

**Untersuchungen zur Bedeutung von TGF- β
während der Entwicklung des Vorderhirns**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sandra Ahrens
aus Hannover

Göttingen 2008

Referent: Prof. Dr. E.-A. Wimmer

Korreferent. Prof. Dr. T. Pieler

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2009

Diese Dissertation entstand in der Zeit von September 2005 bis Dezember 2008 in der Abteilung Neuroanatomie des Zentrums für Anatomie der Georg-August-Universität zu Göttingen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kriegelstein.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Die transformierenden Wachstumsfaktoren-β (TGF-β)	8
1.1.1 Die TGF- β -Isoformen	8
1.1.2 Die Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie	9
1.1.3 Signaltransduktion durch TGF- β	10
1.1.4 Die Familie der Smad-Proteine	11
1.1.5 Signaltransduktion durch Smad-Proteine	12
1.1.6 Smad-unabhängige Signaltransduktion	13
1.1.7 Expression von TGF- β und deren Rezeptoren im Nervensystem	15
1.1.8 Funktionen von TGF- β im Nervensystem	15
1.2 Neurogenese im Telencephalon	17
1.2.1 Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen und die verschiedenen Typen ihrer Zellteilung	19
1.2.2 Einfluss intrinsischer Faktoren auf die Neurogenese cortikaler Stamm- und Vorläuferzellen	22
1.2.3 Einfluss extrinsischer Faktoren auf die Neurogenese cortikaler Stamm- und Vorläuferzellen	23
1.2.4 Die Entwicklung des Hippokampus	25
1.3 Zielsetzung der Arbeit	26
2 MATHIERIAL UND METHODEN	28
2.1 Tiere	28
2.2 Zelllinien	28
2.3 Zellkulturmedien und Zusätze	28
2.4 Chemikalien	28
2.5 Zytokine und Inhibitoren	29
2.6 Enzyme	29
2.7 Kits und fertige Gebrauchslösungen	30
2.8 Antikörper	30
2.9 Plasmide	31

2.10	Standards	31
2.11	Verbrauchsmaterialien	32
2.12	Laborgeräte	32
2.13	Zellbiologische Methoden	34
2.13.1	Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler und cortikaler Neurone ...	34
2.13.2	Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten	35
2.13.3	Kultivierung der Zelllinie Oli-neu	36
2.13.4	Kultivierung der Zelllinie C2C12	36
2.13.5	Stimulation der Primärkulturen mit TGF- β 1	36
2.13.6	BrdU-Markierung primärer Zellkulturen	37
2.13.7	TGF- β -Sekretionsmessung mit MLEC-Zellen.....	37
2.13.8	Transfektion von Zelllinien	38
2.13.9	Transduktion von Primärkulturen mit Adeno-assoziierten Viren.....	38
2.13.10	Transduktion von Primärkulturen mit Lentiviren	39
2.14	Zytochemische Methoden	40
2.14.1	Immunzytochemie.....	40
2.14.2	Bestimmung apoptotischer Zellen durch Propidiumiodid-FACS-Analyse.....	41
2.14.3	Bestimmung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung	41
2.14.4	Quantitativer Nachweis der Smad-Aktivierung mittels des Luciferase-Reporterplasmids pGL3-SBE	42
2.15	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.16	Molekularbiologische Methoden	44
2.16.1	Herstellen von kompetenten Bakterien für die Elektroporation.....	44
2.16.2	Transformation elektrisch kompetenter Bakterien durch Elektroporation	44
2.16.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	45
2.16.4	Restriktions-Spaltung von Plasmid- DNA	45
2.16.5	Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.16.6	Agarosegelelektrophorese.....	46
2.16.7	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
2.16.8	Inhibierung der Genexpression mittels shRNA.....	46
2.16.8.1	Design von shRNA-Sequenzen.....	47
2.16.8.2	Klonierung von pSuper-Konstrukten zur Expression der T β RII-shRNAs in Zelllinien	48
2.16.8.3	Klonierung der shRNA-Konstrukte zur Verwendung in Adeno-assoziierten Viren	48
2.16.9	DNA-Sequenzierung.....	49
2.16.10	Isolierung genomischer DNA.....	49

2.16.11	Isolierung der Gesamt-RNA.....	49
2.16.12	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren	50
2.16.13	Reverse Transkription.....	50
2.16.14	Polymerase-Kettenreaktion	51
2.16.14.1	PCR zur Überprüfung des Rekombinationsereignisses in hippokampalen Neuronen aus T β RII (flox/flox) Mäusen nach Transduktion mit AAV-Cre	51
2.16.14.2	PCR zur Genotypisierung der <i>Ctgf-Knock-out</i> Tiere	52
2.16.14.3	Semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR).....	52
2.16.15	Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	53
2.16.16	Primerdesign.....	54
2.17	Proteinbiochemische Methoden	55
2.17.1	Zellaufschluss	55
2.17.2	Messung der Proteinkonzentration nach Bradford	55
2.17.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.17.4	Western Blot	56
2.18	Statistische Auswertung.....	57
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Charakterisierung dissoziierter Neurone des Hippokampus und Cortex im Hinblick auf die Responsivität gegenüber TGF-β-Signalen	58
3.1.1	Expression der TGF- β Isoformen und deren Rezeptoren.....	58
3.1.2	Sekretion von TGF- β	59
3.1.3	Aktivierung von Smad-Proteinen	60
3.2	Evaluierung von Zielgen-Kandidaten des TGF-β-Signalweges in primären hippokampalen Kulturen	61
3.2.1	TGF- β regulierte Zielgene in jungen hippokampalen Kulturen (DIV4).....	63
3.2.2	TGF- β regulierte Zielgene in reifen hippokampalen Kulturen (DIV12).....	65
3.2.3	TGF- β -Zielgene involviert in Notch- und Wnt-Signalwege.....	67
3.2.4	Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation vom TGF- β -Rezeptor Typ II.....	69
3.2.4.1	Prinzip des Cre/loxP vermittelten <i>Knock-downs</i> des TGF- β -Rezeptor Typs II.....	70
3.2.4.2	Generierung einer gegen den TGF- β -Rezeptor Typ II gerichteten shRNA ...	72
3.2.4.2.1	Validierung T β RII-spezifischer shRNA-Vektoren in Oli-neu und C2C12-Zellen	72
3.2.4.2.2	Klonierung des AAV-shRNA-Expressionsvektors.....	74

3.2.4.3	Einfluss des Cre/loxP vermittelten <i>Knock-downs</i> des TGF- β -Rezeptor Typs II auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen	75
3.2.4.4	Einfluss des shRNA vermittelten <i>Knock-downs</i> des TGF- β -Rezeptor Typs II auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen	77
3.2.5	Regulation der TGF- β -Zielgene in Astrozyten-angereicherten Kulturen.....	79
3.2.6	Smad-Abhängigkeit der TGF- β regulierten Zielgene	80
3.2.7	Einfluss von Ctgf auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen.....	81
3.3	Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung hippokampaler und kortikaler Zellen <i>in vitro</i>	83
3.3.1	TGF- β fördert die Neurogenese von hippokampalen und kortikalen Progenitoren	83
3.3.1.1	Abhängigkeit der TGF- β induzierten Neurogenese von der TGF- β -Isoform ..	86
3.3.1.2	Abhängigkeit der TGF- β induzierten Neurogenese vom Zeitpunkt und der Dauer der TGF- β -Behandlung.....	87
3.3.1.3	Abhängigkeit der TGF- β induzierten Neurogenese von der Smad-Aktivität..	88
3.3.2	TGF- β fördert den Austritt von Progenitoren aus dem Zellzyklus	89
3.3.3	Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese ist abhängig vom Entwicklungsstadium	92
3.3.4	Einfluss von TGF- β auf die Zellzykluslänge.....	93
3.3.5	Einfluss von TGF- β auf die Expression von Zellzyklusregulatoren.....	95
3.3.6	Einfluss der identifizierten TGF- β -Zielgene auf den neurogenen Effekt	96
3.3.7	Expression von Nedd9 in kortikalen Kulturen	100
3.3.8	TGF- β ändert die Morphologie von Nestin-positiven Progenitorzellen	100
3.3.9	Einfluss von TGF- β auf die Spezifizierung neuronaler Subtypen im Cortex	104
4	DISKUSSION.....	106
4.1	Identifizierung von TGF-β-Zielgenen	106
4.1.1	TGF- β reguliert die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix	107
4.1.2	TGF- β reguliert die Expression von Molekülen involviert in die Differenzierung neuronaler Zellen.....	111
4.1.3	TGF- β reguliert die Expression von Molekülen, die ihrerseits auf Signalwege von Mitgliedern der TGF- β -Familie einwirken.....	114
4.1.4	TGF- β reguliert die Expression von Molekülen involviert in Notch-und Wnt- Signalwege	116

4.2	Zuordnung der TGF-β vermittelten Genregulationen zu den verschiedenen Zelltypen innerhalb der hippokampalen Kulturen.....	122
4.3	Smad-Abhängigkeit der TGF-β-Zielgenregulationen	125
4.4	TGF-β beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Morphologie neuraler Progenitoren	126
4.5	Die Bedeutung von Nedd9 während des Prozesses der TGF-β induzierten Neurogenese.....	129
4.6	TGF-β beeinflusst nicht grundlegend die Spezifizierung kortikaler Subtypen	133
4.7	Zusammenfassende Darstellung und Ausblick.....	134
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	138
6	ANHANG	165
6.1	Abbildungsverzeichnis	165
6.2	Tabellenverzeichnis	166
6.3	Primersequenzen	167
6.3.1	Sequenzen der Primer für die TGF- β -Zielgen-Analyse.....	167
6.3.2	Sequenzen der Primer für Genotypisierungen	172
6.4	Sequenzen der TβRII-spezifischen shRNAs	173
6.5	Sequenzen der MISSIONTM shRNAs von Sigma-Aldrich.....	173
6.6	Ergebnisse der PCR-Arrays	174
6.6.1	<i>Mouse Notch Signalling Pathway (PAMM-059).....</i>	<i>174</i>
6.6.2	<i>Mouse Wnt Signalling Pathway (PAMM-043).....</i>	<i>176</i>
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	178
8	DANKSAGUNG.....	179
9	LEBENS LAUF.....	180

Zusammenfassung

Die transformierenden Wachstumsfaktoren β (TGF- β s) sind multifunktionale Zytokine, die zahlreiche zelluläre Prozesse in einer kontextabhängigen Weise regulieren können. TGF- β s und ihre Signaleffektoren sind im Vorderhirn exprimiert, über die Funktion von TGF- β s während der Entwicklung des Vorderhirns ist bisher allerdings nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Funktionen von TGF- β in neuronalen Zellen des sich entwickelnden Vorderhirns zu untersuchen. Als Modell wurden primäre dissoziierte Zellkulturen des Hippokampus und Cortex embryonaler Mäuse verwendet, von denen gezeigt werden konnte, dass sie responsiv für TGF- β -Signale sind.

Die exogene Behandlung von diesen Kulturen mit TGF- β führte über die Regulation von Zellzyklus-Kontrollgenen zu einem Austritt von neuronalen Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus und zu einer Reduzierung der Nestin- und Pax6-positiven Vorläuferzellpopulation. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg an Zellen, welche die neuronalen Marker HuC/D und NeuN exprimierten, was auf eine vermehrte neuronale Differenzierung der Progenitoren schließen lässt. Diese TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese war abhängig von der Aktivität von Smad-Proteinen und vom Entwicklungsstatus der Progenitoren. Während cortikale Progenitoren aus E14.5 Mäuseembryonen auf die TGF- β -Stimulation nicht mit einer vermehrten Neurogenese reagierten, entwickelten Progenitoren später Stadien aus E16.5 Embryonen 34% mehr Neurone im Vergleich zu unbehandelten Kulturen.

In dieser Arbeit konnten weiterhin Zielgene des TGF- β -Signalweges in primären hippokampalen Kulturen identifiziert werden. Die durch TGF- β regulierten Gene umfassten Moleküle der extrazellulären Matrix wie Ctgf, Timp3, TenascinC und die Integrine $\alpha 3$ und $\alpha 5$ sowie Moleküle, die eine regulierende Funktion auf TGF- β -Signale selbst ausüben können, wie Smad7, Igf2r und Fstl3. Durch die Regulation von Genen, die an der Übertragung von Notch- und Wnt-Signalen beteiligt sind, konnte eine Interaktion von TGF- β -Signalwegen mit den an vielfältigen Entwicklungsprozessen beteiligten Notch- und Wnt-Signalwegen festgestellt werden. Außerdem beeinflusste TGF- β die Expression von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung neuraler Zellen spielen, wie Gata2, Runx1, Id3 und Nedd9.

