden die Vorderhirnbe- reiche von Mausembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert und lysiert. Aus den Lysaten wurde TrkB immunpräzipitiert und die sedimentierten Immunkomplexe mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Expression von TrkB konnte so bereits zum Zeitpunkt E10,5 nachgewiesen werden (Abb.: 3-1a). Im Verlauf der nächsten beiden Entwicklungstage E11,5 und E12,5 stieg das Level von TrkB im embryonalen Vorderhirn weiter an, wohingegen zu einem frühen postnatalen Zeitpunkt (P4) eine wieder erniedrigte Expression zu beobachten war (Abb.: 3-1a). Entsprechend der Expression konnte auch die Aktivierung von TrkB auf der Grundlage der Phosphory- lierung der PLC γ -Bindungsstelle gezeigt werden (Abb.: 3-1b).

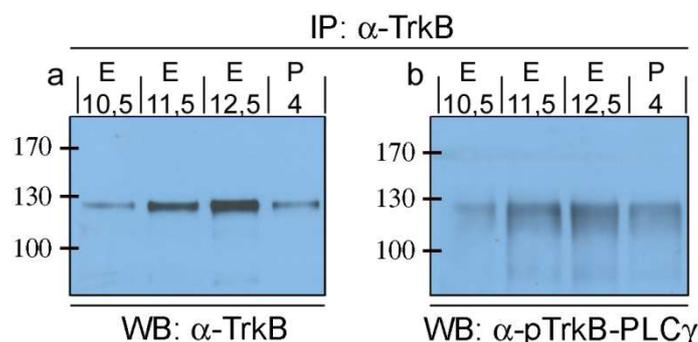


Abbildung 3-1: Die Expression von TrkB im Vorderhirn der Maus

TrkB wurde aus Vorderhirnlysaten der Stadien E10,5, E11,5, E12,5 und P4 immunpräzipitiert und per Western Blot analysiert. (a) Die Detektion mit α -TrkB zeigt ansteigende Mengen von TrkB von E10,5 bis E12,5 und im Vergleich dazu eine geringe Menge zum Zeitpunkt P4. (b) Der Nachweis von pTrkB-PLC γ zeigt die Aktivität von TrkB zu den untersuchten Zeitpunkten.



Neben der Menge an exprimiertem TrkB war auch die Lokalisation des Proteins im dorsalen Telenzephalon von Interesse. Dazu wurden koronale Gefrierschnitte des embryonalen Vorderhirns zum Zeitpunkt E12,5 angefertigt und immunhistochemisch analysiert. Die Expression von TrkB ließ sich dabei sowohl in dorsalen als auch in ventralen Teilen entlang der pialen Oberfläche des Telenzephalon detektieren. Außerdem zeigten auch die apikalen Regionen entlang der Ventrikel und die lateralen und medialen Ganglionhügel eine TrkB-Immunreaktivität (Abb.: 3-2a). Im dorsalen Bereich des Telenzephalon, aus dem im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung der zerebrale Kortex entsteht, konnte die Expression von TrkB auf zwei Schichten bzw. Zelltypen eingegrenzt werden. Zum Einen zeigten die Zellen der basal gelegenen Marginalzone an der pialen Oberfläche des Kortex eine deutliche TrkB-Immunreaktivität, zum Anderen konnten entsprechende Signale ebenfalls in der apikalen Ventrikularzone detektiert werden (Abb.: 3-2b und c). Um die Identität der TrkB-exprimierenden Zellen im dorsalen Telenzephalon genauer eingrenzen zu können, wurde die immunhistochemische Färbung mit spezifischen Zelltypmarkern durchgeführt. Dabei wurden neu geborene, unreife Nervenzellen durch die Expression von Doublecortin (DcX) identifiziert, wohingegen proliferative, multipotente Vorläuferzelltypen durch die Expression des Intermediärfilaments Nestin und des Transkriptionsfaktors Pax6 angezeigt wurden.

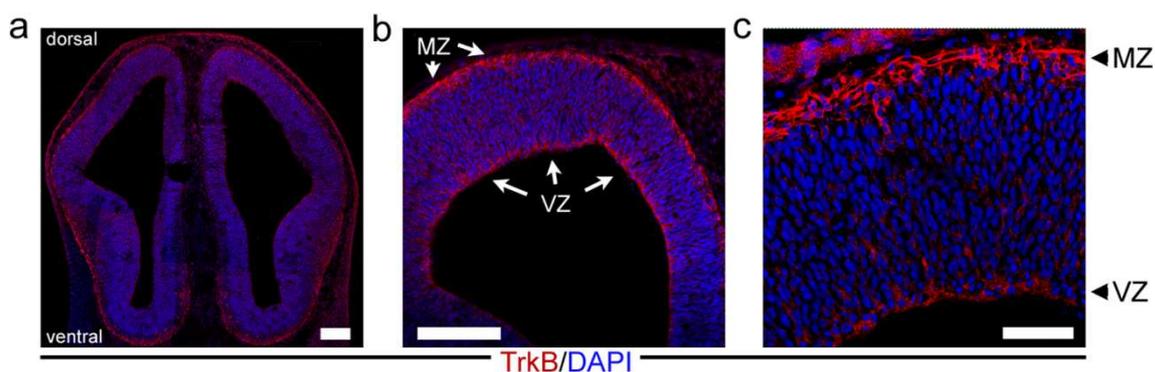


Abbildung 3-2: Die Expression von TrkB im Vorderhirn der Maus am Embryonaltag 12,5

Immunzytochemische Färbung für TrkB in koronalen 25 µm Gefrierschnitten des embryonalen Vorderhirns zu E12,5. (a) Übersicht der TrkB-Expression. (b) TrkB im dorsalen Telenzephalon mit sichtbarer Expression in der Marginalzone (MZ) und Ventrikularzone (VZ). (c) Detailaufnahme der TrkB-Expression in MZ und VZ. Maßstab in (a) und (b): 50 µm, in (c): 25 µm.



Wie die Abbildungen 3-3c und i zeigen, handelte es sich bei den TrkB-positiven Zellen in der Marginalzone um DcX-exprimierende Zellen, die in dieser Phase die aus jungen Neuronen bestehende Präplatte ausbilden. Die Zellen in der ventrikulären Zone sind dagegen positiv für Pax6 und Nestin (Abb.: 3-3b und h), wodurch die klare Unterscheidung dieses proliferativen Zellpools von den ersten postmitotischen Neuronen an der basalen Oberfläche des Kortex möglich war (Abb.: 3-3f und k).

Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper zeigte keine nennenswerte unspezifische Hintergrundfärbung der verwendeten Sekundärantikörper (Abb.: 3-3l-p).

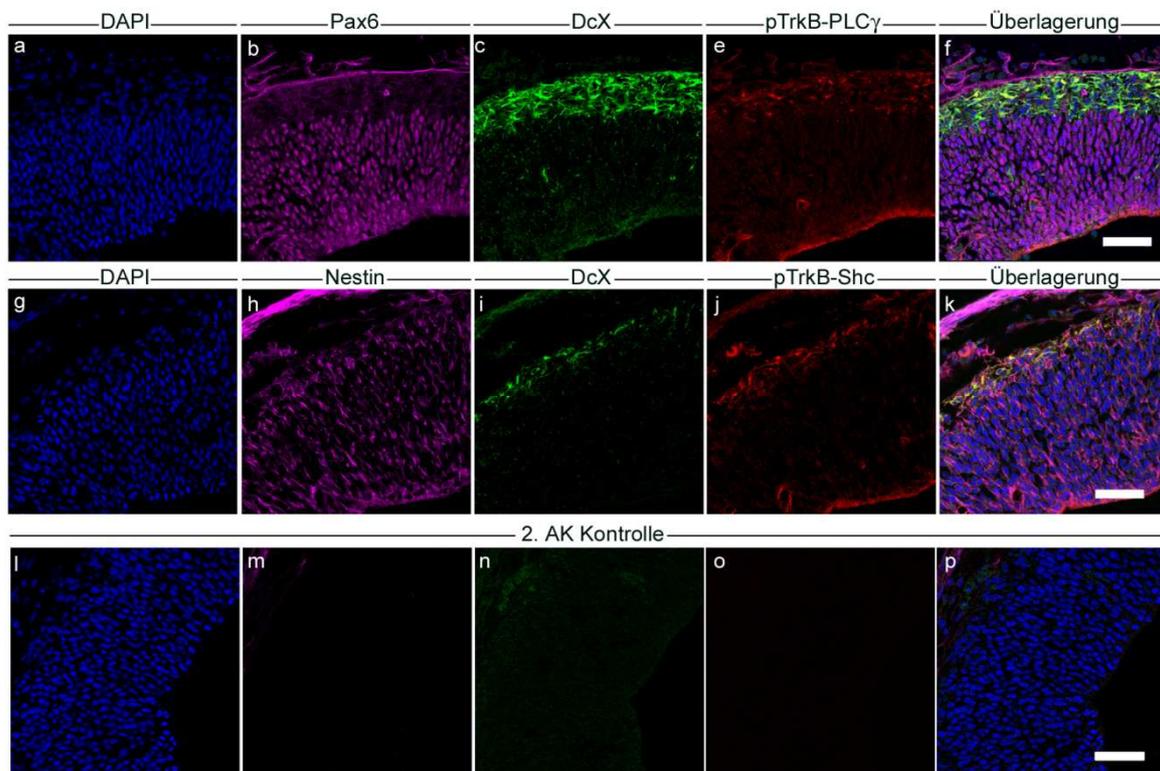


Abbildung: 3-3: Analyse der zelltypspezifischen TrkB-Aktivierung

Immunohistochemische Färbung von E12,5 koronalen Gefrierschnitten mit Zelltyp-spezifischen Markern. Neu geborene Nervenzellen der basalen Präplatte zeigen die Expression von DcX (c, i), während proliferative Vorläuferzellen in der Ventrikularzone durch die Immunreaktivität gegen Nestin (h) und Pax6 (b) identifiziert werden. Die Aktivierung von TrkB ist in beiden Zellpopulationen sowohl an der Bindungsstelle für PLC γ (e) als auch für Shc/Frs2 (j) zu erkennen. Maßstab: 50 μ m.



3.1.2 Die Aktivierung von TrkB im dorsalen Telenzephalon

In den oben beschriebenen Zellpopulationen konnte auch die Aktivierung von TrkB anhand der Phosphorylierung der Bindungsstellen für Shc/Frs2 (Y515) und PLC γ (Y816) durch eine immunhistochemische Färbung koronaler Gefrierschnitte festgestellt werden. Sowohl die basal gelegenen Neurone der Präplatte als auch die apikalen Vorläuferzellen entlang der Ventrikel zeigten dabei eine deutliche Immunreaktivität (Abb.: 3-3e und j).

Um die Rolle der Neurotrophine BDNF und NT-3 für die beobachtete Aktivierung von TrkB im dorsalen Telenzephalon während der frühen Phase der Kortexentwicklung aufzuklären, sollte der Grad der Phosphorylierung von TrkB am Embryonaltag 12,5 in Mäusen untersucht werden, die jeweils für BDNF bzw. NT-3 defizient waren. Dazu wurden die Vorderhirnbläschen zum entsprechenden Zeitpunkt isoliert und damit ein Gewebelysat hergestellt. TrkB wurde aus dieser Proteinlösung immunpräzipitiert und anschließend auf Aktivierung hin mittels Western Blot-Analyse untersucht. Sowohl in BDNF als auch in NT-3 defizienten Tieren war die Expression von TrkB unverändert, außerdem konnte gleichzeitig in beiden Genotypen keine Erniedrigung der Aktivierung von TrkB festgestellt werden (*BDNF*: pTrkB-PLC γ : WT: 100,0 %; KO: 94,0 \pm 9,4 %, pTrkB-Shc: WT: 100,0 %; KO: 96,6 \pm 23,1 %; pTyr: WT: 100,0 %; KO: 97,6 \pm 8,6 %; *NT-3*: pTrkB-PLC γ : WT: 100,0 %; KO: 92,6 \pm 9,2 %, pTrkB-Shc: WT: 100,0 %; KO: 96,1 \pm 9,7 %; pTyr: WT: 100,0 %; KO: 110,4 \pm 4,2 %; Mittelwerte \pm SEM), was anhand der Immunreaktivität von Antikörpern gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle, gegen die phosphorylierte Shc/Frs2-Bindungsstelle und gegen pTyrosin untersucht wurde (Abb.: 3-4a und b).

Da also das Fehlen von BDNF oder von NT-3 nicht zu einer abgeschwächten Aktivierung von TrkB im dorsalen Telenzephalon führte, wurde vermutet, dass in frühen Stadien der Kortexentwicklung andere Effektoren als Neurotrophine für die Phosphorylierung von TrkB verantwortlich sind. Die von extrazellulären Liganden unabhängige Aktivierung von TrkB konnte bereits für einige Rezeptorsysteme gezeigt werden (Lee and Chao, 2001; Lee et al., 2002a; Iwakura et al., 2008; Jeanneteau et al., 2008), so dass es lohnenswert erschien, nach eventuellen Kandidaten für solche Transaktivierungsereignisse im embryonalen Vorderhirn zu suchen.



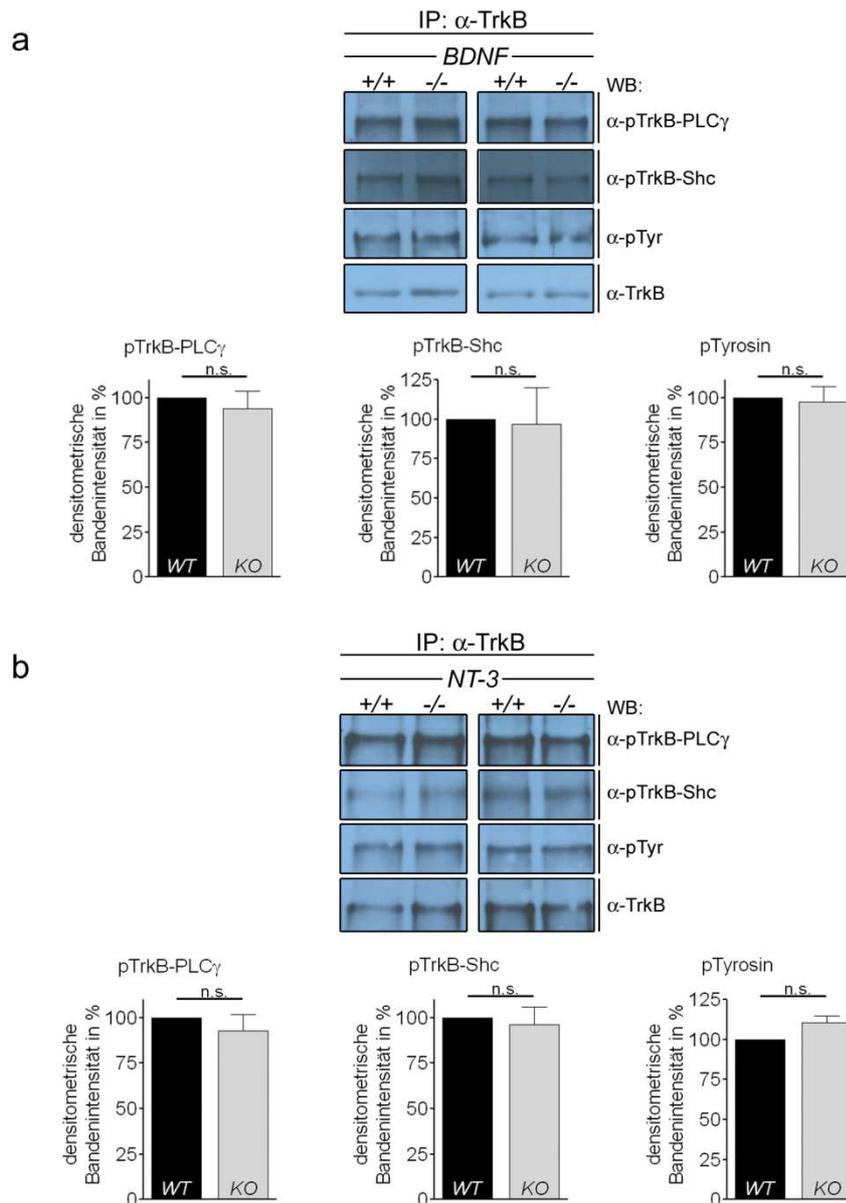


Abbildung 3-4: Die Aktivität von TrkB im E12,5 Vorderhirn in Abhängigkeit von BDNF und NT-3

Die Immunpräzipitation von TrkB aus Vorderhirnlysaten von *BDNF* KO- (a) und *NT-3* KO- (b) Mäusen zeigt keine veränderte TrkB-Aktivierung im dorsalen Telenzephalon anhand des Nachweises von pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc und pTyrosin in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von BDNF oder NT-3. Es sind jeweils zwei exemplarische Experimente gezeigt.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass der EGF-Rezeptor mit den von ihm ausgelösten Signalwegen von enormer Bedeutung für die Entwicklung des zentralen Nervensystems im Allgemeinen und für den zerebralen Kortex im Speziellen ist (Burrows et al., 1997; Sun et al., 2005; Caric et al., 2001). Um einen Hinweis auf die räumliche Verteilung der EGF-Rezeptor Expression zu bekommen, wurden koronale Gefrierschnitte von embryonalen Vorderhirnen mit einem entsprechenden



Antikörper untersucht. Zusammen mit der immunhistochemischen Färbung für TrkB konnte so festgestellt werden, dass beide Proteine in übereinstimmenden Regionen des dorsalen Telenzephalon exprimiert werden (Abb.: 3-5a-f). In hoher Vergrößerung wurde dabei deutlich, dass TrkB und der EGF-Rezeptor größtenteils nicht direkt kolo-kalisieren, jedoch häufig in ein und denselben Zellen vorhanden sind (Abb.: 3-5g-i).

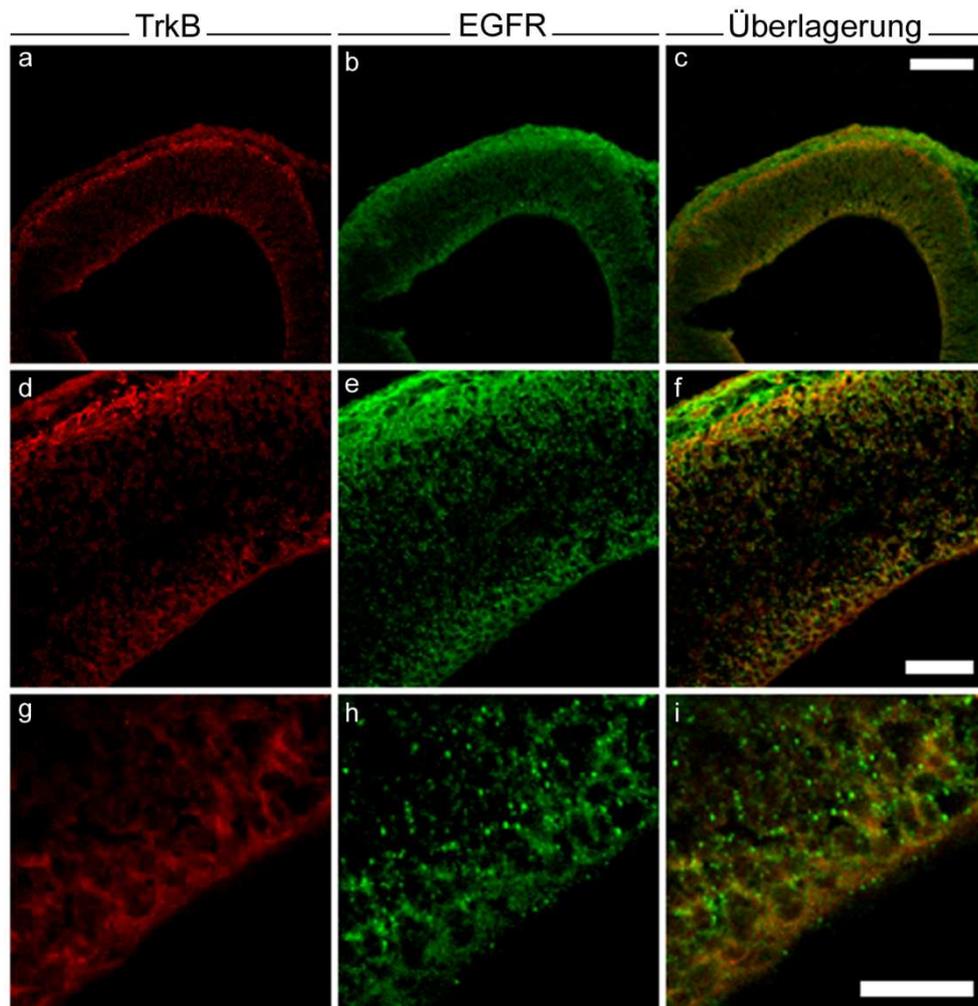


Abbildung 3-5: Die Expression von TrkB und des EGF-Rezeptors im dorsalen Vorderhirn

Die immunhistochemische Färbung an E12,5 koronalen Gefrierschnitten zeigt die Koexpression von TrkB und dem EGF-Rezeptor in überlappenden Bereichen des KorTEX (a-f). Vorläuferzellen der Ventrikularzone koexprimieren TrkB und EGFR mit einem eher geringen Grad von direkter Kolo-kalisation (g-i). Maßstab in (c): 150 µm, in (f): 50 µm, in (i): 25µm.



3.2 Die Primärkultur kortikaler Vorläuferzellen

In Bezug auf die Isolierung und Kultivierung von kortikalen Vorläuferzellen aus der Maus kann prinzipiell zwischen zwei Arten von Primärkulturen unterschieden werden. Bei der akuten Direktkultur werden dabei die Zellen des dorsalen Vorderhirnbläschens im Gewebeverband entnommen, danach vereinzelt und dann direkt auf ein geeignetes Substrat wie poly-D,L-Ornithin und Laminin1 ausplattiert. Die attachierenden Zellen lassen sich für einige Zeit in Kultur halten, während der man eine fortschreitende Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten beobachten kann. Dieses Zellkulturmodell stellt damit eine gute Annäherung zur Situation *in vivo* dar, ist jedoch insofern limitiert, als aus einzelnen Embryonen gerade in frühen Entwicklungsstadien nur eine sehr begrenzte Anzahl von Zellen gewonnen und untersucht werden kann. Im Gegensatz dazu besteht bei der Neurosphärenkultur kortikaler Vorläuferzellen die Möglichkeit einer Vervielfältigung der Zellzahl. Wie oben werden die Zellen des Vorderhirnbläschens zum gegebenen Zeitpunkt entnommen, vereinzelt, dann aber zunächst in Kultur genommen. Die Zellen werden dabei durch Zugabe der mitogenen Wachstumsfaktoren EGF und basicFGF am Ausstieg aus dem Zellzyklus gehindert, was zu deren andauernden Proliferation führt. Es bilden sich innerhalb weniger Tage so genannte Neurosphären, sich in Suspension befindende Zellhaufen aus kortikalen Vorläuferzellen. Im weiteren Verlauf können die Zellen passagiert werden und so eine geraume Zeit in Kultur gehalten werden. Da jedoch regelmäßig eine wiederholte Dissoziation der Zellen mit darauf folgender Ausbildung sekundärer Neurosphären von Nöten ist, können recht heterogene Zellpopulationen entstehen, deren Zusammensetzung nicht mehr absolut eindeutig definiert werden kann. Obwohl die Fähigkeit der kortikalen Vorläuferzellen, sich *in vitro* in die drei hauptsächlichen Zelltypen des zentralen Nervensystems differenzieren zu können auch nach längerer Zeit in Kultur unverändert bleibt, wurde in der vorliegenden Studie eine über vier Wochen hinaus andauernde Kultivierung von Neurosphären möglichst vermieden.

Um die Zusammensetzung von Neurosphärenkulturen hinsichtlich der Zelltypzusammensetzung zu charakterisieren, wurden Neurosphären dissoziiert und auf poly-D,L-Ornithin und Laminin1 ausplattiert.



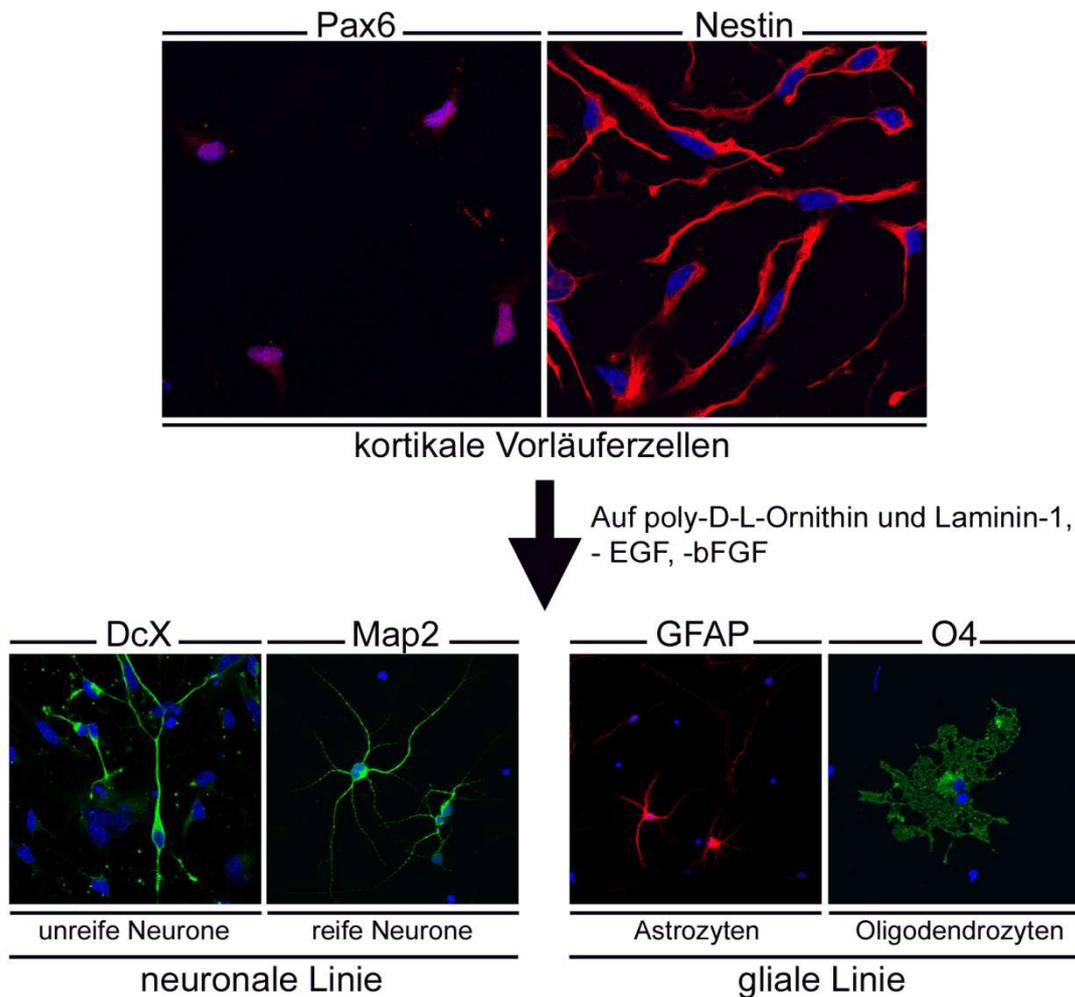


Abbildung 3-6: Das Differenzierungspotenzial isolierter kortikaler Vorläuferzellen

Bei E11,5 isolierte und als Neurosphären kultivierte kortikale Vorläuferzellen differenzieren nach Entzug der mitogenen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF *in vitro* zu den drei hauptsächlich Zelltypen des ZNS: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten.

Der Anteil unterschiedlicher neuronaler Zelltypen in diesen Kulturen wurde dann durch die immunzytochemische Färbung mit verschiedenen Zelltypmarkern ermittelt (Abb.: 3-6). Das Vorkommen multipotenter kortikaler Vorläuferzellen wurde dabei durch die Detektion des Transkriptionsfaktors Pax6 und des intermediären Filamentproteins Nestin nachgewiesen. Junge, unreife Nervenzellen wurden durch die Expression von Doublecortin, reife Neurone durch microtubule associated protein 2 (Map2) identifiziert. Differenzierte Gliazellen schließlich wurden auf Basis der Expression von glial fibrillary acidic protein (GFAP, Astrozyten) und O4 (Oligodendrozyten) gekennzeichnet. Durch das Fixieren der Zellen nach 24 h, 48 h und 120 h dauernder Kultivierung in Abwesenheit der mitogenen Wachstumsfaktoren EGF und



bFGF konnte sowohl die anfängliche Zusammensetzung der Kultur als auch deren Differenzierungspotenzial *in vitro* charakterisiert werden. Nach 24 stündiger Kultivierung bestand die Kultur überwiegend aus Pax6- und Nestin-positiven multipotenten kortikalen Vorläuferzellen (Pax6+, Nestin+). Es konnte außerdem ein vergleichsweise geringer Anteil von Doublecortin- und Map2-exprimierenden Neuronen identifiziert werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt wurden keine ausdifferenzierten, GFAP positiven Astrozyten gefunden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich dann die fortschreitende Differenzierung der Zellen an der Abnahme der Marker für kortikale Vorläuferzellen (Pax6, Nestin) und der Zunahme von Markern für postmitotische Zelltypen des Nervensystems wie Neurone und Astrozyten (DcX, Map2, GFAP). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte in sämtlichen hier beschriebenen Versuchen ein Faktorenentzug von EGF und bFGF für 24 h, so dass es sich bei den gezeigten Zellen jeweils um überwiegend Pax6- und Nestin-positive kortikale Vorläuferzellen handelte. Dadurch eigneten sie sich als hervorragendes Modellsystem für die Zellen der Ventrikularzone des frühen dorsalen Telenzephalon um den Embryonaltag 12,5.

3.2.1 Die Expression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

In der vorliegenden Studie wurden kortikale Vorläuferzellen als Neurosphären kultiviert, was vor allem für biochemische Untersuchungen den Vorteil bietet, in Bezug auf die Zellzahl nicht sehr limitiert zu sein. Außerdem standen so für den Zeitraum der Kultivierung ständig Zellen für Experimente zur Verfügung.

Um Informationen über die Expression von TrkB in den Neurosphärenkulturen in Bezug auf die verschiedenen beschriebenen Isoformen des Rezeptors zu bekommen, wurde zunächst eine Totalpräparation von RNA aus diesen Kulturen mit Hilfe der reversen Transkriptase unter Verwendung von zufälligen Primerhexameren in cDNA umgeschrieben. Die dabei entstandenen cDNA-Fragmente wurden dann als Templates benutzt, um mit entsprechenden Primern spezifische Fragmente für die einzelnen Isoformen von TrkB zu amplifizieren. Es wurden zwei getrennte PCR-Ansätze durchgeführt, um zwischen insgesamt vier Isoformen unterscheiden zu können (Abb.: 3-7). Im ersten Ansatz wurden zur Amplifikation der gewonnenen cDNA zwei Primerpaare benutzt, deren Lage genau den Bereich überspannt, welcher bei den Isoformen TrkB-L0 und TrkB-L1 deletiert ist.



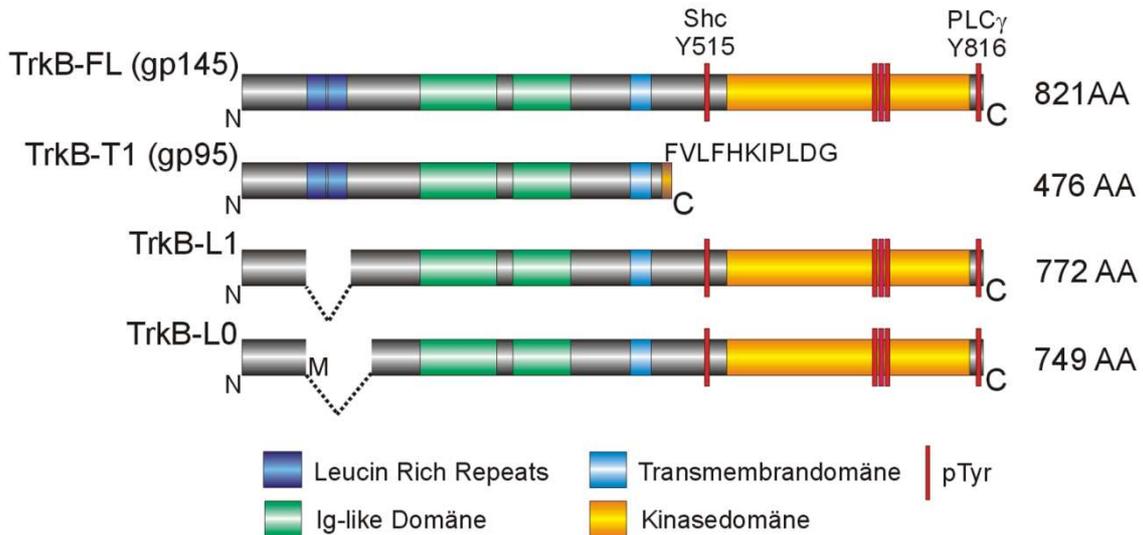


Abbildung 3-7: Schematische Übersicht neuronal exprimierter TrkB-Isoformen

Übersicht der vier TrkB-Isoformen, deren Expression in kortikalen Vorläuferzellen mit Hilfe von RT-PCR-Techniken untersucht wurde. Neben der Voll-Längenisofom TrkB-FL und der trunkierten Isoform ohne Kinasedomäne TrkB-T1 sind die Isoformen TrkB-L1 und TrkB-L0 abgebildet, die jeweils eine Deletion im extrazellulären Bereich des Rezeptors aufweisen. Bei TrkB-T1 ist die einzigartige Aminosäuresequenz am C-Terminus im Einbuchstaben-Code angegeben, welche die spezifische Amplifikation dieser Isoform ermöglichte.

Infolgedessen konnte für die im N-Terminus verschiedenen Isoformen von TrkB ein Amplikon von spezifischer Größe erwartet werden. 600 bp für TrkB-FL, 453 bp für TrkB-L1 und 384 bp für TrkB-L0 für Primerpaar 1 und 1176 bp für TrkB-FL, 1029 bp für TrkB-L1 und 960 bp für TrkB-L0 für Primerpaar 2. Wie Abbildung 3-8a zeigt, konnte jedoch in beiden PCR-Ansätzen (1, 2) lediglich ein spezifisches PCR-Produkt erhalten werden. In beiden Fällen stimmt die erhaltene Größe der Amplikons dabei genau mit den für TrkB-FL vorhergesagten Fragmentgrößen überein, so dass TrkB-Isoformen mit Deletionen in N-terminalen Bereichen nicht exprimiert werden und somit keine Rolle in kortikalen Vorläuferzellen spielen dürften.

Der zur Unterscheidung der TrkB-Isoformen mit und ohne Kinasedomäne benutzte Ansatz bestand aus einer Multiplex-PCR mit dem Einsatz von drei Primern zugleich, mit dem Ziel, zwei PCR-Produkte gleichzeitig zu amplifizieren. Es kamen dabei ein gemeinsamer Primer in 5'-3'-Richtung und je ein Primer in 3'-5'-Richtung des kodierenden Stranges zum Einsatz.



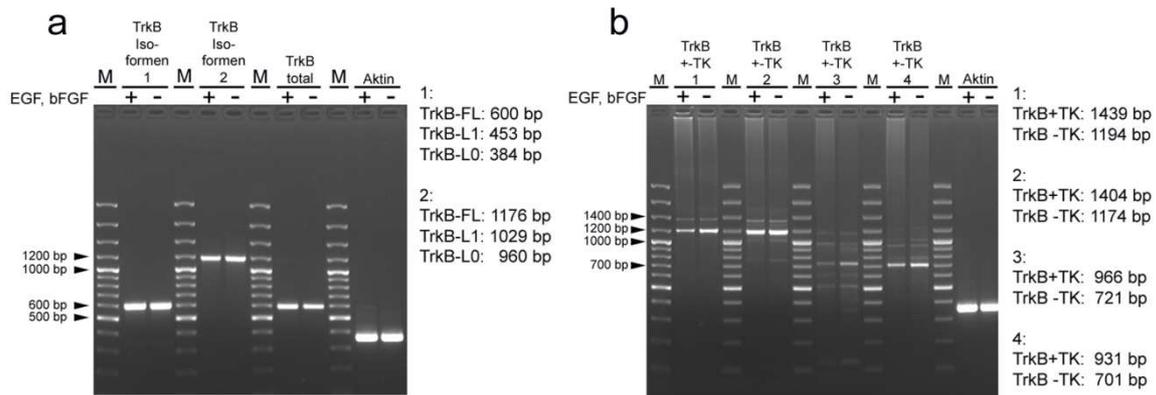


Abbildung 3-8: Die Expression von TrkB-Isoformen in kortikalen Vorläufern auf mRNA-Ebene

Zum Nachweis der Expression unterschiedlicher TrkB-Isoformen auf mRNA-Ebene erfolgte die RT-PCR-Analyse in zwei PCR-Ansätzen. (a) Zwei PCR-Ansätze zur Unterscheidung von TrkB-Isoformen mit N-terminalen Deletionen zeigte die ausschließliche Expression von TrkB-FL. (b) Vier PCR-Ansätze konnten die Präsenz sowohl der TrkB+TK- als auch der TrkB-TK-Isoform nachweisen.

Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die trunkierte TrkB-TK-Isoform eine einzigartige Aminosäuresequenz am C-Terminus besitzt, wodurch für diese Isoform spezifische Primer in 3'-5'-Richtung in die entsprechende kodierende cDNA-Region gelegt werden konnten. Es wurden dazu aus insgesamt sechs unterschiedlichen Primern vier PCR-Ansätze geplant, bei denen die folgenden Fragmentlängen erwartet werden konnten: 1: TrkB-FL (+TK): 1439 bp, TrkB-T1 (-TK): 1194 bp; 2: TrkB-FL (+TK): 1404 bp, TrkB-T1 (-TK): 1174 bp; 3: TrkB-FL (+TK): 966 bp, TrkB-T1 (-TK): 721 bp; 4: TrkB-FL (+TK): 931 bp, TrkB-T1 (-TK): 701 bp. Abbildung 3-8b zeigt, dass auf diese Art und Weise PCR-Produkte erhalten wurden, die den erwarteten Fragmentlängen für beide Isoformen entsprachen. Sowohl TrkB-FL (+TK) als auch TrkB-T1 (-TK) werden also in kortikalen Vorläuferzellen exprimiert. Die unterschiedlichen Bandenintensitäten der beiden PCR-Produkte können hier allerdings keinen Aufschluss über die Höhe der jeweiligen Isoformen-Expression geben, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beiden PCR-Produkte mit ganz unterschiedlicher Effektivität entstehen und somit nicht das Mengenverhältnis der als Template dienenden cDNA repräsentieren würden.

Die RT-PCR-Analyse wurde für beide Ansätze sowohl unter Proliferationsbedingungen in Anwesenheit von EGF und bFGF als auch unter Differenzierungsbedingungen ohne Wachstumsfaktoren durchgeführt.



Eine davon abhängige Regulation einer Isoformen spezifischen Expression von TrkB konnte dabei nicht festgestellt werden (Abb.: 3-8a und b, ± EGF/bFGF).

Die Expression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen wurde auch auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dafür wurden zunächst zwei kommerzielle Antikörper benutzt, deren Epitope in überlappenden Bereichen des N-terminalen, extrazellulären Teils des Rezeptors liegen. Als Ausgangsmaterial wurden kortikale Vorläuferzellen auf Zellkulturschalen ausplattiert, die mit poly-D,L-Ornithin beschichtet worden waren. In Anwesenheit der mitogenen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF wurden die Zellen bis zu einer etwa 60-80 %igen Konfluenz kultiviert, woraufhin ein Entzug beider Faktoren für 24 Stunden erfolgte. Die Zellen wurden gewaschen und in Lysispuffer von der Zellkulturschale entfernt und lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der so gewonnenen Totallysate erfolgte deren Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die Immundetektion von TrkB mit Hilfe beider Antikörper zeigte dabei ein vergleichbares Muster, nämlich das Erscheinen einer dominanten Bande unterhalb der 130 kDa-Markerbande. Die Spezifität der beiden Antikörper sollte anhand von kortikalen Vorläuferzellen aus *TrkB/NTRK2* KO-Mäusen unter Beweis gestellt werden.

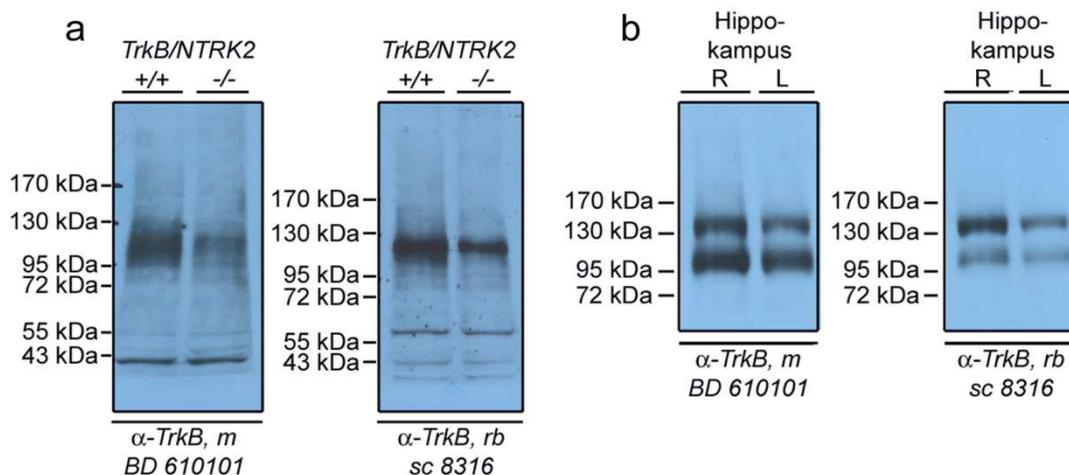


Abbildung 3-9: Die Expression von TrkB-Isoformen in kortikalen Vorläufern auf Proteinebene

Auf Proteinebene wurde die Expression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen mit Hilfe von Western Blot-Techniken untersucht. (a) Die Detektion von TrkB in Lysaten kortikaler Vorläuferzellen aus wildtypischen und *TrkB/NTRK2* mutanten Mäusen zeigte mit zwei kommerziellen Antikörpern eine immunreaktive Bande etwas unterhalb der 130 kDa Markerbande. Im Vergleich zum Wildtyp war dabei die Bandenintensität im *TrkB/NTRK2* KO reduziert. (b) Dieselben Antikörper erkennen in Lysaten aus adulten Hippokampi zwei Banden oberhalb von 130 kDa bzw. 95 kDa. m: Maus; rb: Kaninchen; R: Rechts; L: Links.