Die nähere Untersuchung der Auswirkungen eines Funktionsverlustes der Zielgene Ctgf, Gata2, Runx1 und Nedd9 auf die TGF- β induzierte Neurogenese identifizierte Nedd9 als notwendige Signal-Komponente während dieses Prozesses. Die Expression dieses Proteins, welches an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion über fokale Adhäsionspunkte beteiligt ist, war nicht nur nach TGF- β -Stimulation induziert, sondern auch mit morphologischen Änderungen von Nestin-positiven Vorläuferzellen assoziiert, welche nach TGF- β -Behandlung beobachtet werden konnten. Diese morphologischen Änderungen

scheinen, den durch TGF- β vermittelten Übergang eines Vorläuferzelltyps in einen anderen, stärker differenzierten Typ darzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine Beteiligung von TGF- β an der Differenzierung neuraler Progenitoren des Vorderhirns während später Phasen der Entwicklung. Bei diesem Prozess scheint TGF- β die Progenitoren in einen Status zu versetzen, der nach einer letzten Zellteilung zur Differenzierung zu Neuronen führt.

Summary

Transforming Growth Factor β s (TGF- β s) are multifunctional cytokines and mediate a wide range of biological activities in a context dependent manner. TGF- β s and their signalling effectors are expressed in the forebrain, but little is known upon their role during forebrain development. The aim of this study was to investigate possible functions of TGF- β in neuronal cells of the developing forebrain.

As a model primary cortical and hippocampal cultures isolated from E14.5 and E16.5 mouse embryonic brains were used, which were shown to be responsive for TGF- β signals.

Exogenic treatment with TGF- β induced cell cycle exit of neural progenitors through regulation of cell cycle control genes and led to a reduction of Nestin- and Pax6-positive progenitor cells. At the same time an increased expression of the neuronal markers HuC/D and NeuN were observed, indicating enhanced neuronal differentiation. This TGF- β induced neurogenesis was dependent on the activation of Smad-proteins and on the developmental stage of the respective progenitors. While E14.5 derived progenitors did not respond with increased neurogenesis to the TGF- β stimulus, later-stage progenitors of E16.5 produced around 34% more neurons compared to unstimulated cultures.

Furthermore this study identified several downstream target genes of the TGF- β signalling pathway in primary hippocampal cultures isolated from E16.5 mouse embryos.

These TGF- β regulated genes included molecules of the extracellular matrix like Ctgf, Timp3, TenascinC and the integrins α 3 and α 5, as well as molecules which exert regulating functions on members of the TGF- β superfamily themselves like Smad7, Igf2r and Fstl3.

Due to the regulation of genes involved in the mediation of Notch and Wnt signals a cross talk between TGF- β signalling pathways and the developmentally important Notch and Wnt signalling pathways were discovered. Furthermore TGF- β influenced the expression of genes with a role in neuronal differentiation like Gata2, Runx1, Id3 and Nedd9.

By investigating the implications of a loss of function of the TGF- β -induced target genes Ctgf, Gata2, Runx1 and Nedd9 using siRNA mediated knock-down or knock-out animals, Nedd9 was identified as essential signalling component for TGF- β -dependent increase in neuronal differentiation. Expression of this scaffolding protein, that is mainly described as signalling molecule of the integrin pathway through focal adhesions, was not only induced after TGF- β treatment but was also associated with morphological changes of the Nestin-positive progenitor pool observed upon exposure to TGF- β . This morphological changes seemed to represent the TGF- β mediated transition from one type of progenitor cells to another, more differentiated type.

Summary

The results of this study show an implication for TGF- β during the differentiation of neural progenitors of the forebrain during later phases of their development. In this process TGF- β may transform the progenitor pool into a status that mediates neuronal differentiation after induction of the last mitotic division of neural progenitors.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
AraC	Cytosin-Arabinosid
ATP	Adenosin-tri-phosphat
atRA	<i>all-trans retinoid acid</i>
β-Gal	β-Galaktosidase
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
BLBP	<i>brain-lipid-binding protein</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	CREB-bindendes Protein
Ccnd	Cyclin D
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA
CMF	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freies Medium
CMV	Cytomegalovirus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
Co-Smad	<i>common mediator Smad</i>
CT	<i>cycle treshold</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Ctgf	<i>Connective tissue growth factor</i>
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine <i>t</i> -Butyl Ester
Dcx	Doublecortin
DG	<i>Dentate Gyrus</i> , Gyrus dentatus
DIV	<i>day in vitro</i> , Tag <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dtx	Deltex
Dvl	Dishevelled
E	Embryonaltag
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

et al.	<i>et alteri</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Fstl	<i>Follistatin-like</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gata	<i>GATA-binding-protein</i>
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GTPase	Guanosin-Triphosphat Hydrolase
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
Hes	<i>hairy and enhancer of split</i>
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HuC/D	<i>HuC/HuD neuronal protein</i>
IC	Immunzytochemie
Id	<i>Inhibitor of differentiation</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
Igf2r	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>
I-Smad	inhibitorisches Smad
Itga	Integrin α
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LAP	<i>latency associated protein</i>
LB	Luria-Broth
LEF	<i>lymphoid enhancer binding factor</i>
loxP	<i>Locus of Crossing Over</i> im Genom des Bakteriophagen P1
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-ERK Kinase
MH1/MH2	<i>mad homology domain</i>
MLEC	<i>mink-lung-epithelial cells</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOH	Natronlauge
NDS	<i>normal donkey serum</i> , normales Eselserum
Nedd	<i>neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene</i>
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>
Ngn	Neurogenin
NGS	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegenserum
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
NT	Neurotrophin

Abkürzungsverzeichnis

nt	Nukleotide
N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PSA-NCAM	<i>polysialylated neural cell adhesion molecule</i>
PSN	Penicillin/Streptomycin/Neomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	Umdrehungen (<i>rounds</i>) pro Minute
R-Smad	Rezeptor-reguliertes Smad
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
Runx	<i>runt-related transcription factor</i>
SBE	Smad-bindendes Element
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Ski	<i>Sloan-kettering Institute proto-oncogen</i>
Smad	<i>zusammengesetzt aus Sma und Mad, homologen Genen für Sma (C. elegans) bzw. mothers against decapentaplegic (Drosophila)</i>
Smurf	<i>Smad-ubiquitination-regulatory factor</i>
SnoN	<i>Ski-related novel gene N</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TβRI/TβRII	TGF-β-Rezeptor Typ I/ TGF-β-Rezeptor Typ II
TCF	<i>T-cell factor</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
Timp	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>
Tle	<i>Transducin like enhancer of split</i>
Trk	Tyrosin-Kinase-Rezeptor
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>unit</i>
UV/VIS	ultraviolett/ <i>visible</i>
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β)

Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β (*transforming growth factors- β* , TGF- β) bilden eine große Superfamilie von multifunktionellen Proteinen, zu der mehr als 40 Mitglieder gehören, wie die *bone morphogenetic proteins* (BMPs), Aktivine und Inhibine, das *müllerian inhibiting protein* (AMH) und *growth and differentiation factors* (GDFs) (Massague, 1990; Böttner et al., 2000). Sie alle gehören zur Gruppe der Zytokine. Einige Mitglieder der Superfamilie, wie z.B. GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), werden als neurotrophe Faktoren klassifiziert, da sie neuronales Überleben und Wachstum fördern und auch TGF- β kann innerhalb dieser Definition dazu gezählt werden (Kriegstein et al., 1995).

TGF- β wurde zum ersten Mal 1981 aufgrund seiner Fähigkeit beschrieben, das Wachstum von Fibroblasten der Niere zu stimulieren (Roberts et al., 1981). Später stellte sich jedoch heraus, dass TGF- β vielfältige andere Funktionen entfalten kann, die eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Kontext der Zelle aufweisen. So kann es Proliferation und Differenzierung, Adhäsion und Migration, Überleben und Apoptose in vielen verschiedenen Zelltypen steuern (Massague, 1998). Darüber hinaus wurden ihm Funktionen bei der Angiogenese, Hämatopoese, Immunreaktionen und dem Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) zugeschrieben (Böttner et al. 2000).

1.1.1 Die TGF- β -Isoformen

In der Gruppe der TGF- β s sind fünf Isoformen bekannt, von denen drei (TGF- β 1, - β 2, - β 3) in Säugetieren vorkommen (Assoian et al., 1983; Derynck et al., 1988; ten Dijke, 1988; Wrann et al., 1987). TGF- β 4 wurde als Ortholog von TGF- β 1 im Huhn beschrieben (Jakowlew et al., 1988) und TGF- β 5 konnte in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nachgewiesen werden (Kondaiah et al., 1990).

Alle TGF- β -Isoformen werden zunächst in einer inaktiven, dimeren Vorstufe synthetisiert. Ein Signalpeptid leitet das Vorläuferprotein durch das Endoplasmatische Retikulum in den Sekretionszyklus. Im Golgi-Apparat erfolgt eine Spaltung im C-terminalen Bereich durch die Protease Furin (Dubois et al., 1995). Das 110-140 Aminosäuren umfassende C-terminale Fragment stellt das eigentliche biologisch aktive TGF- β -Molekül dar, während der N-terminale Anteil als *latency-associated protein* (LAP) bezeichnet wird (Munger et al., 1997). Beide Spaltprodukte bleiben zunächst durch nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden und bilden einen inaktiven Komplex, den *small latent complex* (SLC), welcher

gegenüber der aktiven Form von TGF- β eine erheblich größere Biostabilität besitzt. Zudem ist der LAP über Disulfid-Brücken an das *latent TGF- β binding protein* (LTBP) gebunden (Miyazono et al., 1988). Die LTBPs dienen dazu, die Stabilität des TGF- β -Moleküls sicherzustellen und sind vermutlich auch für die Steuerung der Freisetzung des TGF- β in den Extrazellularraum oder seine Speicherung in der extrazellulären Matrix verantwortlich (Taipale und Keski-Oja, 1997).

Die endgültige Aktivierung des TGF- β -Moleküls wird durch Dissoziation des LAP erreicht. Dies kann enzymatisch durch Proteasen wie Plasmin, Cathepsin, Thrombospondin-1 und Matrix-Metalloproteinasen erfolgen (Taipale und Keski-Oja, 1997; Munger et al., 1997; Crawford et al., 1998; Yu und Stamenkovic, 2000) oder durch physikalische Einwirkungen wie pH- und Temperaturänderungen (Brown et al., 1990).

Die aktive Form von TGF- β besitzt ein charakteristisches Strukturmotiv aus sechs Cysteinresten, die drei intramolekulare Schwefelbrücken ausbilden. Dieses Motiv wird als *cystine knot* bezeichnet und ist in allen Mitgliedern der Superfamilie konserviert (Böttner et al., 2000).

1.1.2 Die Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie

Die Signalübertragung von allen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie wird über ein Serin/Threonin-Kinase-Rezeptorsystem vermittelt, welches aus den Rezeptortypen I und II besteht (Massague, 1998). Dabei handelt es sich um transmembrane Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 55-70 kDa (Typ I) und 70-100 kDa (Typ II), die aus einer kurzen Cystein-reichen extrazellulären Domäne zur Bindung des Liganden, einem Transmembransegment und einer intrazellulären Region mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität bestehen (Massague, 1992; Wrana et al., 1994). Die Rezeptoren liegen jeweils als Homodimer in der Zellmembran vor und bilden im Zuge der Aktivierung einen tetrameren Komplex aus jeweils zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren. Typ I Rezeptoren werden auch als ALKs (*activine receptor-like kinases*) bezeichnet. Bisher sind sieben verschiedene Typ I Rezeptoren (ALK1-7) beschrieben worden und fünf Typ II Rezeptoren, nach ihren bevorzugten Liganden benannt als BMPRII (*bone morphogenetic protein receptor II*), ActRII und ActRIIB (*activine receptor II, IIB*), T β RII (*TGF- β receptor II*) und AMHR (*anti-müllerian hormone receptor*). Die Vielfalt an Rezeptoren führt zu einer größeren Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten innerhalb des tetrameren Rezeptorkomplexes. Durch diese kombinatorischen Interaktionen können die Affinitäten der unterschiedlichen Liganden zum jeweiligen Rezeptorkomplex reguliert werden und auch unterschiedliche Antworten auf die Bindung desselben Liganden vermittelt werden (Derynck und Zhang, 2003). Tabelle 1 gibt

eine Übersicht über die verschiedenen Rezeptortypen, ihre bevorzugte Komplexbildung und die daraus resultierende Aktivierung unterschiedlicher R-Smads.

Eine dritte Gruppe der TGF- β -Rezeptoren stellen die Typ III Rezeptoren Betaglycan und Endoglin dar. Diese transmembranen Proteine binden zwar TGF- β , nehmen jedoch nicht aktiv an der Signalübermittlung teil. Im Falle des Betaglycan wurde gezeigt, dass es alle drei TGF- β -Liganden mit hoher Affinität zu binden vermag, während Endoglin nur TGF- β 1 und TGF- β 3 bindet (Cheifetz et al., 1992; Lopez-Casillas et al., 1994). Als akzessorische Rezeptoren verbessern sie die Präsentation von TGF- β für den Rezeptorkomplex und können so die Rezeptoraktivität gegenüber dem Ligandenangebot regulieren (Massague und Wotton, 2000).

Tabelle 1: Kombination der verschiedenen TGF- β -Rezeptoren und die Signalweiterleitung über R-Smads (nach Derynck und Zhang, 2003 ; Lutz und Knaus, 2002)

Rezeptor-Typ II	Rezeptor-Typ I	R-Smad
BMPRII	ALK-2,ALK-3, ALK-6	Smad1, Smad5, Smad8
ActRII, ActRIIB	ALK-4	Smad2
ActRIIB	ALK-7	Smad2
AMHR	ALK-2, ALK-3, ALK-6	Smad1, Smad5
T β RII	ALK-5	Smad2, Smad3
	ALK-1	Smad1, Smad5
	ALK-2	Smad1, Smad5

1.1.3 Signaltransduktion durch TGF- β

Der TGF- β -Rezeptor Typ II (T β RII) stellt eine ständig aktive Kinase dar, im Gegensatz dazu muss die Typ I Rezeptor-Kinase zunächst aktiviert werden. Dieser Vorgang wird durch das Binden des Liganden an den Typ II Rezeptor eingeleitet. Der Ligand-Rezeptorkomplex rekrutiert einen Typ I Rezeptor, wodurch sich eine kurzlebige Verbindung aus dem Liganden TGF- β und den beiden Rezeptortypen ausbildet. In diesem Komplex phosphoryliert T β RII die Glycin-Serin reiche Domäne (GS-Domäne) des TGF- β -Rezeptor Typ I (T β RI) an Serin- und Threonin-Resten (Wrana et al., 1994). Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Typ I Rezeptors und damit zur Freigabe des bisher sterisch behinderten katalytischen Zentrums der Kinase des T β RI (Dennler et al., 2002). Aktivierte

Typ I Rezeptoren können im Anschluss mit einer Reihe von spezifischen, zytoplasmatischen Proteinen interagieren, als deren wichtigste Gruppe die Familie der Smad-Proteine zu nennen ist. Eine Schlüsselrolle bei der T β RI-Smad-Interaktion kommt dabei einer speziellen Region in der Kinase-Domäne des T β RI zu, die als *L45-loop* bezeichnet wird (Feng und Derynck, 1997). In dieser Region bestimmt ein Austausch von nur vier Aminosäuren die Spezifität für die Smad-Isoformen und separiert so TGF- β von BMP-Signalwegen (Chen et al., 1998; Persson et al., 1998).

Darüber hinaus existieren aber auch Signaltransduktionswege, die unabhängig von Smad-Proteinen sind.

Die TGF- β -Signaltransduktion kann bereits auf dem Level der Rezeptor-Aktivierung reguliert werden. Zum einen können die akzessorischen TGF- β -Rezeptoren des Typs III die Aktivität durch erleichterte Bindungen der Liganden steigern, zum anderen kann durch die Bindung von FKBP12 an die unphosphorylierte GS-Domäne des Typ I Rezeptors eine Aktivierung sterisch verhindert werden (Huse et al., 1999). FKBP12 hat in diesem Zusammenhang vermutlich die Aufgabe, die zufällige Aktivierung der TGF- β -Signalkaskade zu minimieren, die durch Liganden-unabhängige Begegnungen von Typ I und Typ II Rezeptoren entstehen. Das *TGF- β -receptor-interacting protein* (TRIP) 1 interagiert mit dem ligandengebundenen Typ II Rezeptor und hemmt die TGF- β -Signalaktivität (Choy und Derynck, 1998). Eine ähnliche Funktion besitzt auch der Translationsfaktor eIF2 α (McGonigle et al., 2002). Der Pseudorezeptor BAMBI (*BMP and activin membrane-bound inhibitor*) bildet inaktive Dimere mit T β RI und blockiert so die Signaltransduktion (Onichtchouk et al., 1999).

1.1.4 Die Familie der Smad-Proteine

In *Drosophila* wurden durch genetisches *Screening* nach intrazellulären Molekülen, welche die Wirkung von dem TGF- β -Funktionshomolog *decapentaplegic* (Dpp) verstärken, neue zytoplasmatische Signalproteine entdeckt, die so genannten *mother's against decapentaplegic* (mad) Proteine (Rafferty et al., 1995; Sekelsky et al., 1995). Auch im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurden nachfolgend homologe Proteine identifiziert, nämlich sma2, sma3 und sma4 (Savage et al., 1996). Schließlich fand man auch in höheren Organismen, einschließlich Säugetieren, homologe Proteine, die als sma/mad verwandte Proteine, kurz als Smads bezeichnet wurden.

Sie werden weiterhin entsprechend ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt: die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads), die *common-mediator* Smads (Co-Smads) sowie die inhibitorischen Smads (I-Smads). Zu den R-Smads zählen Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8. Sie werden direkt durch die Typ I Rezeptor-

Kinase an Serin-Resten des Carboxy-Endes phosphoryliert und somit aktiviert. Für den TGF- β -Signalweg sind vor allem Smad2 und Smad3 von Bedeutung, während Smad1, Smad5 und Smad8 in der BMP-Signaltransduktion eine Rolle spielen (Itoh et al., 2000). Von den Co-Smads ist bislang nur ein Mitglied identifiziert, das Smad4, es gilt als gemeinsamer Bindungspartner für alle R-Smads. Die inhibitorischen Smads, Smad6 und Smad7, wirken als Antagonisten, indem sie mit den signaltransduzierenden R- und Co-Smads um die Bindung an den aktivierten Typ I Rezeptor konkurrieren (Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997).

Eine hoch konservierte Struktur in Smad-Proteinen sind die MH1- und MH2-Domänen (*mad homology domains*). Die MH1-Domäne befindet sich im N-terminalen Bereich von R-Smads und Co-Smads, nicht jedoch in inhibitorischen Smads und besitzt DNA-bindende Eigenschaften (Shi et al., 1998).

Die MH2-Domäne, am C-terminalen Ende gelegen, ist für die Interaktion mit Proteinen und die Transkriptionskontrolle von Bedeutung (Massague, 1998). Beide Domänen sind durch eine variable *Linker*-Region miteinander verbunden. Im basalen Status inhibieren sich die MH1- und MH2-Domänen gegenseitig (Hata et al., 1997). Diese Hemmung wird jedoch durch die ligandengesteuerte Phosphorylierung der R-Smads aufgehoben (Massague, 1998).

1.1.5 Signaltransduktion durch Smad-Proteine

Nach der Phosphorylierung der R-Smads durch die aktivierte TGF- β -Typ I-Rezeptor-Kinase formen die R-Smads über ihre MH2-Domänen Komplexe mit dem Co-Smad Smad4 und wandern in den Nukleus. Dort können die Smad-Komplexe direkt oder indirekt über andere DNA-bindende Proteine an bestimmte Zielsequenzen der DNA binden, die in der Regel eine CAGAC-Sequenz oder ähnliche G/C-reiche Sequenzen besitzen, und so die Transkription beeinflussen. An jedem dieser Schritte können verschiedene Faktoren regulierend auf die Smad-Aktivität einwirken.

Smad anchor for receptor activation (SARA) ist ein Smad-interagierendes Protein, das im basalen Status ein Zurückhalten von Smad2 im Zytoplasma bewirkt. Durch die Phosphorylierung von Smad2 wird dessen Affinität für SARA vermindert und der Kernimport ermöglicht (Xu et al., 2000). Smad4 besitzt ebenso eine intrinsische, Agonisten-unabhängige Kernimportfunktion, wird aber im basalen Status durch ein Exportsignal aus dem Kern ferngehalten (Watanabe et al., 2000). Das *T β RI-associated protein-1* (TRAP-1) hilft bei der Rekrutierung von Smad4 und bringt es in die Nähe des T β RI/T β RII-Rezeptorkomplexes (Wurthner et al., 2001).

Aktiviert R-Smad/Smad4-Komplexe, die den Kern erreichen, besitzen allein oft nur eine geringe Affinität gegenüber den Zielsequenzen. Andere Faktoren sind daher notwendig, um eine selektive Bindung des Komplexes an die Zielgene zu erreichen. Die Tatsache, dass solche Faktoren in unterschiedlichen Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert sind, liefert die Grundlage für die vielfältigen, zelltypspezifischen Antwortmöglichkeiten auf TGF- β -Signale (Chen et al., 1997; Hata et al., 2000). Als akzessorische Proteine, die bei der Zusammensetzung des Transkriptions-Initiationskomplexes und zur verstärkten Transkription Smad-regulierter Gene beitragen, sind beispielsweise DNA-bindende Adaptoren wie der *forkhead activin signal transducer-1* (FAST-1) und *Mixer* beschrieben worden (Chen et al., 1996; Germain et al., 2000). Ein wichtiger Co-Aktivatoren stellt CBP/p300 dar (Yingling et al., 1997; Janknecht et al., 1998). Neben diesen Co-Aktivatoren existieren auch Co-Repressoren, wie der *TG3-interacting factor* (TGIF), das *Sloan-kettering Institute proto-oncogen* (Ski) und das *Ski-related novel gene N* (SnoN) (Wotton et al., 1999; Sun et al., 1999; Luo et al., 1999). Diese Proteine binden und aktivieren direkt oder indirekt Histon-Deacetylasen und verursachen somit eine Kondensation des Chromatins an den Zielgenpromotoren. Ski und SnoN werden durch Stimulation mit TGF- β schnell degradiert, später erhöht sich ihr Level wieder, wodurch ihre Funktion vermutlich darin besteht, die Smad-Aktivität im basalen Status gering zu halten und die Smad-abhängige Genregulation zeitlich verzögert wieder abzuschalten. TGIF dagegen wird durch TGF- β induziert und scheint vielmehr die Amplitude der transkriptionellen Antwort zu begrenzen (Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999).

Die Menge an verfügbaren R-Smads kann durch die Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2 (*Smad-ubiquitination-regulatory factor*) reguliert werden. Diese Faktoren haben eine antagonistische Wirkung, indem sie die R-Smads ubiquitinieren und sie somit der proteasomalen Degradation zuführen (Zhu et al., 1999; Arora und Warrior, 2001).

1.1.6 Smad-unabhängige Signaltransduktion

Die TGF- β vermittelte Signaltransduktion kann auch unabhängig von der Aktivierung von Smad-Proteinen erfolgen. Dabei spielt vor allem die Familie der MAP (*mitogen activated protein*) Kinasen eine wichtige Rolle. Zu den Unterfamilien der MAP-Kinasen, die durch TGF- β aktiviert werden zählen die ERK- (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK- (*Jun N-terminal kinase*) und p38-MAP-Kinase (Derynck und Zhang, 2003). Eine Aktivierung mit langsamer Kinetik kann ein Ergebnis der Smad-abhängigen Transkription sein, jedoch spricht die beobachtete Aktivierung innerhalb von fünf bis 15 Minuten für einen anderen Signalweg, der nicht auf den Weg über den Zellkern angewiesen ist (Massague und Chen, 2000). Versuche mit Smad4-defizienten Zellen oder dominant-negativen Smads

demonstrieren, dass die Aktivierung der JNK durch TGF- β , unabhängig von den Smad-Proteinen ist (Engel et al., 1999).

Neben Smad-unabhängigen Effekten können die MAPK-Signaltransduktoren auch wieder mit den Smad-Proteinen zusammenwirken, indem sie R-Smads phosphorylieren und somit deren Aktivität regulieren (Kretzschmar et al., 1999; Engel et al., 1999; Funaba et al., 2002). Zusätzlich kann die MAPK-Aktivierung direkte Effekte auf Smad-interagierende Transkriptionsfaktoren ausüben und somit die TGF- β vermittelte Transkription regulieren oder, je nach Zellkontext, den Smad-Signalweg negativ beeinflussen (Bakin et al., 2002; Yu et al., 2002). Umgekehrt haben auch die Smads regulatorischen Einfluss auf die MAPK, so kann z.B. Smad7 die Aktivierung der JNK verstärken (Mazars et al., 2001).