Die dabei benutzten Tiere wurden in Bezug auf die Expression von TrkB insofern beschrieben, dass es in homozygoten Knockout-Tieren durch die Deletion der intrazellulären Kinasedomäne zu einer Reduktion der Expression des Rezeptors um etwa 50 % kommt, das Protein also nicht vollständig fehlt (Klein et al., 1993). Damit übereinstimmend sind die entsprechenden Signale auch in TrkB-defizienten kortikalen Vorläuferzellen nur reduziert, nicht abwesend (Abb.: 3-9a). Als weitere Kontrolle der Antikörperspezifität bei der Western Blot-Analyse wurden Hippokampus-Lysate von adulten Mäusen hergestellt und entsprechender Analyse unterzogen. Das dabei erhaltene Bandenmuster unterschied sich in Bezug auf die Laufhöhe der erhaltenen Banden. Hier wurden zwei prominente Banden sichtbar, deren Laufhöhe mit etwas über 130 kDa beziehungsweise etwas über 95 kDa bisher beschriebenen Laufhöhen für die TrkB-FL- beziehungsweise TrkB-T1-Isoform bei der SDS-Gelelektrophorese entsprach (Abb.: 3-9b). Aus diesen beiden Kontrollansätzen konnte der Schluss gezogen werden, dass beide verwendeten Antikörper TrkB spezifisch erkennen, es jedoch in kortikalen Vorläuferzellen zu einer Expression von TrkB kommt, die sich wohl aufgrund des spezifischen Zelltyps und des embryonalen Entwicklungsstadiums von der in adultem neuronalem Gewebe unterscheidet. Die Frage, warum auf Proteinebene lediglich eine prominente TrkB-Bande zu detektieren war, wohingegen auf mRNA-Ebene die Existenz der beiden Isoformen TrkB-FL und TrkB-T1 gezeigt werden konnte, blieb an dieser Stelle ungeklärt.

3.2.2 Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Mit der Primärkultur kortikaler Vorläuferzellen aus dem embryonalen Vorderhirn der Maus stand ein geeignetes Modell zur Verfügung, um die Aktivierbarkeit von TrkB *in vitro* in Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli zu untersuchen. Nach dem anfänglichen Befund, dass am Embryonaltag 12,5 TrkB und der EGF-Rezeptor in kortikalen Vorläuferzellen koexprimiert wird (Abb.: 3-5) und dass dort TrkB unabhängig von BDNF oder NT-3 in aktivierter Form vorliegt (Abb.: 3-4), stellte sich außerdem die Frage, inwieweit auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Tyrosinkinase-Rezeptoren existierte. Die Stimulation der kortikalen Vorläuferzellen mit BDNF und EGF sollte in diesem Zusammenhang Aufschluss darüber geben, wie sich eine klassische Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden BDNF zu einer potentiellen Transaktivierung durch EGF verhält. Für das Experiment



wurden dissoziierte kortikale Vorläuferzellen auf mit poly-D,L-Ornithin und Laminin1 beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 70-80 % kultiviert. Nach einem Entzug der Wachstumsfaktoren für 24 Stunden erfolgte dann die Stimulation der Zellen für die jeweils angegebenen Zeiträume, wonach die Zellen gewaschen und geerntet wurden. Abbildung 3-10 zeigt die Western Blot-Analyse so gewonnener Proteinlysate in Bezug auf die Aktivierung von TrkB und des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs mit entsprechenden Antikörpern gegen phosphorylierte Formen von TrkB und Erk1/2. Die Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ -Bindungsstelle zeigte sich dabei interessanterweise vor allem durch die Stimulation mit EGF induzierbar, was durch das Auftauchen zweier Banden auf der Höhe von etwa 170 kDa und etwas unterhalb von 130 kDa festzustellen war (Abb.: 3-10a). Die Intensität der Banden war dabei nach 5-minütiger Stimulation bereits voll ausgeprägt, nach 120 min noch unvermindert, nach 300 min jedoch wieder stark reduziert (Abb.: 3-10a und b).

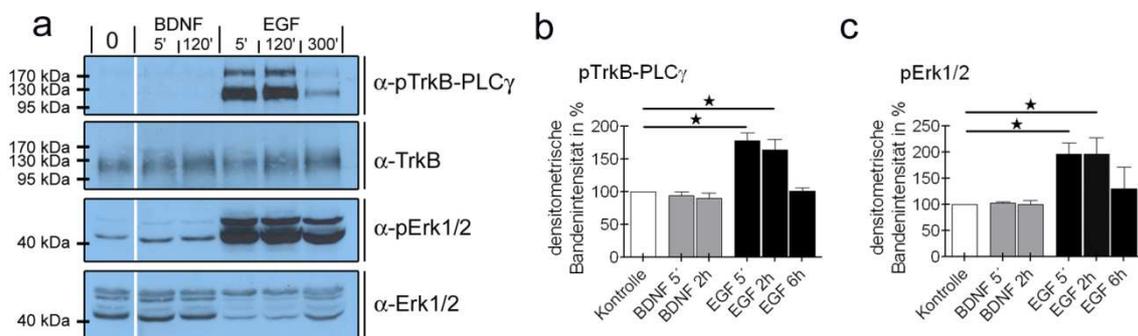


Abbildung 3-10: Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

(a) Western Blot-Analyse von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen, die zu den angegebenen Zeitpunkten nach BDNF- bzw. EGF-Stimulation geerntet worden waren. Während BDNF keine Phosphorylierung von TrkB hervorrief, wurden nach Zugabe von EGF zwei immunreaktive Banden mit dem Antikörper gegen die PLC γ -Bindungsstelle von TrkB detektiert. Analog dazu konnte auch die Induktion des MAPK-Signalwegs anhand der Phosphorylierung von Erk1/2 beobachtet werden. Die quantitative Auswertung zeigte die volle Ausprägung der Bandenintensitäten nach 5 min und den Rückfall auf basale Level nach 300 min für sowohl (b) pTrkB-PLC γ als auch (c) pErk1/2. ★: $p < 0,001$.



Die Zugabe von BDNF hatte dagegen keine sichtbaren Auswirkungen auf die Phosphorylierung von TrkB. Die Signale nach Stimulation für 5 bzw. 120 min unterschieden sich nicht gegenüber der basalen Phosphorylierung der unstimulierten Kontrollspur (Abb.: 3-10a und b; pTrkB-PLC γ : Kontrolle: 100 %; BDNF 5 min: $94,4 \pm 5,9$ %, BDNF 120 min: $89,6 \pm 8,1$ %; EGF 5 min: $178,3 \pm 12,1$ %, EGF 120 min: $164,4 \pm 15,5$ %, EGF 300 min: $101,3 \pm 4,6$ %; Mittelwerte \pm SEM). Ein ähnliches Muster zeigte sich für die Aktivierung von Erk1/2, einer Effektor kinase des MAPK-Signalwegs. Lediglich die Stimulation mit EGF führte hier zu einer maßgeblichen Verstärkung der Phosphorylierung, während die BDNF-Behandlung keine derartige Veränderung zur Folge hatte (Abb. 3-10a und c; pErk1/2: Kontrolle: 100,0 %; BDNF 5 min: $102,4 \pm 2,4$ %, BDNF 120 min: $99,64 \pm 7,9$ %; EGF 5 min: $195,8 \pm 21,5$ %, EGF 120 min: $196,7 \pm 31,3$ %, EGF 300 min: $130,0 \pm 41,6$ %; Mittelwerte \pm SEM).

Die Phosphorylierung von TrkB in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimulation wurde außerdem auch auf immunzytologischer Ebene untersucht. Neben EGF und BDNF wurde hier zusätzlich NT-3 zur Stimulation der Zellen eingesetzt, welches nicht nur eine gewisse Bindungsaffinität gegenüber TrkB besitzt, sondern auch in frühen embryonalen Stadien der Kortexentwicklung exprimiert wird (Farinas et al., 1998; Huang et al., 1999; Maisonpierre et al., 1990). Die kortikalen Vorläuferzellen wurden auf mit poly-D,L-Ornithin und Laminin1 beschichteten Deckgläschen ausplattiert und nach 24-stündigem Faktorentzug mit EGF, BDNF und NT-3 für 5 min stimuliert. Die Aktivierung von TrkB wurde dabei mit der immunzytochemischen Färbung der fixierten Zellen mit dem pTrkB-PLC γ -Antikörper sichtbar gemacht. Außerdem wurden Morphologie und Identität der Zellen mit einer Färbung gegen Nestin gezeigt. Nur im Falle der EGF-Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der pTrkB-PLC γ -Immunreaktivität im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen beobachtet werden (Abb.: 3-11a, i-viii und b; pTrkB-PLC γ : Kontrolle: $15,6 \pm 0,8$; EGF: $93,7 \pm 4,3$; Mittelwerte \pm SEM). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation der Zellen mit BDNF oder NT-3 zu keiner signifikanten Veränderung der Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ -Bindungsstelle (Abb.: 3-11a, i-iv und ix-xvi und b; pTrkB-PLC γ : Kontrolle: $15,6 \pm 0,8$; BDNF: $18,0 \pm 0,9$; NT-3: $21,2 \pm 1,2$; Mittelwerte \pm SEM). Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Western Blot-Experimenten konnte also TrkB nur durch EGF, aber nicht BDNF oder NT-3 signifikant aktiviert werden.



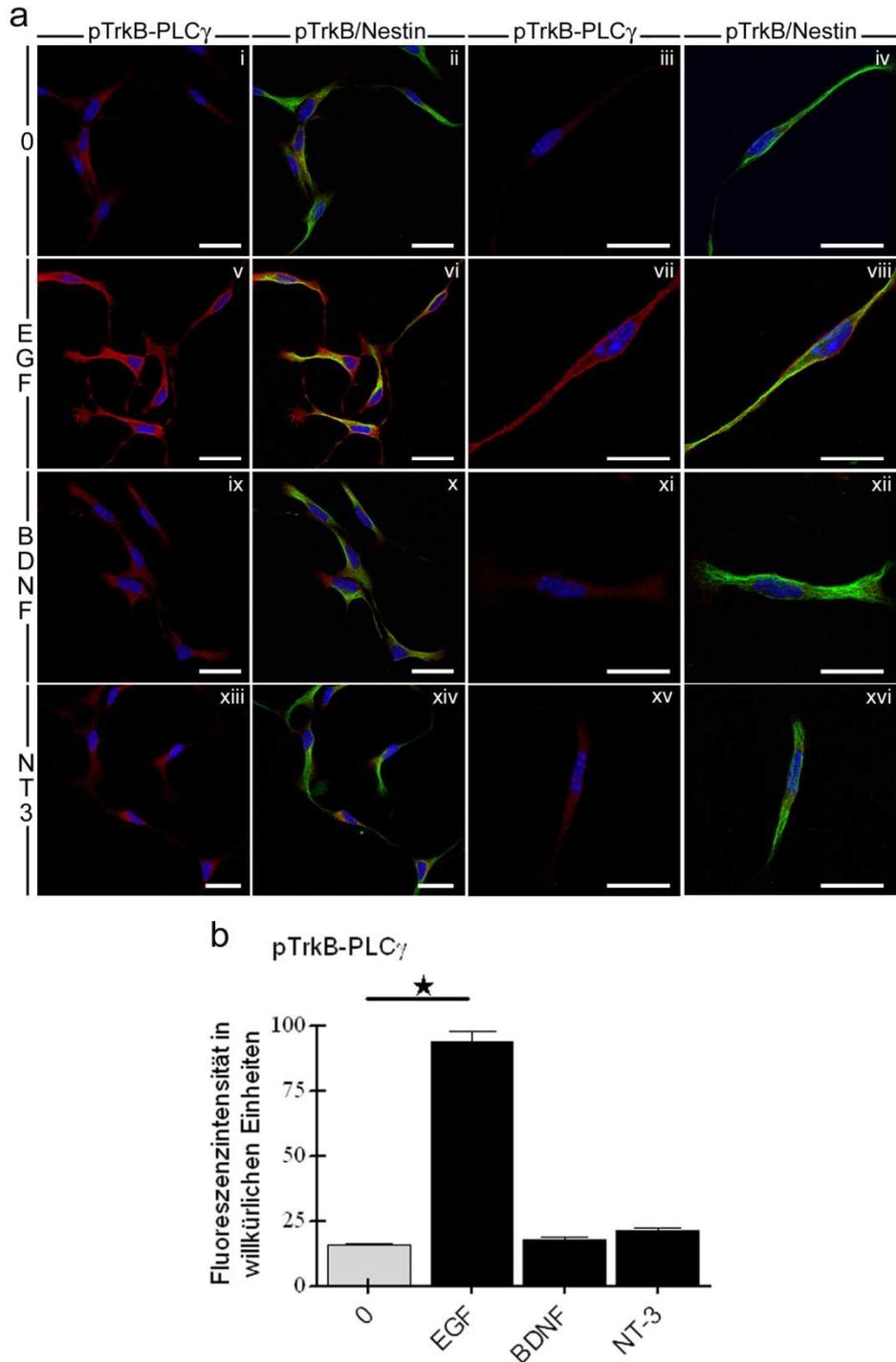


Abbildung 3-11: Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläufern durch EGF, BDNF und NT-3

(a) Die Aktivierung von TrkB durch EGF, BDNF und NT-3 wurde auf Einzelzell-Ebene durch die immunzytochemische Färbung gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle des Rezeptors untersucht. Nestin wurde zur Identifizierung kortikaler Vorläuferzellen herangezogen. (b) Die Quantifizierung der mittleren Pixelintensitäten der pTrkB-PLC γ -Färbung ließ einen signifikanten Anstieg der TrkB-Aktivität nach EGF-Stimulus erkennen, wohingegen die Zugabe von BDNF oder NT-3 keine dahingehenden Veränderungen verursachten. ★: $p < 0,001$. Maßstab: 20 μm .



Zahlreiche Veröffentlichungen hatten bereits die zellulären Antworten neuronaler Zellkultursysteme auf die Stimulation mit Neurotrophinen beschrieben und dabei dokumentiert, dass sich isolierte Zellen aus dem embryonalen Vorderhirn der Maus durchaus empfänglich gegenüber Stimulationen mit BDNF oder NT-3 zeigen (Bartkowska et al., 2007; Cheng et al., 2003; Knusel et al., 1994). Bei den hier verwendeten kortikalen Vorläuferzellen war keine Antwort auf Neurotrophine feststellbar, was zur Frage führte, in welcher Hinsicht sich die jeweilig beschriebenen Zellkultursysteme unterschieden, wodurch wiederum eine unterschiedliche Responsivität gegenüber extrazellulären Stimuli erklärt werden könnte. Bei den in der Literatur beschriebenen Fällen handelte es sich in der Regel um Zellen, die ohne zwischenzeitliche Kultivierung direkt auf ein entsprechendes Substrat ausplattiert und anschließend untersucht wurden (Bartkowska et al., 2007; Barnabe-Heider and Miller, 2003). Meist wurden diese Zellen außerdem nicht vor Embryonaltag 13,5 isoliert.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den durch EGF-stimulierten pTrkB-Banden nicht um ein Artefakt handelte, welches durch die Kultivierung der kortikalen Vorläuferzellen als Neurosphären hervorgerufen wird, wurde eine entsprechende Western Blot-Analyse auch in Direktkulturen durchgeführt. Dazu wurden neben kortikalen Vorläuferzellen aus Neurosphärenkulturen auch akut isolierte Zellen des embryonalen Vorderhirns zum Zeitpunkt E11,5 auf poly-D,L-Ornithin und Laminin1 ausplattiert. Nach 24 Stunden in Abwesenheit mitogener Faktoren erfolgte die Stimulation mit EGF, BDNF und NT-3. Beide Ansätze wurden mittels Western Blot-Analyse verglichen, mit Antikörpern gegen pTrkB-PLC γ und zusätzlich gegen pAkt und pErk1/2, zweier Effektorinasen des PI3K- bzw. MAPK-Signalwegs. Genau wie kortikale Vorläufer aus Neurosphärenkulturen zeigten direkt ausplattierte Zellen des Vorderhirns, die am Embryonaltag 11,5 isoliert wurden, nach Zugabe von EGF eine starke Phosphorylierung von TrkB, wobei das Bandenmuster mit dem Ergebnis von Neurosphärenkulturen übereinstimmte (Abb: 3-12a und b). Zusätzlich wurden nachgeschaltete Signalwege aktiviert, wobei der Anstieg der Akt-Phosphorylierung relativ moderat ausfiel, was durch die bereits recht hohe basale Bandenintensität bedingt war. Die Aktivierung von Erk1/2 in Antwort auf den EGF-Reiz war in beiden Fällen deutlich sichtbar. Im Gegensatz zu den Neurosphärenkulturen zeigten sich die Direktkulturen jedoch auch responsiv gegenüber den Neurotrophinen BDNF und NT-3.



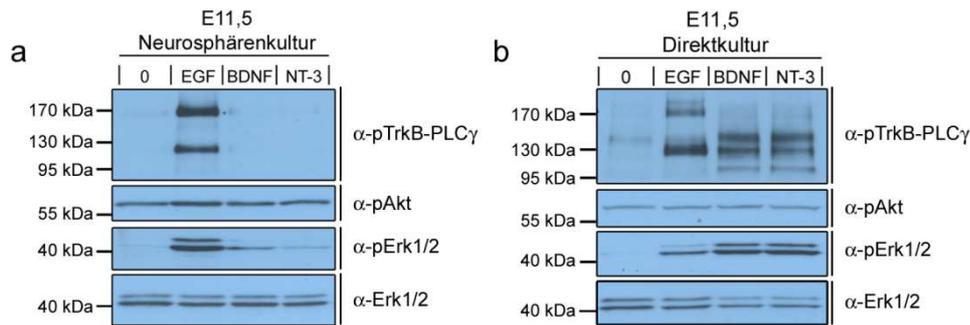


Abbildung 3-12: Die Aktivierung von TrkB in der Neurosphären- bzw. Direktkultur

Western Blot-Analyse von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen, die 5 min nach Stimulation mit EGF, BDNF oder NT-3 geerntet worden waren. (a) In kortikalen Vorläuferzellen aus Neurosphärenkulturen erfolgte die Phosphorylierung von TrkB, Akt und Erk1/2 nach EGF-Stimulation, nicht aber nach Zugabe von BDNF oder NT-3. (b) In Zellen des Vorderhirns von E11,5 führte EGF zu einem vergleichbarem Resultat, wobei hier auch BDNF und NT-3 eine Phosphorylierung von TrkB, Akt und Erk1/2 bewirkten. Dabei unterschieden sich die Laufhöhen der induzierten pTrkB-Banden zwischen EGF- und Neurotrophin-Stimulus.

Die Zugabe beider Neurotrophine führte zu einer deutlichen Verstärkung der Immunreaktivität des Antikörpers gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle von TrkB (Abb.: 3-12 a und b). Das Bandenmuster unterschied sich jedoch von dem der mit EGF-stimulierten Zellen. Obwohl die induzierte Bande unterhalb 130 kDa in beiden Situationen auftauchte, fehlte nach Neurotrophin-Stimulation die Bande um 170 kDa. Stattdessen trat eine markante Bande zu Tage, die sich etwas überhalb der 130 kDa-Markerbande befand. Die Intensität dieser Bande wiederum wurde durch EGF-Stimulation nicht verändert, obwohl sie auch dort sichtbar war. Die Ursache für die Diskrepanz der unterschiedlichen Bandenmuster, die jeweils eine Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ -Bindungsstelle dokumentieren sollten, liegt möglicherweise in der jeweiligen Art der Aktivierung. So könnten für die Neurotrophin-abhängige Aktivierung im Gegensatz zur Neurotrophin-unabhängigen Aktivierung verschieden modifizierte TrkB-Rezeptoren als Substrate dienen. Solche funktionell unterschiedlichen Subpopulationen des Rezeptors könnten sich dann durch unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Gel auszeichnen.

Um zu untersuchen, ob in kortikalen Vorläuferzellen eine vom Entwicklungsstadium bedingte Abhängigkeit der zellulären Antwort auf extrazelluläre Reize vorlag, erfolgte die Isolation von Zellen des embryonalen Vorderhirns für die direkte Kultivierung an zwei zusätzlichen Zeitpunkten. Dabei wurde mit E10,5 ein früherer, mit E14,5 ein späterer Zeitpunkt während der Kortexentwicklung gewählt. Wie sich zeigte,



reagierten die E10,5 isolierten Zellen in ähnlicher Art und Weise wie die aus Neurosphärenkulturen stammenden Zellen auf die Stimulation mit EGF, BDNF und NT-3 (Abb.: 3-12a und 3-13a). Obwohl dabei die Signalintensität insgesamt eher schwach ausfiel, war eine Phosphorylierung von TrkB, Akt und Erk1/2 durch EGF zu erkennen. Wie im Falle der Neurosphärenkulturen zeigte sich auch hier keine Antwort der E10,5 isolierten Zellen auf BDNF und NT-3.

Die am Embryonaltag 14,5 isolierten Zellen wichen davon in Bezug auf die jeweilige Reizantwort deutlich ab. Ebenso wie die direkt ausplattierten Zellen von E11,5 führte sowohl die Stimulation mit EGF als auch die Zugabe von BDNF und NT-3 zu einer deutlichen Aktivierung von TrkB, Akt und Erk1/2 (Abb.: 3-12b und 3-13b). Bemerkenswerterweise war jedoch das Gleichgewicht zwischen den beiden Antworten deutlich auf die Seite der Neurotrophin-induzierten Signale verschoben. War die Aktivierung von TrkB in den bei E11,5 isolierten Zellen durch EGF und Neurotrophine in vergleichbarem Ausmaß möglich, reagierten die E14,5 isolierten Zellen deutlich stärker auf BDNF und NT-3 als auf EGF.

Insgesamt konnte also in Bezug auf die Aktivierung von TrkB eine Verschiebung von hauptsächlich EGF-induzierten Mechanismen in frühen Stadien zu überwiegend Neurotrophin-vermittelter Signalübertragung zu späteren Zeitpunkten der Kortikogenese beobachtet werden.

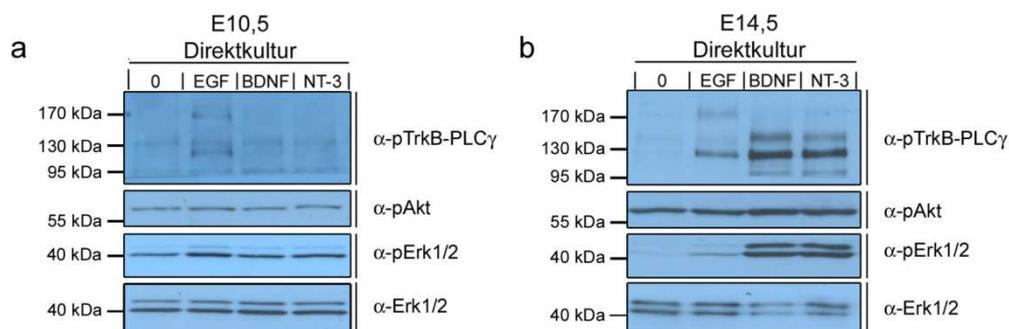


Abbildung 3-13: Die Aktivierung von TrkB in Direktkulturen von E10,5 und E14,5

Western Blot-Analyse von Lysaten direkt ausplattierter Zellen des embryonalen Vorderhirns, die 5 min nach Stimulation mit EGF, BDNF oder NT-3 geerntet worden waren. (a) In kortikalen Vorläuferzellen von E10,5 erfolgte die Phosphorylierung von TrkB, Akt und Erk1/2 nach EGF-Stimulation, nicht aber nach Zugabe von BDNF oder NT-3. (b) In Zellen des Vorderhirns von E14,5 führten sowohl EGF als auch BDNF und NT-3 zu einem Anstieg der Phosphorylierung von TrkB an der PLCγ-Bindungsstelle. Analog dazu erfolgte auch die Aktivierung von Akt und Erk1/2.



3.2.3 Die Abhängigkeit der TrkB-Aktivierung vom Differenzierungsgrad kortikaler Vorläufer

Um die Ursache der oben beschriebenen Unterschiede aufzuklären, wurden die jeweiligen Zellkultursysteme hinsichtlich ihrer Zusammensetzung in Bezug auf unterschiedliche Zelltypen analysiert. Da im dorsalen Telenzephalon in den betreffenden Stadien von E10,5 bis E14,5 zunehmend Nervenzellen aus kortikalen Vorläufern entstehen, lag der Schwerpunkt dieser Zelltypanalyse in der Unterscheidung zwischen multipotenten Vorläuferzellen und reifen Neuronen. Dazu wurde eine immunzytochemische Färbung mit Antikörpern gegen die beiden Markerproteine Pax6 und Map2 durchgeführt. Abbildung 3-14 zeigt die quantitative Auswertung der Anteile an Pax6-positiven Vorläuferzellen und Map2-exprimierenden Neuronen in den jeweiligen Zellpräparationen zusammen mit repräsentativen Bildern der entsprechenden Färbungen (Abb.: 3-14a und b). Es zeigte sich, dass die als Neurosphären kultivierten Zellen eine ähnliche Verteilung aufwiesen wie die Zellen der E10,5 Direktkultur. In beiden Fällen bestand der überwiegende Teil der Zellen aus Pax6-positiven Vorläuferzellen, wohingegen der Anteil an Map2-exprimierenden Nervenzellen gering war (Neurosphären E11,5: Pax6+: $72,5 \pm 5,1$ %; Map2+: $12,4 \pm 3,2$ %; Direktkultur E10,5: Pax6+: $74,4 \pm 4,6$ %; Map2+: $9,2 \pm 3,3$ %; Mittelwerte \pm SEM). In Direktkulturen späterer Zeitpunkte wurde dann eine Zunahme an reifen Neuronen verzeichnet. Zellen aus dem E11,5 Vorderhirn wiesen ein beinahe ausgeglichenes Verhältnis zwischen Vorläuferzellen und reifen Nervenzellen auf (Direktkultur E11,5: Pax6+: $57,0 \pm 5,1$ %; Map2+: $37,7 \pm 3,4$ %; Mittelwerte \pm SEM), wohingegen direkt ausplattierte Zellen von E14,5 zum Großteil aus postmitotischen Neuronen bestehen. Es finden sich nur noch wenige multipotente Vorläuferzellen (Direktkultur E14,5: Pax6+: $7,5 \pm 3,0$ % ; Map2+: $78,9 \pm 3,5$ %; Mittelwerte \pm SEM).

Zusammen genommen konnte hier eine Korrelation zwischen der Stimulierbarkeit von Zellen des embryonalen Vorderhirns und der Zusammensetzung von Kulturen solcher Zellen gezeigt werden. Es wurde dabei deutlich, dass die Aktivierung von TrkB in multipotenten kortikalen Vorläuferzellen vorwiegend durch EGF ausgelöst wird, wohingegen es in reifen Nervenzellen zur Phosphorylierung von TrkB auf klassische Art und Weise durch extrazellulären Neurotrophin-Stimulus kommt.



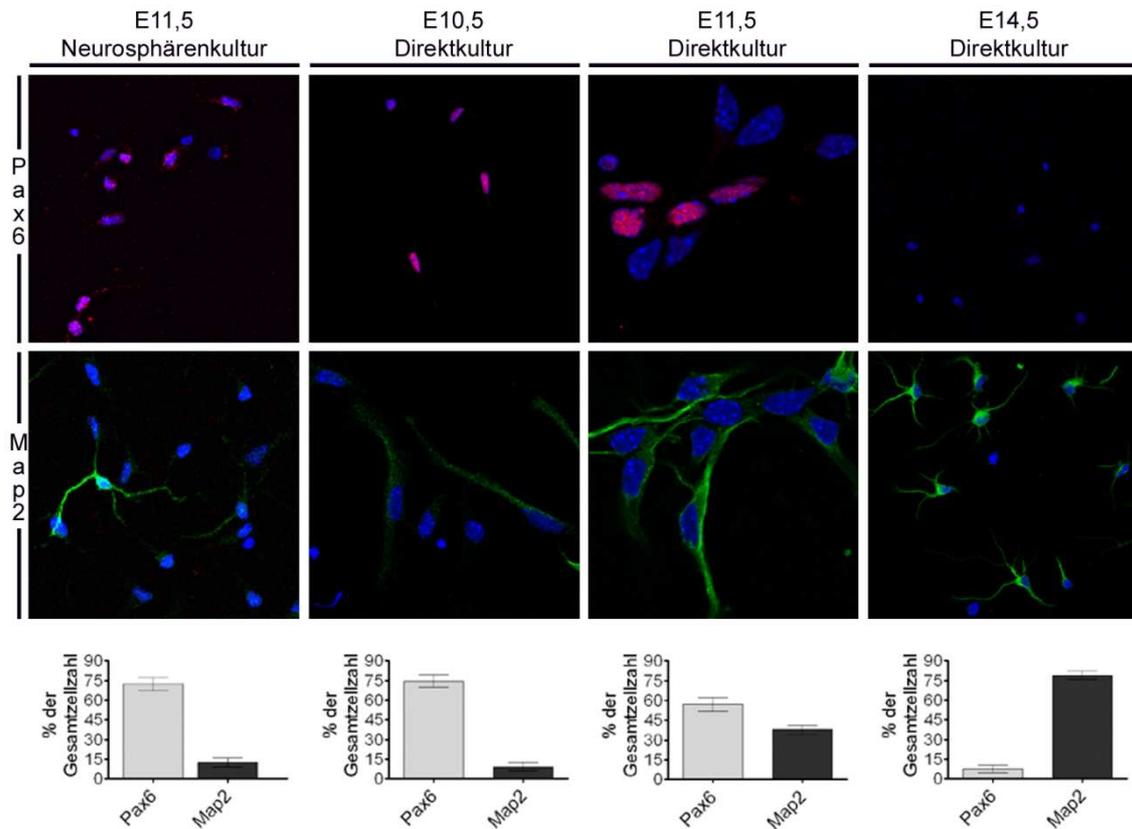


Abbildung 3-14: Die zelltypspezifische Zusammensetzung der unterschiedlichen Kulturen kortikaler Vorläuferzellen

Sowohl die aus Neurosphärenkulturen stammenden Zellen als auch die zu den angegebenen Zeitpunkten isolierten und direkt ausplattierten kortikalen Vorläufer wurden hinsichtlich ihrer zelltypspezifischen Zusammensetzung analysiert. Dabei wurde durch die immunzytochemische Färbung gegen Pax6 und Map2 zwischen multipotenten Vorläuferzellen und postmitotischen Nervenzellen unterschieden. Während die Zellen aus Neurosphärenkulturen und die bei E10,5 isolierten Zellen aus überwiegend Pax6-positiven Vorläufern bestanden, kam es in den Kulturen späterer Zeitpunkte zu einer Zunahme von Map2-positiven Neuronen. Dies korrelierte mit der zuvor beobachteten Responsivitätsverschiebung der Kulturen (Abb.: 3-12 und 3-13).

Zum Anderen wurde deutlich, dass die aus dem E11,5 Vorderhirn isolierten kortikalen Vorläuferzellen durch die Kultivierung als Neurosphären eher Charakteristika von Zellen früherer Entwicklungsstadien, hier E10,5, aufwiesen. Dieses Phänomen ist dadurch erklärbar, dass es durch die Kultivierung in Anwesenheit der mitogenen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF zu einer Expansion der proliferativen Vorläuferzellen kommt, womit weiter differenzierte, postmitotische Zelltypen wie Neurone verdrängt werden und diese außerdem nur begrenzt lange überleben können. Als Modellsystem für multipotente, kortikale Vorläuferzellen schienen Neurosphärenkulturen aber gerade deshalb ideal zu sein.



3.2.4 Der Zeitverlauf der EGF-vermittelten TrkB-Aktivierung

Die Aktivierung von TrkB durch EGF in kortikalen Vorläuferzellen wurde nun genauer charakterisiert. Neben der Phosphorylierung der PLC γ -Bindungsstelle sollte dabei auch die Aktivierung der Shc/Frs2-Bindungsstelle von TrkB untersucht werden. Außerdem war von Interesse, welchem Zeitverlauf die Aktivierung von TrkB in Abhängigkeit vom EGF-Stimulus folgte. Dazu wurden kortikale Vorläuferzellen aus Neurosphärenkulturen mit EGF stimuliert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und für die weitere Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot prozessiert. Für die Immun-detektion von Proteinen wurden hier zusätzlich zu den Antikörpern gegen pTrkB-PLC γ , pAkt und pErk1/2 auch gegen die phosphorylierte Shc/Frs2-Bindungsstelle von TrkB gerichtete Antikörper eingesetzt. Zunächst wurde dabei deutlich, dass die Aktivierung von TrkB nicht nur an der PLC γ -Bindungsstelle, sondern grundsätzlich auch an der Shc/Frs2-Bindungsstelle stattfand. Es konnten durch die Zugabe von EGF zwei Banden induziert werden, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die PLC γ -Bindungsstelle von TrkB bei etwa 170 kDa und etwas unterhalb von 130 kDa liefen (Abb.: 3-15a und b).

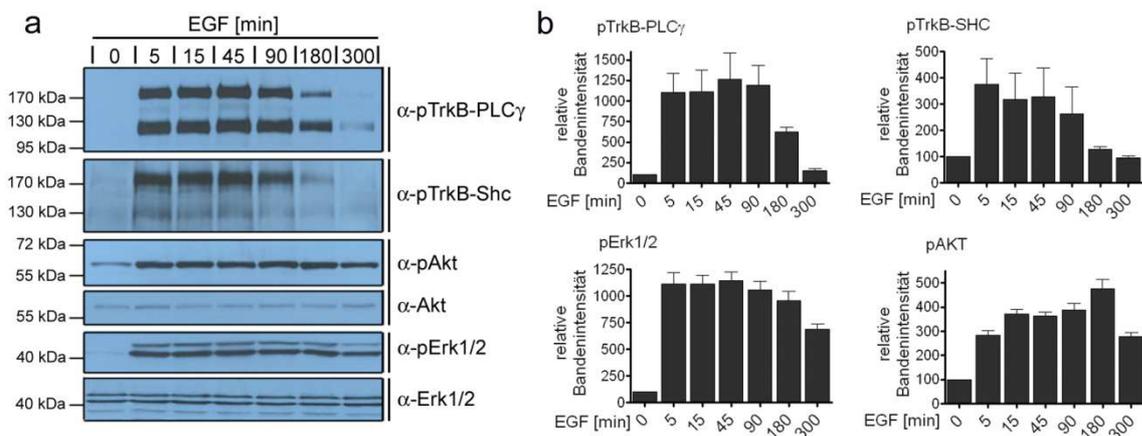


Abbildung 3-15: Der Zeitverlauf der EGF-vermittelten TrkB-Aktivierung

(a) Western Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Aktivierung von TrkB und nachfolgenden Signalkaskaden durch EGF. Die Phosphorylierung von TrkB wurde dabei sowohl an der PLC γ - als auch an der Shc-Bindungsstelle beobachtet. Die Aktivierung der PI3K- und MAPK-Kaskade erfolgte durch die Detektion von pAkt und pErk1/2, zweier Effektorinasen dieser Signalwege. (b) Die quantitative Auswertung der relativen Bandenintensitäten zeigte die rasche Phosphorylierung von TrkB nach bereits 5 min, das Anhalten der Aktivität für etwa 90 min, um dann nach 300 min wieder auf anfängliche basale Level zurückzukehren. Die Aktivität des PI3K- bzw. MAPK-Signalwegs verlief analog dazu, mit allerdings weiterhin erhöhten Signalen nach 300 min.



Dabei fiel auf, dass die Intensität der beiden Banden sehr unterschiedlich war, mit einer schwachen unteren und einer dominanten oberen Bande. Beim Nachweis der phosphorylierten PLC γ -Bindungsstelle hingegen waren die Bandenstärken weitgehend vergleichbar. Der zeitliche Verlauf der TrkB-Aktivierung war an beiden Phosphorylierungsstellen ähnlich. In beiden Fällen kam es bereits fünf Minuten nach EGF-Zugabe zu einer maximalen Induktion der Immunreaktion. Die Intensität der induzierten Banden blieb dann während der ersten 45 bis 90 Minuten unverändert stark, um dann nach 180 Minuten für die PLC γ -Bindungsstelle auf etwa die Hälfte des Maximalwertes und für die Shc/Frs2-Bindungsstelle beinahe auf das basale Level abzufallen. Nach 300 Minuten war bei beiden Phosphorylierungsstellen von TrkB keine Aktivierung mehr zu erkennen. Die nachgeschalteten Signalwege PI3K und MAPK wurden anhand der Phosphorylierung von Akt und Erk1/2 untersucht. Die Aktivität von Akt war ebenfalls nach fünf Minuten deutlich erhöht und stieg dann im weiteren Verlauf auf einen Maximalwert nach 180 Minuten an. Nach 300 Minuten schließlich war das Signal für phosphoryliertes Akt wieder auf den etwa halben Maximalwert gesunken. Erk1/2 zeigte sich nach fünf Minuten bereits maximal aktiviert, was ähnlich lange andauerte. Nach 300 Minuten war die Bandenintensität dann erneut deutlich reduziert. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung von PI3K- und MAPK-Signalwegen erinnert damit eher an die lang anhaltenden, von Neurotrophinen induzierte Aktivierung dieser Signalwege, als an die transienten Effekte durch Wachstumsfaktoren wie EGF.

3.2.5 Die Überexpression von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Um den Neurotrophinrezeptor TrkB als ein Ziel von EGF-vermittelter Phosphorylierung zu bestätigen, wurde ein Pulldown-Experiment nach Überexpression eines Fusionsproteins aus HA-Tag und TrkB-Sequenz in kortikalen Vorläuferzellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu ausplattiert, mit dem entsprechenden HA-TrkB-Konstrukt transfiziert und mit EGF stimuliert. Aus dem Totallysat dieser Zellen wurde dann HA-TrkB mit Hilfe eines gegen den HA-Tag gerichteten Primärantikörpers und immobilisierter Protein-G-Agarose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, indem phosphoryliertes, überexprimiertes Protein mit Antikörpern gegen pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc/Frs2 und pTyrosin nachgewiesen wurde. Abbildung 3-16a zeigt den deutlichen Anstieg der entsprech-



enden Signale nach EGF-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.: 3-16a, vgl. Spur 3 und 4). Die Signale sind dabei spezifisch für die Immunpräzipitation transfizierter Zellen zu sehen, nicht transfizierte Kontrollzellen zeigen keine Signale (Abb.: 3-16a, vgl. Spur 1, 2, 3 und 4). Wie die Input-Kontrolle zeigt (Abb.: 3-16b), war die Induktion der TrkB-Phosphorylierung mit EGF in nicht transfizierten Zellen ähnlich stark wie in den transfizierten Zellen, so dass sichergestellt war, dass die entsprechenden Signale die Aktivität von immunpräzipitiertem HA-TrkB repräsentierten (Abb.: 3-16b, vgl. Spur 1, 2, 3 und 4). Im Gegensatz zur Input-Kontrolle ist jedoch nach Auftragen der Präzipitate lediglich eine einzelne Bande zu sehen, die knapp unterhalb der 130 kDa-Markerbande läuft. Da der HA-Tag dem Molekulargewicht eines Proteins nur etwas mehr als 1 kDa hinzufügt, stimmt diese Laufhöhe gut mit der vorher beobachteten Größe von endogenem TrkB überein (Abb.: 3-9a). Die obere Bande der Inputkontrolle bei etwa 170 kDa war beim Auftrag der Präzipitate nicht zu detektieren. Ob dies möglicherweise daran lag, dass TrkB mit HA-Tag nur in der einen unterhalb 130 kDa laufenden Form exprimiert wurde, oder die Immunpräzipitation nur bei dieser funktionierte, blieb ungeklärt.

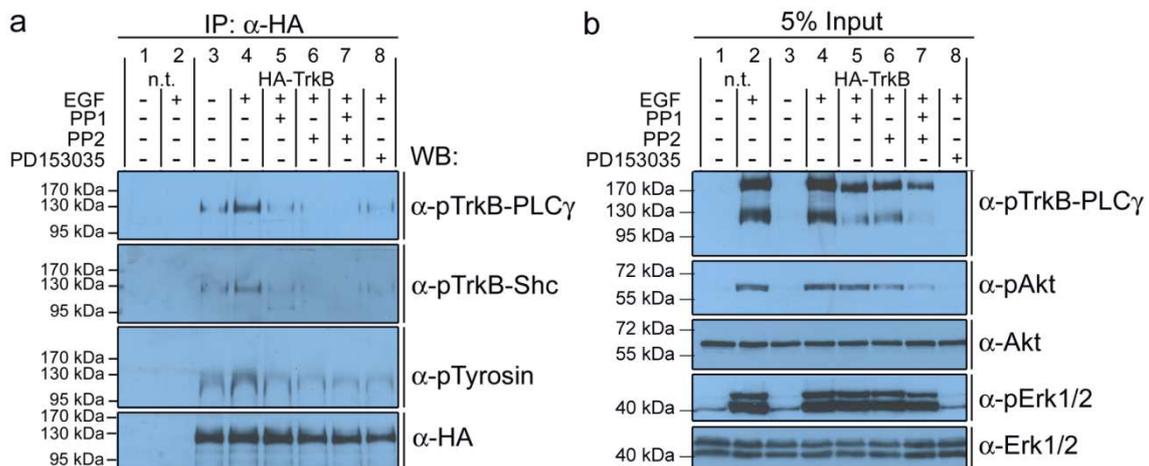


Abbildung 3-16: Die Überexpression von HA-TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

(a) Western Blot-Analyse nach Überexpression von HA-TrkB in kortikalen Vorläufern und anschließender Immunpräzipitation mit α-HA. Die Stimulation mit EGF führt zur Phosphorylierung von HA-TrkB (Spur 4), was durch die pharmakologische Inhibition mit PP1, PP2 und PD153035 geblockt werden konnte (Spuren 5-8). (b) Die Analyse der Input-Kontrolle zeigt die Stimulation von pTrkB nach EGF-Behandlung in nicht transfizierten Zellen (Spur 2) und die Effekte der Inhibitoren (Spuren 5-8). Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs schien durch die Inhibition von Src-Kinasen stärker betroffen als die der MAPK-Kaskade (Spuren 5-7). n.t.= nicht transfiziert.