In Abhängigkeit von der Zelllinie kann TGF- β kleine Rho-GTPasen wie RhoA, Rac und Cdc42 aktivieren (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002).

Rac und Cdc42 können ihrerseits wieder die Aktivierung von JNK- und p38-MAPK-Signalwegen regulieren (Derynck und Zhang, 2003). Die GTPasen sind außerdem an der TGF- β induzierten Epithel-Mesenchym-Transformation beteiligt, indem sie Veränderungen in der Organisation des Zytoskeletts vermitteln (Yu et al. 2002; Bhowmick et al., 2001). Des Weiteren können die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) mit ihrem Effektor Akt (Bakin et al., 2000) und der PP2A/p70^{S6K}-Signalweg durch TGF- β aktiviert werden.

Die Abbildung 1 gibt eine vereinfachte Übersicht über die Smad-abhängige und Smad-unabhängige TGF- β -Signaltransduktion wieder.

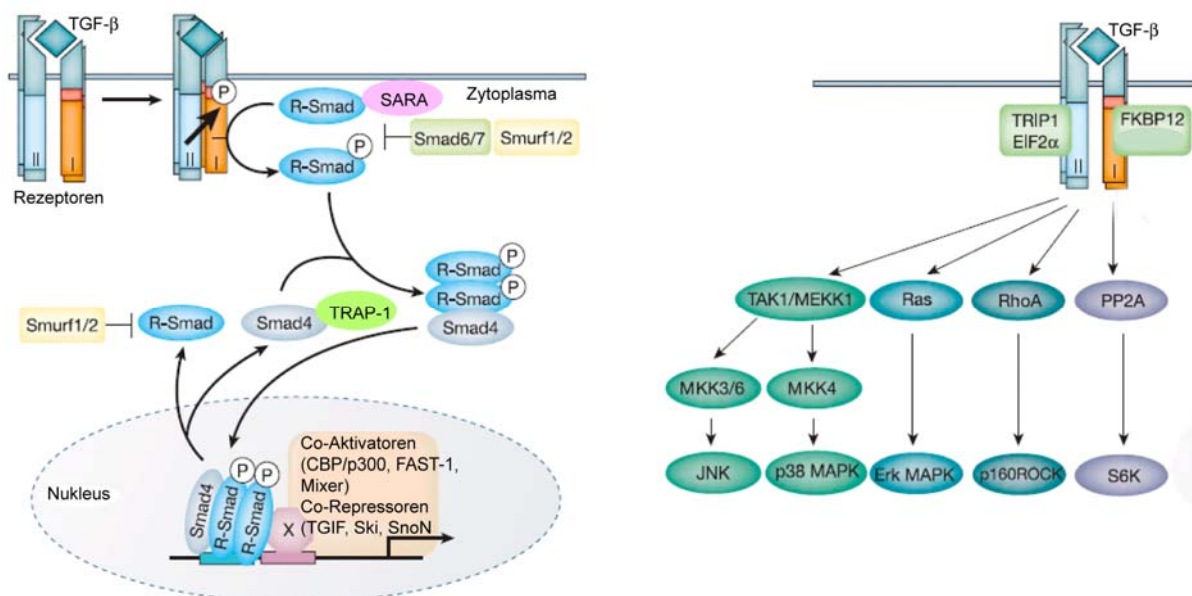


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Smad-abhängigen und die Smad-unabhängigen Signaltransduktionswege (modifiziert nach Derynck und Zhang, 2003)

1.1.7 Expression von TGF- β und deren Rezeptoren im Nervensystem

Im sich entwickelnden Zentralnervensystem (ZNS) werden alle drei TGF- β -Isoformen exprimiert. Während TGF- β 2 und TGF- β 3 weit verbreitet sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen anzutreffen und meist co-exprimiert sind, findet sich die Expression von TGF- β 1 im intakten, unverletzten Nervensystem überwiegend in den Meningen und im Plexus choroideus (Flanders et al., 1991). Es gibt aber auch Hinweise auf die Expression von TGF- β 1 in proliferativen Regionen während der Cortexentwicklung sowie in der gesamten kortikalen Platte (Miller, 2003).

Immunreaktivität von TGF- β 2 und 3 wurde während der Embryonalentwicklung der Maus zuerst ab E12,5 in radialen Gliazellen und ab E15 auch in Neuronen und Gliazellen des Gehirns und Rückenmarks gefunden (Flanders et al., 1991).

Die zur Signalübertragung erforderlichen Rezeptortypen T β RI und T β RII sind im ZNS ebenfalls ubiquitär vorhanden. Die mRNA des T β RII konnte bereits ab E12,5 im Neuroepithel nachgewiesen werden (Falk et al., 2008) und wird auch nachfolgend im Cortex, Mittelhirn, Cerebellum, Hirnstamm und Hippokampus in einer Vielzahl von Zellen wie Neuronen, Astroglia, Mikroglia, Endothelzellen und anderen nicht-neuronalen Zellen wie jenen des choroidalen Plexus exprimiert (Böttner et al., 1996; Morita et al., 1996; Ata et al., 1999; de Groot et al., 1999). T β RI und T β RII werden auch von radialen Gliazellen exprimiert (Galter et al., 1999; Miller, 2003), was auf eine mögliche Bedeutung des TGF- β -Systems für diesen Zelltyp hindeutet, der inzwischen während der Gehirnentwicklung als Stamm- oder Vorläuferzelle für neurale Zellen identifiziert wurde (Malatesta et al., 2003).

Im adulten System sind TGF- β 2 und TGF- β 3 in allen Arealen des ZNS weit verbreitet und werden gleichfalls sowohl von Gliazellen als auch von Neuronen exprimiert (Flanders et al., 1998; Böttner et al., 2000; Unsicker und Strelau, 2000). TGF- β 1 ist auch hier überwiegend in den Meningen und im Plexus choroideus zu finden, allerdings wird es nach Verletzungen des ZNS auch von astroglialen, mikroglialen und neuronalen Zellen verstärkt exprimiert (Flanders et al., 1991; Unsicker et al., 1991; Constam et al., 1992; Zhu et al., 2000; Unsicker und Krieglstein, 2002).

1.1.8 Funktionen von TGF- β im Nervensystem

Ebenso wie in anderen Organsystemen sind auch die Wirkungen von TGF- β auf das Nervensystem vielfältig und stark vom jeweiligen molekularen Kontext abhängig.

So kann TGF- β einerseits das Überleben von Neuronen fördern und sie gegenüber neurotoxischen Substanzen schützen (Krieglstein et al., 1995a; Krieglstein et al., 1995b;

Krieglstein und Unsicker, 1994; Krieglstein und Unsicker, 1996), aber auch Apoptose fördern (Krieglstein, 2006; Krieglstein et al., 2000). Die neurotrophen Wirkungen von TGF- β beruhen dabei häufig auf einem synergistischen Zusammenwirken mit anderen neurotrophen Faktoren. So konnte gezeigt werden, dass TGF- β für die neurotrophe Wirkung von GDNF auf periphere und zentrale dopaminerge Neurone essentiell ist (Krieglstein et al., 1998b). Des Weiteren moduliert TGF- β als wichtiger Co-Faktor die neurotrophe Wirkung von CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) und FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) in Neuronen des Ganglion ciliare (Krieglstein et al., 1998a) und von Neurotrophin (NT)-3 und NT-4 in Hinterwurzel-Neuronen (Krieglstein und Unsicker, 1996). In TGF- β 1-deletierten (TGF- β 1 (-/-)) neonatalen Mäusen kommt es zu einer vermehrten Degeneration von Neuronen und heterozygote (TGF- β 1 (+/-)) Tiere zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber neurotoxischen Stimuli, während die astrogliale Überexpression von TGF- β die Neurone vor Degeneration nach akuten, chronischen und exzitotoxischen Verletzungen schützt (Brionne et al., 2003).

TGF- β kann außerdem die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Zellen beeinflussen. So wurde eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Astrozyten (Lindholm et al., 1992; Morganti-Kossmann et al., 1992; Rich et al., 1999) und Mikroglia (Suzumura et al., 1993) beschrieben. Dabei konnte TGF- β die Proliferationsrate entweder unmittelbar beeinträchtigen oder aber die wachstumsfördernde Wirkung von FGF, EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) und Interleukin2 antagonisieren (Hunter et al., 1993; Vergeli et al., 1995). Darüber hinaus wurden auch Hinweise auf eine differenzierungsfördernde Wirkung auf Astrozyten gefunden (de Sampaio e Spohr et al., 2002; Sousa Vde et al., 2004).

Eine anti-proliferative Wirkung von TGF- β konnte ebenso für kultivierte fötale cortikale (Miller und Luo, 2002), postnatale cerebelläre (Constam et al., 1994) und retinale (Close et al., 2005) Vorläufer und Neuroblasten gezeigt werden.

Der Wnt-1 induzierte konditionale Verlust des T β RII in der Maus führt spezifisch im dorsalen Mittelhirn zu einer erhöhten Zellproliferation neuroepithelialer Zellen (Falk et al., 2008). Ebenso im Mittelhirn kann TGF- β eine differenzierende Wirkung auf Progenitoren ausüben und fördert dort sowohl die Entstehung von Neuronen als auch die Ausbildung eines dopaminergen Phänotyps. Dies konnte sowohl *in vitro* an dissoziierten Kulturen des Mittelhirns von E12,5 Ratten und *in vivo* an frühen Hühnchenembryonen beobachtet werden, wo eine Neutralisation von TGF- β zu einem Verlust ventraler dopaminerge Neurone führte (Farkas et al., 2003). In Neurosphaeren, generiert vom ventralen oder dorsalen Mittelhirn aus E12,5 Mäuseembryonen führt eine Behandlung mit TGF- β ebenso zur Entstehung dopaminerge Neurone. In diesem Kontext induziert TGF- β die Differenzierung, beeinflusst jedoch nicht die Proliferation der Progenitoren (Roussa et al., 2006).

Über die Wirkung von TGF- β auf adulte neuronale Stammzellen des Hippokampus existieren kontroverse Daten, während Wachs et al. (2006) eine Inhibierung der Neurogenese *in vitro* und *in vivo* nach intracerebroventrikulärer Infusion von TGF- β beschreiben, berichten Battista et al. (2006) von einer verstärkten Neurogenese in TGF- β behandelten, adulten neuronalen Stammzellen *in vitro* und in adrenaletomisierten Ratten *in vivo*, bei denen die erhöhte Expression von TGF- β mit einer vermehrten Neurogenese korrelierte.

Die antiproliferativen Eigenschaften von TGF- β auf viele Zelltypen werden vermutlich über eine vermehrte Expression der *cyclin dependent kinase inhibitors* (CDKIs), hauptsächlich p15INK4B und p21CIP1, vermittelt (Datto et al., 1995; Hannon et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995). CDKIs bewirken eine Arretierung des Zellzyklus, indem sie mit den *cyclin dependent kinases* (CDKs) interagieren, welche für die Progression des Zellzyklus wichtig sind. p21CIP1 interagiert mit CyclinE/CDK2 Komplexen und inhibiert so die CDK2-Aktivität und die Progression des Zellzyklus in der G1-Phase (Massague et al., 2000; Reynisdottir et al., 1995). Dagegen kann p15INK4B sowohl CDK4 und CDK6 direkt inhibieren, als auch mit deren Komplexen mit CyclinD assoziieren. Im letzteren Fall inaktiviert dies nicht nur die katalytische Aktivität der CDKs, sondern verdrängt gebundenes p21CIP1 oder p27KIP1 aus der Bindung an CDK4 oder CDK6. Dies führt über eine einfache stöchiometrische Verschiebung zu einer vermehrten Inhibition von CDK2, welches dann in fast vollem Umfang inhibiert ist, und die Progression des Zellzyklus so unterbindet (Massague et al., 2000; Reynisdottir et al., 1995; Sandhu et al., 1997).

Auch in neuronalen Progenitoren konnte ein Zusammenhang zwischen Zellzyklusarrest und verstärkter Expression des CDKI p21CIP1 beobachtet werden. So führte eine Behandlung mit TGF- β in kortikalen neuroepithelialen Kulturen von E10,5 Mäusen (Seoane et al., 2004) und in organotypischen Schnittkulturen des Cortex von E16,5 Ratten (Siegenthaler und Miller, 2005) sowohl zu einer Arretierung des Zellzyklus als auch zu einer Hochregulation von p21Cip1.