3.2.6 Die pharmakologische Inhibition der TrkB-Aktivierung durch EGF

Im selben experimentellen Ansatz sollte auch ein erster Einblick in mechanistische Aspekte der TrkB-Transaktivierung durch EGF erhalten werden. Dabei ging es zunächst um die Frage, ob EGF für eine Aktivierung des Neurotrophinrezeptors möglicherweise direkt an TrkB bindet oder regulär an den EGF-Rezeptor. Die pharmakologische Inhibition des EGFR mit dem Inhibitor PD15035 zeigte, dass die Kinaseaktivität des EGFR für eine EGF-vermittelte Transaktivierung von TrkB notwendig ist, die entsprechenden Banden für pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc/Frs2 und pTyrosin sind deutlich reduziert (Abb.: 3-16a, vgl. Spur 4 und 8). Eine direkte Interaktion von EGF mit TrkB konnte so weitgehend ausgeschlossen werden.

Außerdem wurden ebenfalls Inhibitoren für die Familie der Src-Kinasen benutzt, um deren mögliche Beteiligung an der Signalübertragung vom EGF-Rezeptor hin zu TrkB aufzuklären. Die Familie der Src-Kinasen besteht aus zahlreichen Mitgliedern zytoplasmatischer Proteinkinasen, von denen cSrc und Fyn in neuronalem Gewebe exprimiert werden (Kuo et al., 2005; Stein et al., 1994). Wie gezeigt werden konnte, ist die Src-Kinase Fyn maßgeblich an der Transaktivierung von TrkB durch Adenosin-Rezeptoren beteiligt (Rajagopal and Chao, 2006). Um die Rolle von Src-Kinasen für die Transaktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden die pharmakologischen Inhibitoren PP1 und PP2 jeweils einzeln und in Kombination benutzt. Die Applikation der Inhibitoren führt in beiden Fällen zu einer starken Reduktion der Banden für pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc/Frs2 und pTyrosin nach EGF-Stimulus (Abb.: 3-16a, vgl. Spur 4, 5 und 6). Die Verwendung beider Inhibitoren zusammen führt dabei zu einem additiven Effekt, so dass hier kaum noch Signale zu erkennen sind (Abb.: 3-16a, vgl. Spur 4, 5, 6 und 7). Dieser additive Effekt von PP1 und PP2 ließ sich noch deutlicher in der Input-Kontrolle erkennen (Abb.: 3-16b, vgl. Spur 4, 5 und 6). Des Weiteren fiel bei der Betrachtung der nachgeschalteten Signalwege PI3K und MAPK auf, dass im Falle von PP1 trotz deutlicher Reduktion des pTrkB-Signals keine deutliche Veränderung der pAkt- und pErk1/2-Banden zu erkennen war (Abb.: 3-16b, vgl. Spur 4 und 5). Die Verwendung von PP2 führte dagegen zu einer reduzierten Immunreaktivität für pAkt, jedoch nicht für pErk1/2, was wiederum mit einem abgeschwächten pTrkB-Signal einherging (Abb.: 3-16b, vgl. Spur 4 und 6). Beide Inhibitoren zusammen führten im Fall von pAkt zu einer deutlichen Reduktion, das Signal für pErk1/2 war weit weniger abgeschwächt (Abb.: 3-16b, vgl. Spur 4 und 7). Generell war die hier beobachtete Aktivität der beiden



Signalwege PI3K und MAPK nicht ausschließlich durch die Transaktivierung von TrkB bedingt, sondern auch durch die durch Bindung von EGF ausgelöste reguläre Aktivierung des EGF-Rezeptors allein. Insgesamt war zu sehen, dass der PI3K-Signalweg deutlich stärker von einer Inhibition der Src-Kinasen betroffen war als der MAPK-Signalweg. Daraus wurde gefolgert, dass entweder der Beitrag der Transaktivierung von TrkB an zellulären Signalwegen hauptsächlich in der Aktivierung des PI3K-Signalwegs zu sehen ist, oder aber die Aktivierung der MAPK-Kaskade von weiteren, hier nicht inhibierten Src-Familienmitgliedern vermittelt wird.

3.2.7 Die Inhibition der TrkB-Aktivierung durch dominant negative Src-Mutanten

Da die Verwendung pharmakologischer Inhibitoren im Hinblick auf Substratspezifität immer Anlass für Zweifel gibt, wurde die Frage nach der Beteiligung von Src-Kinasen an der Transaktivierung von TrkB auch auf einem anderen Weg untersucht. Hierzu wurde die enzymatische Aktivität der beiden Src-Kinasefamilienmitglieder cSrc und Fyn unterdrückt, indem dominant negative Isoformen der Proteine in kortikalen Vorläuferzellen überexprimiert wurden. Die entsprechenden codierenden cDNA-Sequenzen wurden dazu aus bereits bestehenden Konstrukten in lentivirale Expressionskonstrukte des Typs pLVX-AcGFP-C1 bzw. pLVX-DsRed-N1 umkloniert, so dass cSrc als Fusionsprotein mit C-terminalem DsRed-Tag, Fyn mit N-terminalem GFP-Tag überexprimiert werden konnte. Die Analyse von mit diesen Konstrukten infizierten Zellen erfolgte zum Einen anhand von SDS-PAGE und Western Blot, zum Anderen auch auf der Ebene von Einzelzellen durch immunzytochemische Färbung. In beiden Fällen wurde der Grad der TrkB-Aktivierung durch die Immunreaktivität des Antikörpers gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle von TrkB sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 3-17a gezeigt, wirkte sich eine Infektion von kortikalen Vorläuferzellen generell nicht auf die Induzierbarkeit der pTrkB-PLC γ -Banden aus (Abb.: 3-17, vgl. Spur 1, 2, 3 und 4), was durch die Verwendung eines ausschließlich GFP-exprimierenden Konstrukts kontrolliert werden konnte.



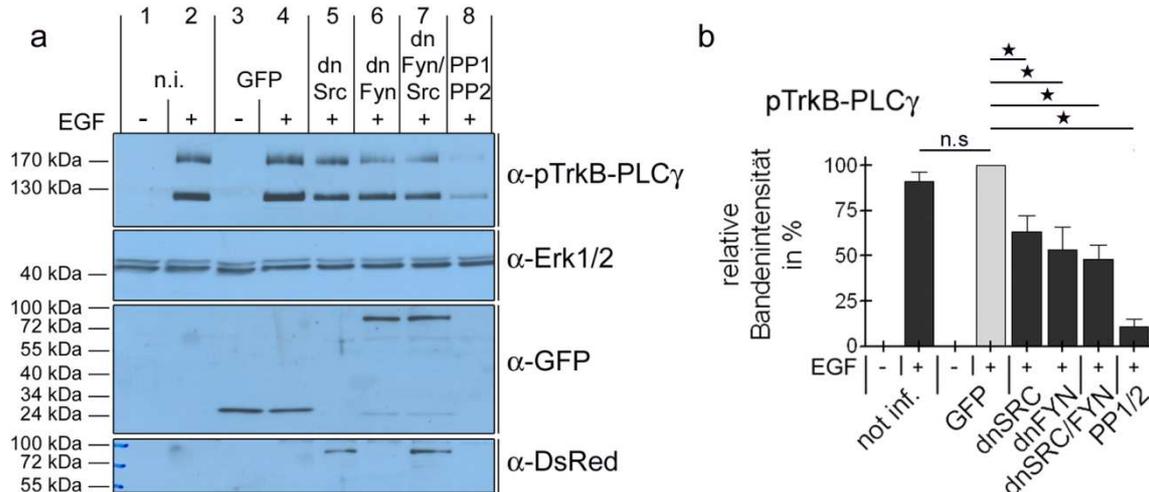


Abbildung 3-17: Die Inhibition von cSrc und Fyn durch Überexpression dominant negativer Proteinmutanten

(a) Western Blot-Analyse von lentiviral infizierten kortikalen Vorläuferzellen. Die Überexpression von dominant negativen Isoformen von cSrc und Fyn führte zur Reduktion der TrkB-Phosphorylierung durch EGF (Spuren 5-7). (b) Die Quantifizierung relativer Bandenintensität zeigte die signifikante Reduktion der pTrkB-Immunität nach Inhibition von cSrc und Fyn. ★: $p < 0,05$.

Die Überexpression der dominant negativen Kinase cSrc und Fyn resultierte in einer Abschwächung der Banden, in beiden Fällen in vergleichbarer Art und Weise (Abb.: 3-17a, Spur 4, 5, und 6 und Abb.: 3-17b, GFP-Kontrolle: 100,0 %; dnSRC: $63,3 \pm 8,7$ %; dnFYN: $53,2 \pm 12,8$ %; Mittelwerte \pm SEM). Auch die Überexpression beider mutanter Proteine zugleich führte zur Reduktion der Immunreaktion für aktiviertes TrkB, welche allerdings nicht deutlich stärker ausfiel als bei den Einzelinfektionen (Abb.: 3-17a, Spur 4, 5, 6 und 7 und Abb.: 3-17b; GFP-Kontrolle: 100,0 %; dnSRC/dnFYN: $48,1 \pm 7,7$ %; Mittelwerte \pm SEM). Die Expression der jeweiligen Fusionsproteine wurde anhand des Nachweises des GFP- beziehungsweise DsRed-Tags überprüft. Dabei wurde deutlich, dass die Expression beider mutanter Proteine vergleichbar war, die beobachteten Laufhöhen stimmten dabei mit den entsprechenden Erwartungen für beide Fusionsproteine überein (GFP-Fyn: ~ 87 kDa; cSrc-DsRed: ~ 90 kDa). Die als Kontrolle durchgeführte pharmakologische Inhibition mit PP1 und PP2 war in Bezug auf die Erniedrigung des pTrkB Levels deutlich wirkungsvoller als die Inhibition der Proteine durch Überexpression dominant negativer Isoformen (Abb.: 3-17a, Spur 4, 5, 6, 7 und 8 und Abb.: 3-17b; GFP-Kontrolle: 100,0 %; PP1/2: $10,6 \pm 4,2$ %; Mittelwerte \pm SEM).



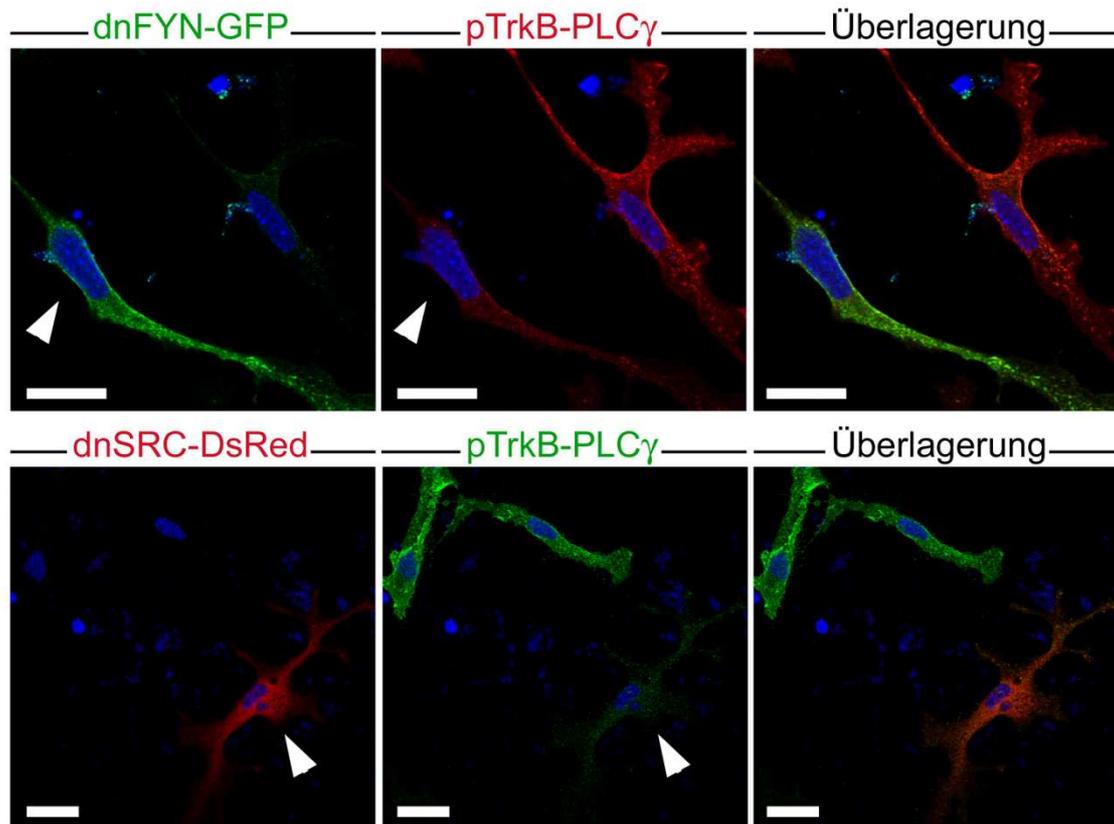


Abbildung 3-18: Die Reduktion von pTrkB nach cSrc/Fyn-Inhibition auf Einzelzellebene

Um das Ausmaß der Reduktion der TrkB-Phosphorylierung durch die Überexpression von dominant negativen Proteinmutanten von cSrc und Fyn auf der Ebene einzelner Zellen zu untersuchen, erfolgte eine immunzytochemische Analyse. Die jeweiligen Fluoreszenz-Tags der überexprimierten Konstrukte ließen infizierte Zellen erkennen (Pfeile), die Immunreaktivität gegenüber pTrkB-PLC γ zeigte die Aktivität von TrkB. Sowohl dnFyn-GFP als auch dnSrc-DsRed setzten die TrkB-Phosphorylierung deutlich herab. Maßstab: 10 μ m.

Der Wirkungsgrad der dominant negativen Inhibition wird dabei nicht nur von der unvollständigen Konkurrenz der mutanten Proteine begrenzt, sondern auch durch die Infektionsrate, die bei etwa 35-45 % lag. Dadurch ist ein relativ hoher Anteil an Zellen völlig unbeeinflusst, so dass reduzierte pTrkB-Signale aus Totallysaten nicht so klar zu Tage treten können, als dass der Grad der Inhibition in der einzelnen Zelle repräsentiert werden könnte. Auf Einzelzellebene wurde die Reduktion der TrkB-Phosphorylierung durch die immunzytochemische Färbung gegen pTrkB-PLC γ untersucht, wobei infizierte Zellen anhand der Expression der Fluoreszenz-Tags der dominant negativen Proteinmutanten identifiziert werden konnten. Wie in Abbildung 3-18 zu sehen ist, war die Immunreaktivität gegenüber pTrkB-PLC γ in infizierten kortikalen Vorläufern (Pfeil) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen deutlich reduziert.



3.3 Die Identität der durch EGF stimulierten pTrkB-PLC γ -Banden

Wie oben beschrieben führte die Stimulation von kortikalen Vorläuferzellen mit EGF zur Induktion von α -pTrkB-PLC γ -reaktiven Banden im Western Blot. Dabei fiel vor allem auf, dass beide induzierten Banden ein für TrkB ungewöhnliches Laufverhalten zeigten. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Molekulargewichten von 145 kDa für die Voll-Längenisofom von TrkB und 95 kDa für die trunkierte TrkB-Isoform fanden sich hier Laufhöhen von unterhalb 130 kDa und etwa 170 kDa. Während die beobachtete Bande unterhalb 130 kDa mit der durch Überexpression von HA-TrkB erhaltenen TrkB-Bande gut übereinstimmte, blieb die Identität der Bande bei 170 kDa zunächst rätselhaft.

3.3.1 Die Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen

Wie oben gezeigt, ist die Aktivität des EGF-Rezeptors für die Transaktivierung von TrkB durch EGF notwendig (Abb.: 3-15a, vgl. Spur 4 und 8). Da für den EGF-Rezeptor ein apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE von etwa 170-180 kDa beschrieben wird und es nach Zugabe von EGF zur Autophosphorylierung des Rezeptors kommt, sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass der gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle von TrkB gerichtete Antikörper eine Kreuzreaktivität gegen den phosphorylierten EGF-Rezeptor zeigte. Dazu wurde der EGF-Rezeptor in Lysaten kortikaler Vorläuferzellen mit und ohne EGF-Stimulation immunpräzipitiert, woraufhin die Detektion von pTrkB-PLC γ erfolgte. Wie Abbildung 3-19 zeigt, war keine Kreuzreaktivität des pTrkB-PLC γ -Antikörpers mit dem phosphorylierten EGF-Rezeptor zu beobachten. Wie in der Input-Kontrolle zu sehen ist, konnten die immunreaktiven Banden mit EGF wie zuvor beobachtet induziert werden. Interessanterweise finden sich beide Banden auch im Überstand der Immunpräzipitation wieder. Obwohl sie hier etwas schwächer erschienen, war die Relation der beiden Banden jedoch mit der in der Input-Kontrolle vergleichbar. Dies diente als erster Hinweis dafür, dass die hochmolekulare Bande kaum der EGF-Rezeptor sein konnte, da die Intensität dieser Bande dann nach Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors deutlich schwächer hätte ausfallen müssen. Nach Auftragen des Immunpräzipitats selbst war keine pTrkB-PLC γ -reaktive Bande zu erkennen, wohingegen die Effizienz der Immunpräzipitation durch den Nachweis des EGF-Rezeptors gezeigt



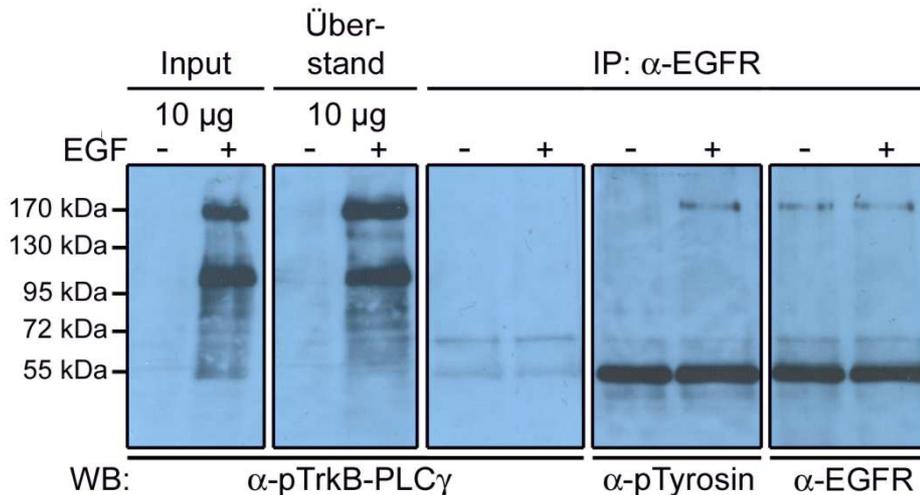


Abbildung 3-19: Die Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors aus Lysaten kortikaler Vorläufer

Um eine Kreuzreaktivität des pTrkB-PLC γ -Antikörpers gegen den aktivierten EGF-Rezeptor ausschließen zu können, wurde der EGF-Rezeptor aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen immunpräzipitiert. Der Nachweis von pTyrosin zeigte die Anwesenheit des aktivierten EGF-Rezeptors in den Präzipitaten von Lysaten stimulierter Zellen. Der pTrkB-PLC γ -Antikörper konnte diese Bande nicht detektieren.

werden konnte. Die Detektion von pTyrosin diente als zusätzliche Kontrolle und zeigte, dass der EGF-Rezeptor nach Zugabe von EGF tatsächlich phosphoryliert vorliegt. Obwohl also der EGF-Rezeptor im Immunpräzipitat deutlich nachweisbar und auch phosphoryliert war, konnten auch im Falle der mit EGF-stimulierten Zellen keine Banden für pTrkB-PLC γ beobachtet werden, so dass eine Kreuzreaktivität des pTrkB-PLC γ -Antikörpers mit dem phosphoryliertem EGF-Rezeptor ausgeschlossen werden konnte.

3.3.2 Die Immunpräzipitation von pTrkB-Shc/Frs2 aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen

Als weiteres Kontrollexperiment wurde außerdem eine Immunpräzipitation mit dem kommerziellen Antikörper durchgeführt, der gegen die phosphorylierte Shc/Frs2-Bindungsstelle des TrkB-Rezeptors gerichtet war. Auf diese Weise konnte der Rezeptor selektiv aus Lysaten von mit EGF-stimulierten und -unstimulierten kortikalen Vorläuferzellen präzipitiert werden, insofern er am Tyrosin 515, der Shc/Frs2-Bindungsstelle, phosphoryliert vorlag. Der anschließende Nachweis von an Tyrosin 816 phosphoryliertem TrkB sollte die Identität der vom pTrkB-PLC γ -Antikörper erkannten Banden bestätigen.



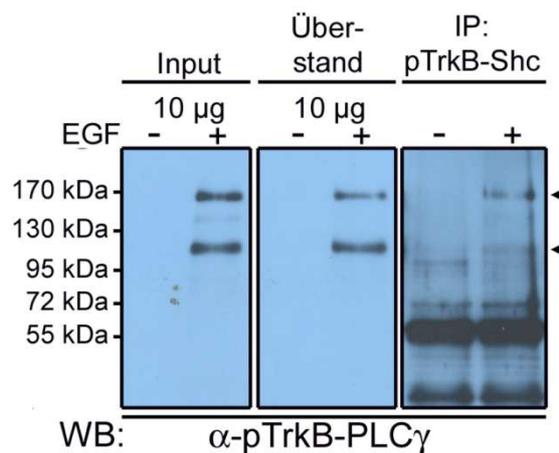


Abbildung 3-20: Die Immunpräzipitation von aktivem TrkB mit α -pTrkB-Shc

Die durch EGF-induzierten pTrkB-Banden ließen sich mit dem Antikörper gegen die phosphorylierte Shc-Bindungsstelle von TrkB immunpräzipitieren und nach Inkubation mit dem gegen die PLC γ -Bindungsstelle gerichteten Antikörper detektieren (Pfeile).

In Abbildung 3-20 ist zu sehen, dass sowohl die Bande bei etwa 170 kDa als auch die Bande bei 130 kDa vom pTrkB-Shc-Antikörper präzipitiert und außerdem vom pTrkB-PLC γ -Antikörper erkannt wird. Der Vergleich von Input- und Überstandskontrolle zeigte eine nur geringe Abschwächung des pTrkB-PLC γ nach der Immunpräzipitation, was auf eine nicht sehr gute Effizienz der Prozedur schließen ließ. Trotzdem lieferte dieses Experiment einen weiteren Hinweis darauf, dass TrkB von EGF über den EGFR stimuliert wird.

3.3.3 Die enzymatische Deglykosylierung von Proteinlysaten kortikaler Vorläuferzellen

Um die Frage zu klären, warum der nach EGF-Stimulus phosphorylierte TrkB-Rezeptor in Lysaten kortikaler Vorläuferzellen mit knapp 170 kDa ein ungewöhnlich hohes Laufverhalten zeigte, wurde die *in vitro*-Deglykosylierung von entsprechenden Proteinlysaten durchgeführt. Dazu wurde ein kommerzielles Deglykosylierungskit benutzt, welches unter Verwendung von fünf Enzymen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten die Entfernung von sowohl N- als auch O-verknüpften Kohlenhydratseitenketten ermöglicht. Da das Kit auf die Deglykosylierung von Proteinen in wässriger Lösung ausgelegt war, wurde zunächst kontrolliert, ob die entsprechenden



Enzymaktivitäten auch in Anwesenheit des für die Lysate verwendeten Lysis-puffers gegeben waren. Als Kontrollprotein wurde dazu fötales Fetuin aus dem Rind herangezogen, ein Glykoprotein, das durch N- und O-verknüpfte Oligosaccharide modifiziert ist. Abbildung 3-21a zeigt die deglykosylierende Aktivität des Enzymmixes anhand des Verdauens von jeweils 1 µg fötalem Fetuin für 3 Stunden bei 37 °C. Das bei etwa 65 kDa laufende Glykoprotein konnte sowohl in Wasser als auch in Gegenwart des Lysis-puffers durch den enzymatischen Verdau auf etwa 50 kDa gebracht werden, wodurch die effiziente Abspaltung von Kohlenhydratseitenketten in beiden Fällen gezeigt werden konnte (Abb.: 3-21a).

Um nun eine mögliche Modifikation von TrkB durch Glykosylierung zeigen zu können, wurden Totallysate aus mit EGF-stimulierten kortikalen Vorläuferzellen wie oben beschrieben enzymatisch verdaut. Dabei konnte eine Verschiebung der EGF-stimulierten pTrkB-PLCγ-Bande bei 170 kDa auf etwa 145 kDa herbeigeführt werden, wohingegen die Bande bei 130 kDa unverändert blieb (Abb.: 3-22b).

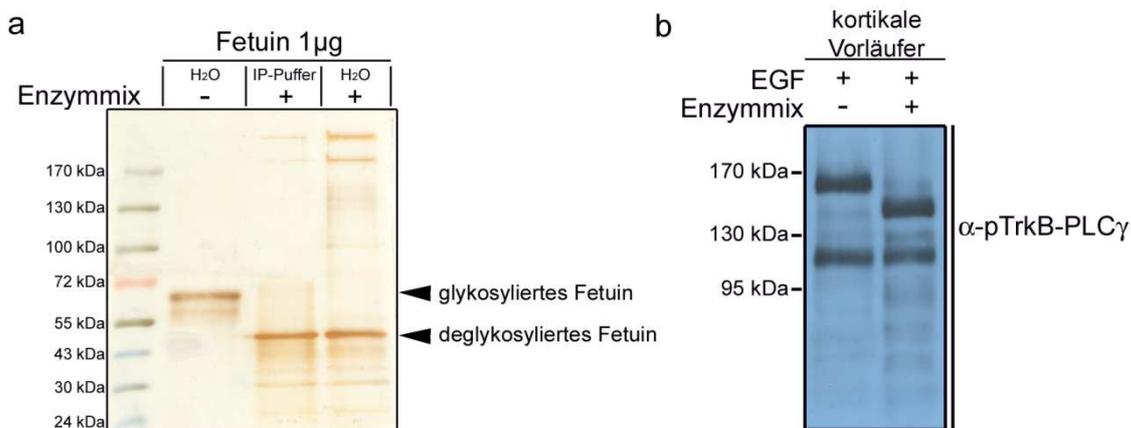


Abbildung 3-21: Die enzymatische Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläufer

(a) Zur Kontrolle der enzymatischen Aktivität des deglykosylierenden Enzymmixes im verwendeten Lysis-puffer wurde 1 µg fötales Rinderfetuin sowohl in Puffer als auch in Wasser verdaut. In beiden Fällen war die Deglykosylierung des Glykoproteins in vergleichbarem Ausmaß zu beobachten. (b) Die enzymatische Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen, welche mit EGF stimuliert worden waren, führte zu einer Verschiebung der oberen pTrkB-PLCγ-Bande auf etwa 145 kDa. Die unterhalb der 130 kDa-Markerbande laufende Bande blieb unverändert.



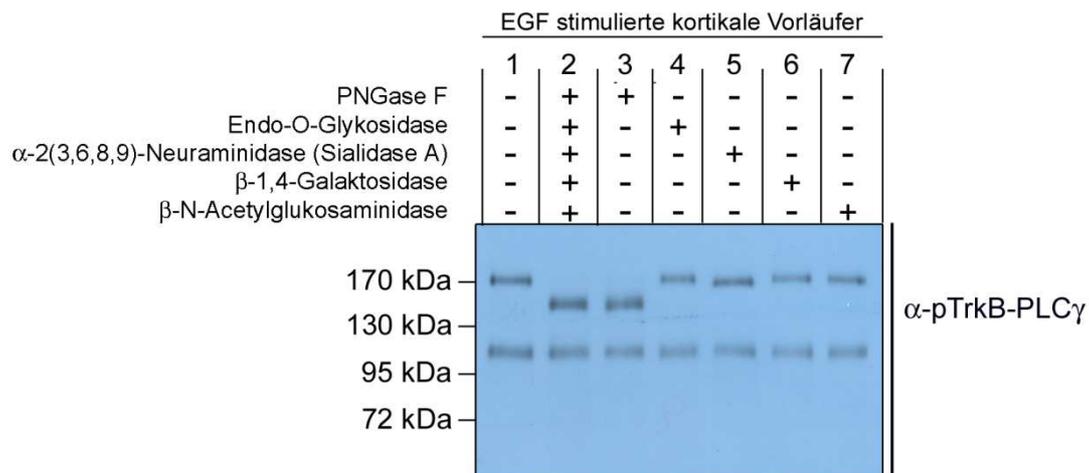


Abbildung 3-22: Die enzymatische Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläufer im Einzelansatz

Western Blot-Analyse der *in vitro*-Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen, die mit EGF stimuliert worden waren. Im Einzelverdau zeigte sich dabei, dass die enzymatische Aktivität von PNGase F für die hauptsächliche Verschiebung der Bande bei 170 kDa verantwortlich ist (vgl. Spur 1, 2 und 3), während andere Enzyme keine sichtbaren Veränderungen bewirkten. Einzig noch Sialidase A rief eine geringe Erniedrigung der Bande hervor (Spur 5).

Um die Art der Modifikation der 170 kDa Bande etwas genauer eingrenzen zu können, wurden die entsprechenden Totallysate mit den jeweiligen Enzymen getrennt voneinander verdaut. Hier wurde deutlich, dass die hauptsächliche Verschiebung der Bande durch die Deglykosylierung mit Peptid Glykosidase F (PNGase F) verursacht wurde (Abb.: 3-22, vgl. Spur 1, 2 und 3). PNGase F spaltet alle Kohlenhydratseitenketten vom komplexen, hybriden und Mannose-reichen Typ ab, die mit Asparagin (N-Glykosylierung) verknüpft sind. Andere Enzyme wie Endo-O-Glykosidase, β -1,4-Galaktosidase und β -N-Acetylglukosaminidase führten zu keiner sichtbaren Veränderung der Laufhöhe der induzierten pTrkB-Bande (Abb.: 3-22, vgl. Spur 1, 4, 6 und 7). Einzig der Verdau mit 2(3,6,8,9)-Neuraminidase (Sialidase A) zeigte noch eine geringfügige Verschiebung, was das Vorhandensein von terminalen Sialinsäure-Modifikationen anzeigte (Abb.: 3-22, vgl. Spur 1 und 5).



3.3.4 Die Inhibition von N-Glykosylierung in kortikalen Vorläuferzellen durch Tunicamycin

Da der oben beschriebene enzymatische Verdau mit den verwendeten Enzymen nicht sicherstellen konnte, alle Typen von N-Glykosyl-Modifikationen zu entfernen und außerdem nur *in vitro* anwendbar war, wurden kortikale Vorläuferzellen zusätzlich mit Tunicamycin behandelt. Tunicamycin ist ein Gemisch homologer Antibiotika, welches das Enzym N-Acetyl-Glukosamin-Transferase sowohl pro- als auch eukaryotischer Herkunft inhibiert. Tunicamycin blockiert damit den ersten Schritt in der Synthese von N-Glykanen, d. h. neu synthetisierte Proteine können nicht mehr durch N-glykosidische Bindungen modifiziert werden. Durch die Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen und deren anschließender Stimulation mit EGF und BDNF sollten die funktionellen Konsequenzen untersucht werden, die eine gestörte Glykosylierung des Neurotrophinrezeptors TrkB zur Folge hat. Die Behandlung von kortikalen Vorläuferzellen mit Tunicamycin für 12 Stunden führte nach Western Blot-Analyse zu einer Reduktion der durch EGF-stimulierten und mit α -pTrkB-PLC γ detektierbaren Banden bei 170 und 130 kDa.

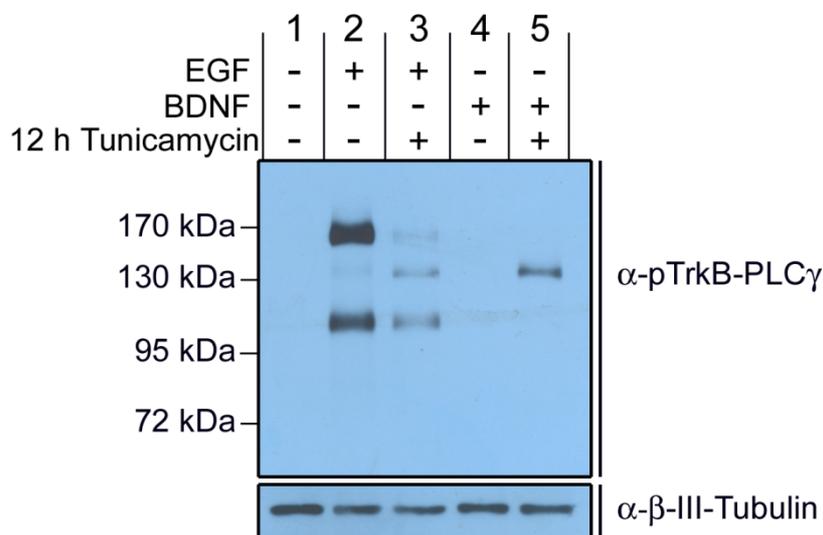


Abbildung 3-23: Die Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen

Western Blot-Analyse von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen, die nach der Behandlung mit Tunicamycin mit EGF oder BDNF stimuliert worden waren. Tunicamycinbehandlung für 12 h führte zu einer Abschwächung der von EGF induzierten pTrkB-PLC γ -Banden bei 170 kDa und unterhalb 130 kDa, allerdings tauchte eine zusätzliche Bande oberhalb 130 kDa auf (Spur 2 und 3). Eine vergleichbare Bande konnte durch die Stimulation behandelter Zellen mit BDNF induziert werden, wohingegen unbehandelte Zellen keine Reaktion zeigten (Spur 4 und 5).



Außerdem wurde eine zusätzliche Bande bei etwa 145 kDa sichtbar, die ohne Tunicamycin-Behandlung nur sehr schwach zu erkennen war (Abb.: 3-23, vgl. Spur 2 und 3). Im Falle der BDNF-Stimulation kortikaler Vorläuferzellen zeigte die Tunicamycin-Behandlung ebenfalls deutliche Auswirkungen. Ohne Behandlung konnte vom pTrkB-PLC γ -Antikörper kein BDNF-induziertes Signal detektiert werden, wohingegen nach Tunicamycin-Behandlung ein deutliches Signal nach BDNF-Stimulus zu erkennen war (Abb.: 3-23, vgl. Spur 4 und 5). Der neu synthetisierte Anteil von TrkB-Rezeptoren, bei denen keine posttranslationelle Modifikation durch N-Glykosylierung möglich war, bestand also aus Proteinen mit einer apparenten Laufrhöhe von etwa 145 kDa. Außerdem waren diese eher durch BDNF als durch EGF aktivierbar, was auf einen funktionellen Unterschied der verschiedenen modifizierten TrkB-Isoformen schließen ließ.

Um einen Hinweis auf die Art und Weise zu bekommen, wie die unterschiedliche Glykosylierung zu solchen funktionellen Unterschieden einzelner TrkB-Subpopulationen führen könnte, wurde im Weiteren auch die Lokalisation von TrkB in Abhängigkeit von N-Glykosylierung untersucht.

3.4 Die subzelluläre Dynamik des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Um Hinweise zu bekommen, wo TrkB in kortikalen Vorläuferzellen lokalisiert ist, sollte die subzelluläre Verteilung des Rezeptors immunzytochemisch untersucht werden. Dabei war von speziellem Interesse, ob es je nach Stimulus oder Rezeptor-modifikation zu einer dynamischen Umverteilung von TrkB zusammen mit funktionellen Konsequenzen innerhalb der Zellen kommen kann.

3.4.1 Die Lokalisation von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Um zum Einen den Grund für die nicht vorhandene Responsivität kortikaler Vorläuferzellen gegenüber Neurotrophinen wie BDNF oder NT-3 zu finden, und zum Anderen die Frage zu klären, auf welche Weise die Behandlung mit Tunicamycin die Funktionalität von TrkB wie oben beschrieben beeinflusst (Abb.: 3-24), wurde die subzelluläre Lokalisation von TrkB immunzytochemisch untersucht. Dazu wurden



kortikale Vorläuferzellen zunächst auf poly-D,L-Ornithin und Laminin1 ausgesät und nach 24-stündigem Faktorentzug fixiert. Die Lokalisation von TrkB wurde dann durch eine immunzytochemische Färbung mit einem α -TrkB-Antikörper untersucht. Gleichzeitig wurde mit α -Nestin gegengefärbt, um die Identität der Zellen als kortikale Vorläuferzellen zu bestätigen und außerdem die Zellmorphologie sichtbar zu machen. Wie die Abbildung 3-24 zeigt, lag der Neurotrophin-Rezeptor TrkB in unbehandelten kortikalen Vorläuferzellen hauptsächlich intrazellulär vor. Die dabei zu sehende Immunreaktivität war punktiert verteilt, was darauf hindeutete, dass TrkB in vesikelartigen, endosomalen Kompartimenten lokalisiert ist. Da die Bindung von Liganden wie BDNF oder NT-3 an Neurotrophin-Rezeptoren an der Zelloberfläche erfolgt, lieferte die vorgefundene, intrazelluläre Lokalisation von TrkB einen guten Hinweis darauf, wieso kortikale Vorläuferzellen kaum zu einer Reaktion auf extrazelluläre Stimulation durch Neurotrophine fähig waren. Dabei schien die Retention des Rezeptors im Zellinneren und die gleichzeitige Verhinderung seiner Exposition an der Zelloberfläche eine zentrale Rolle zu spielen.

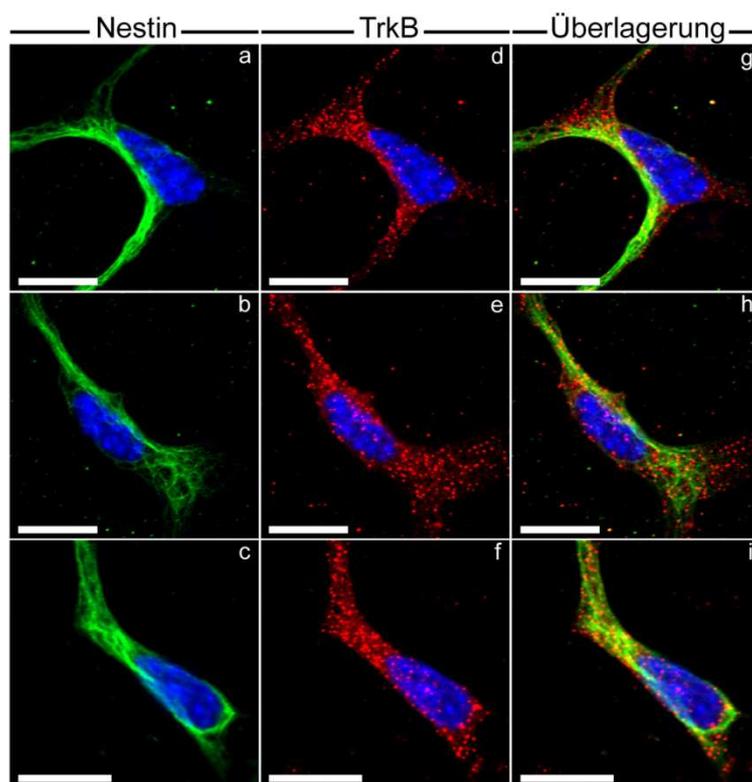


Abbildung 3-24: Die Lokalisation von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Die subzelluläre Verteilung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen wurde mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung gegen TrkB untersucht. TrkB war hauptsächlich in vesikelartigen, intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (d-i). Eine Färbung gegen Nestin zeigte die Morphologie und die Identität der Zellen (a-c, g-i). Maßstab: 10 μ m.



3.4.2 Die Lokalisation von TrkB nach Tunicamycin-Behandlung kortikaler Vorläuferzellen

Wie oben gezeigt (vgl. 3.3.4, Abb.: 3-23), führte die Tunicamycin-Behandlung in kortikalen Vorläuferzellen dazu, dass es nach Stimulation mit BDNF zu einer Phosphorylierung von TrkB kommt. Das war ohne die Behandlung mit Tunicamycin nicht zu beobachten. Um nun die Frage zu klären, ob die Verhinderung der N-Glykosylierung bei der Synthese neuer Proteine durch Tunicamycin einen Einfluss auf die Lokalisation von TrkB hat, wurden die kortikalen Vorläuferzellen für 12 Stunden mit 1 µg/ml Tunicamycin behandelt und anschließend fixiert. Die immunzytochemische Färbung mit α -TrkB sollte Aufschluss über eventuelle Veränderungen der intrazellulären TrkB-Lokalisation geben. Wie die Abbildung 3-25 zeigt, führte die Tunicamycin-Behandlung zu einer Umverteilung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen.

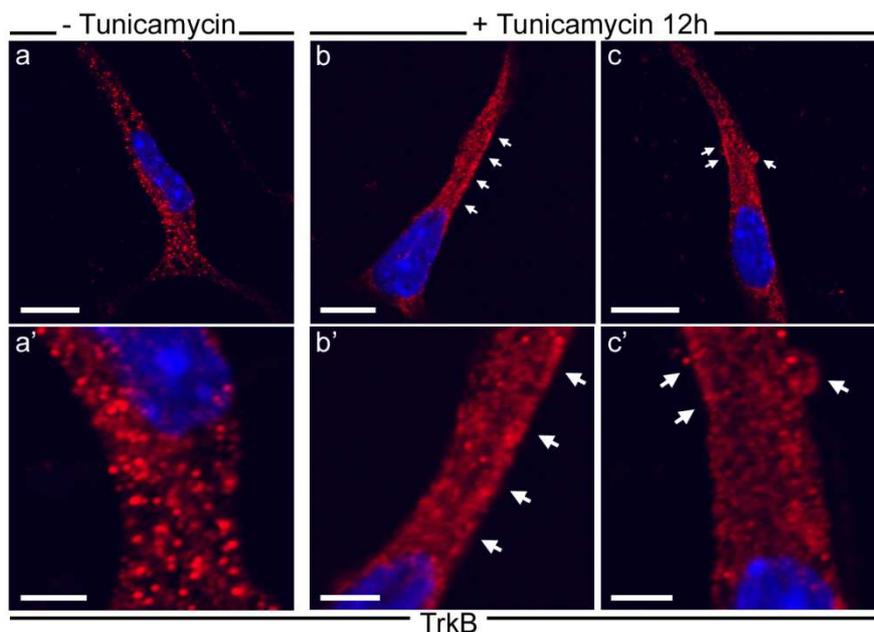


Abbildung 3-25: Die Tunicamycin-Behandlung kortikaler Vorläufer führt zu einer Umverteilung von TrkB

Die Behandlung von kortikalen Vorläuferzellen mit Tunicamycin veränderte die subzelluläre Verteilung von TrkB. Während TrkB in unbehandelten Zellen fast ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist, führt die Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin zu einer Umverteilung des Rezeptors mit einem eher an Membranständigkeit erinnernden Erscheinungsbild. Maßstab: a-c: 10 µm; a'-c': 3 µm.



Während TrkB in unbehandelten Zellen wie vorher beobachtet in intrazellulären Kompartimenten zu erkennen war, kam es zu einer teilweisen Translokation des Rezeptors an die Zellmembran. Die deutlich punktierte Färbung im Zellinneren trat dabei kaum noch auf, wohingegen Bereiche identifiziert werden konnten, die auf eine Membranständigkeit des Rezeptors hindeuteten (Abb.: 3-25b, b', c und c', Pfeile). Zusammen mit den Resultaten aus 3.3.4 wurde so deutlich, dass die in Abbildung 3-23 beobachtete funktionelle Konsequenz einer induzierten Responsivität gegenüber extrazellulären Reizen wie BDNF durch die Aufhebung der intrazellulären Retention von TrkB und dessen dadurch bedingte Exposition an der Zelloberfläche ermöglicht wurde.

3.4.3 Die intrazelluläre Umverteilung von TrkB nach Stimulation kortikaler Vorläuferzellen mit EGF

Dieser Arbeit vorausgegangene Studien über die subzelluläre Verteilung von TrkB in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität oder Stimulation konnten die dynamische Umverteilung des Rezeptors unter bestimmten Umständen bereits beschreiben (Meyer-Franke et al., 1998; Zhao et al., 2009; Du et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich daher die Frage, ob die beobachtete Transaktivierung von TrkB durch EGF mit einer Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zellen einhergeht. Dazu wurden kortikale Vorläuferzellen ausplattiert, 24 Stunden in Medium ohne Wachstumsfaktoren gehalten und schließlich mit 20 ng/ml EGF stimuliert. Die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd erfolgte dabei wie angegeben zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Ziel, die Verteilung von TrkB über einen gewissen Zeitraum hinweg beobachten zu können. Wie in Abbildung 3-26 zu sehen ist, führte die Behandlung kortikaler Vorläuferzellen mit EGF zu einer raschen Translokation des TrkB-Rezeptors weg von intrazellulären Kompartimenten an die Zellmembran. Bereits 30 Sekunden nach der Zugabe von EGF waren die Signale sowohl für TrkB (Abb.: 3-26f-j) als auch pTrkB-PLC γ (Abb.: 3-26a-e) nicht mehr vesikelartig im Zellinneren, sondern vielmehr in einer membranständigen Art und Weise lokalisiert. Dieser Effekt war nach 10 Minuten bereits deutlich abgeschwächt und nach 2 Stunden kaum noch zu erkennen. Interessanterweise waren die Signale für pTrkB-PLC γ auch nach 2 Stunden im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen noch deutlich erhöht, wenn auch das Signal überwiegend intrazellulär lokalisiert war.



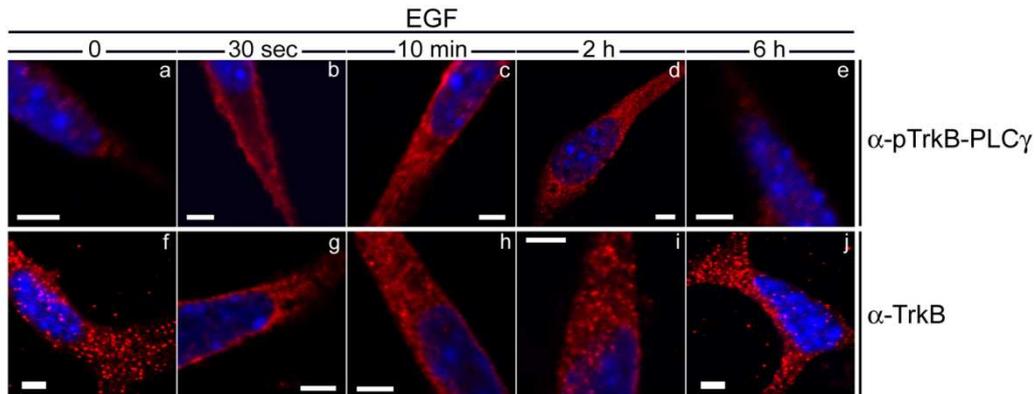


Abbildung 3-26: Der Zeitverlauf der von EGF-induzierten Translokation von TrkB

Die Stimulation von kortikalen Vorläuferzellen mit EGF führte bereits 30 sek nach dem Stimulus zur Translokation von TrkB an die Plasmamembran. Der Effekt war von transientser Natur, was an der Zunahme von intrazellulären Populationen des Rezeptors 10 min nach dem Reiz und dem Zurückkehren zur anfänglichen Lokalisation nach 6 h zu erkennen war (f-j). Analog dazu war die Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ -Bindungsstelle nach 30 sek ausschließlich an der Plasmamembran zu detektieren und nach 6 h wieder verschwunden (a-e). Maßstab: 3 μ m.

Die Rekrutierung von TrkB an die Plasmamembran schien also von transientser Natur zu sein, wohingegen die Phosphorylierung des Rezeptors länger anhielt. Nach sechs Stunden war wieder die Ausgangssituation erreicht, mit kaum zu detektierenden pTrkB-PLC γ -, und vorwiegend intrazellulären, vesikelartigen TrkB-Signalen.

Um den Eindruck der oben beschriebenen Umverteilung von TrkB innerhalb kortikaler Vorläuferzellen vor und nach EGF-Behandlung zu bestätigen, wurde zusätzlich zu klassischer konfokalen Mikroskopie auch die so genannte STED (Stimulated Emission Depletion)-Mikroskopie eingesetzt. Diese Technik hochauflösender Bildgebung setzt die sonst durch die Wellenlänge der verwendeten Laser beschränkte Auflösungsgrenze von Objekten weiter herab, so dass eine noch genauere Analyse der subzellulären Verteilung von TrkB vor und nach der Stimulation mit EGF möglich war. Die Abbildung 3-27 zeigt die entsprechenden Bilder von fixierten kortikalen Vorläuferzellen, die für 30 Sekunden mit EGF stimuliert und gegen TrkB und pTrkB-PLC γ gefärbt worden waren. Dabei ist jeweils die Gegenüberstellung des konfokalen Bilds (Abb.: 3-27a-d) mit der durch STED-Mikroskopie (Abb.: 3-27a'-d') erhaltenen Aufnahme gezeigt. Letztere wurde durch Entfaltung (Deconvolution) der so genannten PSF (point spread function)-Matrix weiter prozessiert (Abb.: 3-27a''-d'').



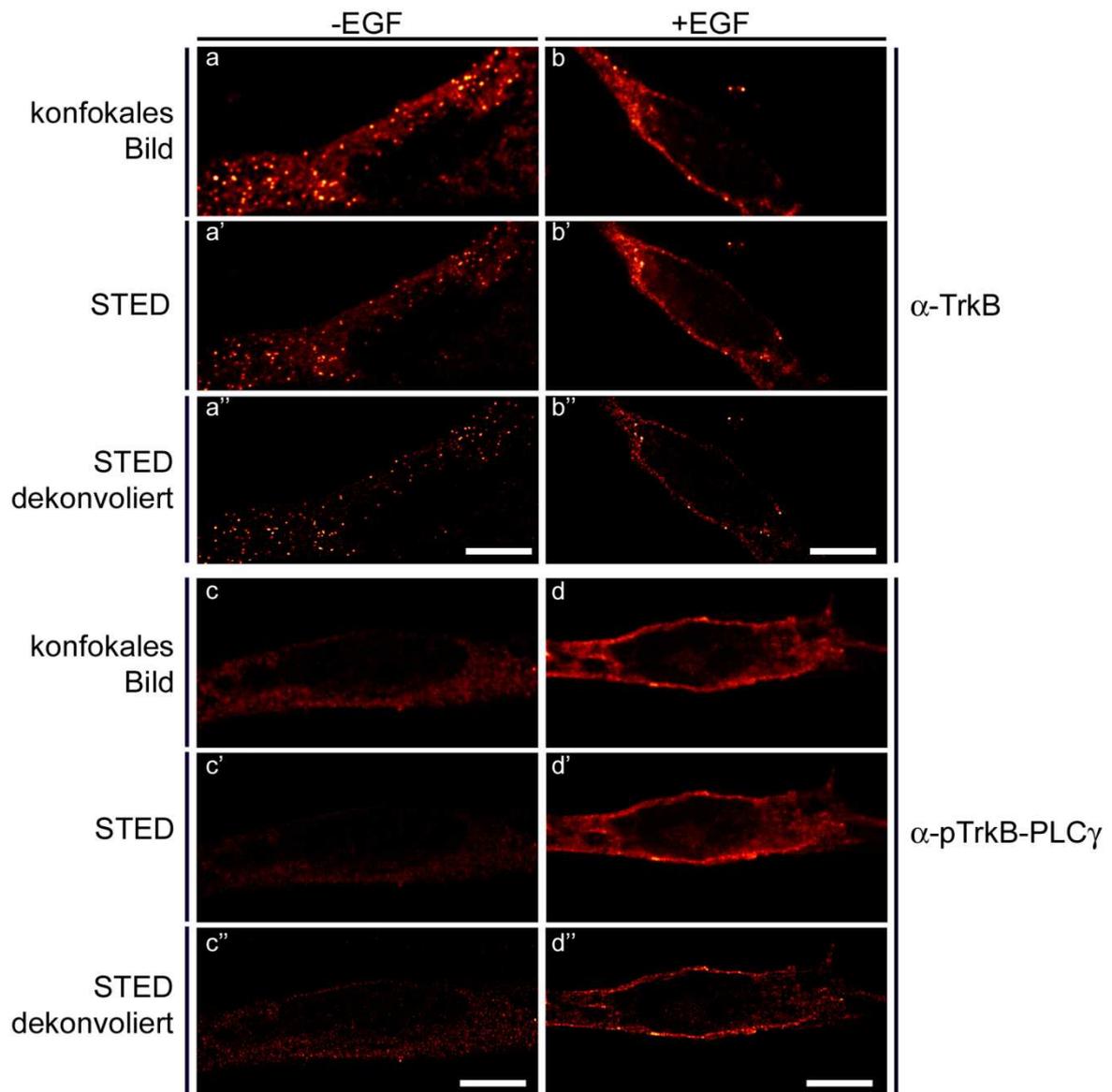


Abbildung 3-27: STED-Bildgebung von mit EGF-stimulierten kortikalen Vorläuferzellen

Die Technik der STED-Mikroskopie erlaubte die detaillierte Darstellung der Translokation von TrkB nach Stimulation kortikaler Vorläuferzellen mit EGF. 30 Sekunden nach Zugabe von EGF war die Umverteilung von TrkB von einer hauptsächlich intrazellulären Lokalisation hin zu einer membranständigen Verteilung zu erkennen (a, b). Analog dazu führte der Nachweis der phosphorylierten PLC γ -Bindungsstelle von TrkB zu Signalen an der Plasmamembran (c, d). Es ist jeweils eine Gegenüberstellung eines konfokalen (a-d), eines mit STED-Technik aufgenommenen (a'-d') und eines weiter prozessierten STED-Bildes (a''-d'') zu sehen. Maßstab: 3 μ m.



Wie zuvor erfährt der Rezeptor durch die Stimulation mit EGF eine rasche Rekrutierung zur Plasmamembran, die vesikelartige Lokalisation im Zellinneren geht deutlich zurück (Abb.: 3-27a und b). Außerdem lässt sich 30 Sekunden nach der Zugabe von EGF auch die Phosphorylierung an der PLC γ -Bindungsstelle erkennen, welche dann in einer membranständigen Art und Weise auftritt, wohingegen das entsprechende Signal in unstimulierten Zellen praktisch fehlt (Abb.: 3-27c und d).

3.4.4 Die Isolation von Zelloberflächenproteinen durch Biotinylierung

Wie oben beschrieben, erfolgt in kortikalen Vorläuferzellen nach EGF-Stimulus eine rasche Translokation von TrkB aus intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran. Diese Umverteilung des Rezeptors konnte durch die bereits gezeigten immunzytochemischen Färbungen gut dokumentiert werden. Allerdings blieb offen, inwieweit es tatsächlich auch zu einer Integration des Rezeptors in die Zellmembran und dabei zu dessen Exposition an der Zelloberfläche kam. Dieser Frage wurde nun auf biochemischem Weg nachgegangen, nämlich mit der Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen und deren anschließender Aufreinigung mit Hilfe der hochaffinen Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin. Dazu wurden kortikale Vorläuferzellen auf 100 mm Zellkulturschalen ausplattiert und nach 24-stündiger Kultivierung ohne Wachstumsfaktoren mit EGF stimuliert. Die darauf folgende Biotinylierung von Proteinen an der extrazellulären Seite der Plasmamembran erlaubte deren gezielte Aufreinigung gegenüber den Proteinen im Zytoplasma der Zellen. Neben dem Vergleich von behandelten und unbehandelten Zellen wurden zusätzlich Zellen untersucht, bei denen der EGFR durch die Vorbehandlung mit PD153035 selektiv blockiert worden war. Um die Spezifität der Avidin-vermittelten Aufreinigung zu überprüfen, wurden nicht biotinylierte Zelllysate als Kontrollen eingesetzt und das permanent an der Oberfläche exprimierte Protein Cadherin nachgewiesen. Die Abbildung 3-28 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse so gewonnener Proben. Zunächst war zu erkennen, dass die durch Avidin vermittelte Aufreinigung spezifisch für Zelloberflächenproteine war, wie das Auftauchen der α -panCadherin-Signale ausschließlich in den zuvor biotinylierten Lysaten zeigte (Abb.: 3-28a, vgl. Spur 1-3 und 4-6). Die Menge von an der Zelloberfläche exponiertem TrkB, sichtbar an der Intensität der α -TrkB-Banden der biotinylierten Proben, war dabei nach Stimulation der kortikalen Vorläuferzellen mit EGF im Vergleich zu unstimulierten Zellen deutlich



erhöht (Abb.: 3-28a, vgl. Spur 4 und 5). Außerdem wurde der Einbau von TrkB in die Plasmamembran durch die Vorbehandlung mit dem spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitor PD153035 blockiert, was an der reduzierten Bandenintensität von biotinyliertem TrkB zu erkennen war (Abb.: 3-28a, vgl. Spur 5 und 6). Der zusätzliche Nachweis der phosphorylierten PLC γ -Bindungsstelle von TrkB zeigte außerdem, dass ein Großteil von TrkB nach der Transaktivierung durch EGF an der Zelloberfläche biotinyliert werden konnte, was an der Verstärkung der entsprechenden immunreaktiven Banden zu sehen war (Abb.: 3-28a, vgl. Spur 4 und 5). Die Analyse von zytoplasmatischen Proteinen im Durchfluss der Avidin Aufreinigung zeigte, dass sich ein maßgeblicher Teil von aktiviertem TrkB zum Zeitpunkt der Biotinylierung im Zellinneren befand und nicht mit Biotin markiert werden konnte (Abb.: 3-28b, vgl. Spur 2 und 5). Dennoch war eine Reduktion der α -pTrkB-PLC γ Banden zwischen biotinylierten und nicht-biotinylierten Proben zu sehen, was den oben beschriebenen Einbau von TrkB in die Plasmamembran widerspiegelte (Abb.: 3-28b, vgl. Spur 4 und 5). Der Nachweis von β -III-Tubulin in den Durchfluss-Proben zeigte den gleichmäßigen Einsatz und die Beladung der analysierten Lysate (Abb.: 3-28b).

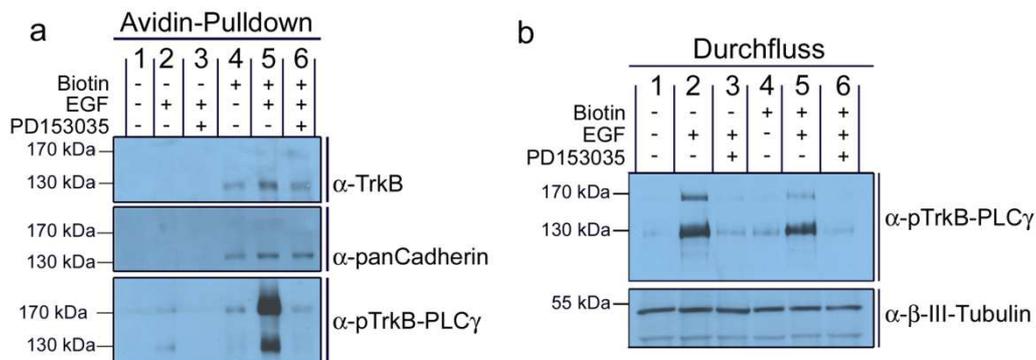


Abbildung 3-28: Der Avidin-Pulldown von biotinylierten Proteinen an der Zelloberfläche

Western Blot-Analyse des Avidin-Pulldown von biotinylierten Proteinen an der Zelloberfläche kortikaler Vorläuferzellen. Nach EGF-Stimulation war ein Anstieg von an der Zelloberfläche exponiertem TrkB zu beobachten (a, Spur 4 und 5; α -TrkB). Dieser Effekt konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem EGF-Rezeptor Inhibitor PD153035 geblockt werden (a, Spur 4, 5 und 6). Der Nachweis der phosphorylierten PLC γ -Bindungsstelle von TrkB zeigte, dass ein Großteil von transaktiviertem TrkB an der Zelloberfläche biotinyliert werden konnte (a, Spur 4 und 5; α -pTrkB-PLC γ). Die Durchfluss-Kontrolle ließ die Abnahme von Signalen für α -pTrkB-PLC γ in biotinylierten Proben erkennen (b, Spur 2 und 5) und zeigte den gleichmäßigen Einsatz der entsprechenden Lysate (b, Spur 1-6; α - β -III-Tubulin).



3.4.5 Die subzelluläre Lokalisation von TrkB im dorsalen Telenzephalon

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit beschrieben wurde, führt die Transaktivierung von TrkB durch EGF *in vitro* nicht nur zu einer Phosphorylierung des Rezeptors, sondern auch zu dessen Umverteilung innerhalb kortikaler Vorläuferzellen. Dabei wird TrkB aus intrazellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche gebracht. Es stellte sich die Frage, ob eine solche Umverteilung von TrkB auch *in vivo* erfolgt und damit möglicherweise einen wichtigen Schritt während der Differenzierung kortikaler Nervenzellen darstellt.

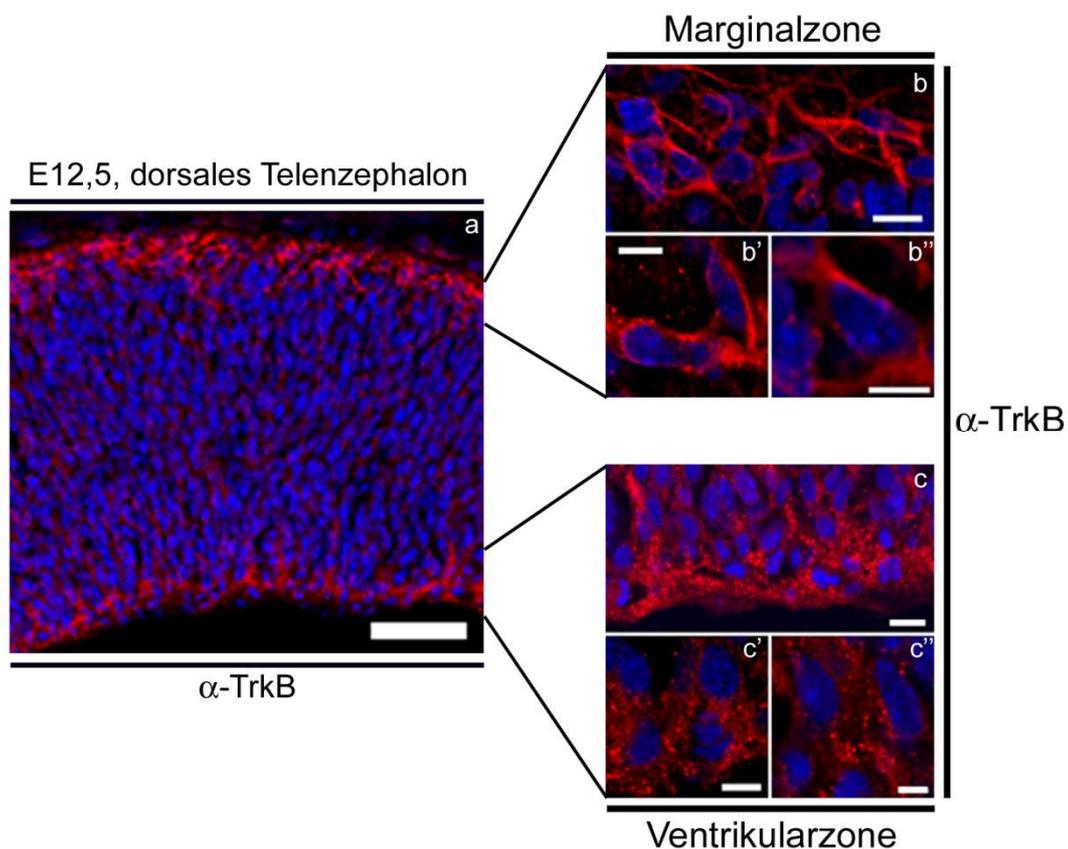


Abbildung 3-29: Die subzelluläre Verteilung von TrkB im dorsalen Telenzephalon

Immunhistochemische Analyse der Lokalisation von TrkB im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 in koronalen 25 µm Gefrierschnitten. (a) Übersicht der Expression von TrkB im dorsalen Telenzephalon, wo der Rezeptor in den Zellen der Ventrikularzone (VZ) und der Marginalzone (MZ) detektiert werden konnte. (b) Detailaufnahmen von TrkB-exprimierenden Zellen der MZ zeigten den Rezeptor homogen entlang der Zellmembran verteilt. (c) In Zellen der VZ trat TrkB dagegen als eine intrazelluläre, punktierte Immunreaktivität auf. Maßstab: a: 50 µm; b und c: 10 µm; b', b'', c' und c'': 3 µm.



Dafür wurde die subzelluläre Lokalisation von TrkB in immunhistochemisch gefärbten, koronalen Gefrierschnitten des dorsalen Telenzephalon am Embryonaltag 12,5 untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei der Vergleich von TrkB-exprimierenden, proliferativen Zellen der Ventrikularzone mit den bereits an die Marginalzone gewanderten Neuronen. Die Abbildung 3-29 zeigt einen Ausschnitt des dorsalen Telenzephalons (a) nach immunhistochemischer Färbung gegen TrkB sowie vergrößerte Bereiche der Marginal- (b) bzw. Ventrikularzone (c). Die subzelluläre Verteilung von TrkB war dabei in den Zellpopulationen der jeweiligen Bereiche unterschiedlich. Während die Zellen der Ventrikularzone eine eher punktierte Färbung zeigten, die an die Verteilung von TrkB in unbehandelten kortikalen Vorläuferzellen *in vitro* erinnerte (Abb.: 3-24 und 3-25), war TrkB in Zellen der Marginalzone homogen und entlang der Zellgrenzen verteilt. Das wiederum ähnelte der Situation in kortikalen Zellen, bei denen TrkB durch die Stimulation mit EGF zur Membran rekrutiert wurde (Abb.: 3-26 und 3-27).

3.5 *In vivo* Analyse des embryonalen Vorderhirns in Wildtyp-, TrkB/NTRK2 KO- und EGFR KO-Mäusen

Um die Bedeutung der *in vitro* beobachteten Transaktivierung von TrkB durch EGF für die Entwicklung des zerebralen Kortex der Maus näher zu untersuchen, wurden TrkB-exprimierende Zellen zunächst hinsichtlich Überleben und Proliferation analysiert. Als Zeitpunkt wurde zunächst der Embryonaltag 12,5 gewählt, entsprechend zum Alter der *in vitro* untersuchten kortikalen Vorläuferzellen, die E11,5 präpariert und vor den entsprechenden Experimenten für 24 h unter Differenzierungsbedingungen kultiviert worden waren. Die Analyse von *TrkB/NTRK2 KO*-Tieren zielte dabei auf die Bedeutung der intrazellulären TrkB-Kinase-Domäne ab, wohingegen in *EGFR KO*-Mäusen speziell die Rolle der EGF-vermittelten Transaktivierung des Neurotrophin-Rezeptors deutlich werden sollte. Da in diesen Tieren ausschließlich TrkB-exprimierende Subpopulationen kortikaler Zellen in die Untersuchung mit einbezogen wurden, konnten globale Effekte der fehlenden Signaltransduktion des EGF-Rezeptors weitgehend außer Acht gelassen werden. Um schließlich auch weiterreichende Effekte auf die Kortexentwicklung untersuchen zu können, erfolgte die Analyse TrkB-exprimierender Zellen im dorsalen Telenzephalon auch zu einem späteren Zeitpunkt der Kortikogenese am Embryonaltag 15,5.



3.5.1 Das Überleben TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5

Um zu überprüfen, ob das Fehlen der TrkB-Kinaseaktivität zum Einen und die Abwesenheit des EGF-Rezeptors zum Anderen direkte Auswirkungen auf TrkB-exprimierende Zellen des dorsalen Telenzephalons hatten, erfolgte die Quantifizierung des Zelltods in dieser Subpopulation kortikaler Zellen am Embryonaltag 12,5. Dazu wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 25 μm angefertigt, die dann zur Auszählung apoptotischer Zellen benutzt wurden. Die Identifizierung solcher Zellen erfolgte dabei entweder anhand kondensierter Zellkerne die mit dem Kernfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht wurden, oder mit Hilfe TUNEL-positiver Zellen, bei denen charakteristische DNA-Einzelstrangbrüche enzymatisch markiert worden waren. Obwohl es sich bei dem hier untersuchten *TrkB/NTRK2 KO*-Modell nicht um einen Totalknockout handelt, bei dem es nicht mehr zur Expression des Proteins kommt, sondern lediglich die Kinasedomäne von TrkB deletiert ist, wurde der Zelltod in Doublecortin-positiven Zellen ermittelt, welche wie vorher gezeigt eine Subpopulation TrkB-exprimierender Zellen repräsentierten (Abb.: 3-30). Die Abbildung 3-30 zeigt Ausschnitte aus 25 μm Gefrierschnitten, die nach immunzytochemischer α -DcX- und DAPI-Färbung zur Auszählung kondensierter Zellkerne herangezogen wurden. In den drei untersuchten Genotypen Kontrolle WT, *NTRK2 KO* und *EGFR KO* war in diesem Entwicklungsstadium die so genannte Präplatte aus DcX-exprimierenden, unreifen Neuronen in vergleichbarem Ausmaß zu erkennen (Abb.: 3-30a). Die in Abbildung 3-30b zu sehende Quantifizierung apoptotischer Zellen in dieser Zellschicht zeigte, dass es keinen signifikant unterschiedlichen Zelltod zwischen den Genotypen gab (Kontrolle WT: $5,3 \pm 0,5 \%$; *NTRK2 KO*: $4,6 \pm 0,5 \%$; *EGFR KO*: $5,2 \pm 0,5 \%$; Mittelwerte \pm SEM). Dieses Ergebnis konnte durch die Auszählung apoptotischer Zellen basierend auf dem so genannten TUNEL-Assay bestätigt werden. Dabei erfolgte die Identifikation apoptotischer Zellen anhand der enzymatischen Fluoreszenzmarkierung von DNA-Einzelstrangbrüchen. Abbildung 3-31a zeigt exemplarische Ausschnitte von 25 μm Gefrierschnitten aus Wildtyp-, *NTRK2 KO*- und *EGFR KO*-Mäusen, die neben der immunzytochemischen α -DcX- und DAPI-Färbung zusätzlich der TUNEL-Reaktion unterzogen wurden.



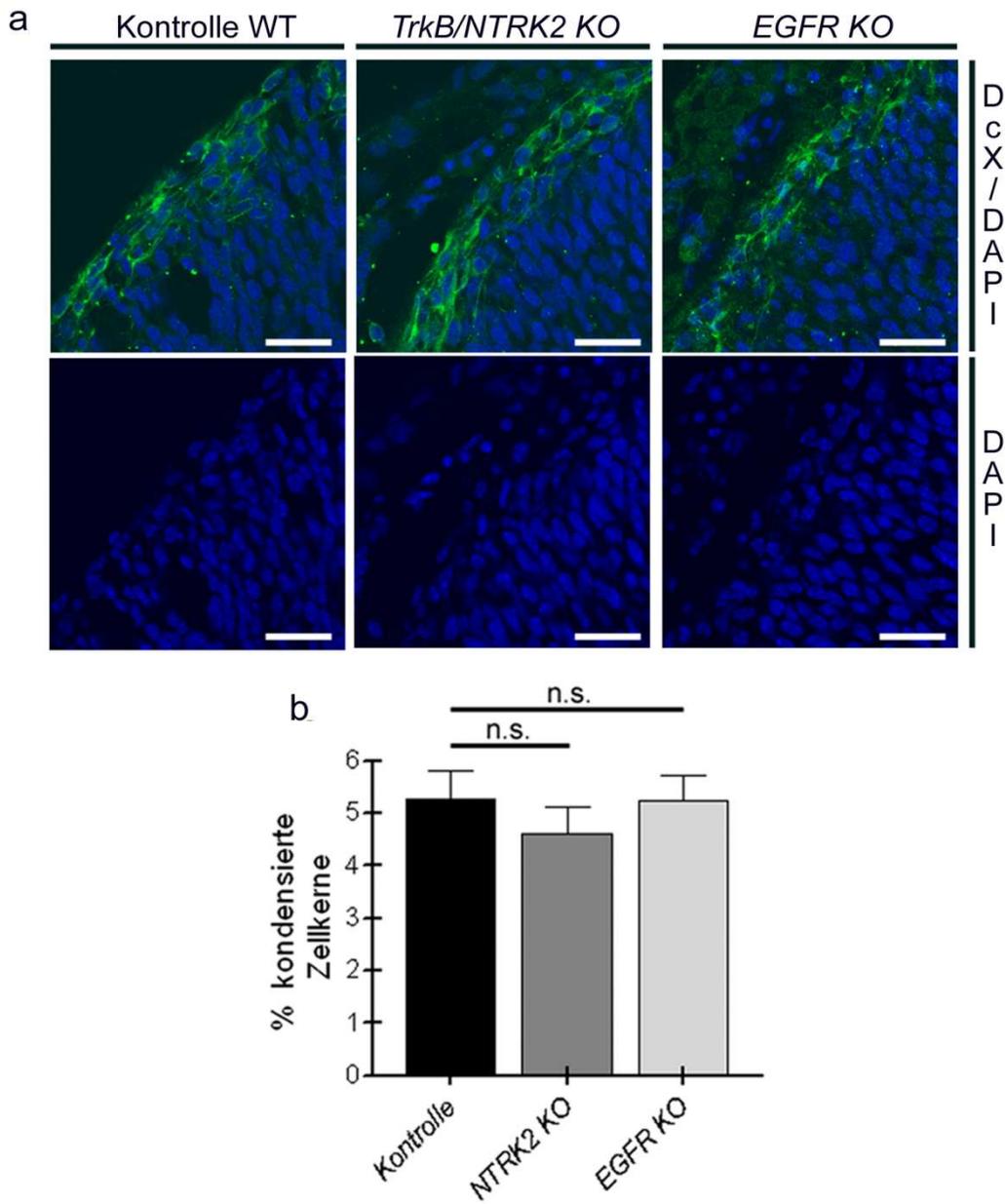


Abbildung 3-30: Die Quantifizierung des Zelltods im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand kondensierter Nuklei

(a) Immunhistochemische Färbung gegen DcX zur Identifizierung der Präplatte im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 bei Wildtyp-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen. (b) Die Quantifizierung des Zelltods in der DcX-positiven Zellschicht der Präplatte anhand kondensierter Nuklei ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen erkennen. Maßstab: 25 μ m.



Der gezeigte DNase-Verdau der Gefrierschnitte diente dabei als Positivkontrolle und zeigte die effiziente Markierung induzierter DNA-Einzelstrangbrüche (Abb.: 3-31b). Die Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen in der DcX-positiven Schicht unreifer Nervenzellen ergab auch hier keine signifikant unterschiedliche Zelltodrate in dieser Zellpopulation (Kontrolle WT: $0,9 \pm 0,2$ %; *NTRK2 KO*: $1,1 \pm 0,3$ %; *EGFR KO*: $1,1 \pm 0,3$ %; Mittelwerte \pm SEM; Abb.: 3-31c).

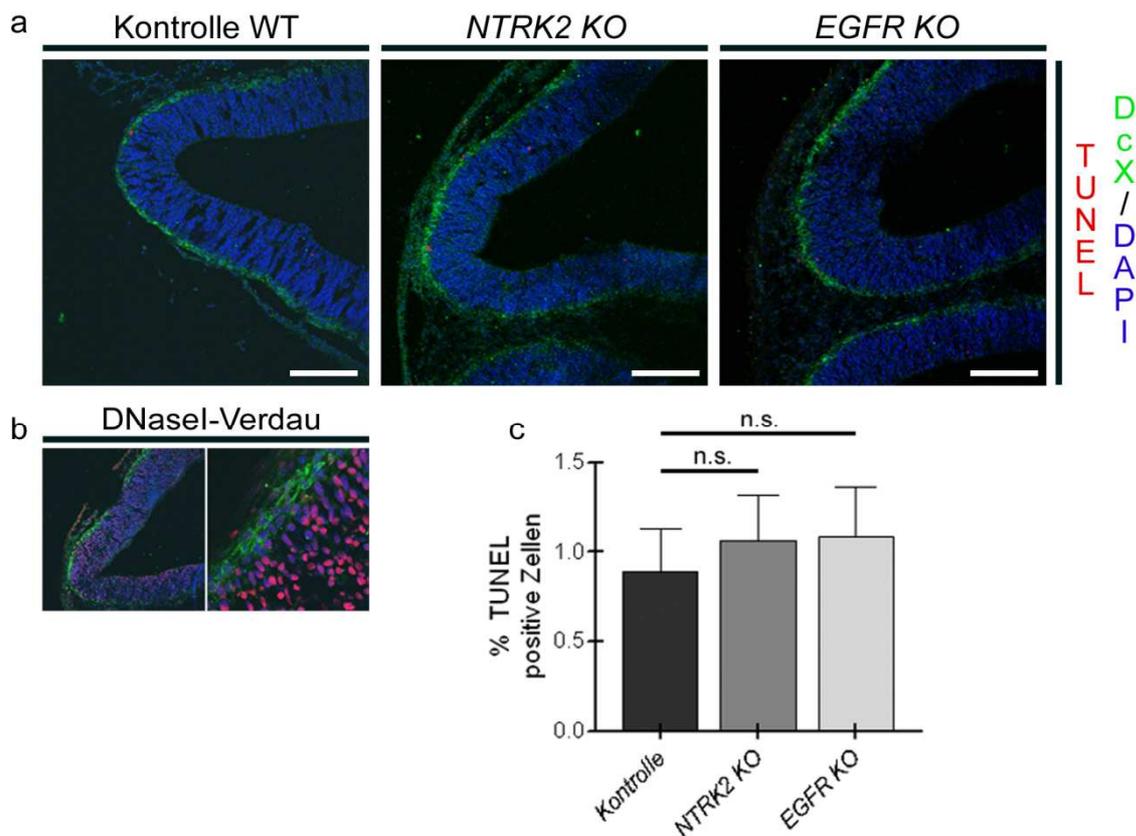


Abbildung 3-31: Die Quantifizierung des Zelltods im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand der TUNEL-Reaktion

(a) Immunhistochemische Färbung gegen DcX zur Identifizierung der Präplatte im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 bei WT-, *TrkB/NTRK2 KO*- und *EGFR KO*-Mäusen. (b) Durch DNaseI-Verdau von 25 μ m Gefrierschnitten konnte die Effizienz der enzymatischen Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen bestätigt werden. (c) Die Quantifizierung des Zelltods in der DcX-positiven Zellschicht der Präplatte anhand TUNEL-positiver Zellen ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, *TrkB/NTRK2 KO*- und *EGFR KO*-Mäusen erkennen. Maßstab: 150 μ m.



3.5.2 Die Proliferation TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5

Die strikte Regulation der Zellteilung ist einer der zentralen Punkte in der Biologie kortikaler Vorläuferzellen. Neben der oben beschriebenen Zelltodanalyse wurde deshalb auch das Proliferationsverhalten DcX-exprimierender Zellen im dorsalen Telenzephalon untersucht. Hierfür wurden Zellen durch die immunzytochemische Färbung gegen phosphoryliertes Histon H3 (pH3) markiert. Da Histon H3 ausschließlich während charakteristischer Phasen des Zellzyklus phosphoryliert vorliegt, konnten so Zellen identifiziert werden, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der mitotischen Synthesephase befanden. In der Abbildung 3-32a ist der Vergleich koronaler Vorderhirnschnitte von Wildtyp-, *NTRK2 KO*- und *EGFR KO*-Mäusen gezeigt. Die Bilder i bis iii geben dabei einen Eindruck über die generelle Verteilung proliferativer Zellen im dorsalen Telenzephalon. Der Großteil von sich im Zellzyklus befindenden Zellen war dabei entlang der Ventrikel in der ventrikulären Zone zu finden, aber auch in mehr pial gelegenen Schichten gab es pH3-positive Zellen. Die Bilder i' bis iii' der Abbildung 3-32a zeigen exemplarische Bildausschnitte, die zur Quantifizierung pH3-positiver Zellen innerhalb der DcX-exprimierenden Zellschicht der Präplatte verwendet wurden. Das Resultat der Auszählung ist in Abbildung 3-32b zu sehen, wo deutlich wird, dass in Bezug auf das Proliferationsverhalten zwischen den untersuchten Genotypen kein signifikanter Unterschied festzustellen war (Kontrolle WT: $2,6 \pm 0,3$ %; *NTRK2 KO*: $2,2 \pm 0,3$ %; *EGFR KO*: $2,0 \pm 0,3$ %; Mittelwerte \pm SEM).

3.5.3 Die Quantifizierung TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 12,5

Die markante Expression von TrkB in der Marginalzone/Schicht I des entstehenden Kortex gab Anlass, neben Zelltod und Proliferation auch die Anzahl an TrkB-exprimierenden Zellen in der Präplatte zu untersuchen. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die TrkB-exprimierenden Zellen, die am Embryonaltag 12,5 unter den neugeborenen Neuronen der Präplatte zu finden sind, in allen untersuchten Genotypen gleich häufig waren. Da zuvor keine Veränderung in Bezug auf Zelltod und Proliferation festzustellen war, sollten so Rückschlüsse auf eventuelle Migrationsdefekte kortikaler Vorläuferzellen in den jeweiligen Genotypen gezogen werden. Die obere Zeile der Abbildung 3-33a zeigt die Expression von TrkB in einer Übersicht koronaler Gefrierschnitte des Vorderhirns am Embryonaltag 12,5 in Wildtyp-, *NTRK2*



KO- und *EGFR* KO-Mäusen. Das insgesamt Erscheinungsbild schien dabei in allen Genotypen vergleichbar zu sein, ohne auffällige morphologische Veränderungen erkennen zu lassen.

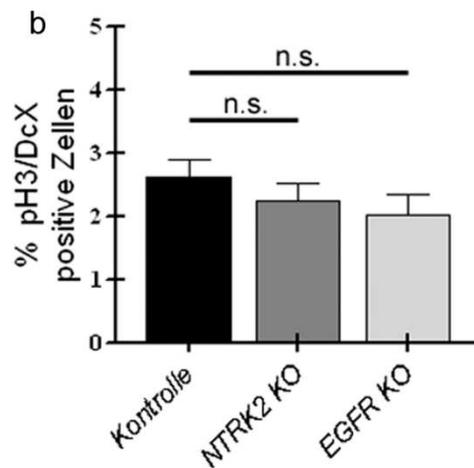
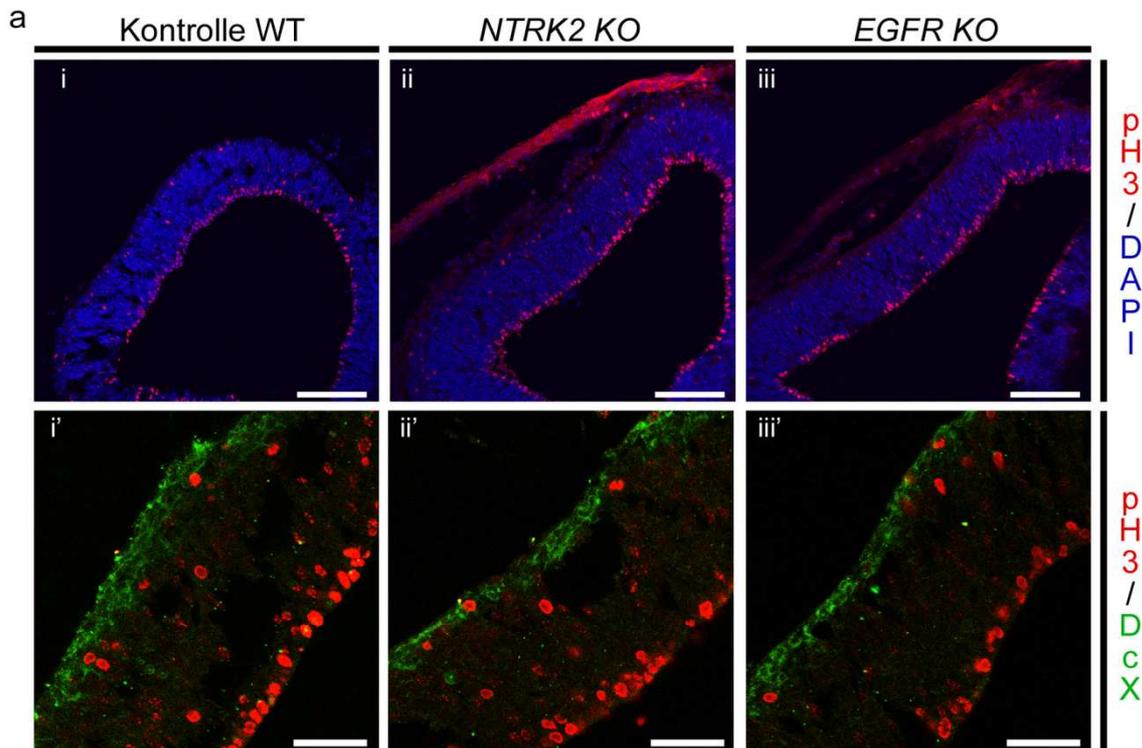


Abbildung 3-32: Die Quantifizierung der Proliferation im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand pH3-positiver Zellen

(a) Immunhistochemische Färbung gegen pH3 und DcX zur Identifizierung proliferativer Zellen in der Präplatte im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 in WT-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen. (b) Die Quantifizierung der Proliferation in der DcX-positiven Zellschicht der Präplatte anhand pH3 positiver Zellen ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen erkennen. Maßstab: i-iii: 150 µm; i'-iii': 50 µm.