Auf welche Weise TGF- β seine differenzierungsfördernden Wirkungen entfalten kann, ist dagegen noch unklar. Es ist aber anzunehmen, dass dies ebenfalls durch die Regulation von Zielgenen geschieht und spezifisch für den jeweiligen zellulären Kontext ist.

1.2 Neurogenese im Telencephalon

Die Neurone des zentralen Nervensystems entstehen während der Embryonalentwicklung aus einer einschichtigen Zelllage neuroektodermaler Zellen, welche die Wand des Neuralrohrs formen und als Neuroepithel bezeichnet werden. Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird das Neuroepithel zu einem mehrschichtigen Gewebe, dessen innerste Schicht die Ventrikularzone bildet und die primäre proliferative Zone im Neuroepithel

darstellt. Ausgehend von diesen Neuroepithelzellen entwickeln sich die Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in zeitlich koordinierter Reihenfolge, wobei zuerst Neurone, dann Astrozyten und zuletzt Oligodendrozyten entstehen (Bayer und Altmann, 1991; Sauvageot und Stiles, 2002). Im Cortex der Maus werden Neurone hauptsächlich zwischen dem Embryonaltag 10 (E10) und E17 gebildet, während die ersten Astrozyten etwa ab E16 erscheinen und den Höhepunkt ihrer Entwicklung in den ersten Tagen nach der Geburt erreichen. Differenzierte Oligodendrozyten werden dagegen erst postnatal beobachtet (Altmann und Bayer, 1991) (Abbildung 2A). Diese Abfolge kann auch an kultivierten Zellen beobachtet werden. Primäre cortikale Zellen aus E10-E12 Embryonen generieren in den ersten Tagen *in vitro* ausschließlich Neurone, gefolgt von der sequenziellen Generierung von Astrozyten und Oligodendrozyten bei fortgesetzter Kultivierungsdauer (Qian et al., 2000) (Abbildung 2B). Diese Beobachtung spricht dafür, dass ein intrinsisches Programm die zeitliche Differenzierung der Progenitoren steuert. Experimente mit Co-Kulturen, in denen multipotente Progenitoren unterschiedliche Zellschicksale annehmen, je nachdem ob sie dem neurogenen Milieu embryonaler cortikaler *Explants* oder dem gliogenen Milieu postnataler cortikaler *Explants* ausgesetzt waren, legen jedoch nahe, dass auch extrinsische Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, eine Rolle bei der Festlegung des Zellschicksals spielen (Morrow et al., 2001).

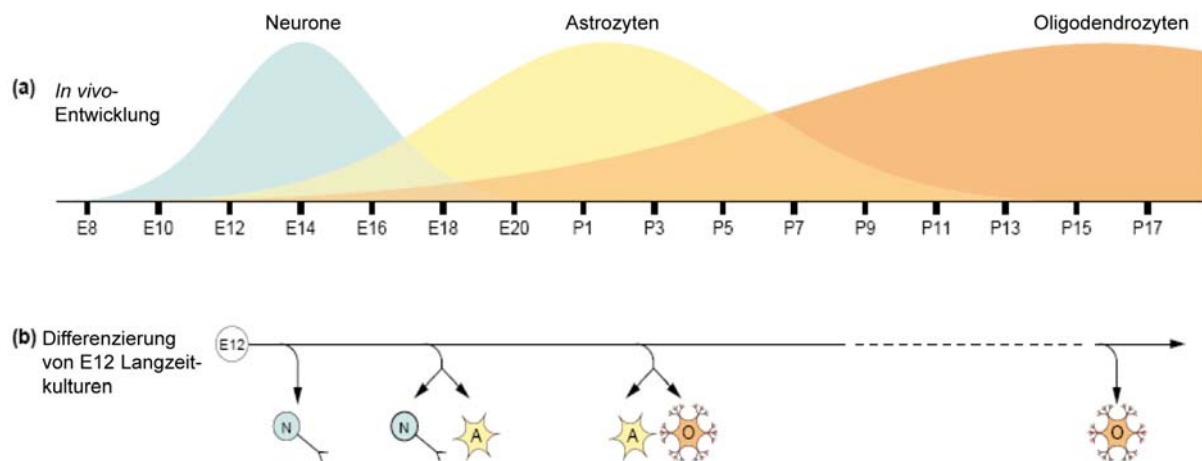


Abbildung 2: Die Entwicklung cortikaler Progenitoren erfolgt in einer zeitlich koordinierten Abfolge (modifiziert nach Sauvageot und Stiles, 2002)

(A) In vivo werden Neurone hauptsächlich zwischen E10 und E17, Astrozyten zwischen E16 und der ersten postnatalen Woche gebildet. Die Generierung von Oligodendrozyten erreicht ihr Maximum in der späteren postnatalen Entwicklung

(B) Kultivierte Progenitoren isoliert aus dem Cortex von E12 Mäuseembryonen zeigen eine analoge zeitliche Reihenfolge in der Differenzierung von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, was auf das Vorhandensein intrinsischer Faktoren hindeutet, die das Zellschicksal bestimmen.

1.2.1 Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen und die verschiedenen Typen ihrer Zellteilung

Im Telencephalon läuft die Differenzierung neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen zu Neuronen in mehreren Phasen ab, wobei verschiedene Populationen von Progenitoren beteiligt sind: die Neuroepithelzellen, die auch als Stammzellen bezeichnet werden, die Radialglia und die basalen Progenitoren (Götz und Huttner, 2005). In der ersten Phase werden durch symmetrische, proliferierende Teilungen aus einer Neuroepithelzelle zwei neuroepitheliale Tochterzellen gebildet, die anschließend wieder in den Zellzyklus eintreten. In dieser Phase kommt es also zu einer Expansion des Pools an Vorläuferzellen. In der zweiten Phase gehen Neuroepithelzellen von der Proliferation zur Neurogenese über. Dabei kommt es zu einem Wechsel von den symmetrisch-proliferierenden Zellteilungen zu asymmetrisch-differenzierenden Teilungen. Hierbei wird neben einer Neuroepithel-Tochterzelle auch eine stärker differenzierte Zelle wie eine pluripotente Vorläuferzelle ohne Stamzellcharakter oder ein postmitotisches Neuron generiert. Die Zahl an Neuroepithelzellen bleibt konstant, während die an Neuronen ansteigt. Die pluripotenten Vorläuferzellen können sich ebenfalls wieder auf selbsterneuernde Weise asymmetrisch-differenzierend teilen oder sie gehen symmetrisch-differenzierende Teilungen ein, wobei z.B. zwei Neurone entstehen. Dabei wird die Population an Progenitoren aufgebraucht.

Radiale Gliazellen stellen solche pluripotenten Vorläuferzellen dar, die nach und nach die Neuroepithelzellen ersetzen und sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorbringen können. Die Radialglia teilen sich an der apikalen Oberfläche des Ventrikels des Telencephalons und generieren direkt oder indirekt die meisten Neurone des Gehirns. Sie zeichnen sich durch die Expression einiger astroglia-typischer Moleküle aus, wie dem astrozyten-spezifischen Glutamattransporter GLAST, dem Ca^{2+} -bindenden Protein S100 β , GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), Vimentin und BLBP (*brain-lipid-binding protein*), darüber hinaus exprimieren sie den neuroepithelialen Marker Nestin (Götz und Huttner, 2005).

Die basalen Progenitoren stellen vermutlich einen noch stärker spezifizierten Vorläuferzelltyp dar. Sie gehen aus Mitosen von Neuroepithelzellen und radialen Gliazellen hervor. Im Gegensatz zu den Radialglia teilen sich die basalen Progenitoren an der basalen Seite der Ventrikularzone, wo sich eine zweite proliferative Zone, die Subventrikularzone (SVZ) bildet (Campbell und Götz, 2002). Basale Progenitoren unterscheiden sich von Neuroepithelzellen und Radialglia durch die Expression verschiedener Gene, wie z.B. der Transkriptionsfaktoren Tbr2, Cux1 und Cux2 sowie der nicht kodierenden RNA Svet1 (Götz und Huttner, 2005). Bei der Beteiligung von basalen Progenitoren an der Neurogenese kann man anstatt der asymmetrisch-neurogenen Zellteilungen genauer von asymmetrisch-differenzierenden Teilungen sprechen, da aus einer Vorläuferzelle (Neuroepithelzelle oder Radialglia) zwei

Vorläuferzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad hervorgehen (z.B. eine radiale Gliazelle und ein basaler Progenitor) Die basalen Progenitoren erzeugen dann in symmetrisch-neurogenen Teilungen ausschließlich Neurone. Abbildung 3 gibt eine schematische Übersicht über die auftretenden Zellteilungen während der Entwicklung des Cortex mit (A) und ohne (B) Beteiligung der basalen Progenitoren.

Wie der Wechsel von symmetrischen zu asymmetrischen Teilungen zustande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Während der Neurogenese von *Drosophila* wird der Wechsel des Zellschicksals durch eine wesentliche Änderung der Orientierung der Teilungsebene, nämlich von vertikal zu horizontal, verursacht (Matsuzaki, 2000; Knoblich, 2001; Wodarz und Huttner, 2003).

Ähnliches wurde auch im embryonalen Gehirn von Säugern beobachtet (Smart, 1973; Landrieu and Goffinet, 1979; Heins et al, 2001). Während eine vertikale Teilungsebene die gleiche Verteilung der unterschiedlichen apikalen und basolateralen Zellbestandteile auf beide Tochterzellen gewährleistet, erbt bei einer horizontalen Teilungsebene nur eine der Tochterzellen alle apikalen Komponenten einschließlich der Zell-Zell-Kontakte und bleibt daher Progenitor. Allerdings sind horizontale Teilungsebenen in Neuroepithelzellen von Säugern, im Gegensatz zu Neuroblasten in *Drosophila*, selten und nur für einen sehr geringen Teil der asymmetrisch-neurogenen Zellteilungen verantwortlich. Vielmehr führt bereits eine geringfügige Abweichung der Teilungsebene von der vertikalen Orientierung dazu, dass eine der beiden Tochterzellen keine apikalen Komponenten und Zell-Zell-Kontakte erbt und Neuron wird (Kosodo et al., 2004).

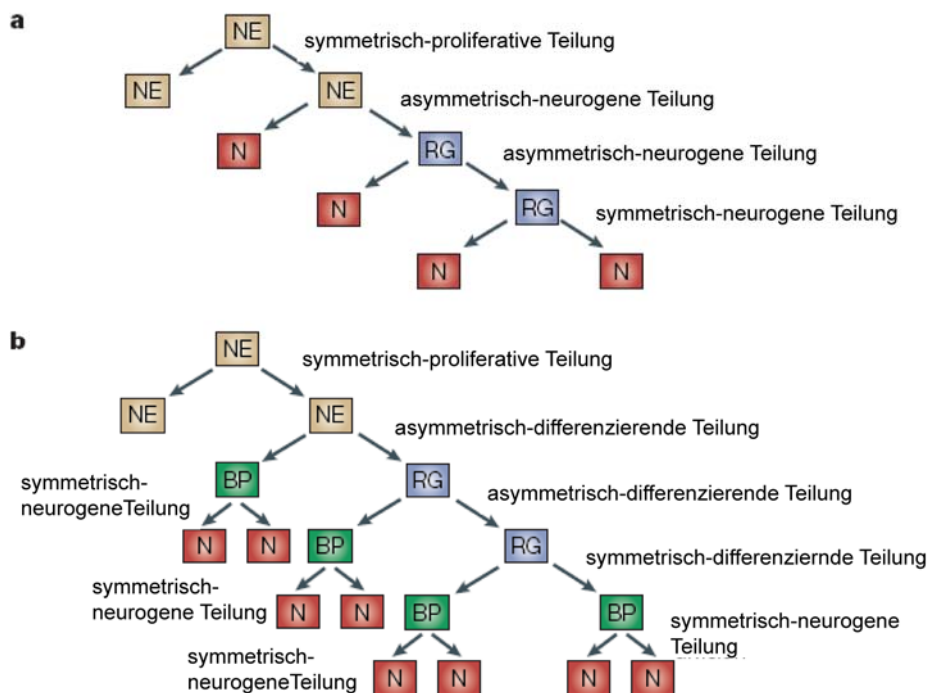


Abbildung 3: Typen der Zellteilung während der Neurogenese (modifiziert nach Götz und Huttner, 2005)

(A) Bei der symmetrisch-proliferativen Teilung erzeugt eine Neuroepithelzelle zwei neue Epithelzellen und erweitert somit den Stammzellenpool. Die asymmetrisch-neurogene Zellteilung führt zur Bildung eines Neurons und einer weiteren Vorläuferzelle, die aber nicht mehr über den Stammzellencharakter der Neuroepithelzellen verfügt. Die symmetrisch-neurogene Teilung führt zur Bildung von zwei Neuronen.