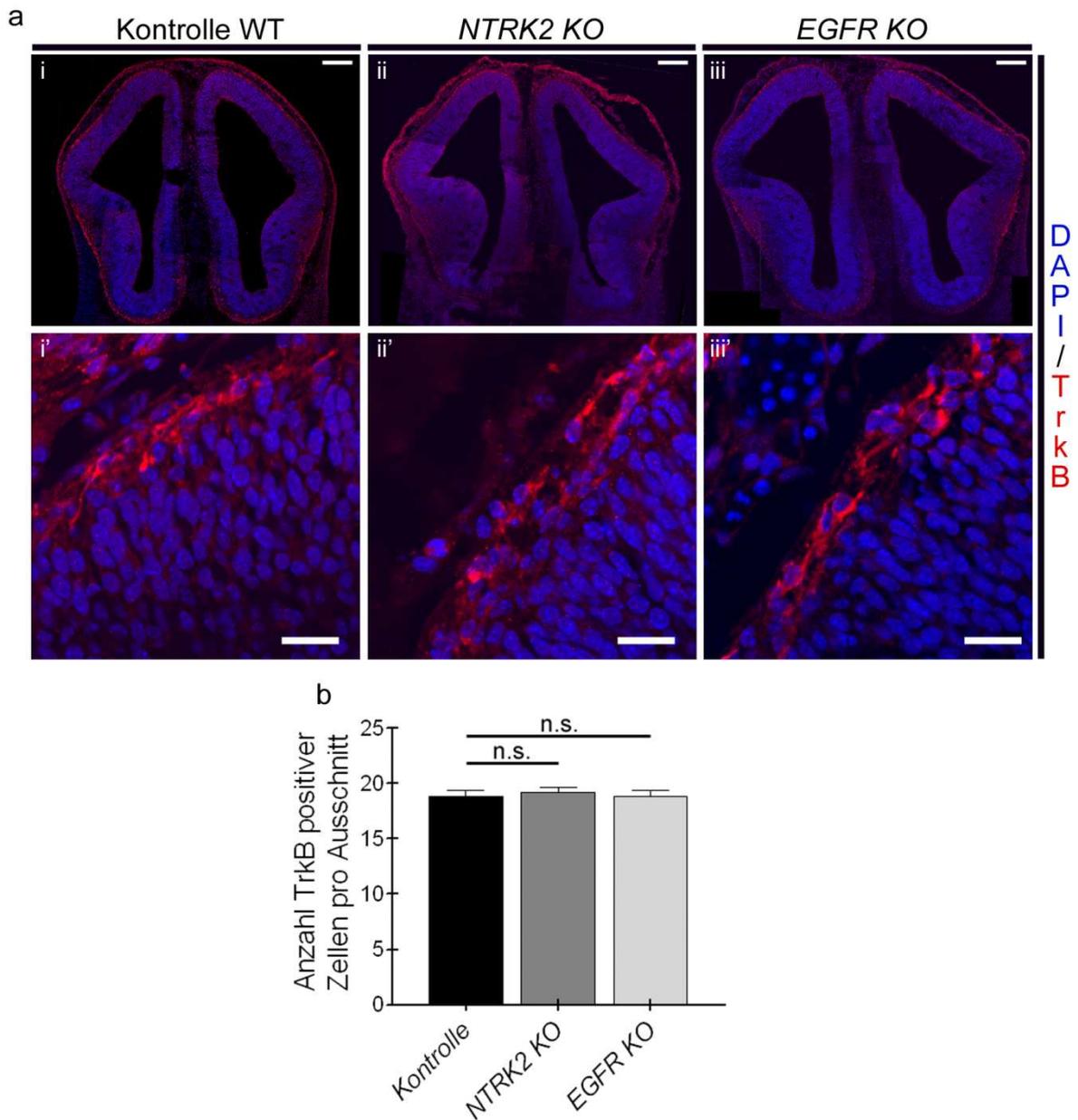


Abbildung 3-33: Die Quantifizierung von TrkB-exprimierenden Zellen in der Marginalzone zum Zeitpunkt E12,5

(a) Immunhistochemische TrkB-Färbung im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 in WT-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen. (i-iii) Die Expression von TrkB im embryonalen Vorderhirn bei E12,5 wies keine Auffälligkeiten in den untersuchten Genotypen auf. (i'-iii') Exemplarische Bildausschnitte, die zur Quantifizierung von TrkB-exprimierenden Zellen in der Marginalzone benutzt wurden. (b) Die Quantifizierung TrkB-positiver Zellen ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen erkennen. n.s.: nicht signifikant. Maßstab: i-iii: 150 µm; i'-iii': 20 µm.



Interessanterweise war auch in Schnitten von *NTRK2 KO*-Tieren eine deutliche TrkB-Immunreaktivität zu sehen. Dies stand allerdings im Einklang zum ursprünglichen Befund, dass es im hier benutzten Mausmodell trotz der Deletion der intrazellulären Kinasedomäne noch zur Expression des mutanten, nicht funktionellen Proteins kommt (Klein et al., 1993). In den Bildern i' bis iii' der Abbildung 3-33a sind exemplarische Bildausschnitte zu sehen, die zur Auszählung TrkB-exprimierender Zellen in der Präplatte benutzt wurden. Das Balkendiagramm in Abbildung 3-33b stellt diese Quantifizierung grafisch dar. Ein Unterschied in Bezug auf die Anzahl TrkB-positiver Zellen in der Marginalzone des dorsalen Telenzephalons am Embryonaltag 12,5 war dabei nicht zu erkennen (Kontrolle WT: $18,9 \pm 0,5$ %; *NTRK2 KO*: $19,2 \pm 0,4$ %; *EGFR KO*: $18,8 \pm 0,6$ %; Mittelwerte \pm SEM).

3.5.4 Die Phosphorylierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in *EGFR KO*-Mäusen am Embryonaltag 12,5

Morphologisch gesehen war, wie oben beschrieben, kein auffälliger Unterschied zwischen Wildtyp-, *NTRK2 KO*- und *EGFR KO*-Mäusen zu erkennen. TrkB-exprimierende Zellen verhielten sich in diesen Genotypen hinsichtlich Überleben, Proliferation und Positionierung identisch. Um dennoch einen Hinweis auf die physiologische Bedeutung der Transaktivierung von TrkB durch EGF zu erhalten, wurde die Aktivität von TrkB anhand des Phosphorylierungszustands des Rezeptors in EGF-Rezeptor defizienten Tieren ermittelt. Dazu wurde embryonales Vorderhirn am Embryonaltag 12,5 präpariert und lysiert. Aus den gewonnenen Gewebelysaten wurde dann TrkB immunpräzipitiert und per Western Blot-Analyse untersucht. Die Aktivität des Rezeptors wurde dabei anhand der Immunreaktivität verschiedener phosphospezifischer Antikörper ermittelt. Wie die Abbildung 3-34a anhand zweier exemplarischer Experimente zeigt, kam es zu einer deutlichen Reduktion immunreaktiver Banden für pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc/Frs2 und pTyrosin in Vorderhirngeweben aus *EGFR KO*-Mäusen. Eine Veränderung im Expressionslevel von TrkB war dabei nicht zu erkennen. Die quantitative Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3-34b gezeigt, wo die Herabsetzung der Phosphorylierung von TrkB in *EGFR KO*-Tieren graphisch in Balkendiagrammen dargestellt wurde (pTrkB-PLC γ : WT: 100,0 %; KO: $10,9 \pm 5,2$ %, pTrkB-Shc: WT: 100,0 %; KO: $3,7 \pm 1,8$ %; pTyr: WT: 100,0 %; KO: $3,8 \pm 1,9$ %; Mittelwerte \pm SEM).



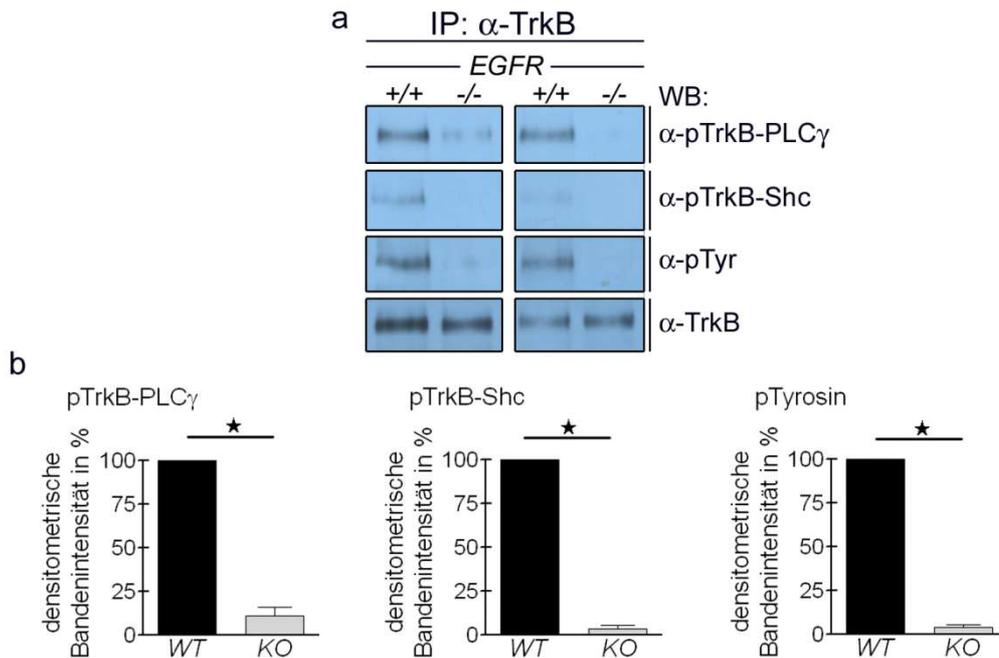


Abbildung 3-34: Die Phosphorylierung von TrkB im Vorderhirn von *EGFR* KO-Mäusen zum Zeitpunkt E12,5

(a) Western Blot-Analyse nach Immunpräzipitation von TrkB aus Vorderhirnlysaten von *EGFR* KO-Mäusen. In *EGFR* defizienten Tieren zeigte sich eine drastische Reduktion der TrkB-Aktivierung im dorsalen Telenzephalon, was anhand des Nachweises von pTrkB-PLC γ , pTrkB-Shc und pTyrosin untersucht werden konnte. Es sind jeweils zwei exemplarische Experimente gezeigt. (b) Die quantitative Auswertung der densitometrischen Bandenintensitäten ergab eine signifikante Reduktion der TrkB-Phosphorylierung in Abwesenheit des *EGFR* bei E12,5. ★: $p < 0,005$.

3.5.5 Die Quantifizierung und Lokalisation TrkB-positiver Zellen am Embryonaltag 15,5

Um die Konsequenzen der erniedrigten TrkB-Phosphorylierung in frühen Phasen der Kortexentwicklung (Abb.: 3-34) in *EGFR* KO-Mäusen zu untersuchen, wurde die Expression und Lokalisation von TrkB auch zu einem späteren Zeitpunkt in der Kortikogenese, am Embryonaltag 15,5 analysiert. *NTRK2* KO-Mäuse wurden ebenso in die Analyse mit einbezogen, um allein die Rolle der Kinasaktivität von TrkB beleuchten zu können.

Zunächst wurde deutlich, dass das insgesamt Erscheinungsbild des embryonalen Vorderhirns am Embryonaltag 15,5 in den untersuchten Genotypen Wildtyp, *NTRK2* KO und *EGFR* KO vergleichbar war. Es traten keine auffälligen morphologischen Veränderungen in den jeweiligen mutanten Mäusen gegenüber dem Wildtyp auf (Abb.: 3-35a-c). Im dorsalen Telenzephalon, wo die entstehende kortikale Platte



zu diesem Zeitpunkt bereits eine gewisse räumliche Ausdehnung aufweist, zeigte sich TrkB in zwei markanten Schichten hoch exprimiert (Abb.: 3-35d-l). Zum Einen war TrkB in einer oberflächlichen Zellschicht zu detektieren, die sich im Bereich der Marginalzone/Schicht I befand. Zum Anderen gab es eine weitere, tiefer liegende Zellschicht, die aufgrund ihrer basal zur Intermediärzone orientierten Lage mit Schicht V/VI bezeichnet wurde.

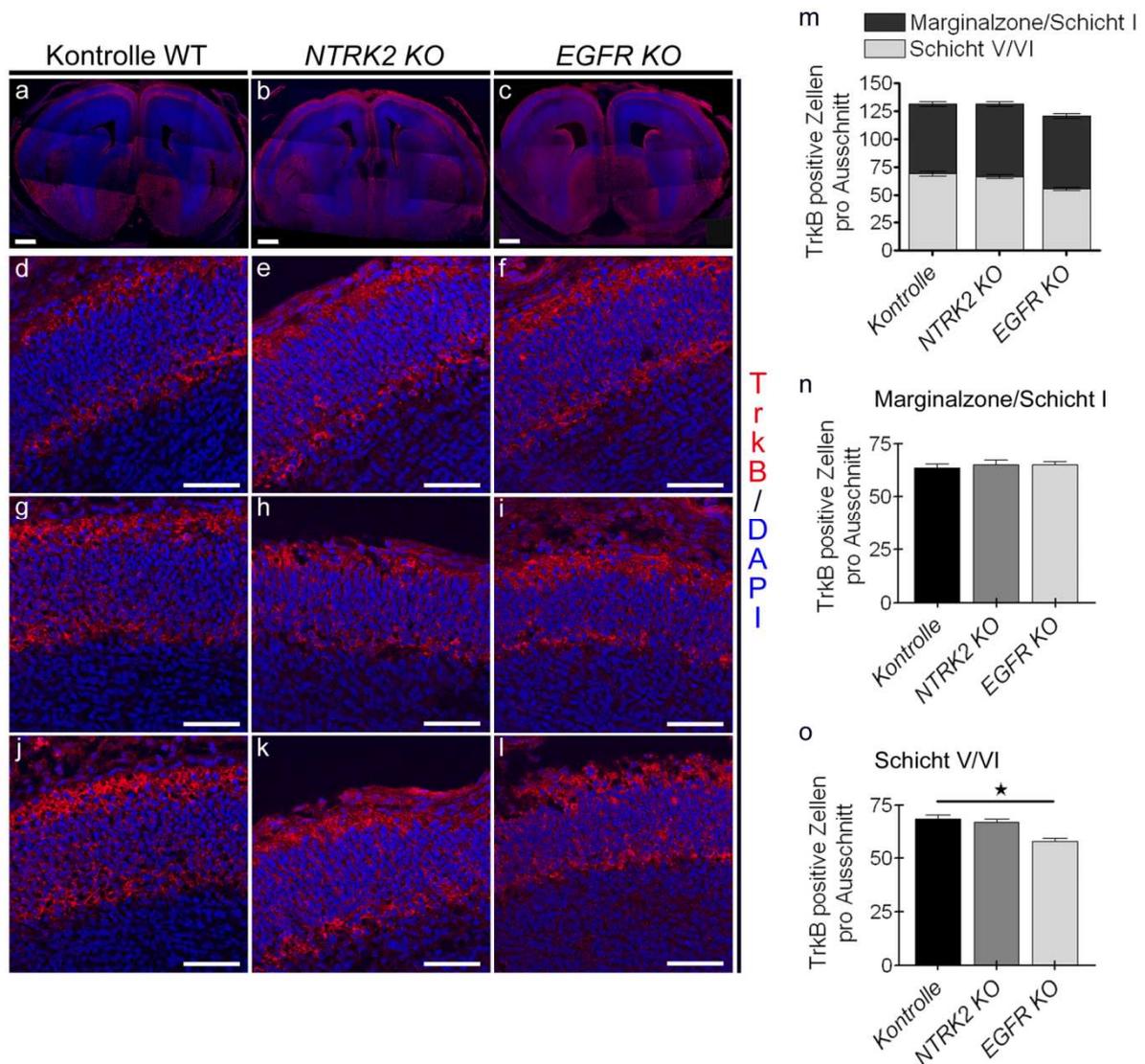


Abbildung 3-35: Die Quantifizierung von TrkB-exprimierenden Zellen in Vorderhirn zum Zeitpunkt E15,5 in Wildtyp-, *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen

(a-c) Das Erscheinungsbild des Vorderhirns zum Zeitpunkt E15,5 zeigte ebenso wie das Expressionsmuster von TrkB keine größeren Auffälligkeiten in *TrkB/NTRK2* KO- und *EGFR* KO-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. (d-l) Innerhalb der kortikalen Platte kam es zur Expression von TrkB in zwei markanten Zellschichten, die aufgrund ihrer Lage als Marginalzone/Schicht I und Schicht V/VI identifiziert werden konnten. (m-o) Die in den Balkendiagrammen dargestellte Quantifizierung der TrkB-positiven Zellen in diesen beiden Schichten zeigte eine signifikant geringere Anzahl von TrkB-exprimierenden Zellen in der Schicht V/VI, wohingegen deren Zahl in der Marginalzone/Schicht I unverändert schien. Maßstab: a-c: 150 μ m; d-l: 50 μ m; \star : $p < 0,001$.



Die Quantifizierung TrkB-positiver Zellen wurde anhand von Bildausschnitten durchgeführt, wie sie exemplarisch in Abbildung 3-35d-l zu sehen sind. Die in Abbildung 3-35m-o abgebildeten Balkendiagramme zeigen das Resultat dieser Auszählung mit der Gegenüberstellung der TrkB-positiven Zellen in den beiden markanten Zellschichten zum Einen und der Auswertung für beide Schichten getrennt voneinander zum Anderen. Dabei wurde deutlich, dass es bei einer unveränderten Zellzahl in der Marginalzone/Schicht I (Kontrolle WT: $63,7 \pm 1,8$; *NTRK2* KO: $65,2 \pm 2,1$; *EGFR* KO: $64,9 \pm 1,7$; Mittelwerte \pm SEM) gleichzeitig zu einer reduzierten Zahl TrkB-positiver Zellen in Schicht V/VI in EGF-Rezeptor defizienten Mäusen kam (Kontrolle WT: $68,3 \pm 1,9$; *NTRK2* KO: $66,9 \pm 1,6$; *EGFR* KO: $58,1 \pm 1,5$; Mittelwerte \pm SEM).

Die oben beschriebene Reduktion der Zahl TrkB-positiver Zellen in der Schicht V/VI führte schließlich zu einem detaillierteren Vergleich TrkB-exprimierender Zellen im dorsalen Telenzephalon zwischen Wildtyp- und *EGFR* KO-Tieren. Dazu wurden die TrkB-positiven Zellen über die gesamte radiale Ausdehnung des embryonalen Kortex, welcher in vier Areale unterteilt wurde, erfasst. Zusätzlich zu Marginalzone/Schicht I und Schicht V/VI wurde dafür auch das Areal zwischen diesen beiden Schichten als kortikale Platte und der Bereich apikal der Intermediärzone als Ventrikularzone/Subventrikularzone (VZ/SVZ) definiert. Für die quantitative Auswertung wurden dann die jeweiligen Zahlen TrkB-positiver Zellen in den einzelnen Arealen als Prozentwerte der Gesamtzahl TrkB-exprimierender Zellen angegeben. Die Abbildung 3-36a zeigt neben Übersichtsbildern in der oberen Reihe die Expression von TrkB über die gesamte Ausdehnung des dorsalen Telenzephalon (mittlere Reihe) und eine Detailaufnahme der VZ/SVZ (untere Reihe). In Abbildung 3-36b sind die Resultate der quantitativen Auswertung für jede der vier Regionen graphisch dargestellt. Dabei war zu erkennen, dass es zu einer Verschiebung der Zellzahlen kam, mit einem geringeren Prozentsatz an TrkB-positiven Zellen in der Schicht V/VI und einem erhöhten Wert in der Marginalzone/Schicht I (MZ/I: Kontrolle WT: $47,9 \pm 1,0$ %; *EGFR* KO: $53,2 \pm 0,7$ %; V/VI: Kontrolle WT: $51,3 \pm 1,1$ %; *EGFR* KO: $45,5 \pm 0,7$ %; Mittelwerte \pm SEM). Des Weiteren wurden mehr TrkB-positive Zellen in der VZ/SVZ gefunden, wohingegen deren Anzahl innerhalb der kortikalen Platte unverändert blieb (VZ/SVZ: Kontrolle WT: $0,4 \pm 0,1$ %; *EGFR* KO: $0,8 \pm 0,1$ %; KP: Kontrolle WT: $0,4 \pm 0,1$ %; *EGFR* KO: $0,6 \pm 0,1$ %; Mittelwerte \pm SEM).



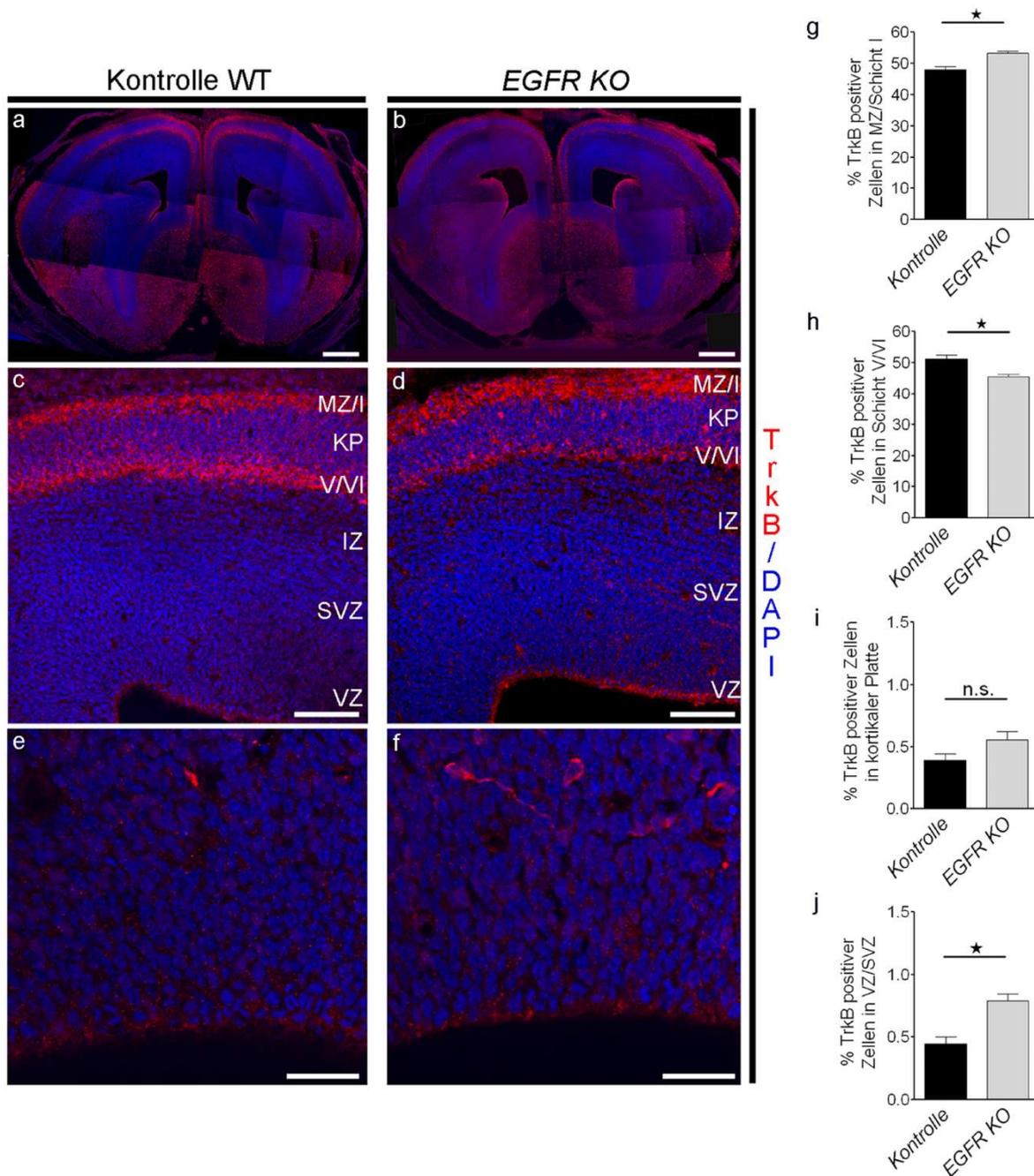


Abbildung 3-36: Die relative Verteilung von TrkB-expressierenden Zellen im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E15,5 in Wildtyp- und *EGFR KO*-Mäusen

(a, b). Das Erscheinungsbild des Vorderhirns zum Zeitpunkt E15,5 war in *EGFR KO*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp größtenteils unauffällig. (c, d) Die relative Verteilung TrkB-expressierender Zellen in unterschiedlichen Zonen des dorsalen Telenzephalon im Vergleich von *EGFR* defizienten mit wildtypischen Mäusen. (e, f) Detailaufnahme der Ventrikularzone mit immunhistochemischem Nachweis TrkB-expressierender Zellen. (g - j) Quantifizierung der Verteilung TrkB-positiver Zellen im dorsalen Telenzephalon mit Angabe des jeweiligen prozentualen Anteils an der Gesamtmenge TrkB-expressierender Zellen. In *EGFR* defizienten Mäusen gab es weniger Zellen in Schicht V/VI, dagegen mehr in der Marginalzone/Schicht I und außerhalb dieser beiden prominenten Zellschichten in der kortikalen Platte und der Ventrikular- und Subventrikularzone. Maßstab: a, b: 150 μ m; c, d: 50 μ m; e, f: 25 μ m; \star : $p < 0,001$. MZ/I: Marginalzone/Schicht I; KP: kortikale Platte; V/VI: Schicht V/VI; IZ: Intermediärzone; SVZ: Subventrikularzone; VZ: Ventrikularzone.



3.6 Die *TrkB*-abhängige Wanderung kortikaler Vorläuferzellen

3.6.1 Der Streifentest als *in vitro*-Migrations-Assay

Am Embryonaltag 15,5 war die Lokalisation von *TrkB*-exprimierenden Zellen im dorsalen Telenzephalon in EGF-Rezeptor defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp verändert. Nachdem dabei tiefer liegende Schichten reduzierte und oberflächliche Schichten erhöhte Zellzahlen aufwiesen und außerdem mehr *TrkB*-exprimierende Zellen außerhalb der im Wildtyp klar definierten Schichten auftauchten (vgl. Abschnitt 3.5.5), sollte die Frage geklärt werden, ob die Ursache dafür eine gestörte Wanderung kortikaler Vorläuferzellen sein konnte. Um zu überprüfen, ob kortikale Vorläuferzellen in *TrkB*-abhängiger Art und Weise in Richtung eines EGF-Reizes wandern, wurde ein *in vitro*-Migrationsassay etabliert. Dazu wurden die Zellen auf einem Substratteppich ausgesät, der aus alternierenden Streifen von EGF bzw. BSA bestand. Durch den Vergleich von ausgezählten Zellen kurz nach der Aussaat (6 h), mit denen eines späteren Zeitpunkts (20 h), konnte ermittelt werden, ob die Zellen eine Präferenz für das jeweilig angebotene Substrat zeigten. Außerdem wurde gleichzeitig die subzelluläre Verteilung von *TrkB* bzw. phosphoryliertem *TrkB* dokumentiert, um die Wanderung von kortikalen Vorläuferzellen mit der Umverteilung von *TrkB* korrelieren zu können.

Die Abbildung 3-37a zeigt beispielhafte Ausschnitte kortikaler Vorläuferzellen, die auf den entsprechenden Substratteppichen kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert wurden. Durch die immunzytochemische Färbung gegen Nestin wurden die Zellen identifiziert. Die Färbung gegen *TrkB* erlaubte die Analyse der subzellulären Verteilung des Rezeptors. Wie dort zu erkennen ist, zeigten kortikale Vorläuferzellen nach 20-stündiger Inkubation ein präferentielles Wachstum auf den mit EGF beschichteten Streifen gegenüber den mit BSA beschichteten Streifen (Abb.: 3-37a, I und II). In den beiden Kontrollsituationen mit jeweils identischen Beschichtungen war dagegen nach 20 Stunden eine zufällige Verteilung der Zellen zu sehen (Abb.: 3-37a, III und IV). Die Quantifizierung dieses Experiments zeigte die signifikante Erhöhung der Zahl kortikaler Vorläuferzellen auf den EGF-Streifen bei gleichzeitiger Erniedrigung auf BSA-Streifen (Abb.: 3-37b; I: EGF: $66,6 \pm 2,3$ %; BSA: $33,4 \pm 2,3$ %; II: EGF: $59,8 \pm 1,7$ %; BSA: $40,1 \pm 1,7$ %; Mittelwerte \pm SEM).



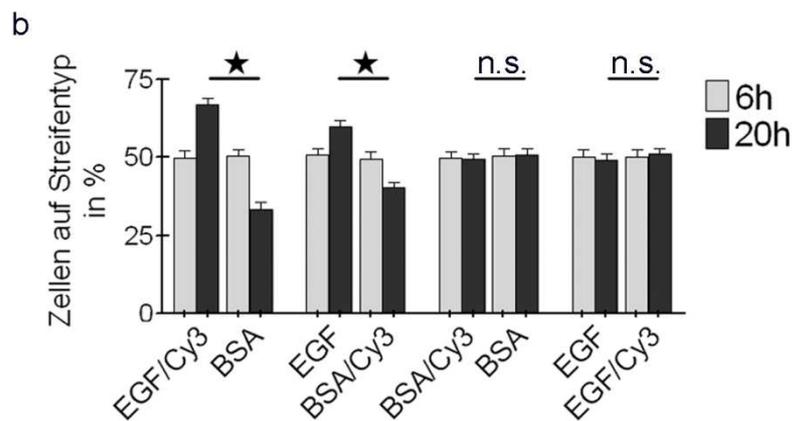
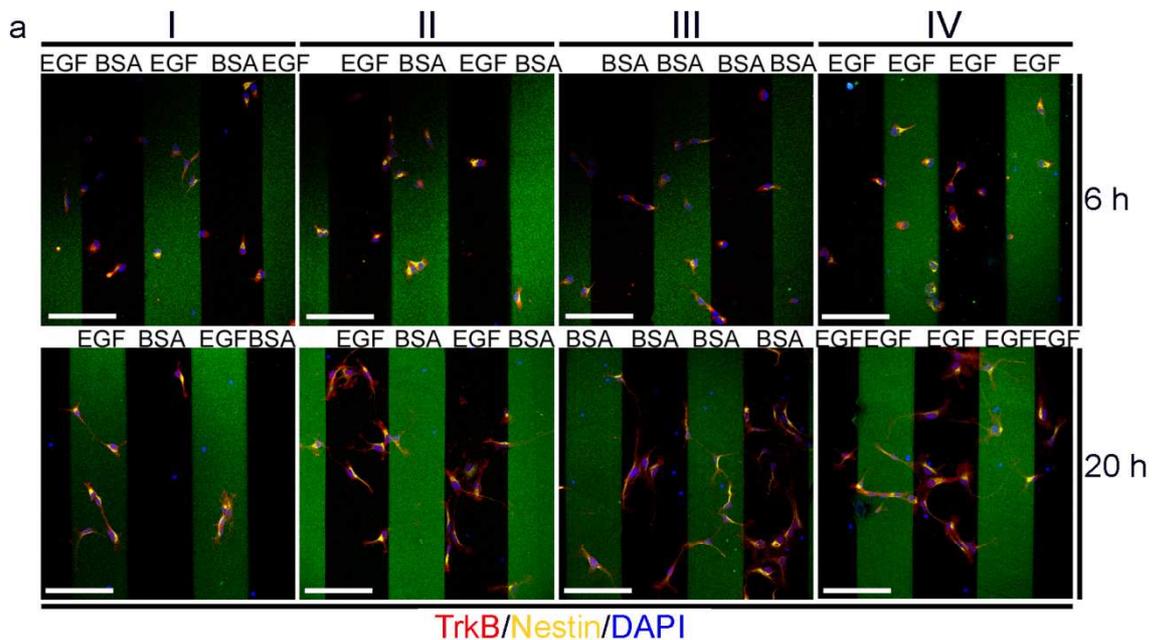


Abbildung 3-37: Streifentest zur Analyse des Wanderungsverhaltens kortikaler Vorläufer

(a) Das Wanderungsverhalten kortikaler Vorläuferzellen wurde anhand eines *in vitro*-Migrationsassays untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Substratteppiche aus alternierenden Streifen von EGF und BSA ausgesät und nach 6 bzw. 20 h fixiert und immunzytochemisch gefärbt. (b) Die Quantifizierung der prozentualen Verteilung der Zellen auf EGF bzw. BSA nach 20 h zeigte ein präferentielles Wachstum der Zellen auf dem EGF-Substrat. Maßstab: 100 μ m.

Die Auszählung von Zellen auf identischen Streifen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb.: 3-37b.: III: BSA: $49,2 \pm 1,9$ %; BSA: $50,8 \pm 1,9$ %; IV: EGF: $49,1 \pm 1,8$ %; EGF: $50,8 \pm 1,8$ %; Mittelwerte \pm SEM).

Um schließlich die beobachtete Zellwanderung mit der subzellulären Lokalisation von TrkB in Verbindung bringen zu können, wurde die Verteilung von TrkB immunzytochemisch untersucht. Beim Vergleich von Zellen, die nach 20 h auf EGF



bzw. BSA beschichteten Streifen attachierten, wurde beobachtet, dass TrkB je nach Substrat unterschiedlich verteilt ist. In Zellen auf EGF-Streifen erschien TrkB eher an der Plasmamembran als im Zellinneren lokalisiert, wohingegen in Zellen auf BSA-Streifen eine punktierte, intrazelluläre Verteilung zu sehen war (Abb.: 3-38a). Zur Analyse von phosphoryliertem TrkB wurden kortikale Vorläuferzellen kurz nach der Aussaat (6 h) fixiert und mit α -pTrkB-PLC γ gefärbt. Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in unmittelbarer Nähe von EGF-Streifen befanden, zeigten eine ungleichmäßige Verteilung von phosphoryliertem TrkB mit einer Akkumulation des aktivierten Rezeptors am EGF-zugewandten Pol (Abb.: 3-38b).

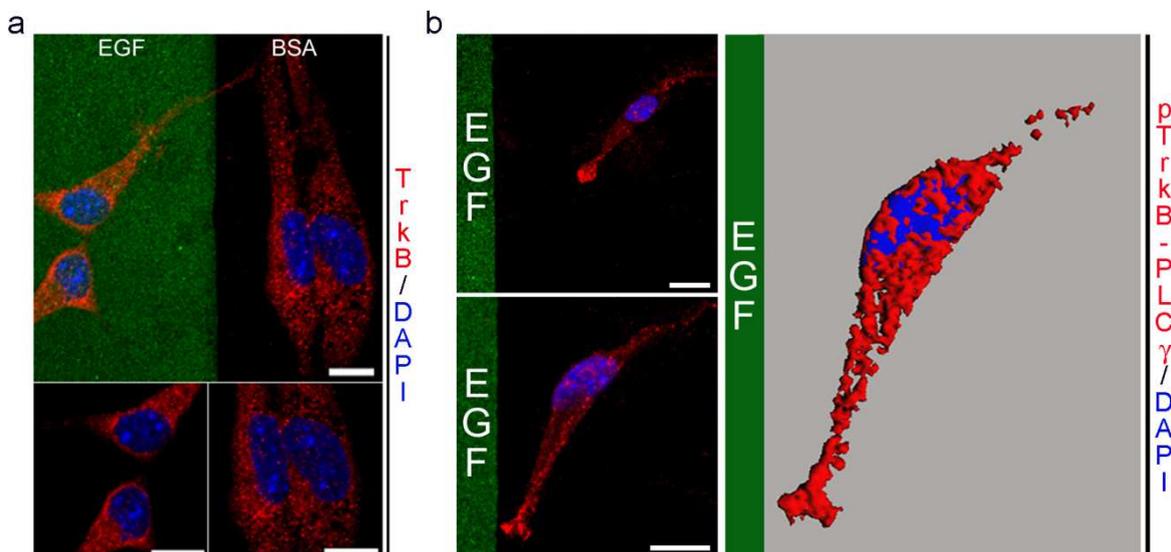


Abbildung 3-38: Die Verteilung von TrkB in kortikalen Vorläufern während der *in vitro*-Migration
 (a) Die subzelluläre Lokalisation von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen war abhängig vom jeweiligen Substrat. EGF führte zu einer mehr membranständigen Verteilung, wohingegen auf BSA die punktierte, intrazelluläre Immunreaktivität von TrkB auftrat. (b) Die Phosphorylierung von TrkB an der PLC γ -Bindungsstelle erfolgte in asymmetrischer Art und Weise, mit einer Akkumulation aktivierter Rezeptoren am der Wanderungsrichtung zugewandten Pol. Maßstab: 10 μ m.