(B) Unter der Annahme der Beteiligung von basalen Progenitoren kann man statt der asymmetrisch-neurogenen Teilung eher von asymmetrisch-differenzierenden Teilungen sprechen, bei denen aus einer Vorläuferzelle zwei Vorläuferzelltypen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad entstehen. Basale Progenitoren erzeugen durch symmetrisch-neurogene Zellteilungen ausschließlich Neurone. N: Neuron, NE: Neuroepithelzelle, RG: Radialglia, BP: basaler Progenitor

Nach dem Austritt aus dem Zellzyklus wandern die neugeborenen Neurone aus der Ventrikularzone aus und migrieren in radialer Richtung zu ihrem Zielort im Cortex. Radiale Gliazellen, die die cortikale Schicht durchziehen, dienen dabei als Gerüst und unterstützen die Migration der Neurone (Schmechel und Rakic, 1979).

Die neugeborenen Neurone und neuronalen Vorläuferzellen migrieren in der Reihenfolge, in der sie generiert werden. Die erstgeborenen Neurone bilden etwa ab E11 die *Preplate*. Eine darauf folgende Welle migrierender Zellen ab etwa E13 teilt die *Preplate* in zwei Schichten: die oberhalb gelegene Marginalzone, welche die ersten sich differenzierenden Neurone, die Cajal-Retzius-Zellen, enthält, und die darunter liegende *Subplate*.

Neuronale Vorläuferzellen, die die tieferen Schichten des Cortex bilden, werden früher geboren, als solche, die oberflächennahe Schichten bilden. Später geborene Zellen durchwandern die früher gebildeten Schichten in einem so genannten *Inside-out*-Mechanismus (Gillies und Price, 1993). Im adulten Zustand besteht der Cortex aus sechs Schichten, von denen jede Schicht Neurone mit bestimmten Eigenschaften enthält, die sich anhand ihrer Morphologie, ihrer Projektionsmuster, ihres Neurotransmitter-Phänotyps und ihres Genexpressionsmusters unterscheiden (Guillemot et al., 2006). Die Neurone der tieferen Schichten V und VI werden zwischen E10 und E14 der Embryonalentwicklung gebildet, während Progenitoren nach E14,5 Neurone der oberen cortikalen Schichten IV, III und II hervorbringen (McConnell, 1988). Am Zeitpunkt E16,5 ist die Wanderung der neugeborenen Neurone in die unteren Schichten V und VI bereits zum größten Teil abgeschlossen. Die Bildung der oberen Schichten setzt sich dagegen noch bis in frühe postnatale Phasen fort. Dabei wird das Potential der Progenitoren in der Ventrikularzone, die verschiedenen neuronalen Subtypen hervorzubringen, mit fortschreitender Entwicklung mehr und mehr begrenzt (Frantz und McConnell, 1996).

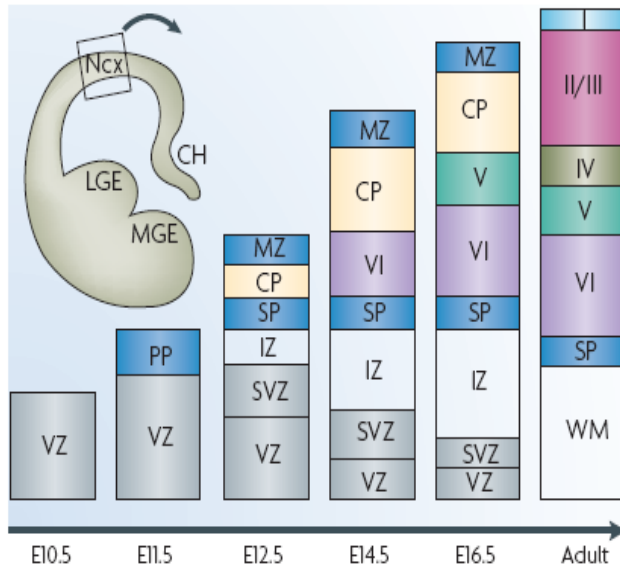


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtenbildung im Cortex (aus Molyneaux et al., 2007)

Die zuerst geborenen Neurone bilden die *Preplate* (PP), welche später in die *Marginalzone* (MZ) und die darunter liegende *Subplate* (SP) geteilt wird. Die *corticale Platte* (CP), aus der die Schichten des Cortex hervorgehen, entwickelt sich zwischen diesen beiden Schichten, indem die später geborenen Neurone durch die Schichten der früher geborenen Neurone hindurchwandern. CH: *cortical hem*; Ncx: *Neocortex*; IZ: *Intermediärzone*; LGE: *lateral ganglionic eminence*; MGE: *medial ganglionic eminence*; SVZ: *Subventrikularzone*; VZ: *Ventrikularzone*; WM: *Weißer Substanz*

1.2.2 Einfluss intrinsischer Faktoren auf die Neurogenese kortikaler Stamm- und Vorläuferzellen

Die Differenzierung von Stammzellen zu neuronal-spezifizierten Progenitoren erfordert ein hoch koordiniertes transkriptionelles Programm. Dabei spielen proneurale bHLH- (*basic helix loop helix*) Faktoren, wie Mash1, Math1 und Neurogenin 1 und 2 (Ngn1/2) eine zentrale Rolle.

Klonale Analysen *in vitro* haben gezeigt, dass die proneuralen Gene eine Restriktion der Progenitoren auf die neuronale Linie und eine Inhibierung des alternativen astroglialen Schicksals bewirken (Nieto et al., 2001; Parras et al., 2004). Außerdem können unterschiedliche proneurale Gene Einfluss auf die Spezifizierung bestimmter neuronaler Subtypen nehmen (Bertrand et al., 2002).

Die wichtige Bedeutung von proneuralen Genen für die Spezifizierung von neuronalen Stammzellen konnte durch die Analysen von *Gen-Knock-out* Modellen in der Maus unterstützt werden. *Mash1*-deletierte Mäuse weisen einen Verlust GABAerger Interneurone im Telencephalon auf (Casarosa et al., 1999). In Einzel- oder Doppel-Mutanten für *Ngn1* und *Ngn2* kommt es zu schweren Defekten im neuronalen Differenzierungsprogramm und einem Verlust korrekt spezifizierter neuronaler Vorläuferzellen, die dadurch verfrüht in Gliazellen differenzieren (Fode et al., 2000; Nieto et al., 2001; Sun et al., 2001). Neben Mash1 und Ngn1/2, die auch als Determinierungsfaktoren bezeichnet werden, existieren weitere Mitglieder der bHLH-Familie, die spätere Prozesse der neuronalen Differenzierung steuern, wie NeuroD1, NeuroD, Math2 und Math3. Sie werden zeitlich verzögert nach den proneuralen Genen in postmitotischen Neuronen exprimiert.

Die Aktivität der proneuralen Gene kann durch zahlreiche Faktoren inhibiert werden, was dazu führt, dass die Progenitoren in einem undifferenzierten Status gehalten werden. Hes-Proteine, die als Zielgene des Notch-Signalweges fungieren, inhibieren die Neurogenese durch Repression der proneuralen Gentranskription (Kageyama und Ohtsuka, 1999). Ebenso als transkriptioneller Repressor inhibiert REST/NRSF (*neuron-restrictive silencer factor/RE1 silencing transcription factor*) die Expression von Mash1 und der Übergang von neuronalen Stammzellen zu Neuronen erfordert die Degradation von REST/NRSF (Ballas et al., 2005). Andere Faktoren inhibieren die Neurogenese, indem sie die Aktivität von proneuralen Proteinen blockieren. Id-Proteine sind strukturverwandt mit bHLH Transkriptionsfaktoren, sie besitzen ebenso eine HLH-Domäne, es fehlt ihnen jedoch die basische DNA-Bindungsdomäne. Sie stören die Aktivität von proneuralen bHLH-Proteinen, indem sie an deren Bindungspartner, die E-Proteine, binden und sie an der Kontaktierung ihrer Ziel-DNA hindern (Benezra et al., 1990).

Der Zellzyklusregulator und Determinierungsfaktor Geminin inhibiert die Interaktion der proneuralen Proteine mit Brg1 und blockiert so deren Aktivität (Seo et al., 2005). Auch Sox-Gene der B1-Gruppe wie Sox1, Sox2 und Sox3 spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status von Stammzellen, indem sie die Funktion von proneuralen Proteinen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus hemmen (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003).

Die bHLH Proteine sind jedoch nicht die einzigen Faktoren, die Neurogenese in multipotenten Progenitoren instruieren. Ein anderes wichtiges Molekül in diesem Zusammenhang ist der Transkriptionsfaktor Pax6. Ein Verlust der Pax6 Funktion führt zu einer reduzierten Zahl von kortikalen Neuronen (Hack et al., 2005; Heins et al., 2002). Dabei fördert Pax6 die Neurogenese zumindest zum Teil durch die direkte Aktivierung der Transkription von Ngn2. Es wurden aber wichtige Unterschiede zwischen der Funktion von Pax6 und den proneuralen Genen beobachtet, so dass Pax6 auch über Ngn2-unabhängige Mechanismen zu agieren scheint. In *Pax6 (-/-)* Mutanten kommt es zwar zu einer reduzierten Neurogenese, nicht aber zu verstärkter Generierung von Astrozyten, wie in *Ngn2*-deletierten Mäusen. Auch kann Pax6 die Neurogenese in postnatalen Astrozyten induzieren, während bHLH Proteine dazu nicht in der Lage sind (Heins et al., 2002).

1.2.3 Einfluss extrinsischer Faktoren auf die Neurogenese kortikaler Stamm- und Vorläuferzellen

Die Entwicklung neuraler Progenitoren wird zudem von zahlreichen Faktoren beeinflusst, die von außen auf die Zellen einwirken und verschiedene Signalwege aktivieren oder deaktivieren können. Dabei kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel der einzelnen

Signalwege und die Selektion eines bestimmten Zellschicksals resultiert aus der Integration der verschiedenen Signale.

Ein wichtiger Signalweg, involviert in die Steuerung der Neurogenese, ist der Wnt-Signalweg. Dabei können Wnt-Signale zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung gegensätzliche Auswirkungen haben. In einem frühen Stadium der kortikalen Entwicklung fördern Wnt-Signale die Proliferation von Progenitoren. Die Überexpression einer dominant-aktiven Form von β -Catenin, dem zentralen Effektormolekül des kanonischen Wnt-Signalweges, führt zu einer Überproduktion von kortikalen Progenitoren (Chenn und Walsh, 2003), während der Verlust von β -Catenin im Cortex eine Reduzierung der Progenitoren zur Folge hat (Zechner et al., 2003; Backmann et al., 2005). Ein möglicher Mediator der proliferativen Wirkung von Wnt-Signalen im Cortex ist der Transkriptionsfaktor Emx2 (Muzio et al., 2005)

Im Gegensatz dazu können Wnt-Signale zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung (nach E13,5) die Neurogenese fördern. Die Überexpression von Wnt7a oder eine stabilisierte Form von β -Catenin führen dann zu einem Zellzyklusarrest und zu neuronaler Differenzierung kortikaler Progenitoren, während die Expression von Wnt-Inhibitoren wie Axin und Dkk1 die Differenzierung verhindern (Hirabayashi et al., 2004). Vermutlich wird der positive Effekt der Wnt-Signale auf die Neurogenese durch direkte Induktion von Ngn1 und Ngn2 ausgelöst, denn aus *in vitro* Experimenten geht hervor, dass β -Catenin/Tcf-Komplexe die Promotoren von Ngn1 und 2 aktivieren können (Hirabayashi et al., 2004; Israsena et al., 2004) und in Mäusen mit kortikaler β -Catenin Deletion kommt es zum Verlust der Ngn2 Expression (Machon et al., 2003). Möglicherweise stimulieren Wnt-Signale im Zusammenwirken mit anderen Signalen wie *Sonic hedgehog* (Shh) und FGF2 die Transformation von Radialglia zu basalen Progenitoren, die darauf spezialisiert sind, Neurone zu generieren (Viti et al., 2003). Auch *in vitro* ist die neurogene Aktivität der Wnt-Signale auf späte kortikale Progenitoren beschränkt und führt in frühen Progenitoren (E10) zur Inhibierung der Differenzierung (Hirabayashi und Gotoh, 2005).