4 Diskussion

Die Entstehung des zerebralen Kortex mit seiner hochgradig geordneten Architektur aus unterschiedlichen Rindenschichten ist ein komplexer Vorgang, der auf zahlreichen Ebenen genau reguliert sein muss. Eine Grundlage der Kortikogenese ist dabei die zeitliche und räumliche Kontrolle von Zellteilungsvorgängen, die in den germinativen Zonen des dorsalen Telenzephalons stattfinden und aus proliferativen Vorläuferzellen postmitotische Nervenzellen hervorbringen. Die neugeborenen Neurone wiederum müssen dann die Reize ihrer unmittelbaren Umgebung dergestalt verarbeiten, damit sie schließlich zu genau definierten, endgültigen Positionen im reifen Kortex wandern können. Dort differenzieren sie schließlich zu reifen Nervenzellen, die über die Ausbildung von synaptischen Verbindungen an Dendriten und Axonterminalen zu einem integralen Bestandteil des zentralen Nervensystems werden (Ayala et al., 2007; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

Obwohl die prinzipiellen Vorgänge während der Kortikogenese schon seit geraumer Zeit bekannt sind, gelang es erst im vergangenen Jahrzehnt, einen genaueren Einblick in die dort beteiligten molekularen Mechanismen zu erhalten. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden dabei viele Proteine charakterisiert, die an der Regulation neuronaler Wanderung beteiligt zu sein scheinen. Große Aufmerksamkeit erhielten speziell Proteine der extrazellulären Matrix, die als potentielle Kandidaten gelten, Richtungs- und Positionsinformation an wandernde Nervenzellen zu vermitteln. Das vermutlich Prominenteste unter ihnen ist Reelin, ein von Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone sezerniertes Glykoprotein. Die spontane Mutation des *Reelin*-Gens führt zu einer charakteristischen Umkehrung der Rindenschichtung, wodurch die enorme Bedeutung dieses Faktors deutlich wird (Tissir and Goffinet, 2003). Vieles spricht dafür, dass Reelin für das präzise Positionieren von kortikalen Neuronen verantwortlich ist, indem es deren Migration unterbricht. Zusätzlich zu solchen notwendigen Stoppsignalen brauchen die heranreifenden Zellen im zerebralen Kortex allerdings auch Informationen zur Wegfindung, die beispielsweise in Form eines radialen Konzentrationsgradienten zur Verfügung gestellt werden können. Eine solche Verteilung konnte bereits für Mitglieder unterschiedlicher Proteinfamilien mit chemotaktischen Wirkungen gegenüber kortikalen Zellpopulationen in Zusammenhang gebracht werden, darunter die Semaphorine 3A und 3F (Chen et al., 2008; Polleux et al., 2000), der epidermale Wachstumsfaktor (Caric et al., 2001) und



eben auch BDNF als Mitglied der Neurotrophin-Familie (Behar, 1997). Durch die konditionale Deletion von TrkB konnten die Labore von Klaus Unsicker und Liliana Minichiello 2004 *in vivo* zeigen, dass der BDNF-Rezeptor die Formierung kortikaler Strukturen über die Kontrolle neuronaler Migration beeinflusst. Zusätzlich wurde dabei durch die Mutation des Rezeptors deutlich, dass dafür sowohl die Shc/Frs2- als auch die PLC γ -Bindungsstelle von Nöten ist (Medina et al., 2004). Eine Arbeit aus den Laboren von David Kaplan und Freda Miller beschrieb 2007 damit weitgehend übereinstimmende Ergebnisse in einem experimentellen Ansatz, bei dem die Funktion von TrkB/C durch die *in utero* Elektroporation dominant negativer TrkB/C-Konstrukte oder auch gegen TrkB gerichtete shRNAs inhibiert wurde (Bartkowska et al., 2007). Die Rolle des Neurotrophinrezeptors TrkB bei der Entstehung des zerebralen Kortex stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

4.1 Die Expression und Aktivierung von TrkB im embryonalen Telenzephalon

Zunächst wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TrkB in frühen Stadien der Kortikogenese, von E10,5 bis E12,5, verhältnismäßig hoch exprimiert wird (vgl. 3.1.1), wodurch vorherige Berichte über die embryonale TrkB-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene bestätigt werden konnten (Cheng et al., 2003; Behar, 1997). Die immunhistochemische Lokalisation auf Proteinebene zeigte bei E12,5 eine Konzentration des Rezeptors in zwei Regionen des embryonalen Telenzephalons. Zum Einen in der aus unreifen Neuronen bestehenden Präplatte an der pialen Oberfläche des Kortex, zum Anderen in den multipotenten Vorläuferzellen der Ventrikularzone (vgl. 3.1.1). Bereits 1997 wurde in der Ratte gezeigt, dass die Expression von TrkB im dorsalen Telenzephalon in relativ frühen Entwicklungsstadien (E14,5) sowohl in den proliferativen neuroepithelialen Vorläufern als auch in postmitotischen, für den neuronalen Marker TUJ1-positiven Zellen der Präplatte stattfand. In späteren Stadien (E16,5 und E19,5, Ratte) konzentrierte sich die Immunreaktivität gegen TrkB dagegen mehr in Zellen der kortikalen Platte und Subplatte, die zu diesem Zeitpunkt postmitotische Nervenzellen enthalten. In der Ventrikular- und Subventrikularzone hingegen war der Rezeptor in dieser späteren Phase der Kortexentwicklung kaum noch nachzuweisen (Behar, 1997). Die Expression von BDNF, dem hauptsächlichen Liganden von TrkB, wurde in verschiedenen Studien als zeitlich nachfolgend



beschrieben, mit nachweisbaren Mengen um E14,5 und einer erst später folgenden Hochregulation, um in frühen postnatalen Stadien ein Maximum zu erreichen (Maisonpierre et al., 1990; Behar, 1997). Außerdem ist die dokumentierte räumliche Verteilung des BDNF-Transkripts im dorsalen Telenzephalon bemerkenswert. In der Ratte verteilte sich zum Zeitpunkt E17,5 das Gros der BDNF-mRNA auf die kortikale Platte, wohingegen sich in der Ventrikularzone deutlich weniger fand, was letztendlich zu der Annahme eines radialen Gradienten mit ansteigender BDNF-Konzentration vom Ventrikel zur pialen Oberfläche führte (Behar, 1997). Wie in einer Arbeit von Knüsel et al. an Rattengewebe gezeigt wurde, durchlaufen die Zellen des entstehenden Kortex eine Stadium- und Gewebe-spezifische Regulation, was die Responsivität gegenüber Neurotrophinen betrifft. Während nämlich E14,5 die Tyrosin-Phosphorylierung von Trk-Rezeptoren im Striatum als Antwort auf BDNF, NT-3 oder NT-4/5 sehr deutlich ausfiel, hatten solche Stimulationen in kortikalen Geweben nur geringfügige Auswirkungen. E18,5 dagegen war auch im Kortex eine massive Aktivierung zu erkennen, einzig die BDNF Antwort im Hippokampus fiel zu diesem Zeitpunkt noch moderat aus. In frühen postnatalen Stadien wie P7 war auch dort eine maximale BDNF-Antwort erreicht (Knusel et al., 1994). Zusammen genommen entstand dadurch der Eindruck, dass die Neurotrophin-abhängige Aktivierung von TrkB im dorsalen Telenzephalon zeitlich versetzt zur früher einsetzenden Expression des Rezeptors, und auch erst auf der Entwicklungsstufe differenzierter Nervenzellen stattfindet. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, kam es in BDNF- bzw. NT-3-defizienten Mäusen zum Zeitpunkt E12,5 zu keiner Erniedrigung des Phosphorylierungsgrades von TrkB (vgl. 3.1.2). Die Aktivität des Rezeptors war in dieser Phase der Kortikogenese also unabhängig von der Verfügbarkeit entsprechender Liganden. Gleichzeitig war auch in den isolierten kortikalen Vorläuferzellen keinerlei Responsivität gegenüber den beiden Neurotrophinen BDNF und NT-3 zu beobachten. Dies traf zum Einen auf die E11,5 präparierten und als Neurosphären kultivierten Zellen und zum Anderen auf die E10,5 isolierten, akut ausplattierten Zellen zu. In beiden Fällen kam es nach Zugabe der Faktoren weder zu einer Phosphorylierung von TrkB noch von nachgeschalteten Effektorproteinen wie Erk1/2 oder Akt (vgl. 3.2.2). Interessanterweise war dies dann aber bei später isolierten Zellen des dorsalen Telenzephalon zu beobachten. Bei E11,5 Direktkulturen war die Aktivierung von TrkB, Erk1/2 und Akt bereits klar zu sehen, bei Zellen aus E14,5 Gewebe fiel der Effekt noch deutlicher ins Auge. Durch die immunzytochemische Charakterisierung



der verschiedenen Zellkultursysteme bzw. Isolationszeitpunkte konnte schließlich gezeigt werden, dass die unterschiedliche Responsivität der Zellen mit der Zusammensetzung der jeweiligen Kultur korrelierte. So bestanden die Neurosphärenkulturen und die E10,5 isolierten Direktkulturen überwiegend aus Pax6-positiven kortikalen Vorläuferzellen, wohingegen der Anteil Map2-positiver Neurone gering war. Zu späteren Zeitpunkten kam es dann zu einer Verschiebung hin zu reifen Nervenzellen mit einem etwa ausgeglichenen Verhältnis von Pax6- und Map2-positiven Zellen bei E11,5 isolierten Kulturen und Kulturen von E14,5 Zellen, die überwiegend aus Map2-exprimierenden Nervenzellen bestanden (vgl. 3.2.3). Freda Miller und ihre Mitarbeiter konnten in diesem Zusammenhang verschiedene Arbeiten veröffentlichen, welche die Bedeutung von Neurotrophin-induzierten Signalwegen für das Überleben und die Differenzierung junger kortikaler Neurone herausstellen konnten (Bartkowska et al., 2007; Barnabe-Heider and Miller, 2003). Wie außerdem bereits 1997 gezeigt wurde, scheint BDNF auf Tuj1- und TrkB-exprimierende Nervenzellen des embryonalen dorsalen Telenzephalon chemotaktisch zu wirken (Behar, 1997). Wie diese Studie berichtet, zeigen zwischen E14,5 und E20,5 isolierte Zellen eine zum BDNF-Substrat gerichtete Wanderung, wobei ein Maximum an Neurotrophin-Antwort bei E17,5 gefunden wurde. Dabei konnte die Expression von BDNF-mRNA zu diesem Zeitpunkt überwiegend in der kortikalen Platte, dem Zielgebiet wandernder Nervenzellen, lokalisiert werden. Obwohl also offensichtlich ein Zusammenhang zwischen neuronaler Wanderung und Differenzierung während der Kortikogenese und BDNF/TrkB-Signalwegen besteht, scheinen die oben beschriebenen Effekte auf bereits zu post-mitotischen Neuronen differenzierte Zellen beschränkt zu sein. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, setzt die Responsivität gegenüber Neurotrophinen wie BDNF oder NT-3 erst in Direktkulturen ein, die nach E11,5 isoliert wurden, und deshalb bereits zu einem gewissen Teil aus differenzierten Nervenzellen bestehen. Direktkulturen von E10,5 mit fast ausschließlich Pax6-positiven Vorläuferzellen scheinen dagegen nicht ohne Weiteres die Fähigkeit zu besitzen, auf extrazelluläre Neurotrophin-Reize ansprechen zu können.



4.2 Die funktionelle Interaktion zwischen TrkB- und dem EGF-Rezeptor

Die Transaktivierung von Trk-Rezeptoren ist ein Konzept, welches eine von Liganden unabhängige Aktivierung beschreibt (Lee et al., 2002b; Chao, 2003). Im Gegensatz zur klassischen Situation, bei der die Bindung von Neurotrophinen im extrazellulären Raum die entsprechenden Signalwege auslöst, kommt es dabei zur intrazellulären Aktivierung ausgehend von andersartigen Rezeptorsystemen. Den Ausgangspunkt dafür setzte 2001 eine Arbeit von Francis S. Lee und Moses V. Chao, in der die Phosphorylierung von Trk-Rezeptoren durch Agonisten des A₂A-Adenosin-Rezeptors sowohl in PC12-Zellen als auch in embryonalen, hippokampalen Nervenzellen beschrieben wurde (Lee and Chao, 2001). Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass dieses Transaktivierungsereignis an intrazellulären Membranen stattfindet und von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie vermittelt wird (Rajagopal et al., 2004; Rajagopal and Chao, 2006). Außerdem wurde die physiologische Bedeutung dieser Art der Rezeptoraktivierung dadurch unterstrichen, dass der Motoneuronenverlust in einem klassischen Läsionsparadigma des Fazialisnerven durch die Applikation von CGS21680, einem A₂A-Rezeptor-Agonisten, in TrkB-abhängiger Art und Weise gemildert werden kann (Wiese et al., 2007). In den letzten Jahren wurden dann einige weitere Rezeptorsysteme beschrieben, die mit Trk-Rezeptoren in funktioneller Interaktion verbunden zu sein scheinen, darunter die des Glukokortikoidrezeptors, des Dopamin D1 Rezeptors und weiteren G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Iwakura et al., 2008; Jeanneteau et al., 2008; Lee et al., 2002a).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals eine funktionelle Interaktion zwischen TrkB und dem EGF-Rezeptor in kortikalen Vorläuferzellen beschrieben werden. Sowohl Neurosphärenkulturen von E11,5 als auch Direktkulturen von Maus-Embryonen zum Zeitpunkt E10,5 bis E14,5 zeigten dabei die Phosphorylierung von TrkB, Erk1/2 und Akt nach EGF-Stimulus (vgl. 3.2.2). Auch in diesem Fall korrelierte das Ausmaß der Proteinphosphorylierung mit den vorherrschenden Zelltypen. Bei überwiegend aus Pax6-positiven Vorläuferzellen bestehenden Kulturen dominierten EGF-induzierte Signale, wohingegen mit Zunahme von Map2-exprimierenden Neuronen die Neurotrophin-Antwort in den Vordergrund rückte. Die beobachtete Phosphorylierung von TrkB durch EGF folgte dabei einem Zeitverlauf, welcher zu der bei der GPCR-vermittelten Transaktivierung verschieden war. Während die Transaktivierung im zuletzt genannten Fall einige Stunden in Anspruch nahm, und dabei die



Regulation der Genexpression mit einschloss, konnte hier die maximale Phosphorylierung von TrkB bereits nach fünf Minuten erreicht werden. Gleichzeitig war die Dauer der Aktivierung auf mehrere Stunden ausgedehnt, was für EGF-induzierte Signalwege sonst eher untypisch ist. Wie gezeigt werden konnte, sind Trk-Rezeptoren dagegen in der Lage, speziell über die Interaktion mit dem Transmembranprotein ARMS/Kiddins220 für eine lang anhaltende Aktivierung von MAPK-Signalwegen zu sorgen (Arevalo et al., 2004). Die unkonventionelle Verschaltung von EGF-induzierten Signalwegen mit TrkB böte auf diese Weise die Möglichkeit, aus sonst kurzlebigen Impulsen lang anhaltende Signale zu generieren. Da die verschieden lange Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie der MAPK-Kaskade zu unterschiedlichen Konsequenzen hinsichtlich Proliferation und Differenzierung führen kann (Wixler et al., 1996; Traverse et al., 1992), dürfte das von tatsächlicher physiologischer Bedeutung für die einzelne Zelle sein. Durch die Transaktivierung von TrkB ließe sich das Wirkungsspektrum des EGF-Rezeptors um einen wichtigen Aspekt erweitern.

Dass die Transaktivierung von TrkB dabei tatsächlich über den EGF-Rezeptor, und nicht über die direkte Bindung von EGF an TrkB stattfindet, konnte durch die pharmakologische Inhibition des EGF-Rezeptors gezeigt werden, wonach die Phosphorylierung von TrkB nach EGF-Stimulus nicht mehr möglich war. Für die rasche Signaltransduktion vom EGF-Rezeptor hin zu TrkB scheinen außerdem Mitglieder der Src-Kinase-Familie verantwortlich zu sein. Dies geht zum Einen aus der pharmakologischen Inhibition dieser Proteine mit PP1 und PP2 hervor, wodurch die Phosphorylierung von überexprimiertem TrkB in kortikalen Vorläuferzellen nach EGF-Stimulus aufgehoben werden konnte (vgl. 3.2.6). Wie die Input-Kontrolle dieses Experiments zeigte, kam es bei gleichzeitiger Verwendung von PP1 und PP2 zu einem additiven Effekt mit einer stärkeren Reduktion der pTrkB-Banden als bei der einzelnen Anwendung der Inhibitoren. Außerdem schien der PI3K-Signalweg stärker von der pharmakologischen Inhibition betroffen zu sein als die MAPK-Kaskade, was ein Vergleich der Bandenreduktion von pAkt (PI3K) und pErk1/2 (MAPK) zeigte. Während die pAkt-Bande fast vollständig verschwand, war im Fall von pErk1/2 lediglich eine milde Abschwächung der Bandenintensität zu erkennen. Zusätzlich konnte zum Anderen gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition von cSrc und Fyn, zweier in neuronalem Gewebe exprimierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie, auch zu einer signifikanten Erniedrigung der von EGF ausgelösten Phosphorylierung von



endogenem TrkB führte (vgl. 3.2.7). Der hier verwendete experimentelle Ansatz bestand in der lentiviralen Transduktion von DNA-Konstrukten, die jeweils die Überexpression von dominant negativen Enzymvarianten erlaubten. Darin dürfte ein Grund gesehen werden, warum die Erniedrigung der TrkB-Aktivierung in der Western Blot-Analyse relativ moderat ausfällt. Sowohl die begrenzte Infektionsrate als auch die sicherlich nicht vollständige Unterdrückung der jeweiligen Enzymfunktion limitieren hier die Effizienz der Inhibition. Ein zweiter Grund mag sein, dass die Familie der Src-Kinasen weitere Mitglieder umfasst, die auch im ZNS exprimiert werden und dabei zu einem gewissen Grad redundante Funktion besitzen dürften. Es wurden bereits funktionelle Interaktionen von Fyn mit TrkB beschrieben. Einerseits wurde gezeigt, dass Fyn ein kritischer Faktor für die Transaktivierung von TrkB durch GPCRs an intrazellulären Membranen ist (Rajagopal and Chao, 2006), andererseits scheint Fyn notwendig zu sein, um TrkB in so genannten „lipid raft“-Mikrodomänen zu lokalisieren, was wiederum als wichtige Voraussetzung für die effiziente Signaltransduktion vieler membranständiger Rezeptoren angesehen wird (Pereira and Chao, 2007).

Die Beteiligung des EGF-Rezeptors an der Entwicklung des zerebralen Kortex wurde in zahlreichen Publikationen beschrieben, darunter Berichte über die chemotaktische Wirkung von EGF während der Wanderung von Zellen in Richtung kortikaler Platte und auch über die spezifische Verteilung des EGF-Rezeptors in unterschiedlichen Subpopulationen kortikaler Zellen (Burrows et al., 1997; Sun et al., 2005; Caric et al., 2001). Die Expressionsmuster von Liganden des EGF-Rezeptors wie EGF aber auch TGF α (transforming growth factor α) und HB-EGF (heparin binding EGF) deuten außerdem darauf hin, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von neuronalen Vorläuferzellen sowohl im embryonalen als auch im adulten ZNS spielen dürften (Cameron et al., 1998; Kornblum et al., 1997; Opanashuk et al., 1999). Wie die hier beschriebenen Resultate andeuten, könnte dabei die Transaktivierung von TrkB eine entscheidende Rolle spielen. Im Folgenden soll weiter diskutiert werden, wie die EGF-Rezeptor vermittelte Phosphorylierung von TrkB in frühen Phasen der Kortikogenese kortikaler Vorläuferzellen darauf vorbereiten kann, sich zu Neurotrophin-responsiven Nervenzellen zu differenzieren, um schließlich in funktionelle neuronale Netzwerke integriert werden zu können.



4.3 Die dynamische Verteilung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB in kortikalen Vorläuferzellen

Die Liganden-vermittelte Aktivierung von klassischen Rezeptor Tyrosin Kinasen wie TrkB erfolgt an der Außenseite der Plasmamembran im extrazellulären Raum. Die Exposition der Proteine an der Zelloberfläche ist damit von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Signaltransduktion ins Zellinnere. Im Falle von TrkB scheint die dynamische Umverteilung des Rezeptors zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten ein zentrales Mittel zu sein, um dessen Signaltransduktion zu modulieren. Nach der klassischen Aktivierung durch Liganden an der Zelloberfläche kommt es beispielsweise zur Internalisierung des Rezeptors, wodurch die Responsivität der Zelle gegenüber solchen Reizen zunächst reduziert wird. Durch die im Zellinneren ausgelösten Signale kann es aber auf der anderen Seite wieder zu einer verstärkten Insertion von TrkB in die Membran kommen. Je nach Lage des Gleichgewichts wird auf diese Weise die Responsivität der Zelle positiv oder negativ beeinflusst (Huang and Reichardt, 2003). Wie einige Arbeiten nahelegen, befindet sich TrkB in gewissen neuronalen Zelltypen tatsächlich größtenteils intrazellulär und weniger an der Zelloberfläche. 1998 berichteten die Labore von Louis Reichardt und Ben Barres über die Dynamik von TrkB in retinalen Ganglionzellen und spinalen Motoneuronen. In beiden Zelltypen fanden sie eine überwiegend intrazelluläre Verteilung von TrkB. Durch die Depolarisation oder die Erhöhung von zyklischem AMP durch Forskolin der Zellen in Kultur war jedoch eine rapide Zunahme des Zelloberflächenlevels von TrkB zu beobachten (Meyer-Franke et al., 1998). Auch in hippokampalen Neuronen konnte eine derartige Regulation der TrkB-Exposition beobachtet werden. Hier erfolgte die Insertion des Rezeptors in Abhängigkeit elektrischer Aktivität und intrazellulärer Kalzium-Ionen-Konzentration (Du et al., 2000). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung gewährte erste Einblicke in mechanistische Vorgänge während solcher Rezeptor-Translokationen. So scheint für die durch Aktivität induzierte Insertion von TrkB in die Plasmamembran eine Cdk5 vermittelte Phosphorylierung von Ser478 essentiell zu sein (Zhao et al., 2009). Zusammengefasst kann man sagen, dass die Überlebens- und Differenzierungs-fördernden Effekte von Neurotrophinen wie BDNF nicht nur der bloßen Expression eines Rezeptors wie TrkB bedürfen, sondern dass dieser außerdem von zusätzlichen Faktoren abhängt, um überhaupt zur Weiterleitung der entsprechenden Signale befähigt zu werden. Die



induzierte Insertion des Rezeptors in die Plasmamembran ist in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung.

4.3.1 Die Glykosylierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB

Die in dieser Arbeit untersuchten, als Neurosphären kultivierten kortikalen Vorläuferzellen, zeigten gegenüber den Neurotrophinen BDNF und NT-3 keine Sensitivität (vgl. 3.2.2). Die Ursache dafür fand sich in der subzellulären Lokalisation von TrkB. In unbehandelten Zellen verteilte sich der Rezeptor praktisch vollständig im Zytoplasma mit einer an endosomale Vesikel erinnernden Lokalisation (vgl. 3.4.1). Die Regulation der subzellulären Lokalisation von Proteinen geschieht auf vielfältige Weise. Beispielsweise können sie nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) dort und im darauffolgenden Kompartiment des Golgi-Apparates post-translationell modifiziert und damit für spezifische Bestimmungsorte markiert werden. Diese nachträglichen Veränderungen betreffen dabei überwiegend das Anhängen von Kohlenhydratgruppen an Aminosäureseitenketten der Proteinsequenz. Im ER werden dabei N-glykosidische Bindungen an Asparagin geknüpft, O-glykosidische Bindungen entstehen dagegen an Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin im Golgi-Apparat. Die dabei entstehenden Glykan-Strukturen besitzen oft hohe Komplexität und damit ein großes informatives Potential. Außerdem kann das Anfügen von Oligosacchariden je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium sehr unterschiedlich erfolgen, wodurch ein jeweils angepasstes Protein-Sorting erreicht werden kann (Potter et al., 2006). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die hochmolekulare, durch die beiden pTrkB-Antikörper im Western Blot erkannte Bande durch Glykosylierung modifiziert. Der *in vitro*-Verdau mit fünf unterschiedlichen deglykosylierenden Enzymen machte deutlich, dass es sich dabei praktisch ausschließlich um eine Modifikation durch N-Glykosylierung handelte, da die alleinige Inkubation mit PNGase F genügte, um die insgesamt beobachtete Verschiebung der Protein-Bande zu erreichen (vgl. 3.3.3). Des Weiteren führte die Inhibition der N-Glykosylierung durch die Applikation von Tunicamycin zu einer veränderten Verteilung des Rezeptors innerhalb der Zelle. Das punktierte, intrazelluläre Erscheinungsbild wich nach 12-stündiger Behandlung einer homogeneren Verteilung mit Bereichen, die eine membranständige Lokalisation von TrkB vermuten ließen (vgl. 3.4.2). Dass dies funktionelle Konsequenzen nach sich zog, wurde in der Western Blot-Analyse stimulierter Kulturen deutlich. Während unbehandelte Zellen zwar auf EGF,



nicht aber auf BDNF mit der Phosphorylierung von TrkB reagierten, tauchte in den mit Tunicamycin behandelten Zellen eine BDNF-induzierte pTrkB-Bande auf. Gleichzeitig waren die beiden für die EGF-Stimulation charakteristischen pTrkB-Banden stark reduziert und es kam eine weitere pTrkB-Bande zum Vorschein, die vorher nur schwach vorhanden war. Diese stimmte in ihrer Laufhöhe mit der BDNF-induzierten Bande überein. Offensichtlich war durch die Inhibition der N-Glykosylierung eine Population von TrkB entstanden, die an der Zelloberfläche exponiert wurde und deshalb zur Bindung von BDNF fähig war. Auch für die Transaktivierung durch EGF war diese Form des Rezeptors zumindest teilweise zugänglich. Die Tatsache, dass beide EGF-induzierten pTrkB-Banden reduziert waren, könnte bedeuten, dass nicht nur der stark N-glykosylierte Rezeptor (~170 kDa) transaktiviert wird, sondern auch eine weiter prozessierte Form, die möglicherweise in den Kompartimenten des Golgi-Apparates existiert. So werden die Zuckerreste vom high-mannose-Typ des ER im Golgi-Apparat zum Teil wieder abgebaut, um dann als Plattform für die weiteren Modifikationen zu Zucker des komplexen oder hybriden Typs zu dienen (Vagin et al., 2009). Solche Veränderungen könnten schließlich zu einer TrkB-Variante mit einem geringeren Laufverhalten im SDS-Gel (~130 kDa) führen.

Interessanterweise stimmte die Laufhöhe der von BDNF-induzierten Banden in mit Tunicamycin behandelten kortikalen Vorläuferzellen mit der der Banden überein, die in den Direktkulturen ab E11,5 nach Neurotrophin-Stimulus (BDNF, NT-3) zusätzlich zu der 130 kDa Bande beobachtet worden waren (vgl. 3.3.4 und 3.2.2). Insgesamt spricht das für ein Szenario, bei dem es in den Zellen des dorsalen Telencephalons je nach Entwicklungsstadium und Differenzierungsgrad zu spezifischen posttranslationalen Modifikationen von TrkB in Form von Glykosylierung kommt. Diese wiederum bedingt dann je nach Ausprägung die Retention des Rezeptors in ER-Golgi-Kompartimenten oder erlaubt dessen Transport zur Plasmamembran und die Insertion in dieselbe. Auf diese Weise könnten funktionell unterschiedliche Subpopulationen von TrkB existieren, die Eine als transaktivierbarer Pool im Zellinneren, die Andere mit klassischen membranständigen Rezeptoren, die zur Bindung von Neurotrophinen im extrazellulären Raum fähig wären.



4.3.2 Die induzierte Insertion von TrkB in die Plasmamembran kortikaler Vorläuferzellen durch EGF

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die Stimulation von kortikalen Vorläuferzellen mit EGF zu einer Umverteilung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB. Während dieser in unbehandelten Zellen überwiegend intrazellulär zu finden war, kam es innerhalb der ersten 30 Sekunden nach dem Stimulus zu einer Rekrutierung des Rezeptors zur Plasmamembran (vgl. 3.4.3). Wie sich herausstellte, war diese Verlagerung von transientser Natur. Zehn Minuten nach der Zugabe von EGF war bereits wieder ein deutlicher Anstieg von intrazellulärem TrkB zu erkennen, nach etwa sechs Stunden war die Ausgangssituation mit intrazellulärer Lokalisation des unphosphorylierten Rezeptors wieder erreicht. Obwohl die Membranrekrutierung nur von relativ kurzer Dauer zu sein schien, war die erhöhte Immunreaktivität gegenüber phosphoryliertem TrkB (PLC γ -Bindungsstelle) für einen deutlich längeren Zeitraum erhöht. Dies erlaubt, wie oben beschrieben, eine anhaltende Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie beispielsweise der MAPK- und der PI3K-Kaskade und transformiert so den EGF-induzierten Reiz in eine Antwort, die für Neurotrophin-Rezeptoren charakteristisch ist. Zusätzlich dazu kann die Umverteilung von TrkB der Zelle zur Responsivität gegenüber extrazellulären Stimuli verhelfen. Wie die Biotinylierung von Oberflächenproteinen in dieser Arbeit zeigt, erfolgt nach EGF-Stimulation von kortikalen Vorläuferzellen tatsächlich ein Einbau von TrkB in die Plasmamembran (vgl. 3.4.4). Eine solche induzierte Exposition des Rezeptors könnte einen kritischen Schritt im Differenzierungsprogramm der Zelle darstellen, da sie dadurch gegenüber einem neuen Typ von Stimulus zugänglich werden kann. Es ist vorstellbar, dass die Responsivität gegenüber Neurotrophinen wie BDNF während der Entwicklung sowohl räumlich als auch zeitlich genau reguliert sein muss. Dies kann prinzipiell nicht nur durch die Verfügbarkeit des Liganden erreicht werden, sondern auch durch die regulierte Lokalisation von TrkB.

Die asymmetrische Expression und ungleichmäßige Verteilung des EGF-Rezeptors in kortikalen Vorläuferzellen nach der Mitose ist unmittelbar mit dem Schicksal der generierten Tochterzellen verknüpft. Die sich zu postmitotischen Zellen differenzierenden Tochterzellen besitzen dabei im Vergleich zu proliferativ bleibenden Tochterzellen ungleich größere Mengen des EGF-Rezeptors (Sun et al., 2005). In solchen Zellen könnte dann der Kontakt mit EGF oder weiteren Liganden des EGF-Rezeptors dazu führen, extrazelluläre Reize in Form von beispielsweise BDNF



verarbeiten zu können. Wie Laura Lillien und Mitarbeiter gezeigt haben, vermittelt bereits die Aktivierung des EGF-Rezeptors chemotaktische Reize an die Zellen des embryonalen Telenzephalon (Caric et al., 2001). Dies könnte den EGF-Rezeptor exprimierenden Vorläuferzellen ermöglichen, nach der Zellteilung die unmittelbare Umgebung der Ventrikularzone zu verlassen und damit in eine neue Mikroumgebung zu gelangen. Wird dabei gleichzeitig der Neurotrophin-Rezeptor TrkB an die Zelloberfläche gebracht, könnten dann graduelle Neurotrophin-Konzentrationen im Telenzephalon die weitere Zielfindung übernehmen. Ein derartiger BDNF-Gradient wurde in der Literatur bereits postuliert (Behar, 1997). Die *in vivo*-Analyse der subzellulären Lokalisation von TrkB zeigte dann auch, dass der Rezeptor in Zellen der Ventrikularzone eine andere Verteilung zu haben scheint als in den Zellen der Marginalzone. Während in Ersteren eine eher punktierte, intrazelluläre Färbung zu sehen ist, erinnert die Situation in Letzteren mehr an eine Membranständigkeit des Rezeptors (vgl. 3.4.5).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transaktivierung von TrkB anhand der EGF-vermittelten Aktivierung des EGF-Rezeptors gezeigt. Betrachtet man die Expression weiterer Mitglieder der ErbB-Familie, könnte das in Bezug auf die Situation im Organismus durchaus lediglich exemplarischen Charakter haben. Beispielsweise sind auch ErbB2 und ErbB4 in den germinativen Zonen des ZNS ab etwa E12 (Ratte) anwesend (Kornblum et al., 2000). Außerdem existieren wie oben bereits erwähnt neben EGF noch weitere Liganden, die zur Aktivierung des EGF-Rezeptors fähig sind. Sowohl die mRNAs von TGF α als auch HB-EGF, beides Liganden des EGF-Rezeptors, konnten in frühen Phasen der Kortextentwicklung nachgewiesen werden, und sind somit weitere Kandidaten für eine Aktivierung des EGF-Rezeptors *in vivo* (Kornblum et al., 1997; Opanashuk et al., 1999).

4.4 Die Bedeutung der TrkB-Transaktivierung durch den EGF-Rezeptor *in vivo*

Dass die Transaktivierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB durch den EGF-Rezeptor für die Entwicklung des zerebralen Kortex von physiologischer Bedeutung sein muss, wurde durch die Untersuchung der Phosphorylierungslevel von TrkB in EGF-Rezeptor defizienten Tieren deutlich. Im dorsalen Telenzephalon dieser Tiere war am Embryonaltag 12,5 die Aktivierung von TrkB fast vollständig reduziert. Dies



betraff dabei sowohl die Bindungsstelle für Shc (Y515) als auch für PLC γ (Y816). Offensichtlich wird also in dieser recht frühen Phase der Kortextentwicklung die hauptsächliche Phosphorylierung von TrkB über die Transaktivierung ausgehend vom EGF-Rezeptor und weniger von Neurotrophinen vermittelt. Nach dem oben vorgeschlagenen Modell käme es also in kortikalen Vorläuferzellen zunächst zu einer TrkB-Aktivierung über den EGF-Rezeptor, der nicht nur nachgeschaltete Signalwege wie die der MAPK- und PI3K-Kaskade induziert, sondern auch die Exposition des Rezeptors an der Zelloberfläche bewirkt. Die im Bezug zu TrkB zeitlich versetzte Expression von Neurotrophinen wie BDNF wäre dann damit zu erklären, dass die Neurotrophin-Abhängigkeit kortikaler Vorläuferzellen erst mit einem gewissen Differenzierungsgrad eintritt und wahrscheinlich erst dann eine Rolle zu spielen beginnt, wenn die migrierenden Nervenzellen die erste Etappe heraus aus der VZ/SVZ zurückgelegt haben.

Die direkten Auswirkungen fehlender TrkB-Aktivität während der Kortextentwicklung wurden in dieser Arbeit sowohl in Geweben aus *TrkB/NTRK2 KO*- als auch aus *EGFR KO*-Mäusen untersucht. In beiden Fällen waren dabei am Embryonaltag 12,5 weder Veränderungen im Überleben noch bei der Proliferation TrkB-exprimierender Zellen festzustellen (vgl. 3.5.1 und 3.5.2). In einer vorangegangenen Arbeit wurde die Kortextentwicklung in Mäusen untersucht, in denen der Neurotrophin-Rezeptor TrkB durch das Flankieren kritischer Genomsequenzen mit LoxP-Erkennungsstellen und gleichzeitiger Expression der CRE-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promotors konditional ausgeschaltet worden war. Obwohl die Expression von TrkB in diesem Mausmodell bereits ab E11,5 stark reduziert ist, konnten im Verlauf der Entwicklung ebenfalls keine erhöhten Werte für apoptotische Zellen oder eine Veränderung der Proliferation kortikaler Zellen festgestellt werden (Medina et al., 2004). Die Markierung neu geborener Nervenzellen durch die Inkorporation von BrdU und deren späterer immunhistochemischer Nachweis zeigten jedoch, dass es in Abwesenheit von TrkB zu einer fehlerhaften Positionierung der wandernden Neurone kommt. Dies wurde dabei in zwei Zeiträumen untersucht, einmal nach Markierung der Zellen am Embryonaltag 12,5 und einmal am Embryonaltag 14,5. Die Analyse erfolgte jeweils bei E18,5. Wann genau nun die Defizienz in Bezug auf TrkB die Migration kortikaler Zellen zu beeinträchtigen beginnt, und welche Stimuli für dessen Aktivierung jeweils verantwortlich sind, wird daraus zwar nicht klar, trotzdem wird dadurch die Beteiligung von TrkB an der Wanderung unterschiedlicher



Populationen von kortikalen Neuronen deutlich. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit in den *TrkB/NTRK2 KO*-Mäusen kein vergleichbarer Defekt gefunden werden. Die Analyse der TrkB-positiven Zellen im dorsalen Vorderhirn zum Zeitpunkt E15,5 zeigte nämlich eine identische Verteilung im Vergleich zum Wildtyp (vgl. 3.5.5). Dies kann zwei Gründe haben: Einerseits handelt es sich nicht um eine komplette Deletion des Rezeptors, sondern lediglich um eine funktionelle Mutante mit deletierter Kinasedomäne. Dadurch könnten Signalwege, die von der TrkB-Kinasedomäne unabhängig sind, nach wie vor funktionieren, wodurch beispielsweise eine vom EGF-Rezeptor vermittelte Transaktivierung ungestört ablaufen könnte. TrkB-exprimierende Zellen aus *TrkB/NTRK2 KO*-Mäusen wären so funktionell zunächst nicht beeinträchtigt. Andererseits erstreckte sich hier die Analyse nicht in spätere Phasen der Kortikogenese, sondern betraf nur die Situation zum Zeitpunkt E15,5. Es ist möglich, dass die Effekte gestörter TrkB-Expression erst in späteren Zeiträumen auftreten, die hier nicht untersucht wurden. Erwartungsgemäß müsste es aber auch in den *TrkB/NTRK2 KO*-Mäusen zu Störungen neuronaler Migration kommen, wenn auch erst in späteren Phasen, nämlich wenn diese von der Neurotrophin-induzierten Autophosphorylierung des Rezeptors abhängt. Es soll hier nicht versäumt werden, auf eine Arbeit hinzuweisen, in welcher die Funktionalität von Trk-Rezeptoren während der Kortextentwicklung durch die *in utero* Elektroporation dominant negativer Konstrukte für sowohl TrkB als auch TrkC inhibiert worden war (Bartkowska et al., 2007). Die Analyse transfizierter Zellen zeigte dabei ebenfalls keinen erhöhten Zelltod, allerdings waren im Vergleich zur Kontrolle weniger Zellen in die kortikale Platte eingewandert. Im Gegensatz zur Arbeit von Medina et al. (s.o.) wurde dieses Phänomen aber nicht auf eine gestörte Migration, sondern auf eine verminderte Proliferation der kortikalen Vorläuferzellen in der VZ zurück geführt. Generell gesehen dürfte eine verzögerte Neurogenese in der VZ durchaus zu einer fehlerhaften Positionierung von Nervenzellen führen, da zeitliche Präzision sicherlich ein kritischer Faktor in diesem Prozess ist. Da jedoch die absolute Zahl der sich teilenden Zellen in den konditionalen *TrkB/NTRK2 KO*-Tieren aus Medina et al. (s.o.) unverändert zu sein scheint und es auch Hinweise auf die chemotaktische Wirkung von Neurotrophinen gibt (Behar, 1997), spricht einiges dafür, dass Trk-Rezeptoren die Entstehung des zerebralen Kortex über die Regulation neuronaler Wanderung mitgestalten.



Auch in EGFR-defizienten Tieren war die Morphologie des Vorderhirns am Embryonaltag 15,5 im Vergleich zum Wildtyp größtenteils unauffällig (vgl. 3.5.5). Die Quantifizierung TrkB-positiver Zellen ließ allerdings eine veränderte Verteilung dieser Zellpopulation erkennen. In *EGFR KO*-Mäusen war dabei die Positionierung der Zellen insofern gestört, als dass die innere der beiden TrkB-immunreaktiven Zellschichten dünner erschien und aus weniger Zellen bestand, wohingegen die oberflächliche Zellschicht mehr TrkB-positive Zellen enthielt. Außerdem fand sich ein größerer Teil TrkB-exprimierender Zellen außerhalb dieser zwei abgegrenzten Schichten innerhalb der kortikalen Platte und der VZ/SVZ. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass früher geborenen Neurone innerhalb der kortikalen Platte tiefer zu liegen kommen als später entstandene (inside first-outside last, vgl. 1.1.2), kann eine solche Verschiebung durch eine gestörte Migration kortikaler Nervenzellen erklärt werden. Kommt es dabei zu Verzögerungen, würden eher die oberflächlichen Rindenschichten besiedelt werden. Die Zellen außerhalb der definierten Areale könnten in diesem Zusammenhang die immer noch umher wandernden Zellen repräsentieren, die ohne die Aktivität des EGF-Rezeptors Schwierigkeiten haben, die VZ/SVZ verlassen zu können. Die Beeinträchtigung neuronaler Wanderung in Abwesenheit des EGF-Rezeptors deutete sich bereits 1995 an, als in einer EGF-Rezeptor-defizienten Mauslinie verdickte germinale Zonen im zerebralen Kortex zum Zeitpunkt E18,5 gefunden wurden (Threadgill et al., 1995). Die verhältnismäßig spät einsetzende Neurodegeneration in *EGFR KO*-Mäusen (Sibilia et al., 1998) ließe sich dementsprechend mit einer fehlenden gegenseitigen Unterstützung erklären, die wegfiel, wenn bestimmte Populationen kortikaler Zellen nicht mehr an ihre ursprünglich definierten Positionen gelangen können.

4.5 Die TrkB-abhängige Migration kortikaler Vorläuferzellen

Die chemotaktische Wirkung von EGF auf kortikale Vorläuferzellen wurde durch die Analyse des Migrationsverhaltens *in vitro* anhand des Streifentests untersucht. Dabei konnte zum Einen die Attraktion der Zellen durch das angebotene EGF-Substrat festgestellt werden, zum Anderen wurde die dabei auftretende Aktivierung von TrkB beobachtet. In Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in räumlicher Nähe zum EGF-Substrat befanden, traten dabei asymmetrische Anhäufungen von phosphoryliertem TrkB auf, die häufig auf der dem Substrat zugewandten Seite der Zelle



lokalisiert waren. Bei Weitem nicht alle Zellen in der Nähe von EGF-Streifen zeigten solche pTrkB-Aggregate, was verschiedene Gründe haben dürfte. So macht es die transiente Natur der Umverteilung von TrkB sicherlich schwer, die Zellen im richtigen Zeitfenster zu beobachten, wenn nämlich gerade die Rekrutierung von TrkB erfolgt war. Außerdem muss man wohl vermuten, dass durch die Diffusion von EGF ein gewisser Konzentrationsgradient ausgehend von beschichteten Streifen entsteht. Nur so wäre auch gewährleistet, dass Zellen abseits des EGF-Substrats den Stimulus überhaupt wahrnehmen, um sich dann in die entsprechende Richtung bewegen zu können. Ob ein solcher Gradient überall in vergleichbarer Stärke und Ausdehnung existiert ist fraglich. Nichtsdestotrotz unterstützen die Ergebnisse des Streifentests die Hypothese, dass es durch einen EGF-Stimulus zu einer gerichteten Translokation von TrkB zur Plasmamembran kommen kann. In wandernden Zellen könnte auf diese Art die Neurotrophin-Responsivität gezielt am vorwärtsgerichteten Wanderungspol kortikaler Zellen hergestellt werden. Gerade bei der Zellbewegung durch Nukleokinese, bei der ein langer Fortsatz in Richtung der pialen Kortexoberfläche vorausgeschickt wird, wäre eine solche asymmetrische Exposition von TrkB an der Zelloberfläche ein geeignetes Mittel, um dort befindliches BDNF wahrnehmen zu können. Möglicherweise erhalten kortikale Nervenzellen auf diese Weise die notwendige Information zur gerichteten Wanderung oder auch zur Identifikation apikaler Zielgebiete.

4.6 Die Spezifität des pTrkB-PLC γ -Antikörpers

Die immunreaktiven Banden, die nach EGF-Stimulus bei der Western Blot-Analyse von Lysaten kortikaler Vorläuferzellen zu sehen waren, liefen auf einer ungewöhnlichen Höhe. Sowohl der Antikörper gegen die PLC γ -Bindungsstelle, der im Labor von M. Chao generiert worden war, als auch ein kommerzieller Antikörper gegen die Shc-Bindungsstelle von TrkB lieferten Banden bei etwa 170 kDa und etwas unter 130 kDa. Bislang waren für TrkB aber Banden im SDS-Gel bei etwa 145 kDa für die Voll-Längenisofom, und etwa 95 kDa für die trunkierte Isoform ohne Kinasedomäne beschrieben. Obwohl der Antikörper gegen die phosphorylierte PLC γ -Bindungsstelle bereits charakterisiert und dessen Spezifität für das entsprechende Antigen gezeigt worden war (Bath et al., 2008), wurden im Rahmen dieser Arbeit noch weitere Anstrengungen unternommen, die Identität der detektierten Banden als TrkB zu



bestätigen. Die etwas unterhalb 130 kDa laufende Bande wurde dabei durch den TrkB-Antikörper erkannt und konnte außerdem durch die Überexpression von HA-TrkB verifiziert werden, welches eine übereinstimmende Laufhöhe zeigte (vgl. 3.2.1 und 3.2.5). Zusätzlich konnte diese Bande auch durch die Stimulation von akut isolierten kortikalen Vorläuferzellen mit BDNF induziert werden. Die Zuordnung der höheren, sich bei etwa 170 kDa befindende Bande jedoch war etwas zweifelhafter. Zunächst musste sichergestellt werden, dass es keine Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber aktiviertem EGF-Rezeptor, der im SDS-Gel bei etwa 175 kDa läuft, gab. Durch das Immunpräzipitationsexperiment in Abschnitt 3.3.1 konnte dies aber ausgeschlossen werden. Auch die aus Lysaten kortikaler Vorläuferzellen präzipitierten TrkB-Rezeptoren, die an der Shc-Bindungsstelle phosphoryliert waren, konnten mit dem Antikörper gegen die PLC γ -Bindungsstelle erkannt werden (vgl. 3.3.2). Die Voll-Längenisofom von TrkB besteht aus 821 Aminosäuren und müsste bei einem durchschnittlichen Gewicht von 110 Da pro AS auf einer ungefähren Laufhöhe im SDS-Gel von 90 kDa zu erwarten sein. Die beobachtete Laufhöhe von 145 kDa weist jedoch darauf hin, dass es generell zu posttranslationalen Modifikationen des Rezeptors kommen kann, welche das apparente Molekulargewicht des Proteins verändern. Davon ausgehend entstand während dieser Arbeit die Hypothese, dass es im Fall von TrkB je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium zu unterschiedlichen Modifikationen kommen kann, die dann einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors haben. Auf welche Weise in diesem Zusammenhang eine spezifische Glykosylierung von TrkB zu funktionell unterschiedlichen Populationen des Rezeptors führen könnte, wurde bereits weiter oben diskutiert (vgl. 4.3.1). Die umfangreiche Glykosylierung von TrkB im extrazellulären Bereich des Rezeptors wird auch als Ursache in Frage, warum der in dieser Arbeit benutzte TrkB-Antikörper lediglich die bei 130 kDa laufende Bande erkennt. Das im N-terminalen Bereich des Proteins gelegene Epitop könnte dabei von den dort angefügten Kohlenhydratseitenketten maskiert und der Antikörper dadurch sterisch an der Bindung gehindert werden. Auch im Falle der mit diesem Antikörper durchgeführten Immunpräzipitationen ließe sich so lediglich das Protein mit der Laufhöhe unterhalb 130 kDa präzipitieren, wie ja tatsächlich auch beobachtet werden konnte. Interessanterweise ist in einer Arbeit über Transaktivierung von TrkA durch GPCRs ein apparentes Molekulargewicht dieses Neurotrophin-Rezeptors dokumentiert, welches ebenfalls zu ungewöhnlichen Laufhöhen im SDS-Gel führt.



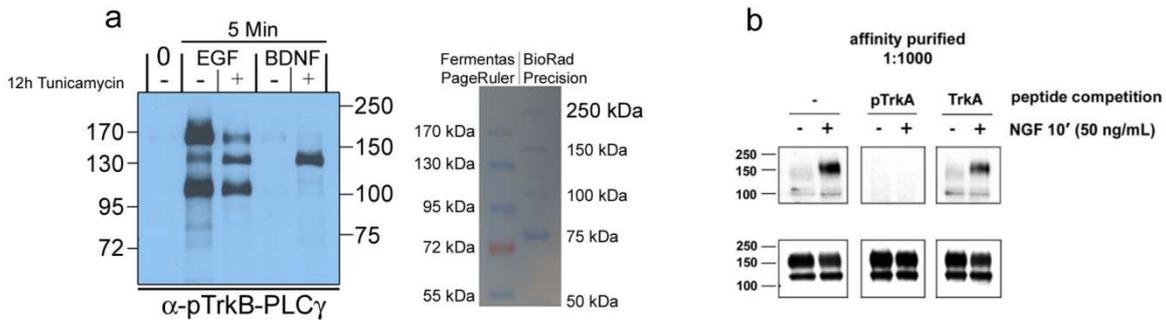


Abbildung 4-1: Laufhöhenzuordnung der pTrkB-PLC γ -Banden

Die Zuordnung der jeweiligen Laufhöhe der pTrkB-PLC γ -Banden anhand zweier verschiedener Proteinstandards zeigt die Vergleichbarkeit mit pTrkA- und TrkA-Banden aus der Arbeit von Rajagopal et al., 2004. (a) Exemplarisch für die in dieser Arbeit beobachteten pTrkB-PLC γ -Banden ist die Western Blot-Analyse von Tunicamycin-behandelten Zellen, zusammen mit einer Gegenüberstellung zweier unterschiedlicher Proteinstandards gezeigt. (b) Western Blot-Analyse von pTrkA und TrkA reaktiven Banden aus Rajagopal et al., 2004. In beiden Fällen treten Doppelbanden bei knapp über 150 kDa und oberhalb der 100 kDa-Markerbande (Marker: BioRad Precision) auf.

Ein Vergleich dieser TrkA-Banden mit den hier beschriebenen TrkB-Banden zeigt eine deutliche Übereinstimmung (Abb.: 4-1). Diese wird besonders klar, wenn die Beurteilung der Bandengrößen anhand des gleichen Proteinstandards erfolgt. Tatsächlich zeigte sich dabei auch eine gewisse Diskrepanz zwischen den Produkten von Fermentas und BioRad. Obwohl die Laufhöhe von TrkA in der Arbeit von Rajagopal et al. unkommentiert bleibt, deutet sich hier möglicherweise die generelle Bedeutung solcher Modifikationen an, um Trk-Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten zurück zu halten, und sie so dem Mechanismus der Transaktivierung zugänglich zu machen.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern die bisherigen Konzepte der kortikalen Differenzierung und können einen wichtigen Teil zum Verständnis des komplexen Ablaufs von Entwicklungsprogrammen während der Kortikogenese beitragen. Unvermeidlicherweise gibt es eine Reihe offener Fragen.

Ein Schwerpunkt dabei liegt sicherlich in der Aufklärung der Verhältnisse im Organismus: Welche Subpopulationen kortikaler Nervenzellen sind von der funktionellen Interaktion zwischen TrkB und dem EGF-Rezeptor abhängig? In welchen Phasen der Differenzierung geschieht die Verlagerung hin zur Neurotrophin-Responsivität? Welches sind die tatsächlichen Aktivatoren der jeweiligen Signalwege *in vivo*?



Experimente zur Klärung solcher und ähnlicher Fragen könnten die genaue immunhistochemische Charakterisierung von TrkB-exprimierenden Zellen in der kortikalen Platte und auch die Lokalisation von Liganden des EGF-Rezeptors beinhalten. Kandidaten wären hier beispielsweise EGF, HB-EGF, TGF α und auch Amphiregulin. Obwohl schon die Abwesenheit des EGF-Rezeptors zu einer drastischen Reduktion des Phosphorylierungslevels von TrkB im embryonalen Vorderhirn bei E12,5 führt, wäre es wichtig, auch die Auswirkungen eines Fehlens sowohl von BDNF als auch von NT-3 auf die TrkB-Aktivität zu zeigen. Da es Hinweise gibt, dass TrkB zusammen mit TrkC in überlappender Art und Weise während der Kortextentwicklung von Bedeutung sein könnten, wären entsprechende Versuche mit BDNF/NT-3-Doppelmutanten auch im Hinblick auf einen möglichen kortikalen Phänotyp hochinteressant.

Des Weiteren bietet der bislang erhaltene Einblick in die mechanistischen Aspekte der TrkB-Transaktivierung einen reizvollen Einstieg in die genauere Aufklärung der konkreten Zusammenhänge. In welchen zellulären Kompartimenten geschieht die Interaktion? Wie genau entscheidet Art und Ausmaß der Rezeptor-Glykosylierung über dessen Lokalisation innerhalb der Zelle? Welche Moleküle sind an der Integration der Signalwege beteiligt? In diesem Zusammenhang ist die Technik der Lebend-Zell-Bildgebung ein Mittel der Wahl. Die dynamische Verteilung von TrkB abhängig von bestimmten Signalen beispielsweise ließe sich hervorragend mit Hilfe der Überexpression geeigneter Fluoreszenz-getaggtter TrkB-Konstrukte beobachten. Die gezielte Mutation konservierter Glykosylierungsstellen des Rezeptors könnte außerdem Aufschluss über die Anforderungen der Protein-Sortierungs-Maschinerie der Zelle geben. In Bezug auf weitere an den Signalwegen teilnehmende Moleküle wären Interaktionsstudien hilfreich. Speziell die Aufklärung von Interaktionen, die erst durch Transaktivierungsereignisse induziert werden, könnten fehlende Mediatoren aufdecken.

Zuletzt sollte außerdem nicht außer Acht gelassen werden, dass untereinander verschaltete Signalwege der hier beschriebenen Art ein generelles Prinzip von zellulärer Signalintegration darstellen dürften. Das Ablaufen komplexer biologischer Programme besäße so eine Art von zusätzlicher Kontrolle, die durch sich gegenseitig bedingende Signalkomponenten auf einer weiteren Ebene vor Fehlfunktionen schützen könnte.





5 Literaturverzeichnis

1. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Rev Neurosci* 2:287-293.
2. Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.
3. Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
4. Ang ES, Jr., Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23:5805-5815.
5. Angevine JB, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.
6. Arevalo J (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20:5908-5916.
7. Arevalo J (2001) A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20:1229-1234.
8. Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (2004) A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J* 23:2358-2368.
9. Arevalo JC, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2006) Cell Survival through Trk Neurotrophin Receptors Is Differentially Regulated by Ubiquitination. *Neuron* 50:549-559.
10. Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265-277.
11. Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128:29-43.
12. Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403.
13. Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.
14. Barde YA (1990) The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 2:237-248.
15. Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549-553.
16. Barnabe-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149-5160.



17. Bartkowska K, Paquin A, Gauthier AS, Kaplan DR, Miller FD (2007) Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development* 134:4369-4380.
18. Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS (2008) Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci* 28:2383-2393.
19. Bayer SA, Altman J (1991) *Neocortical Development*. Raven, New York, USA.
20. Beattie M (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36:375-386.
21. Bedard A, Parent A (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 151:159-168.
22. Behar TN (1997) Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 9:2561-2570.
23. Bentley CA, Lee KF (2000) p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci* 20:7706-7715.
24. Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Götz M, Canossa M (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15570-15575.
25. Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* 99:691-709.
26. Bibel M, Hoppe E, Barde Y (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 18:616-622.
27. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
28. Book KJ, Morest DK (1990) Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J Comp Neurol* 297:55-76.
29. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
30. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
31. Burrows RC, Wancio D, Levitt P, Lillien L (1997) Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron* 19:251-267.
32. Cameron HA, Hazel TG, McKay RD (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36:287-306.



33. Campbell K, Götz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25:235-238.
34. Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.
35. Caric D, Raphael H, Viti J, Feathers A, Wancio D, Lillien L (2001) EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* 128:4203-4216.
36. Carpenter G (2003) ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 284:66-77.
37. Carpenter G, Cohen S (1979) Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48:193-216.
38. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383:716-719.
39. Caviness VS, Rakic P (1978) Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1:297-326.
40. Caviness VS, SO DK, Sidman RL (1972) The Hybrid Reeler Mouse. *J Hered* 63:241-246.
41. Caviness VS, Takahashi T (1995) Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17:159-163.
42. Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
43. Chen G, Sima J, Jin M, Wang KY, Xue XJ, Zheng W, Ding YQ, Yuan XB (2008) Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat Neurosci* 11:36-44.
44. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314:140-143.
45. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Developmental Biology* 258:319-333.
46. Chenn A, McConnell SK (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-641.
47. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
48. Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284:54-65.
49. Clary DO, Reichardt LF (1994) An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11133-11137.
50. Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.



51. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der KD (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
52. Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL, Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF, . (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14:1201-1211.
53. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein coupled receptors. *Nature* 379:557-560.
54. De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
55. Dechant G (1993) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* 119:545-558.
56. Dechant G, Barde YA (1997) Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 7:413-418.
57. Dechant G, Barde Y-A (2002) The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neurosci* 5:1131-1136.
58. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999a) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
59. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999b) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11619-11624.
60. Du J (2003) Regulation of TrkB receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and Ca²⁺ influx. *J Cell Biol* 163:385-395.
61. Du J, Feng L, Yang F, Lu B (2000) Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 150:1423-1434.
62. Egan M (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.
63. Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996) Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16:3123-3129.
64. Englund C (2005) Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25:247-251.
65. Esposito D (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and TrkA receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 276:32687-32695.
66. Farinas I, Wilkinson GA, Backus C, Reichardt LF, Patapoutian A (1998) Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron* 21:325-334.



67. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 31:1203-1208.
68. Fishell G, Kriegstein AR (2003) Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* 13:34-41.
69. Frade JM, Barde YA (1998) Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 20:137-145.
70. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168.
71. Frotscher M (1997) Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell and Tissue Research* 290:315-322.
72. Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500:419-432.
73. Gartner A, Polnau DG, Staiger V, Sciarretta C, Minichiello L, Thoenen H, Bonhoeffer T, Korte M (2006) Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J Neurosci* 26:3496-3504.
74. Gates MA, Tai CC, Macklis JD (2000) Neocortical neurons lacking the protein-tyrosine kinase B receptor display abnormal differentiation and process elongation in vitro and in vivo. *Neuroscience* 98:437-447.
75. Geetha T, Jiang J, Wooten MW (2005) Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20:301-312.
76. Goffinet A (2006) What makes us human? A biased view from the perspective of comparative embryology and mouse genetics. *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration* 1:16.
77. Götz M (2003) Glial cells generate neurons [mdash] master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist* 9:379-397.
78. Götz M, Hartfuss E, Malatesta P (2002) Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* 57:777-788.
79. Götz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.
80. Götz R, Wiese S, Takayama S, Camarero GC, Rossoll W, Schweizer U, Troppmair J, Jablonka S, Holtmann B, Reed JC, Rapp UR, Sendtner M (2005) Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells. *Nat Neurosci* 8:1169-1178.
81. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655.
82. Grove EA, Williams BP, Li D-Q, Hajihosseini M, Friedrich A, Price J (1993) Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* 117:553-561.



83. Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3:342-355.
84. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, III (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136.
85. Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M (2004) Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci* 25:664-678.
86. Hallbook F (1999) Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* 9:616-621.
87. Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (1999) p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14:28-40.
88. Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689.
89. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6226-6230.
90. Harrison SM, Jones ME, Uecker S, Albers KM, Kudrycki KE, Davis BM (2000) Levels of nerve growth factor and neurotrophin-3 are affected differentially by the presence of p75 in sympathetic neurons in vivo. *J Comp Neurol* 424:99-110.
91. Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
92. Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3196-3201.
93. He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.
94. Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlen DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12419-12424.
95. Huang E, Reichardt L (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
96. Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
97. Huang EJ, Wilkinson GA, Farinas I, Backus C, Zang K, Wong SL, Reichardt LF (1999) Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development* 126:2191-2203.



98. Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO (2008) Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57:546-558.
99. Huttner WB, Brand M (1997) Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* 7:29-39.
100. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A (2001) The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 8:151-159.
101. Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354.
102. Ibanez CF (1998) Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 21:438-444.
103. Iwakura Y, Nawa H, Sora I, Chao MV (2008) Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *J Biol Chem* 283(23):15799-806
104. Jablonka S, Wiese S, Sendtner M (2004) Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* 58:272-286.
105. Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV (2008) Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4862-4867.
106. Jimenez D, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F (2002) Further studies on cortical tangential migration in wild type and Pax-6 mutant mice. *J Neurocytol* 31:719-728.
107. Johansson CB (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
108. Jones KR, Farinas I, Backus C, Reichardt LF (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 76:989-999.
109. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276:18169-18177.
110. Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.
111. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4995-5000.
112. Klein M, Hempstead BL, Teng KK (2005) Activation of STAT5-dependent transcription by the neurotrophin receptor Trk. *J Neurobiol* 63:159-171.
113. Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M (1993) Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75:113-122.



114. Knoll B, Weini C, Nordheim A, Bonhoeffer F (2007) Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat Protoc* 2:1216-1224.
115. Knusel B, Rabin SJ, Hefti F, Kaplan DR (1994) Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J Neurosci* 14:1542-1554.
116. Kornblum HI, Hussain R, Wiesen J, Miettinen P, Zurcher SD, Chow K, Derynck R, Werb Z (1998) Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci Res* 53:697-717.
117. Kornblum HI, Hussain RJ, Bronstein JM, Gall CM, Lee DC, Seroogy KB (1997) Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. *J Comp Neurol* 380:243-261.
118. Kornblum HI, Yanni DS, Easterday MC, Seroogy KB (2000) Expression of the EGF receptor family members ErbB2, ErbB3, and ErbB4 in germinal zones of the developing brain and in neurosphere cultures containing CNS stem cells. *Dev Neurosci* 22:16-24.
119. Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13:2739-2748.
120. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8856-8860.
121. Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V (2006) Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Rev Neurosci* 7:883-890.
122. Kriegstein AR, Götz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43.
123. Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27:392-399.
124. Kuo G, Arnaud L, Kronstad-O'Brien P, Cooper JA (2005) Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J Neurosci* 25:8578-8586.
125. Kyhse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-209.
126. Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2001) Neuronal migration. *Mech Dev* 105:47-56.
127. Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881-7888.
128. Lee F, Chao M (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3555-3560.
129. Lee FS, Ragagopal R, Kim AH, Chang P, Chao MV (2002a) Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J Biol Chem* 277:9096-9102.



130. Lee FS, Rajagopal R, Chao MV (2002b) Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:11-17.
131. Lee R, Kermani P, Teng K, Hempstead B (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
132. Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
133. Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59:399-412.
134. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16:4999-5005.
135. Luttrell L, Daaka Y, Lefkowitz R (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:177-183.
136. Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140(trk) binding [mdash] implications for multisubunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 269:6884-6891.
137. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: Parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5:501-509.
138. Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA (2005) p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 6:936-941.
139. Malatesta P (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
140. Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.
141. Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
142. Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Rev Neurosci* 2:780-790.
143. Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293:872-875.
144. Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64-71.
145. Martin MG, Trovo L, Perga S, Sadowska A, Rasola A, Chiara F, Dotti CG (2009) Cyp46-mediated cholesterol loss promotes survival in stressed hippocampal neurons. *Neurobiol Aging*. Article in Press, Corrected Proof doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.022
146. Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13:1-6.



147. McConnell SK (1995) Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15:761-768.
148. McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991) New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354:411-414.
149. Meakin SO, Suter U, Drinkwater CC, Welcher AA, Shooter EM (1992) The rat *trk* protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2374-2378.
150. Medina DL, Sciarretta C, Calella AM, Von Bohlen und Halbach O, Unsicker K, Minichiello L (2004) *TrkB* regulates neocortex formation through the *Shc/PLCγ*-mediated control of neuronal migration. *EMBO J* 23:3803-3814.
151. Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit *TrkB* to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
152. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341.
153. Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of *TrkB*-Mediated Hippocampal Long-Term Potentiation. *Neuron* 36:121-137.
154. Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999) Essential Role for *TrkB* Receptors in Hippocampus-Mediated Learning. *Neuron* 24:401-414.
155. Miyata T (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131:3133-3145.
156. Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
157. Morris NR, Efimov VP, Xiang X (1998) Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* 8:467-470.
158. Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nature Neurosci* 5:218-224.
159. Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150.
160. Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.
161. Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 20:2180-2190.



162. Nieto M (2004) Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 479:168-180.
163. Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279:560-563.
164. Noctor SC (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.
165. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.
166. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neurosci* 7:136-144.
167. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427:843-848.
168. Opanashuk LA, Mark RJ, Porter J, Damm D, Mattson MP, Seroogy KB (1999) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in hippocampus: modulation of expression by seizures and anti-excitotoxic action. *J Neurosci* 19:133-146.
169. Parnavelas JG (2002) The origin of cortical neurons. *Braz J Med Biol Res* 35:1423-1429.
170. Pereira DB, Chao MV (2007) The Tyrosine Kinase Fyn Determines the Localization of TrkB Receptors in Lipid Rafts. *J Neurosci* 27:4859-4869.
171. Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573.
172. Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147-3160.
173. Poo M-M (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Rev Neurosci* 2:24-31.
174. Potter BA, Hughey RP, Weisz OA (2006) Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1-C10.
175. Rajagopal R, Chao MV (2006) A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 33:36-46.
176. Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2004) Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes. *J Neurosci* 24:6650-6658.
177. Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
178. Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18:383-388.



179. Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E (2007) Pharmacologically Diverse Antidepressants Rapidly Activate Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptor TrkB and Induce Phospholipase-C[gamma] Signaling Pathways in Mouse Brain. *Neuropsychopharmacology* 32(10):2152-62
180. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
181. Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13.
182. Riese DJ, Stern DF (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20:41-48.
183. Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487-492.
184. Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B (1999) Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina. *J Neurosci* 19:8919-8930.
185. Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426:74-78.
186. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
187. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.
188. Sanai N (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.
189. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
190. Schlessinger J (2002) Ligand-Induced, Receptor-Mediated Dimerization and Activation of EGF Receptor. *Cell* 110:669-672.
191. Schober A (1998) TrkB and neurotrophin-4 are important for development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons innervating the adrenal medulla. *J Neurosci* 18:7272-7284.
192. Schropel A, von Schack D, Dechant G, Barde Y-A (1995) Early expression of the nerve growth factor receptor *ctrkA* in chick sympathetic and sensory ganglia. *Mol Cell Neurosci* 6:544-556.
193. Sen S (2003) A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology* 28:397-401.
194. Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD (1995) Human *trks*: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15:477-491.



195. Sibilina M, Steinbach J, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF (1998) A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 17:719-731.
196. Sibilina M, Wagner EF (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269:234-238.
197. Smart IH (1973) Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* 116:67-91.
198. Smart IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12:37-53.
199. Smart IH, McSherry GM (1982) Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J Anat* 134:415-442.
200. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217-1281.
201. Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL (2000) ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148:385-397.
202. Stein PL, Vogel H, Soriano P (1994) Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* 8:1999-2007.
203. Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde YA, Dechant G (1996) A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 15:3332-3337.
204. Sun Y, Goderie SK, Temple S (2005) Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* 45:873-886.
205. Tamamaki N, Fujimori K, Nojyo Y, Kaneko T, Takauji R (2003) Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 455:238-248.
206. Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313-8323.
207. Tanaka D, Nakaya Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130:5803-5813.
208. Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
209. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25:5455-5463.



210. The Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat Rec* 166:257-261.
211. Thoenen H, Barde YA (1980) Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev* 60:1284-1335.
212. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, . (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269:230-234.
213. Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nature Rev Neurosci* 4:496-505.
214. Toledo-Aral J, Brehm P, Halegoua S, Mandel G (1995) A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction. *Neuron* 14:607-611.
215. Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P (1992) Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* 288:351-355.
216. Tucker MS, Eves EM, Wainer BH, Rosner MR (1993a) Activation of mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor in hippocampal neurons and neuronal cell lines. *J Neurochem* 61:1376-1387.
217. Tucker MS, Khan I, Fuchs-Young R, Price S, Steininger TL, Greene G, Wainer BH, Rosner MR (1993b) Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptor in neonatal and adult rat hippocampus. *Brain Res* 631:65-71.
218. Turner BA, Sparrow J, Cai B, Monroe J, Mikawa T, Hempstead BL (2006) TrkB/BDNF signaling regulates photoreceptor progenitor cell fate decisions. *Developmental Biology* 299:455-465.
219. Vagin O, Kraut JA, Sachs G (2009) Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:459-469.
220. Vielmetter J, Stolze B, Bonhoeffer F, Stuermer CA (1990) In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp Brain Res* 81:283-287.
221. Visel A, Carson J, Oldekamp J, Warnecke M, Jakubcakova V, Zhou X, Shaw CA, Alvarez-Bolado G, Eichele G (2007) Regulatory Pathway Analysis by High-Throughput In Situ Hybridization. *PLoS Genet* 3(10):1867-83.
222. Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
223. Wiese S, Jablonka S, Holtmann B, Orel N, Rajagopal R, Chao MV, Sendtner M (2007) Adenosine receptor A2A-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB. *PNAS* 104:17210-17215.
224. Williams BP, Price J (1995) Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14:1181-1188.



225. Wixler V, Smola U, Schuler M, Rapp U (1996) Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett* 385:131-137.
226. Wong RW (2003) Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. *Cell Mol Life Sci* 60:113-118.
227. Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H (1997) The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 51:19-37.
228. Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S (2005) Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int* 80:37-41.
229. Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S3-S8.
230. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
231. Yau HJ, Wang HF, Lai C, Liu FC (2003) Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13:252-264.
232. York RD (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392:622-626.
233. Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38-45.
234. Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ (1997) Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9562-9567.
235. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117:2051-2058.
236. Zhao L, Sheng AL, Huang SH, Yin YX, Chen B, Li XZ, Zhang Y, Chen ZY (2009) Mechanism underlying activity-dependent insertion of TrkB into the neuronal surface. *J Cell Sci* 122:3123-3136.
237. Zhu Y, Li H, Zhou L, Wu JY, Rao Y (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23:473-485.
238. Zimmer C, Tiveron MC, Bodmer R, Cremer H (2004) Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14:1408-1420.





6 Anhang

6.1 Sequenzen und Plasmidkarten

Dominant negatives cSRC:

DNA-Sequenzen:

>dnSRC-Sequenzierung

```
ATGGGCAGCAACAAGAGCAAGCCCAAGGACGCCAGCCAGCGGGCGCCGAGCCTGGAGCCCTCGGAAAACGTGCAC
GGGGCAGGGGGCGCCTTCCCGGCCCTCACAGACACCGAGCAAGCCCGCCTCCGCCGACGGCCACCGGGGCCCAGC
GCCGCCTTCGTGCCGCCCCGCGGCCGAGCCCAAGCTCTTCGGAGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCACCTCCCCG
CAGAGGGCGGGGCTCTGGCAGGTGGGGTGACCACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGTCACGGACAGAGACT
GACCTGTCCTTCAAGAAAGGGGAGCGGCTGCAGATTGTCAATAACACGGAGGGGAGACTGGTGGCTGGCACACTCG
CTGAGCACGGGACAGACCGGTTACATCCCCAGCAACTATGTGGCGCCCTCCGACTCCATCCAGGCTGAGGAGTGG
TACTTTGGCAAGATCACTAGACGGGAATCAGAGCGGCTGCTGCTCAACGCCGAGAACCCGAGAGGGACCTTCCTC
GTGAGGGGAGAGTGAGACCACAAAAGGTGCCTACTGCCTCTCTGTATCCGACTTCGACAATGCCAAGGGCCTAAAT
GTGAAACACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGCGGTTTCTACATCACCTCCCGCACCCAGTTCAACAGCCTG
CAGCAGCTCGTGGCTTACTACTCCAAACATGCTGATGGCCTGTGTACCCGCTCACTACCGTATGTCCCACATCC
AAGCCTCAGACCCAGGGATTGGCCAAGGATGCGTGGGAGATCCCCCGGGAGTCCCTGCGGCTGGAGGTCAAGCTG
GGCCAGGGTTGCTTCGGAGAGGTGTGGATGGGGACCTGGAACGGCACCACGAGGGTTGCCATCAGGACTCTGAAG
CCAGGCACCATGTCCCCAGAGGCCTTCTGCAGGAGGCCCAAGTCATGAAGAAAAGTGGAGCACGAGAAAAGTGGTG
CAGCTGTATGCTGTGGTGTGCGGAAGAACCATTACATTGTGACAGAGTACATGAACAAGGGGAGTCTGCTGGAC
TTTCTCAAGGGGGAAACGGGGCAAATATTTGCGGCTACCCCAGCTGGTGGACATGTCTGCTCAGATCGCTTCAGGC
ATGGCCTATGTGGAGCGGATGAACTATGTGCACCGGGACCTTCGAGCCGCCAATATCCTAGTAGGGGGAGAACCCTG
GTGTGCAAAGTGGCCGACTTTGGGTTGGCCCGGCTCATAGAAGACAACGAATACACAGCCCGCAAGGTGCCAAA
TTCCCCATCAAGTGGACCGCCCTTGAAGCTGCTCTGTACGGCAGGTTACCATCAAGTCGGATGTGTGGTCCCTTT
GGATTCTGCTGACCGAGCTCACCCTAAGGGAAGAGTGCCTATCCTGGGATGGTGAACCGTGAGGTTCTGGAC
CAGGTGGAGCGGGGCTACCGGATGCCTTGTCCCCCGAGTGCCCCGAGTCCCTGCATGACCTTATGTGCCAGTGC
TGGCGGAAGGAGCCCGAGGAGCGGCCACCTTCGAGTACCTGCAGGCCTTCTTGGAAAGACTACTTTACGTCCACT
GAGCCACAGTTCCAGCCCCGGGGAGAACCTATAC
```

>NM_001025395_cSRC

```
ATGGGCAGCAACAAGAGCAAGCCCAAGGACGCCAGCCAGCGGGCGCCGAGCCTGGAGCCCTCGGAAAACGTGCAC
GGGGCAGGGGGCGCCTTCCCGGCCCTCACAGACACCGAGCAAGCCCGCCTCCGCCGACGGCCACCGGGGCCCAGC
GCCGCCTTCGTGCCGCCCCGCGGCCGAGCCCAAGCTCTTCGGAGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCACCTCCCCG
CAGAGGGCGGGGCTCTGGCAGGTGGGGTGACCACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGTCACGGACAGAGACT
GACCTGTCCTTCAAGAAAGGGGAGCGGCTGCAGATTGTCAATAACACAGAGGGGAGACTGGTGGCTGGCACACTCG
CTGAGCACGGGACAGACCGGTTACATCCCCAGCAACTATGTGGCGCCCTCCGACTCCATCCAGGCTGAGGAGTGG
TACTTTGGCAAGATCACTAGACGGGAATCAGAGCGGCTGCTGCTCAACGCCGAGAACCCGAGAGGGACCTTCCTC
GTGAGGGGAGAGTGAGACCACAAAAGGTGCCTACTGCCTCTCTGTATCCGACTTCGACAATGCCAAGGGCCTAAAT
GTGAAACACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGCGGTTTCTACATCACCTCCCGCACCCAGTTCAACAGCCTG
CAGCAGCTCGTGGCTTACTACTCCAAACATGCTGATGGCCTGTGTACCCGCTCACTACCGTATGTCCCACATCC
AAGCCTCAGACCCAGGGATTGGCCAAGGATGCGTGGGAGATCCCCCGGGAGTCCCTGCGGCTGGAGGTCAAGCTG
GGCCAGGGTTGCTTCGGAGAGGTGTGGATGGGGACCTGGAACGGCACCACGAGGGTTGCCATCAAAACTCTGAAG
CCAGGCACCATGTCCCCAGAGGCCTTCTGCAGGAGGCCCAAGTCATGAAGAAAAGTGGAGCACGAGAAAAGTGGTG
CAGCTGTATGCTGTGGTGTGCGGAAGAACCATTACATTGTGACAGAGTACATGAACAAGGGGAGTCTGCTGGAC
TTTCTCAAGGGGGAAACGGGGCAAATATTTGCGGCTACCCCAGCTGGTGGACATGTCTGCTCAGATCGCTTCAGGC
ATGGCCTATGTGGAGCGGATGAACTATGTGCACCGGGACCTTCGAGCCGCCAATATCCTAGTAGGGGGAGAACCCTG
GTGTGCAAAGTGGCCGACTTTGGGTTGGCCCGGCTCATAGAAGACAACGAATACACAGCCCGCAAGGTGCCAAA
TTCCCCATCAAGTGGACCGCCCTTGAAGCTGCTCTGTACGGCAGGTTACCATCAAGTCGGATGTGTGGTCCCTTT
GGGATTCTGCTGACCGAGCTCACCCTAAGGGAAGAGTGCCTATCCTGGGATGGTGAACCGTGAGGTTCTGGAC
CAGGTGGAGCGGGGCTACCGGATGCCTTGTCCCCCGAGTGCCCCGAGTCCCTGCATGACCTTATGTGCCAGTGC
TGGCGGAAGGAGCCCGAGGAGCGGCCACCTTCGAGTACCTGCAGGCCTTCTTGGAAAGACTACTTTACGTCCACT
GAGCCACAGTACCAGCCCCGGGGAGAACCTATAG
```



DNA-Sequenzvergleich:

```

dnSRC-TOPO-Klon      ATGGGCAGCAACAAGAGCAAGCCCAAGGACGCCAGCCAGCCAGCGGGCCGCGCCTGGAGCCC 60
NM_001025395        ATGGGCAGCAACAAGAGCAAGCCCAAGGACGCCAGCCAGCCAGCGGGCCGCGCCTGGAGCCC 60
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TCGGAAAACGTGCACGGGGCAGGGGGCGCCTTCCCAGCCTCACAGACACCGAGCAAGCCC 120
NM_001025395        TCGGAAAACGTGCACGGGGCAGGGGGCGCCTTCCCAGCCTCACAGACACCGAGCAAGCCC 120
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GCCTCCGCCGACGGCCACCGGGGCCAGCGCCGCCTTCGTGCCGCCCGCGGCCGAGCCC 180
NM_001025395        GCCTCCGCCGACGGCCACCGGGGCCAGCGCCGCCTTCGTGCCGCCCGCGGCCGAGCCC 180
*****

dnSRC-TOPO-Klon      AAGCTCTTCGGAGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCACCTCCCCGAGAGGGCGGGGCCT 240
NM_001025395        AAGCTCTTCGGAGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCACCTCCCCGAGAGGGCGGGGCCT 240
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CTGGCAGGTGGGGTGACCACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGTCACGGACAGAGACT 300
NM_001025395        CTGGCAGGTGGGGTGACCACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGTCACGGACAGAGACT 300
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GACCTGTCTTCAAGAAAGGGGAGCGGCTGCAGATTGTCAATAACACGGAGGGAGACTGG 360
NM_001025395        GACCTGTCTTCAAGAAAGGGGAGCGGCTGCAGATTGTCAATAACACGGAGGGAGACTGG 360
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TGGCTGGCACACTCGCTGAGCACGGGACAGACCGGTTACATCCCCAGCAACTATGTGGCG 420
NM_001025395        TGGCTGGCACACTCGCTGAGCACGGGACAGACCGGTTACATCCCCAGCAACTATGTGGCG 420
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CCTCCGACTCCATCCAGGCTGAGGAGTGGTACTTTGGCAAGATCACTAGACGGGAATCA 480
NM_001025395        CCTCCGACTCCATCCAGGCTGAGGAGTGGTACTTTGGCAAGATCACTAGACGGGAATCA 480
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GAGCGGCTGCTGCTCAACGCCGAGAACCAGAGGGACCTTCCTCGTGAGGGAGAGTGAG 540
NM_001025395        GAGCGGCTGCTGCTCAACGCCGAGAACCAGAGGGACCTTCCTCGTGAGGGAGAGTGAG 540
*****

dnSRC-TOPO-Klon      ACCACAAAAGGTGCCTACTGCCTCTCTGTATCCGACTTCGACAATGCCAAGGGCCTAAAT 600
NM_001025395        ACCACAAAAGGTGCCTACTGCCTCTCTGTATCCGACTTCGACAATGCCAAGGGCCTAAAT 600
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GTGAAACACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCGTTTCTACATCACCTCCCGCACC 660
NM_001025395        GTGAAACACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCGTTTCTACATCACCTCCCGCACC 660
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CAGTTCAACAGCCTGCAGCAGCTCGTGGCTTACTACTCCAAACATGCTGATGGCCTGTGT 720
NM_001025395        CAGTTCAACAGCCTGCAGCAGCTCGTGGCTTACTACTCCAAACATGCTGATGGCCTGTGT 720
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CACCGCCTCACTACCGTATGTCCACATCCAAGCCTCAGACCCAGGGATTGGCCAAGGAT 780
NM_001025395        CACCGCCTCACTACCGTATGTCCACATCCAAGCCTCAGACCCAGGGATTGGCCAAGGAT 780
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GCGTGGGAGATCCCCGGGAGTCCCTGCGGCTGGAGGTCAAGCTGGGCCAGGGTTGCTTC 840
NM_001025395        GCGTGGGAGATCCCCGGGAGTCCCTGCGGCTGGAGGTCAAGCTGGGCCAGGGTTGCTTC 840
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GGAGAGGTGTGGATGGGGACCTGGAACGGCACCACGAGGGTTGCCATCAGGACTCTGAAG 900
NM_001025395        GGAGAGGTGTGGATGGGGACCTGGAACGGCACCACGAGGGTTGCCATCAGGACTCTGAAG 900
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CCAGGCACCATGTCCCCAGAGGCTTCTGCAGGAGGCCAAGTCATGAAGAACTGAGG 960
NM_001025395        CCAGGCACCATGTCCCCAGAGGCTTCTGCAGGAGGCCAAGTCATGAAGAACTGAGG 960
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGCTGTGGTGTGCGAAGAACCATTACATTGTGACA 1020
NM_001025395        CACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGCTGTGGTGTGCGAAGAACCATTACATTGTGACA 1020
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GAGTACATGAACAAGGGGAGTCTGCTGGACTTTCTCAAGGGGAAACGGGCAAATATTTG 1080
NM_001025395        GAGTACATGAACAAGGGGAGTCTGCTGGACTTTCTCAAGGGGAAACGGGCAAATATTTG 1080
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CGGCTACCCAGCTGGTGGACATGTCTGCTCAGATCGCTTCAGGCATGGCCTATGTGGAG 1140
NM_001025395        CGGCTACCCAGCTGGTGGACATGTCTGCTCAGATCGCTTCAGGCATGGCCTATGTGGAG 1140
*****

```



```

dnSRC-TOPO-Klon      CGGATGAACTATGTGCACCGGGACCTTCGAGCCGCCAATATCCTAGTAGGGGAGAACCTG 1200
NM_001025395         CGGATGAACTATGTGCACCGGGACCTTCGAGCCGCCAATATCCTAGTAGGGGAGAACCTG 1200
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GTGTGCAAAGTGGCCGACTTTGGGTGGCCCGGCTCATAGAAGACAACGAATACACAGCC 1260
NM_001025395         GTGTGCAAAGTGGCCGACTTTGGGTGGCCCGGCTCATAGAAGACAACGAATACACAGCC 1260
*****

dnSRC-TOPO-Klon      CGGCAAGGTGCCAAATTCCTCATCAAGTGGACCGCCCTGAAGCTGCTCTGTACGGCAGG 1320
NM_001025395         CGGCAAGGTGCCAAATTCCTCATCAAGTGGACCGCCCTGAAGCTGCTCTGTACGGCAGG 1320
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TTCACCATCAAGTCGGATGTGTGGTCCCTTTGGGATTCTGCTGACCGAGCTCACCCTAAG 1380
NM_001025395         TTCACCATCAAGTCGGATGTGTGGTCCCTTTGGGATTCTGCTGACCGAGCTCACCCTAAG 1380
*****

dnSRC-TOPO-Klon      GGAAGAGTGCCTTATCCTGGGATGGTGAACCGTGAGGTTCTGGACCAGGTGGAGCGGGGC 1440
NM_001025395         GGAAGAGTGCCTTATCCTGGGATGGTGAACCGTGAGGTTCTGGACCAGGTGGAGCGGGGC 1440
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TACCGGATGCCTTGTCCCCCGAGTGCCCGAGTCCCTGCATGACCTTATGTGCCAGTGC 1500
NM_001025395         TACCGGATGCCTTGTCCCCCGAGTGCCCGAGTCCCTGCATGACCTTATGTGCCAGTGC 1500
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TGGCGGAAGGAGCCCGAGGAGCGGCCACCTTCGAGTACCTGCAGGCCTTCCTGGAAGAC 1560
NM_001025395         TGGCGGAAGGAGCCCGAGGAGCGGCCACCTTCGAGTACCTGCAGGCCTTCCTGGAAGAC 1560
*****

dnSRC-TOPO-Klon      TACTTTACGTCCACTGAGCCACAGTCCAGCCCGGGGAGAACCTATAC 1608
NM_001025395         TACTTTACGTCCACTGAGCCACAGTCCAGCCCGGGGAGAACCTATAC 1608
*****

```

N.B.: A348G ist stumme Mutation, Basentriplet codiert weiterhin Threonin

Protein-Sequenzen:

>dnSRC-Sequenzierung

```

MGSNKS PKDASQRRRSLEPSENVHGAGGAFPASQTPSKPASADGHRGPSAAFVPPAAEPKLFGGFNSSDVTVTS P
QRAGPLAGGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTGEGDWLWLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAE EW
YFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESEETTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSGGFYITSR TQFN SL
QQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQCFGEVWMTWNGTTRVAI R TLK
PGTMSPEAFLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKGETGKYLRLPQLVDM SAQ IASG
MAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFG LARLIEDNEYTARQGA KFP I KWTAPEAALYGRFT I KSDVWS F
GILLTELTTKGRVPYPGMVNREVL DQVERGYRMP CPPECPESLHDLMCQWRKEPEERPTFEYLQAFLEDYFTST
EPQFQPGENL

```

>NM_001025395

```

MGSNKS PKDASQRRRSLEPSENVHGAGGAFPASQTPSKPASADGHRGPSAAFVPPAAEPKLFGGFNSSDVTVTS P
QRAGPLAGGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTGEGDWLWLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAE EW
YFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESEETTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSGGFYITSR TQFN SL
QQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQCFGEVWMTWNGTTRVAI K TLK
PGTMSPEAFLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKGETGKYLRLPQLVDM SAQ IASG
MAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFG LARLIEDNEYTARQGA KFP I KWTAPEAALYGRFT I KSDVWS F
GILLTELTTKGRVPYPGMVNREVL DQVERGYRMP CPPECPESLHDLMCQWRKEPEERPTFEYLQAFLEDYFTST
EPQYQPGENL

```

Protein-Sequenzvergleich:

```

NM_001025395      MGSNKS PKDASQRRRSLEPSENVHGAGGAFPASQTPSKPASADGHRGPSAAFVPPAAEP 60
dnSRC-TOPO-Klon_1 MGSNKS PKDASQRRRSLEPSENVHGAGGAFPASQTPSKPASADGHRGPSAAFVPPAAEP 60
*****

NM_001025395      KLFGGFNSSDVTVTS PQRAGPLAGGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTGEGDW 120
dnSRC-TOPO-Klon_1 KLFGGFNSSDVTVTS PQRAGPLAGGVTTFVALYDYESRTETDLSFKKGERLQIVNNTGEGDW 120
*****

NM_001025395      WLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAE EWYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESE 180
dnSRC-TOPO-Klon_1 WLAHSLSTGQTGYIPSNYVAPSDSIQAE EWYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESE 180
*****