Dem Notch-Signalweg wird klassischerweise in erster Linie eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status der Progenitoren während der proliferativen Phasen der ZNS-Entwicklung zugeschrieben (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mizutani und Saito, 2005). In neuerer Zeit wurde jedoch deutlich, dass Notch-Signale komplexere Funktionen bei der neuralen Entwicklung haben, indem sie die Transformation von neuroepithelialen Progenitoren zu radialen Gliazellen und im weiteren Verlauf die Differenzierung von radialen Gliazellen zu Astrozyten unterstützen (Anthony et al., 2005; Gaiano et al., 2000). Dabei aktivieren Notch-Signale direkt die Expression des Radialglia-Markers BLBP.

Die Neurogenese wird auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst.

FGF2 hat eine grundlegende Funktion bei der Stimulierung der Proliferation telencephaler Progenitoren (Ghosh und Greenberg, 1995). EGF agiert ebenso als Mitogen für Progenitoren und erhält ihren multipotenten Status, indem es deren Determinierung auf neuronale und oligodendrogliale Schicksale blockiert (Burrows et al., 1997; Morrow et al., 2001).

Die Differenzierung zu Neuronen dagegen wird durch neurotrophe Faktoren wie NT-3, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und Wachstumsfaktoren wie PDGF gefördert (Ghosh und Greenberg, 1995; Menard et al., 2002; Barnabe-Heider und Miller, 2003)

PDGF fördert die Neurogenese *in vitro* durch die Aktivierung des MEK-ERK-C/EBP Signalweges (Menard et al., 2002). Cortikale Progenitoren exprimieren BDNF und NT-3 sowie deren Rezeptoren TrkB and TrkC, deren Funktion wichtig für das Überleben dieser Zellen ist und außerdem die Neurogenese stimulieren kann. Dabei sind zwei unterschiedliche Signalmechanismen beteiligt. Während die überlebensfördernde Funktion über die Aktivierung der PI3-Kinase verläuft, ist die Aktivierung des MEK-ERK Signalweges für die differenzierungsfördernde Wirkung verantwortlich (Barnabe-Heider und Miller, 2003) .

Andere Wachstumsfaktoren unterstützen eher die Differenzierung zu Gliazellen. CNTF und LIF (*leukemia inhibitory factor*) signalisieren dabei über den JAK-STAT Signalweg, der eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Astrozyten einnimmt (Bonni et al., 1997; Sauvageot und Stiles, 2002).

Für BMPs sind ebenso wie für Wnt- und Notch-Signale differenzielle Auswirkungen in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums beschrieben worden. So wurden fördernde Wirkungen auf die neuronale Differenzierung in frühen cortikalen *Explant*-Kulturen (E12-13 in der Maus) beobachtet (Li et al., 1998). In älteren Kulturen neuraler Vorläufer nach E14 dagegen induzieren BMP2 und BMP4 die Differenzierung zu Astrozyten und unterdrücken die alternative neuronale und oligodendrogliale Entwicklung (Gross et al., 1996; Nakashima et al., 2001). Die Inhibierung der Neurogenese durch BMP2 wird durch die Induktion der anti-neurogenen Transkriptionsfaktoren Id1, Id3 und Hes5 vermittelt (Nakashima et al., 2001).

1.2.4 Die Entwicklung des Hippokampus

Der Hippokampus nimmt im Telencephalon insofern eine Sonderstellung ein, da er eine größere Anzahl undifferenzierter Stammzellen bis in das Erwachsenenalter aufrecht erhält. Diese befinden sich in einer Region, die als Gyrus dentatus (DG) bezeichnet wird.

Während der Embryogenese entwickelt sich der Hippokampus ausgehend von der medialen Wand des dorsalen Telencephalons. Das Neuroepithel des DG wird durch einen besonderen Bauplan aufgebaut, der einzigartig im Nervensystem ist. Die Formierung des DG beginnt in der Maus etwa ab E15, dabei wird das Primordium des DG anfänglich von Cajal-Retzius-

Zellen und radialen Gliazellen besiedelt, die bei der Histogenese des DG helfen (Rickmann et al., 1987; Del Rio et al., 1997; Alcantara et al., 1998; Borrell et al., 1999). Anders als in anderen Cortexregionen beginnen migratorische Progenitoren, und postmitotische Neurone aus der subventrikulären Zone des DG-Neuroepithels auszuwandern und sich im Bereich der späteren Hilusregion des Hippokampus anzusiedeln. Dort bilden sie eine ektopische proliferative Zone, die tertiäre Matrix aus, von der aus ab etwa E17 die Körnerzellen des DG generiert werden. Diese sind in einer V-förmigen, laminaren Struktur angeordnet (Altman und Bayer, 1990; Cowan et al., 1980). Die Progenitoren der tertiären Matrix persistieren bis in das Erwachsenenalter in einer als Subgranulären Schicht bezeichneten Region im Bereich des Hilus (Altman und Bayer, 1990; Altman und Das, 1965). Diese Progenitoren können während des gesamten Lebens neue Körnerzellen hervorbringen und gelten als Quelle der adulten Neurogenese.

Welche Moleküle die Entwicklung des DG und die Spezifizierung der Zelltypen steuern, ist noch nicht vollständig verstanden, aber auch hier scheinen proneurale bHLH-Proteine und Signalwege wie der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen. Wnt-Signale fördern dabei die Proliferation von DG-Progenitoren. Mäusen mit einer Deletion von *Wnt3a* fehlt beispielsweise der komplette Hippokampus (Lee et al., 2000), während der Verlust von *Lef1* zu erheblichen Defekten des DG und zu verminderter Proliferation von bestimmten Populationen von Progenitoren führt (Galceran et al., 2000). Dabei agiert der Wnt-Signalweg zumindest zum Teil durch Induktion des Transkriptionsfaktors *Emx2*, welcher für das Wachstum des Hippokampus und die Migration der DG-Progenitoren notwendig ist (Backman et al., 2005; Oldekamp et al., 2004; Pellegrini et al., 1996; Theil et al., 2002; Tole et al., 2000). Wnt-Signale scheinen aber auch die Spezifizierung von DG-Körnerzellen zu fördern, da eine ektopische Aktivität von Wnt-Signalen im Cortex die Expression Hippokampus-spezifischer Marker induziert (Machon et al., 2007).

Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie, wie *NeuroD1* und *Math2*, sind hauptsächlich in postmitotische Körnerzellen exprimiert und spielen vermutlich eine Rolle in späteren Phasen der Differenzierung der Körnerzellen (Liu et al., 2000; Miyata et al., 1999; Pleasure et al., 2000; Schwab et al., 2000). Für die frühe Determinierung der Progenitoren scheint in erster Linie *Ngn2* von Bedeutung zu sein (Galichet et al., 2008).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung des Vorderhirns ist ein äußerst komplexer Prozess und er verlangt die genau abgestimmte Balance zwischen der Proliferation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen, deren korrekte Spezifizierung zu den verschiedenen Typen von Neuronen und Gliazellen, die Migration zu ihren Zielorten und die terminale Differenzierung dieser

Zellen zu funktionsfähigen Systemen, welche die vielfältigen Aufgaben des Gehirns ausführen. Zahlreiche Signale sorgen für den geordneten Ablauf der Entwicklung und die Integration dieser Signale ist dabei von zentraler Bedeutung. Dabei spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Sie werden in den extrazellulären Raum abgegeben und stimulieren durch die Bindung an membranständige Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden, die Genexpressionen steuern. Diese signalabhängige Regulation der Genexpression erlaubt die Koordinierung von Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung. Dabei können dieselben Signale in unterschiedlichen Kontexten differentielle Wirkungen entfalten, je nachdem welche Kombinationen an Rezeptoren und intrazellulären Mediatoren in der Zelle vorliegen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von TGF- β während der embryonalen Entwicklung des murinen Vorderhirns auf molekularer und zellulärer Ebene zu untersuchen. Dabei sollten TGF- β regulierte Zielgene in primären neuronalen Zell-Präparationen des Vorderhirns identifiziert werden, die Auskunft darüber geben könnten, auf welche Weise TGF- β die Entwicklung dieser Zellen beeinflusst. In weiteren Experimenten sollte die Auswirkungen einer exogenen TGF- β -Behandlung auf die Entwicklung dieser Zellen *in vitro* analysiert werden. Dabei sollte geklärt werden, ob TGF- β auf die Proliferation, Apoptose und/oder Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen des Vorderhirns einwirkt und ob die identifizierten TGF- β -abhängigen Zielgene mit diesen Effekten in Zusammenhang gebracht werden können. Dabei sollte verglichen werden, ob TGF- β die Entwicklung der neuronalen Zellen in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium auf unterschiedliche Weise beeinflusst.

2 Matherial und Methoden

2.1 Tiere

NMRI-Mäuse wurden von der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen bezogen.

Ctgf (+/-) Mäuse stammten ursprünglich von K.M. Lyons, Los Angeles , USA und wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten und gezüchtet.

Mäuse mit einem geflochten Allel des TGF- β -Rezeptors Typ II stammen ursprünglich von H.L. Moses, Nashville, USA und wurden im hauseigenen Tierstall gehalten und gezüchtet.

2.2 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Zelllinien verwendet: die Muskelzelllinie C2C12 der Maus (Blau et al., 1985; Yaffe und Saxel, 1977), die oligodendrogliale Vorläuferzelllinie Oli-neu der Maus (Jung et al., 1995) und die stabil mit einem TGF- β -Reporterkonstrukt transfizierte Zelllinie MLEC (Abe et al., 1994).

2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*), Neurobasal-Medium, HBSS (*Hank's buffered salt solution*), D-PBS, 50x B27, fötales Rinderserum (FBS), Pferdeserum (HS), 35% BSA, Glutamin, 100x Penicillin/Streptomycin/Neomycin (PSN) und 7,5% Natriumbicarbonat wurden von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Apo-Transferrin, Cytosin-Arabinosid (AraC), Glutamat, Glutathion, Insulin, Laminin, Poly-L-Lysin, Poly-L-Ornithine, Progesteron, Puromycin, Putrescin, Selenit, Super-Oxid-Dismutase (SOD), L-Thyroxin und Tri-Iod-L-Thyronin wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Chemikalien

Aceton, Acrylamidlösung, Agarose, Ammoniumperoxysulfat (APS), bovines Serumalbumin (BSA), EDTA, EGTA, Ethanol, Glucose, Glycin, Glycerin, Glycylglycin, Isopropanol, LB-Medium, LB-Agar, Magermilchpulver, Magnesiumchlorid (MgCl₂), Methanol, Natriumchlorid (NaCl), Natriumcitrat, Natriumhydroxid (NaOH), Saccharose, Salzsäure (HCl), Tris-HCl, Trypan-Blau und Tween-20 wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Eindeckmittel (Fluoromount-G) wurde von Southern Biotechnology (Birmingham, AL, USA) bezogen.

Borsäure (H_3BO_3), Dinatriumphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), Ethidiumbromid, Formaldehyd, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($KH_2PO_4 \cdot H_2O$), Magnesiumsulfat ($MgSO_4$), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) und Propidiumiodid wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Bromodeoxyuridin (BrdU), DTT (Dithiothreitol), Proteinase K, β -Mercaptoethanol, TEMED (Tetramethylethyldiamin) und Triton-X 100 wurden von Fluka/Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde von Serva (Heidelberg) bezogen.

Entwickler- und Fixierlösung für Röntgenfilme wurden von Adefo (Nürnberg) bezogen.

Normal Goat Serum (NGS) und *Normal Donkey Serum* (NDS) wurden von Sigma (Taufkirchen) oder Dianova (Hamburg) bezogen.