```



```

NM_001025395      TTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSGGFYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLC 240
dnSRC-TOPO-Klon_1 TTKGAYCLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDSSGGFYITSRTQFNSLQQLVAYYSKHADGLC 240
*****

NM_001025395      HRLTTVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFCGEVWMGTWNGTTRVAIKTLK 300
dnSRC-TOPO-Klon_1 HRLTTVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFCGEVWMGTWNGTTRVAIRTLK 300
*****

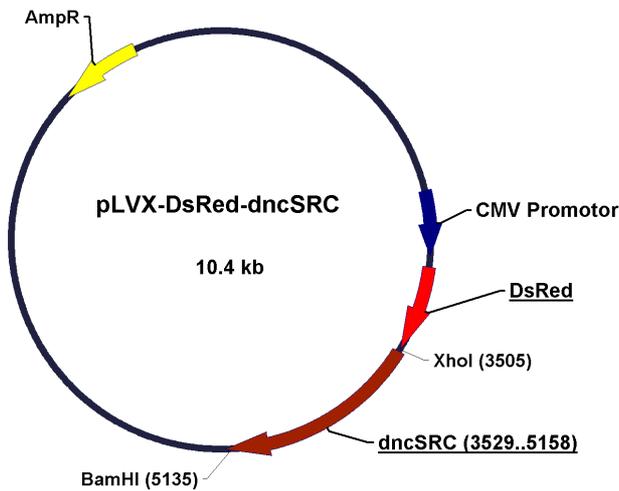
NM_001025395      PGTMSPEAFLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEPYIVTEYMNKGSLLDFLKGETGKYL 360
dnSRC-TOPO-Klon_1 PGTMSPEAFLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEPYIVTEYMNKGSLLDFLKGETGKYL 360
*****

NM_001025395      RLPQLVDMSAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFGLARLIEDNEYTA 420
dnSRC-TOPO-Klon_1 RLPQLVDMSAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFGLARLIEDNEYTA 420
*****

NM_001025395      RQGAKFPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVLQVERG 480
dnSRC-TOPO-Klon_1 RQGAKFPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVLQVERG 480
*****

NM_001025395      YRMPCPPECPESLHDLMCQWRKEPEERPTFEYLQAFLEDYFTSTEPQYQPGENL 535
dnSRC-TOPO-Klon_1 YRMPCPPECPESLHDLMCQWRKEPEERPTFEYLQAFLEDYFTSTEPQYQPGENL 536
*****
    
```

Konstrukt für lentivirale Überexpression von dncSRC



Dominant negatives FYN

DNA-Sequenzen:

>FYN_Sequenzierung

```

ATGGGCTGTGTGCAATGTAAGGATAAAGAAGCAACAAAACCTGACGGAGGAGAGGGACGGCAGCCTGAACCAGAGC
TCTGGGTACCGCTATGGCACAGACCCACCCCTCAGCACTACCCAGCTTCGGTGTGACCTCCATCCCCAACTAC
AACAACCTCCACGCAGCCGGGGCCAAGGACTCACCGTCTTTGGAGGTGTGAACTCTTCGTCTCATACGGGGACC
TTGCGTACGAGAGGAGGAACAGGAGTGACACTCTTTGTGGCCCTTTATGACTATGAAGCACGGACAGAAGATGAC
CTGAGTTTTACAAAGGAGAAAAATTTCAAATATTGAACAGCTCGGAAGGAGATTGGTGGGAAGCCCGCTCCTTG
ACGACTGGAGAGACAGGTTACATTTCCAGCAATTATGTGGCTCCAGTTGACTCTATCCAGGCAGAAGAGTGGTAC
TTTGAAAACCTTGGCCGAAAAGATGCTGAGCGACAGCTATTGTCCTTTGAAAACCAAGAGGTACCTTTCTTATC
CGCGAGAGTGAAACCACCAAAGGTGCCTATTTACTTTCTATCCGTGATTGGGATGATATGAAAGGAGACCATGTC
AAACATTATAAAATTCGCAAACCTTGACAATGGTGGATACTACATTACCACCCGGGCCAGTTTGAAACACTTCAG
CAGCTTGTACAACATTACTCAGAGAGAGCTGCAGGTCTCTGCTGCCGCCTAGTAGTTCCCTGTACAAAGGGATG
    
```



CCAAGGCTTACCGATCTGTCTGTCAAACCAAAGATGTCTGGGAAATCCCTCGAGAATCCCTGCAGTTGATCAAG
 AGACTGGGAAATGGGCAGTTTGGGGAAGTATGGATGGGTACCTGGAATGGAAACACAAAAGTAGCCATAATGACT
 CTTAAACCAGGCACAATGTCCCCGAATCATTCCTTGAGGAAGCGCAGATCATGAAGAAGCTGAAGCACGACAAG
 CTGGTCCAGCTCTATGCAGTGGTGTCTGAGGAGCCCATCTACATCGTCACCGAGTATATGAACAAAAGGAAGTTTA
 CTGGATTTCTTAAAAGATGGAGAAGGAAGAGCTCTGAAATTACCAAATCTTGTGGACATGGCAGCACAGGTGGCT
 GCAGGAATGGCTTACATCGAGCGCATGAATTATATCCATAGAGATCTGCGATCAGCAAAACATTTAGTGGGGAAAT
 GGACTCATATGCAAGATTGCTGACTTCGGATTGGCCCGATTGATAGAAGACAATGAGTACACAGCAAGACAAGGT
 GCAAAGTTCCCATCAAGTGGACGGCCCCCGAGGCAGCCCTGTACGGGAGGTTCACAATCAAGTCTGACGTGTGG
 TCTTTTGGAAATCTTACTCACAGAGCTGGTACCAAAGGAAGAGTGCATATCCAGGCATGAACAACCGGGAGGTG
 CTGGAGCAGGTGGAGCAGGCTACAGGATGCCCTGCCCGCAGGACTGCCCATCTCTCTGCATGAGCTCATGATC
 CACTGCTGAAAAAGGACCCTGAAGAACGCCCACTTTTGTAGTACTTGCAGAGCTTCTTGGAAAGACTACTTTACC
 GCGACAGAGCCCCAGTACCAACCTGGTGAAAACCTGTCA

>NM_002037_FYN

GCCGCGCTGGTGGCGGGCGGCGGCTCGTTGCAGTTGCGCCATCTGTGAGGAGCGGAGCCGGCGAGGAGGGGGCTGC
 CGCGGGCGAGGAGGAGGGGTGCGCCGCGAGCCGAAGGCCTTCGAGACCCGCCCGCCGGCGGCGAGAGTAGAG
 GCGAGGTTGTTGTGCGAGCGGCGGCTCTCTCCCGCCGGGCGCGCCGCGCTTCTCCAGCGCACCGAGGACCGC
 CCGGGCGCACACAAAGCCGCCGCCCGCGCCGACCGCCGGCGGCGCCGCCAGGGAGGGATTTCGGCCG
 CCGGGCCGGGGACACCCCGCGCCGCCCTCGGTGCTCTCGGAAGGCCACCGGCTCCCGGGCCCGCGGGGAC
 CCCCCGAGCCGCTCGGCCGCGCCGGAGGAGGGCGGGGAGAGGACCATGTGAGTGGGCTCCGGAGCCTCAGCGC
 CGCGCAGTTTTTTTTGAAGAAGCAGGATGCTGATCTAAACGTGAAAAAGACCAGTCCCTGCCTCTGTTGTAGAAGA
 CATGTGGTGTATATAAAGTTTGTGATCGTTGGCGGACATTTTGGAAATTTAGATAATGGGCTGTGTGCAATGTAAG
 GATAAAGAAGCAACAAAACACTGACGGAGGAGAGGGACGGCAGCCTGAACCAGAGCTCTGGGTACCGCTATGGCACA
 GACCCACCCCTCAGCACTACCCAGCTTCGGTGTGACCTCCATCCCCAACTACAACAACCTCCACGCAGCCGGG
 GGCAAGGACTCACCGTCTTTGGAGGTGTGAACTCTTCGTCTCATAACGGGACCTTGCCTACGAGAGGAGGAACA
 GGAGTGACACTCTTTGTGGCCCTTTATGACTATGAAGCAGGACAGAAAGATGACCTGAGTTTTACAAAAGGAGAA
 AAATTTCAAATATTGAACGCTCGGAAGGAGATTGGTGGGAAGCCCGCTCCTTGACAACCTGGAGAGCAGGTTAC
 ATTCCAGCAATTATGTGGCTCCAGTTGACTCTATCCAGGCAGAAGAGTGGTACTTTGGAAAACCTTGCCGAAAA
 GATGCTGAGCGACAGCTATTGTCCTTTGAAAACCAAGAGGTACCTTTCTTATCCGCGAGAGTGAAACCACCAA
 GGTGCCTATTCACTTTCTATCCGTGATTGGGATGATATGAAAGGAGACCATGTCAAACATTATAAAATTCGCAA
 CTTGACAATGGTGGATACTACATTACCACCCGGGCCAGTTTGAACACTTCAGCAGCTTGTACAACATTACTCA
 GAGAGAGCTGCAGGTCTCTGCTGCCGCTAGTAGTTCCTGTCAAAAGGATGCCAAGGCTTACCGATCTGTCT
 GTCAAAACCAAAGATGTCTGGGAAATCCCTCGAGAATCCCTGCAGTTGATCAAGAGACTGGGAAATGGCAGTTT
 GGGGAAGTATGGATGGGTACCTGGAATGGAAACACAAAAGTAGCCATAAAGACTCTTAAACCAGGCACAATGTCC
 CCCGAATCATTCTTGGAGGAAGCGCAGATCATGAAGAAGCTGAAGCACGACAAGCTGGTCCAGCTCTATGCAGTG
 GTGTCTGAGGAGCCCATCTACATCGTCACCGAGTATATGAACAAAGGAAGTTTACTGGATTTCTTAAAAGATGGA
 GAAGGAAGAGCTCTGAAATTACCAAATCTTGTGGACATGGCAGCACAGGTGGCTGCAGGAATGGCTTACATCGAG
 CGCATGAATTATATCCATAGAGATCTGCGATCAGCAAACATTTAGTGGGGAATGGACTCATATGCAAGATTGCT
 GACTTCGGATTGGCCCGATTGATAGAAGACAATGAGTACACAGCAAGACAAGGTGCAAAGTTCCCCATCAAGTGG
 ACGGCCCCGAGGCAGCCCTGTACGGGAGGTTCACAATCAAGTCTGACGTGTGGTCTTTTGGAACTTACTCACA
 GAGCTGGTACCAAAGGAAGAGTGCCATACCCAGGCATGAACAACCGGGAGGTGCTGGAGCAGGTGGAGCGAGGC
 TACAGGATGCCCTGCCCGCAGGACTGCCCATCTCTCTGCATGAGCTCATGATCCACTGCTGAAAAAGGACCCT
 GAAGAACGCCCACTTTTGTAGTACTTGCAGAGCTTCTTGGAAAGACTACTTTACCGCGACAGAGCCCCAGTACCAA
 CCTGGTGAACCTGTAAGGCCCGGGTCTGCGGAGAGAGCCCTTG

DNA-Sequenzvergleich:

NM_002037_FYN	AAGTTTGTGATCGTTGGCGGACATTTTGGAAATTTAGATAATGGGCTGTGTGCAATGTAAG	600
FYN_Seq	-----ATGGGCTGTGTGCAATGTAAG	21

NM_002037_FYN	GATAAAGAAGCAACAAAACACTGACGGAGGAGAGGGACGGCAGCCTGAACCAGAGCTCTGGG	660
FYN_Seq	GATAAAGAAGCAACAAAACACTGACGGAGGAGAGGGACGGCAGCCTGAACCAGAGCTCTGGG	81

NM_002037_FYN	TACCGCTATGGCACAGACCCACCCCTCAGCACTACCCAGCTTCGGTGTGACCTCCATC	720
FYN_Seq	TACCGCTATGGCACAGACCCACCCCTCAGCACTACCCAGCTTCGGTGTGACCTCCATC	141

NM_002037_FYN	CCCAACTACAACAACCTCCACGCAGCCGGGGCCAAAGACTCACCGTCTTTGGAGGTGTG	780
FYN_Seq	CCCAACTACAACAACCTCCACGCAGCCGGGGCCAAAGACTCACCGTCTTTGGAGGTGTG	201

NM_002037_FYN	AACTCTTCGTCTCATAACGGGACCTTGCCTACGAGAGGAGGAACAGGAGTACACTCTTT	840
FYN_Seq	AACTCTTCGTCTCATAACGGGACCTTGCCTACGAGAGGAGGAACAGGAGTACACTCTTT	261



NM_002037_FYN FYN_Seq	GTGGCCCTTTATGACTATGAAGCACGGACAGAAGATGACCTGAGTTTTCCAAAAGGAGAA GTGGCCCTTTATGACTATGAAGCACGGACAGAAGATGACCTGAGTTTTCCAAAAGGAGAA *****	900 321
NM_002037_FYN FYN_Seq	AAATTTCAAATATTTGAACAGCTCGGAAGGAGATTGGTGGGAAGCCCGCTCCTTGACAAC AAATTTCAAATATTTGAACAGCTCGGAAGGAGATTGGTGGGAAGCCCGCTCCTTGACGACT *****	960 381
NM_002037_FYN FYN_Seq	GGAGAGACAGGTTACATTCCCAGCAATTATGTGGCTCCAGTTGACTCTATCCAGGCAGAA GGAGAGACAGGTTACATTCCCAGCAATTATGTGGCTCCAGTTGACTCTATCCAGGCAGAA *****	1020 441
NM_002037_FYN FYN_Seq	GAGTGGTACTTTGGAAAACCTTGGCCGAAAAGATGCTGAGCGACAGCTATTGTCCTTTGGA GAGTGGTACTTTGGAAAACCTTGGCCGAAAAGATGCTGAGCGACAGCTATTGTCCTTTGGA *****	1080 501
NM_002037_FYN FYN_Seq	AACCCAAGAGGTACCTTTCTTATCCGCGAGAGTGAAACCACCAAAGGTGCCTATTCACCT AACCCAAGAGGTACCTTTCTTATCCGCGAGAGTGAAACCACCAAAGGTGCCTATTCACCT *****	1140 561
NM_002037_FYN FYN_Seq	TCTATCCGTGATTGGGATGATATGAAAGGAGACCATGTCAAACATTATAAAATTCGCAAA TCTATCCGTGATTGGGATGATATGAAAGGAGACCATGTCAAACATTATAAAATTCGCAAA *****	1200 621
NM_002037_FYN FYN_Seq	CTTGACAATGGTGGATACTACATTACCACCCGGGCCAGTTTGAACACTTCAGCAGCTT CTTGACAATGGTGGATACTACATTACCACCCGGGCCAGTTTGAACACTTCAGCAGCTT *****	1260 681
NM_002037_FYN FYN_Seq	GTACAACATTACTCAGAGAGAGCTGCAGGTCTCTGCTGCCGCCCTAGTAGTTCCTGTCC GTACAACATTACTCAGAGAGAGCTGCAGGTCTCTGCTGCCGCCCTAGTAGTTCCTGTCC *****	1320 741
NM_002037_FYN FYN_Seq	AAAGGGATGCCAAGGCTTACCAGTCTGTCTGTCAAACCAAAGATGTCTGGGAAATCCCT AAAGGGATGCCAAGGCTTACCAGTCTGTCTGTCAAACCAAAGATGTCTGGGAAATCCCT *****	1380 801
NM_002037_FYN FYN_Seq	CGAAGATCCCTGCAGTTGATCAAGAGACTGGGAAATGGGCAGTTTGGGGAAGTATGGATG CGAAGATCCCTGCAGTTGATCAAGAGACTGGGAAATGGGCAGTTTGGGGAAGTATGGATG *****	1440 861
NM_002037_FYN FYN_Seq	GGTACCTGGAATGGAAACACAAAAGTAGCCATAAAGACTCTTAAACCAGGCACAATGTCC GGTACCTGGAATGGAAACACAAAAGTAGCCATAAAGACTCTTAAACCAGGCACAATGTCC *****	1500 921
NM_002037_FYN FYN_Seq	CCCGAATCATTCTTGGAGGAGCGCAGATCATGAAGAAGCTGAAGCACGACAAGCTGGTC CCCGAATCATTCTTGGAGGAGCGCAGATCATGAAGAAGCTGAAGCACGACAAGCTGGTC *****	1560 981
NM_002037_FYN FYN_Seq	CAGCTCTATGCAGTGGTGTCTGAGGAGCCCATCTACATCGTCACCGAGTATATGAACAAA CAGCTCTATGCAGTGGTGTCTGAGGAGCCCATCTACATCGTCACCGAGTATATGAACAAA *****	1620 1041
NM_002037_FYN FYN_Seq	GGAAGTTTACTGGATTCTTAAAAGATGGAGAAGGAAGACTCTGAAATTACCAATCTT GGAAGTTTACTGGATTCTTAAAAGATGGAGAAGGAAGACTCTGAAATTACCAATCTT *****	1680 1101
NM_002037_FYN FYN_Seq	GTGGACATGGCAGCACAGGTGGCTGCAGGAATGGCTTACATCGAGCGCATGAATTATATC GTGGACATGGCAGCACAGGTGGCTGCAGGAATGGCTTACATCGAGCGCATGAATTATATC *****	1740 1161
NM_002037_FYN FYN_Seq	CATAGAGATCTGCGATCAGCAAACATTCTAGTGGGAATGGACTCATATGCAAGATTGCT CATAGAGATCTGCGATCAGCAAACATTCTAGTGGGAATGGACTCATATGCAAGATTGCT *****	1800 1221
NM_002037_FYN FYN_Seq	GACTTCGGATTGGCCCGATTGATAGAAGACAATGAGTACACAGCAAGACAGGTGCAAAG GACTTCGGATTGGCCCGATTGATAGAAGACAATGAGTACACAGCAAGACAGGTGCAAAG *****	1860 1281
NM_002037_FYN FYN_Seq	TTCCCCATCAAGTGGACGGCCCCGAGGCAGCCCTGTACGGGAGGTTTACAATCAAGTCT TTCCCCATCAAGTGGACGGCCCCGAGGCAGCCCTGTACGGGAGGTTTACAATCAAGTCT *****	1920 1341
NM_002037_FYN FYN_Seq	GACGTGTGGTCTTTTGGAACTTACTCACAGAGCTGGTCAACAAAGGAAGAGTGCCATAC GACGTGTGGTCTTTTGGAACTTACTCACAGAGCTGGTCAACAAAGGAAGAGTGCCATAC *****	1980 1401



```

NM_002037_FYN      CCAGGCATGAACAACCGGGAGGTGCTGGAGCAGGTGGAGCGAGGCTACAGGATGCCTGC 2040
FYN_Seq           CCAGGCATGAACAACCGGGAGGTGCTGGAGCAGGTGGAGCGAGGCTACAGGATGCCTGC 1461
*****

NM_002037_FYN      CCGCAGGACTGCCCCATCTCTCTGCATGAGCTCATGATCCACTGCTGGAAAAGGACCCT 2100
FYN_Seq           CCGCAGGACTGCCCCATCTCTCTGCATGAGCTCATGATCCACTGCTGGAAAAGGACCCT 1521
*****

NM_002037_FYN      GAAGAACGCCCCACTTTTGAGTACTTGCAGAGCTTCTGGAAGACTACTTTACCGCGACA 2160
FYN_Seq           GAAGAACGCCCCACTTTTGAGTACTTGCAGAGCTTCTGGAAGACTACTTTACCGCGACA 1581
*****

NM_002037_FYN      GAGCCCCAGTACCAACCTGGTGAAAACCTGTAAGCCCCGGTCTGCGGAGAGAGGCCTTG 2220
FYN_Seq           GAGCCCCAGTACCAACCTGGTGAAAACCTGTCA----- 1614
*****

```

Protein-Sequenzen:

```

>Fyn-Sequenzierung_1
MGCVQCKDKEATKLTEERDGLNQSSGYRYGTDPTPQHYPSPFGVTSIPNYNNFHAAGGQGLTVFGGVNSSSHTGT
LRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDDWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQAE EWY
FGKLGKDAERQLLSFGNPRGTFLIRESETTKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQ
QLVQHYSERAAAGLCCRLVVPCHKGMPRLTDL SVKTKDVWEIPRESLQLIKRLGNGQFGEVVMGTWNGNTKVAIMT
LKPGTMSPEFLEEAAQIMKKLKHDKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKDGEGRALKLPNLVDMAAQVA
AGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGNGLICKIADFG LARLIEDNEYTARQGA KFPKWTAPEAALYGRFTIKSDVW
SFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVERGYRMP CPQDCPISLHELMIHCWKKDPEERPTFEYLQSFLEDYFT
ATEPQYQPGENL

```

```

>NM_002037
MGCVQCKDKEATKLTEERDGLNQSSGYRYGTDPTPQHYPSPFGVTSIPNYNNFHAAGGQGLTVFGGVNSSSHTGT
LRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDDWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQAE EWY
FGKLGKDAERQLLSFGNPRGTFLIRESETTKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQ
QLVQHYSERAAAGLCCRLVVPCHKGMPRLTDL SVKTKDVWEIPRESLQLIKRLGNGQFGEVVMGTWNGNTKVAIKT
LKPGTMSPEFLEEAAQIMKKLKHDKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKDGEGRALKLPNLVDMAAQVA
AGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGNGLICKIADFG LARLIEDNEYTARQGA KFPKWTAPEAALYGRFTIKSDVW
SFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVERGYRMP CPQDCPISLHELMIHCWKKDPEERPTFEYLQSFLEDYFT
ATEPQYQPGENL

```

Protein-Sequenzvergleich:

```

NM_002037      MGCVQCKDKEATKLTEERDGLNQSSGYRYGTDPTPQHYPSPFGVTSIPNYNNFHAAGGQ 60
Fyn-Sequenzierung_1 MGCVQCKDKEATKLTEERDGLNQSSGYRYGTDPTPQHYPSPFGVTSIPNYNNFHAAGGQ 60
*****

NM_002037      LTVFGGVNSSSHTGTLRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDDW 120
Fyn-Sequenzierung_1 LTVFGGVNSSSHTGTLRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDDW 120
*****

NM_002037      EARS LTTGETGYIPSNYVAPVDSIQAE EWYFGKLGKDAERQLLSFGNPRGTFLIRESET 180
Fyn-Sequenzierung_1 EARS LTTGETGYIPSNYVAPVDSIQAE EWYFGKLGKDAERQLLSFGNPRGTFLIRESET 180
*****

NM_002037      TKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQQLVQHYSERAAAGLCC 240
Fyn-Sequenzierung_1 TKGAYSLIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQQLVQHYSERAAAGLCC 240
*****

NM_002037      RLVVPCHKGMPRLTDL SVKTKDVWEIPRESLQLIKRLGNGQFGEVVMGTWNGNTKVAIKT 300
Fyn-Sequenzierung_1 RLVVPCHKGMPRLTDL SVKTKDVWEIPRESLQLIKRLGNGQFGEVVMGTWNGNTKVAIMT 300
*****

NM_002037      LKPGTMSPEFLEEAAQIMKKLKHDKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKDGEGR 360
Fyn-Sequenzierung_1 LKPGTMSPEFLEEAAQIMKKLKHDKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMNKGSLLDFLKDGEGR 360
*****

NM_002037      ALKLPNLVDMAAQVAAGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGNGLICKIADFG LARLIEDNEY 420
Fyn-Sequenzierung_1 ALKLPNLVDMAAQVAAGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGNGLICKIADFG LARLIEDNEY 420
*****

NM_002037      TARQGA KFPKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVE 480
Fyn-Sequenzierung_1 TARQGA KFPKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVE 480
*****

```

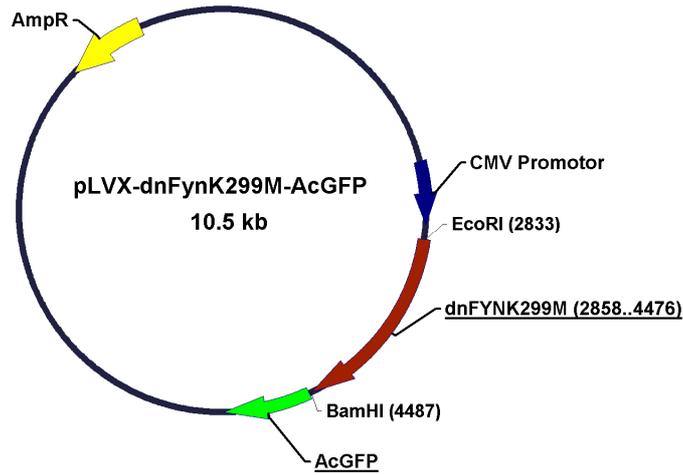


NM_002037
Fyn-Sequenzierung_1

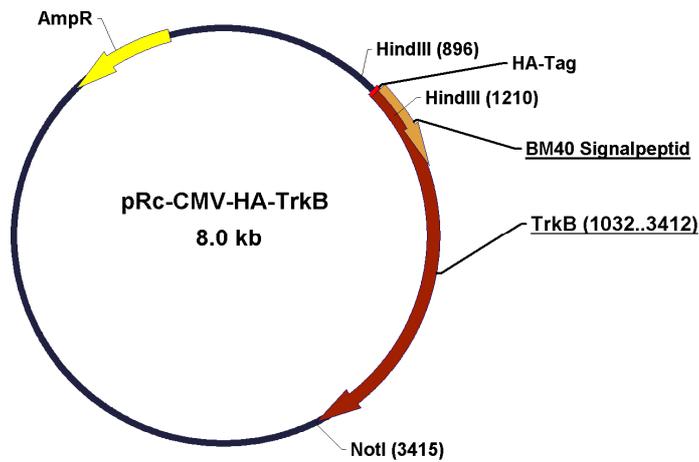
```

RGYRMPCPQDCPISLHELMHCWKKDPEERPTFEYLSFLEDYFTATEPQYQPGENL 537
RGYRMPCPQDCPISLHELMHCWKKDPEERPTFEYLSFLEDYFTATEPQYQPGENL 537
*****
    
```

Konstrukt für lentivirale Überexpression von dncSRC



Konstrukt für die Überexpression von HA-TrkB



6.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Die Wanderungsrichtungen von Nervenzellen während der Kortikogenese	2
Abbildung 1-2: Die Entstehung des zerebralen Kortex in der Maus	4
Abbildung 1-3: Stammbaum kortikaler Neurogenese	6
Abbildung 1-4: Zellteilungsvorgänge während der Neurogenese im embryonalen Kortex	8
Abbildung 1-5: Die Familie der Neurotrophinrezeptoren	13
Abbildung 1-6: Die Signaltransduktion der Neurotrophinrezeptoren	18
Abbildung 1-7: Die Familie der EGF-Rezeptoren und ihre Liganden	24
Abbildung 3-1: Die Expression von TrkB im Vorderhirn der Maus	73
Abbildung 3-2: Die Expression von TrkB im Vorderhirn der Maus am Embryonaltag 12,5	74
Abbildung 3-3: Analyse der zelltypspezifischen TrkB-Aktivierung	77
Abbildung 3-4: Die Aktivität von TrkB im E12,5 Vorderhirn in Abhängigkeit von BDNF und NT-3	77
Abbildung 3-5: Die Expression von TrkB und des EGF-Rezeptors im dorsalen Telenzephalon	78
Abbildung 3-6: Das Differenzierungspotenzial isolierter kortikaler Vorläuferzellen	80
Abbildung 3-7: Schematische Übersicht neuronal exprimierter TrkB-Isoformen	82
Abbildung 3-8: Die Expression von TrkB-Isoformen in kortikalen Vorläufern auf mRNA-Ebene	83
Abbildung 3-9: Die Expression von TrkB-Isoformen in kortikalen Vorläufern auf Proteinebene	84
Abbildung 3-10: Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	86
Abbildung 3-11: Die Aktivierung von TrkB in kortikalen Vorläufern durch EGF, BDNF und NT-3	88
Abbildung 3-12: Die Aktivierung von TrkB in der Neurosphären- bzw. Direktkultur	90
Abbildung 3-13: Die Aktivierung von TrkB in Direktkulturen von E10,5 und E14,5	91
Abbildung 3-14: Die zelltypspezifische Zusammensetzung der unterschiedlichen Kulturen kortikaler Vorläuferzellen	93
Abbildung 3-15: Der Zeitverlauf der EGF vermittelten TrkB-Aktivierung	94
Abbildung 3-16: Die Überexpression von HA-TrkB in kortikalen Vorläuferzellen	96
Abbildung 3-17: Die Inhibition von cSrc und Fyn durch Überexpression dominant negativer Proteinmutanten	99
Abbildung 3-18: Die Reduktion von pTrkB nach c-Src/Fyn-Inhibition auf Einzelzellebene	100
Abbildung 3-19: Die Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors aus Lysaten kortikaler Vorläufer	102
Abbildung 3-20: Die Immunpräzipitation von aktivem TrkB mit α -pTrkB-Shc	103
Abbildung 3-21: Die enzymatische Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläufer	104
Abbildung 3-22: Die Deglykosylierung von Lysaten kortikaler Vorläufer im Einzelansatz	105
Abbildung 3-23: Die Tunicamycinbehandlung kortikaler Vorläuferzellen	106



Abbildung 3-24: Die Lokalisation von TrkB in kortikalen Vorläuferzellen.....	108
Abbildung 3-25: Die Tunicamycin-Behandlung kortikaler Vorläufer führt zu einer Umverteilung von TrkB.....	109
Abbildung 3-26: Der Zeitverlauf der von EGF induzierten Translokation von TrkB	111
Abbildung 3-27: STED-Bildgebung von mit EGF stimulierten kortikalen Vorläuferzellen	112
Abbildung 3-28: Der Avidin-Pulldown von biotinylierten Proteinen an der Zelloberfläche	114
Abbildung 3-29: Die subzelluläre Verteilung von TrkB im dorsalen Telenzephalon	115
Abbildung 3-30: Die Quantifizierung des Zelltods im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand kondensierter Nuklei.....	118
Abbildung 3-31: Die Quantifizierung des Zelltods im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand der TUNEL-Reaktion	119
Abbildung 3-32: Die Quantifizierung der Proliferation im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E12,5 anhand pH3-positiver Zellen	121
Abbildung 3-33: Die Quantifizierung von TrkB-exprimierenden Zellen in der Marginalzone zum Zeitpunkt E12,5	122
Abbildung 3-34: Die Phosphorylierung von TrkB im Vorderhirn von <i>EGFR KO</i> -Mäusen zum Zeitpunkt E12,5	124
Abbildung 3-35: Die Quantifizierung von TrkB-exprimierenden Zellen in Vorderhirn zum Zeitpunkt E15,5 in Wildtyp-, <i>TrkB/NTRK2 KO</i> - und <i>EGFR KO</i> -Mäusen	125
Abbildung 3-36: Die relative Verteilung von TrkB-exprimierenden Zellen im dorsalen Telenzephalon zum Zeitpunkt E15,5 in Wildtyp- und <i>EGFR KO</i> -Mäusen	127
Abbildung 3-37: Streifentest zur Analyse des Wanderungsverhaltens kortikaler Vorläufer.....	129
Abbildung 3-38: Die Verteilung von TrkB in kortikalen Vorläufern während der <i>in vitro</i> -Migration.....	130
Abbildung 4-1: Laufhöhenzuordnung der pTrkB-PLC γ -Banden	148



6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Die Familien neurotropher Faktoren und ihre Rezeptoren	12
Tabelle 2-1: Übersicht verwendeter Primärantikörper	40
Tabelle 2-2: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper	41
Tabelle 2-3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide.....	41
Tabelle 2-4: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide.....	42
Tabelle 2-5: Für RT-PCR verwendete Oligonukleotide	42
Tabelle 2-6: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide.....	43
Tabelle 2-7: Übersicht verwendeter Plasmide.....	43
Tabelle 2-8: Ligationsansatz	48
Tabelle 2-9: Photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	48
Tabelle 2-10: Standard-PCR-Ansatz.....	49
Tabelle 2-11: PCR-Programm NTRK2	49
Tabelle 2-12: PCR-Programm EGFR.....	50
Tabelle 2-13: PCR-Programm BDNF	50
Tabelle 2-14: PCR-Programm NT-3.....	50
Tabelle 2-15: PCR-Ansatz für Sequenzierungen	51
Tabelle 2-16: PCR-Programm für Sequenzierungen.....	51
Tabelle 2-17: Ansatz zur cDNA-Synthese aus isolierter Total-RNA	52
Tabelle 2-18: Inkubationszeiten der Reaktion zur cDNA-Synthese aus isolierter Total-RNA.....	52
Tabelle 2-19: RT-PCR-Ansatz zur Unterscheidung von TrkB-Isoformen	53
Tabelle 2-20: PCR-Programm der RT-PCR zur Unterscheidung von TrkB-Isoformen	53
Tabelle 2-21: Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford	55
Tabelle 2-22: Probenzusammensetzung für die Proteinbestimmung nach Bradford.....	55
Tabelle 2-23: Zusammensetzung des <i>in vitro</i> -Deglykosylierungsansatzes	57
Tabelle 2-24: Zusammensetzung des Trenngels für die SDS-PAGE.....	59
Tabelle 2-25: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE	59
Tabelle 2-26: Beschreibung der vier im Migrationsassay benutzten Substratteppiche	69



6.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Ampere
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
APS	Amoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	engl. brain derived neurotrophic factor
bFGF	engl. Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	engl. copy DNA
cAMP	cyclic Adenosine monophosphate
Cre	Cre Rekombinase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DcX	Doublecortin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E	Embryonaltag
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl. epidermal growth factor
EGFP	engl. Enhanced green fluorescent protein
engl.	englisch
FCS	engl. fetal calf serum
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFAP	engl. gliary fibrillaric acid protein
GPCR	engl. G-protein coupled receptor



h	Stunde(n)
HA	Hemagglutinin
GFP	engl. green fluorescent protein
HBSS	engl. hanks balanced salt solution
HEK293T	engl. human embryonic kidney cells 293T
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
KO	engl. Knockout
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
m	Milli
μ	Mikro
Map2	engl. Microtubule-associated-protein2
MAPK	engl. mitogen activated protein kinase
mEGF	engl. murine epidermal growth factor
min	Minute(n)
mRNA	engl. messenger RNA
MZ	Marginalzone
n	Nano
NGF	engl. nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophin-Rezeptor
O4	engl. Oligodendrocyte marker 4
OD	Optische Dichte
P	Postnatahtag
p	Phospho
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12	Phäochromozytomzellen 12
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatinositol-3-kinase



Rho	Ras homolog
RNA	engl. ribonucleid acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. reverse transcription PCR
sek	Sekunde(n)
SVZ	Subventrikularzone
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	engl. sodium-dodecylsulfate-polyacryl-amid-gel-elektrophoresis
SEM	engl. standard error of mean
shRNA	engl. short hairpin RNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	engl. Tropomyosin-related-kinase
U	engl. unit
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VZ	Ventrikularzone
WB	Western Blot
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent
°C	Grad Celsius



6.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,

dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat,

und dass ich früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 06. Mai 2010

Dirk Pühringer



6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dirk Pühringer
 Geburtsdatum: 05.12.1975
 Geburtsort: Augsburg
 Familienstand: verheiratet
 Nationalität: deutsch
 Eltern: Klaus Pühringer, technischer Zeichner i. R.,
 Christine Pühringer, Kinderkrankenschwester

Schulbildung

1982-1986 St. Ägidius Volksschule, Neusäß
 1986-1995 Justus-von-Liebig Gymnasium, Neusäß
 Allgemeine Hochschulreife Jun.1995

Ersatzdienst

Okt.1995-Dez.1996 Bei BRK- Blutspendedienst, Institut Augsburg

Studium

Apr 1997-Jul 2004 An der bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 Studiengang Biologie Diplom
 Studienschwerpunkte:
 Genetik und Neurobiologie, Biochemie und Verhaltensphysiologie und
 Soziobiologie
 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
 Thema „Funktionelle Analyse verschiedener CK2 β -Isoformen in *Drosophila melanogaster*“
 Diplom vom 27.07.2004
 2004–2010 Promotion am Institut für klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum
 Würzburg bei Prof. Dr. Michael Sendtner
 Titel: „Die Transaktivierung des Neurotrophin-Rezeptors TrkB durch EGF
 während der Kortextentwicklung der Maus“



6.7 Publikationsliste

Publikationen:

Dirk Puehringer, Nadiya Orel, Thomas Herrmann, Moses V. Chao and Michael Sendtner. EGF Uses TrkB for Differentiation of Cortical Precursor Cells. Manuskript in Revision.

Karin Frebel, Stefan Wiese, Natalja Funk, **Dirk Pühringer**, Michael Sendtner. Differential Modulation of Neurite Growth by the S- and the L-Forms of bag1, a Co-Chaperone of Hsp70. *Neurodegenerative Diseases* 2007; 4:261-269;

Mirko Hekman, Stefan Albert, Antoine Galmiche, Ulrike E. E. Rennefahrt, Jochen Fueller, Andreas Fischer, **Dirk Puehringer**, Stefan Wiese, and Ulf R. Rapp. Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;

Abstracts:

Puehringer D., Orel N., Chao M. and Sendtner M. Migration of newly generated neurons in the cortex depends on the cooperation of TrkB and EGFR. Presented at: Neuroscience Meeting of the Society for Neuroscience 2009, Chicago, IL, USA, 17.10.-21.10.2009

Puehringer D, Orel N, Chao MV, Sendtner M. EGF mediated transactivation of TrkB dominates over BDNF signalling in neural stem cells. Presented at: Neuroscience Meeting of the Society for Neuroscience 2008, Washington, DC, USA, 14.11.-19.11.2008

Puehringer D, Wiese S, Chao MV, Sendtner M. Die Rolle der Transaktivierung von Neurotrophinrezeptoren für Überleben und Differenzierung von Nervenzellen. Begutachtung Schilling Stiftung, 27.11.2007.

Frebel K, Nichiporuk E, Wierk N, **Puehringer D**, Sendtner M, Wiese S. Overexpression of Bag-1 in differentiated cells leads to reduced neurite outgrowth. Presented at: Neuroscience Meeting of the Society for Neuroscience 2005, Washington, DC, USA, 12.11.-16.11.2005



Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner für seine Bereitschaft, mir in den vergangenen Jahren als Doktorvater zu Verfügung gestanden zu haben. Nicht zuletzt durch sein stetes fachliches und persönliches Engagement wurde die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht. Dabei erwiesen sich die Arbeitsbedingungen in seinen Labors der klinischen Neurobiologie mit schier unbegrenzten Möglichkeiten und hervorragender Ausstattung als einzigartig. Vielen herzlichen Dank auch für die Unterstützung bei der Teilnahme an internationalen Kongressen, die für mich immer von großem Erfahrungswert waren und noch sind.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Erich Buchner für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Seit ich hier im Hauptlabor Platz genommen habe, bin ich so vielen KollegInnen begegnet, so dass ich hier unmöglich alle persönlich ansprechen kann. Es darf sich deshalb jeder angesprochen fühlen, wenn ich sage:
Dankeschön.

Ausdrücklich danken möchte ich aber Stefan für die Einführungen und Anleitung in meiner Anfangszeit am Institut.

Vielen lieben Dank an Karin für die ausgesprochen nette Zusammenarbeit, die Hilfestellungen und die Gesprächsbereitschaft.

Dem ganzen ursprünglichen Hauptlaborteam fühle ich mich zu größtem Dank verpflichtet, eben vor allem für die freundliche Aufnahme ins Team, Eure Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Vielen Dank an Michi, Kathi, Christine und Christian.

Vielen Dank an alle Ex-ZEMMLer und neu-MSZler:
Carsten, Tom, danke euch für kompetente Anleitungen und Ratschläge.
Danke , Robert, für deine wertvollen Anmerkungen und die tatkräftige Unterstützung und Deine Zeit, die Du für mich übrig hattest.

Jetzt Kopfklinik:
Lieben Dank an Nadiya, für die zahlreichen Tipps und Tricks im Laboralltag und alle sonstigen Ratschläge.

Mir Dir hat die Arbeit Spass gemacht, Susanne. Trotz Deines Sauberkeitswahns.
Danke für Deine Freundschaft und auch für die netten Aufbaukärtchen.

Dann natürlich die aktuelle Mannschaft:
Dank an Sibylle, dass ich inmitten der „AG Jablonka“ immer meine kleine Nische einnehmen durfte.
Katrin, Du warst wirklich die gute Seele des Instituts. Immer für zwei gearbeitet und nie ein Wort drüber verloren. Lieben Dank für die Hilfe bei Bestellungen aller Art und den ganzen Versandfragen.



Christian, war immer schön, mit Dir zu verreisen und das Doppelbett zu teilen.
 Stichwort ewige Tabelle: Da geht noch was. Chapeau!
 Benjamin, Genie und Wahnsinn. Einen roten Gruß an Dich, weiter so.
 Nicole, Danke für Dein angenehmes Wesen. Ein echtes Elflein.
 Elke, Katharina und Frank, seid ja noch nicht so lange da, passt aber super,
 danke Euch.

Lieben Dank an meine fleißigen Korrekturleser Mona, Frank und Veronika Eggert.
 Judita und Urveen für jede Hilfe, dir Ihr mir u. A. in meinem ganz persönlichen
 Papierkrieg habt zukommen lassen.

Für die hervorragende Unterstützung in allen Maus-Angelegenheiten danke ich ganz
 herzlich dem Tierstallteam um Viktor Buterus, Joachim Horschig
 und Regine Sendtner.

Besten Dank an Helga, die mir speziell mit meinem Maustransfer sehr geholfen hat,
 aber mir auch sonst immer hilfsbereit unter die Arme gegriffen hat,
 wenn Not an der Maus war.

Dem Team der Neuroradiologie, für die unzähligen Male, die ich mich in die
 Dunkelkammer geschlichen habe.

Für Ihre Unterstützung, das in mich gesetzte Vertrauen und die Freundschaft danke
 ich herzlichst der Familie Tschida, meiner Mama Christine und Michael
 und meinem Papa Klaus und Emmi.

Meiner lieben Schwester Carmen für den Rückhalt und den immerwährenden
 Zuspruch, der mir in schweren Phasen sehr geholfen hat.
 Schön gedruckt, danke George.

Ohne Dich, Nina, hätte ich nichts geschafft. Danke für Deine Liebe und die geduldige
 Unterstützung in den ganzen Jahren. Moritz und Emil, das ist das Größte.
 Dirk

*Don't be so gloomy. After all it's not that awful. Like the fella says, in Italy for
 30 years under the Borgias they had warfare, terror, murder, and bloodshed, but
 they produced Michelangelo, Leonardo da Vinci, and the Renaissance. In
 Switzerland they had brotherly love - they had 500 years of democracy and
 peace, and what did that produce? The cuckoo clock.
 So long Holly.
 Orson Welles als Harry Lime, Der dritte Mann*