2.5 Zytokine und Inhibitoren

TGF- β 1 (Kat. Nr. 100-21C)	PeptoTech, London/Hamburg
TGF- β 2 (Kat. Nr. 10035B)	PeptoTech, London/Hamburg
TGF β 3 (Kat. Nr. 100-36)	PeptoTech, London/Hamburg
DAPT (Presinilin γ -Sekretase-Inhibitor)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
SB 431542 (ALK4,5,7-Inhibitor)	Tocris, London, UK

2.6 Enzyme

DNaseI	Qiagen oder Machery Nagel
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St-Leon-Rot
Restriktionsenzyme	Fermentas, St-Leon-Rot
Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim
RNaseA	Machery Nagel, Düren
RNase-Inhibitor	Fermentas, St-Leon-Rot
0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA	Gibco, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Kits und fertige Gebrauchslösungen

Bradford-Lösung	Bio-Rad, München
ET-Mix	Amersham Biosciences, Freiburg
Galacto Light™ Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>In situ</i> Cell Death Detection TMR red Kit	Roche, Mannheim
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNAII	Machery-Nagel, Düren
NuPage® LDS Sample Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy MiniKit	Qiagen, Hilden
RNeasy MicroKit	Qiagen, Hilden
SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Western Lighting Chemilumineszenz Lösung	Millipore, Billerica, MA, USA

2.8 Antikörper

Primärantikörper (Name u. Katalognr.)	Spezies und Typ	eingesetzte Verdünnung	Firma
BrdU (ab1893)	Schaf polyklonal	1:500 (IC)	Abcam, Cambridge, UK
Ctip2 (ab18465)	Ratte monoklonal	1:500 (IC)	Abcam, Cambridge, UK
Doublecortin (sc-8066)	Maus monoklonal	1:100 (IC)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Flag (F7425)	Kaninchen polyklonal	1:5000 (WB)	Sigma, Taufkirchen
Foxp2 (ab16046)	Kaninchen polyklonal	1:5000 (IC)	Abcam, Cambridge, UK
GAPDH (ab8245)	Maus monoklonal	1:10000 (WB)	Acris, Hiddenhausen
GFAP (G3893)	Maus monoklonal	1:500 (IC)	Sigma, Taufkirchen
GFAP (Z0334)	Kaninchen polyklonal	1:1000 (IC)	DakoCytomation GmbH, Hamburg
HuC/D (A21271)	Maus monoklonal	1:100 (IC)	Invitrogen, Karlsruhe
Ki67(M7249)	Ratte monoklonal	1:20 (IC)	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Nedd9 (18056)	Maus monoklonal	1:500 (IC)	Abcam, Cambridge, UK
Nestin (Rat-401)	Maus monoklonal	1:10 (IC)	DS Hybridoma Bank, Iowa City, USA
Nestin (ab5968)	Kaninchen polyklonal	1:500 (IC)	Abcam, Cambridge, UK
NeuN (MAB377)	Maus monoklonal	1:100 (IC)	Chemicon, Hampshire, UK
Pax6 (PRB-278P)	Kaninchen polyklonal	1:250 (IC)	Covance, Denver, PA, USA

Material und Methoden

PSA-NCAM (5A5)	Maus monoklonal	1:20 (IC)	DS Hybridoma Bank, Iowa City, USA
Reelin	Maus monoklonal	1:50 (IC)	M. Ogawa, Wako, Saitama, Japan
Satb2	Kaninchen polyklonal	1:500 (IC)	Dr. V. Tarabykin, Göttingen
Smad 1,2,3 (Sc-7960)	Maus monoklonal	1:200 (IC)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Tbr1 (AB9616)	Kaninchen polyklonal	1:500 (IC)	Chemicon, Hampshire, UK
Tuj1 (MMS-435P)	Maus monoklonal	1:500 (IC)	Covance, Denver, PA, USA

Konjugierte Sekundär-Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Firma
Ziege anti-Maus FITC (115-095-062)	1:100 (IC)	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen FITC (111-095-003)	1:100 (IC)	Dianova, Hamburg
Esel anti-Maus Cy3 (715-165-151)	1:800 (IC)	Dianova, Hamburg
Esel anti-Kaninchen Cy3 (711-165-152)	1:800 (IC)	Dianova, Hamburg
Esel anti-Ratte FITC (712-095-150)	1:100 (IC)	Dianova, Hamburg
Esel anti-Schaf Cy3 (713-165-147)	1:800 (IC)	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus HRP (115-035-003)	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen HRP (111-035-003)	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg

2.9 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pSuper.gfp/neo	OligoEngine, Seattle, WA, USA
pGL3-SBE	P. ten Dijke, Amsterdam, Niederlande
pCMV- β -Gal	Humangenetik, Göttingen
pT β RII-flag-tag	C.S. Krishnaveni, Gießen
pAAV 6P1 Cre SEWB	S. Kügler, Göttingen
pAAV EGFP	S. Kügler, Göttingen
pAAV H1 CytbAS SEWB	S. Kügler, Göttingen

2.10 Standards

DNA-Standards:

Hyperladder I (1 kb)

Bioline, Luckenwalde

Hyperladder II (100 bp)

Bioline, Luckenwalde

Proteinstandard:

SeeBlue™ Plus2, *prestained* Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (Durchmesser 12 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Multiwellplatten für die Zellkultur	Nunc, Langenselbold
Nitrocellulosemembran (Porengr. 45µm)	Bio-Rad, München
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	WU, Mainz
PCR <i>Softtubes</i> (0,2 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar, Schiphol-Rijk, Niederlande
Plastik-Küvetten (1,5 ml)	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg und Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Langenselbold
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg

2.12 Laborgeräte

Autoklav	Systemc ELV 5050	Systemc GmbH, Wetttenberg
Binokular		Zeiss, Jena
Blot-Apparatur		Harnischmacher, Kassel
Brutschrank	Biometra OV5	Biometra, Göttingen
Geldokumentations- Anlage		Intas, Göttingen
PCR Cycler	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
	Gradientencycler	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	pH526 Multical®	WTW, Weilheim

Material und Methoden

Luminometer	Lumat LB 9507	EG&G Berthold, Bad Wildbach
Photometer	BIOPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Magnet-Rührer	RET basic	Schütt Labortechnik, Göttingen
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Real-Time-Maschine	ABI 7500 Real Time PCR	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Rollschüttler	CAT RM5	NeoLab, Heidelberg
Rundschüttler	KS 250 basic IKA	Schütt Labortechnik, Göttingen
SDS-PAGE-Kammer	Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, München
Elektrophorese Zelle		Bio-Rad, München
Spannungsquellen		Bio-Rad, München
Sterilbank	Heraeus HeraSafe	Kendro Laboratory GmbH, Langenselbold
Ultraschallbad	ElmaSonic Elma®	Roth, Karlsruhe
Vortexer	VORTEX Genie2 G560	Scientific industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen	Sartorius 1602MP	Sartorius, Göttingen
	Sartorius 3716MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge5415D	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge5417	Eppendorf, Hamburg
	Sorval EvolutionRC	Kendro Laboratory GmbH, Langenselbold

2.13 Zellbiologische Methoden

2.13.1 Präparation und Kultivierung primärer hippocampaler und cortikaler Neurone

Für die Kultivierung primärer Zellen wurden die Zellkulturschalen und Deckgläser mit Poly-L-Ornithin und Laminin beschichtet. 12 mm-Deckgläser wurden zuvor durch Erhitzen für drei Stunden bei 180°C sterilisiert und dann in 24-Well-Platten ausgelegt. Die Beschichtung erfolgte in zwei Schritten, zunächst wurden die Zellkulturschalen für mindestens eine Stunde mit einer Poly-L-Ornithin-Lösung (0,1 mg/ml in Aqua dest.) bedeckt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden sie mit einer Laminin-Lösung (1 µg/ml in DMEM) bedeckt und bis zur Verwendung im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Kurz vor der Aussaat der Zellen wurden die Deckgläser und Schalen zweimal mit DMEM gewaschen.

Für die Präparation der primären Zellen aus dem Cortex und Hippokampus wurden Embryonen einer zeitlich verpaarten Maus am Trächtigkeitstag 16,5 bzw. 14,5 (E16,5 bzw. E14,5) verwendet. Der Morgen der Feststellung des Vaginalplugs galt dabei als Zeitpunkt E0,5. Das Muttertier wurde durch cervikale Dislokation getötet, die Embryonen wurden entnommen, in ein Gefäß mit CMF (Ca²⁺- und Mg²⁺-freies HBSS, 0,04% Natriumbikarbonat) überführt und auf Eis gekühlt. Die Schädeldecke der Embryonen wurde mit Hilfe einer Augenschere durch einen Schnitt entlang der Mittellinie und zwei seitlichen Schnitten eröffnet, sodass das Gehirn freigelegt werden konnte. Für die Präparation des Cortex wurden nun die beiden Hemisphären direkt mit einer Augenschere durch einen flach angesetzten Schnitt abgetrennt, in einen Tropfen CMF überführt und von den Meningen befreit. Danach wurden die Hemisphären mit der Augenschere grob zerkleinert und die Stücke in eiskaltem CMF gesammelt. Für die Präparation der Hippokampi wurde das Gehirn mit einem Löffel entnommen, die Hemisphären getrennt und vom Hirnstamm und den Meningen befreit und der Hippokampus durch einen präzisen konvexen Schnitt isoliert. Für die Dissoziation wurden die Gewebestücke zunächst enzymatisch mit 750 µl 0,25% Trypsin/0,02% EDTA für zehn Minuten bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 450 µl FBS beendet. Die Suspension wurde mit Kulturmedium (Neurobasalmedium supplementiert mit 1x B27, 5 µg/ml Apo-Transferrin, 1 µg/ml Glutathion, 0,5 mM Glutamin, 0,8 µg/ml SOD und 1x PSN (Penicillin/Streptomycin/Neomycin)) auf 2 ml aufgefüllt und es erfolgte zunächst eine grobe mechanische Zerkleinerung mit einer silikonisierten, feuerpolierten Pasteur-Pipette (Durchmesser der Öffnung 3 mm), dann eine feine Dissoziation mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette mit kleinerer Öffnung (Durchmesser 1 mm). Die Zellen wurden durch zehnmündige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert und in 2

ml Kulturmedium resuspendiert. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung ermittelt.

Cortikale Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Dichte von 100.000 Zellen/Deckglas und hippocampale Zellen in einer Dichte von 80.000 Zellen/Deckglas ausgesät. Dafür wurden die Deckgläschen in einer sterilen Petrischale auf die Innenseite abgeschnittener Deckel von 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesetzt und 100 µl der Zellsuspension als Tropfen auf das Deckgläschen pipettiert. Die Zellen wurden so zum Absetzen für ein bis zwei Stunden kultiviert und dann in die vorbereiteten, mit Medium befüllten 24-Well Platten überführt. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass sich die Gesamtheit der ausgesäten Zellen auch auf dem Deckgläschen befand. Für die Gewinnung von RNA- und Proteinextrakten wurden die Zellen in einer Dichte von 150.000 Zellen/cm² ausgesät. Bei der Aussaat wurde dem Kulturmedium 25 µM Glutamat zugefügt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Der Tag des Ausplattierens der aus dem Gewebe dissoziierten Zellen wird als Tag *in vitro* (DIV) 0 bezeichnet. Das Medium wurde ab DIV4 alle drei Tage zur Hälfte erneuert. Dem Medium der hippocampalen Kulturen, die für die RNA- oder Proteinisolation an DIV12 vorgesehen waren, wurde ab dem ersten Mediumwechsel 2 mM AraC zugefügt, um das Wachstum von Astrozyten einzudämmen.

2.13.2 Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten

Für die Anlage der Astrozyten-angereicherten Kulturen wurden die übrigen Großhirn-Hemisphären von E16,5 Mäuseembryonen nach der Entnahme der Hippokampi verwendet. Die Hemisphären wurden sorgfältig von den Meningen befreit, mit der Augenschere grob zerkleinert und in eiskaltem CMF gesammelt. Die enzymatische und mechanische Dissoziation erfolgte analog zu dem Protokoll für die Präparation der primären Neurone. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Kulturmedium (DMEM, 10% FBS, 1x PSN) aufgenommen und in unbeschichteten Zellkulturschalen oder auf Deckgläschen ausgesät. Nach drei Tagen Kultivierung im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte wurden das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um abgestorbene Neurone und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz (ca. 14 Tage) weiterkultiviert, dabei wurde das Kulturmedium alle drei Tage zur Hälfte erneuert.

2.13.3 Kultivierung der Zelllinie Oli-neu

Bei Oli-neu Zellen handelt es sich um murine oligodendrogliale Vorläuferzellen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM supplementiert mit 1% Pferdeserum, 1x PSN, 340 ng/ml Triiod-L-Thyronin, 400 ng/ml L-Thyroxin, 5 µg/ml Insulin, 100 µg/ml Transferrin, 6,3 ng/ml Progesteron, 16 µg/ml Putrescin und 5,2 ng/ml Selenit in poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturflaschen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Zum Passagieren oder Aussäen der Zellen wurden die Zellen kurz in D-PBS gewaschen und für etwa 2-3 min in 2 ml Trypsin-EDTA bei 37°C abgelöst. Das Stoppen der Trypsinierung erfolgte mit 8 ml Stoppmedium (DMEM, 10% Pferdeserum). Die gelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Stoppmedium wurde abgezogen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen. Das Zellpellet einer voll bewachsenden Kulturflasche wurde im Verhältnis 1:3 bis 1:4 geteilt. Während der Behandlung mit TGF-β1 wurde das DMEM-Medium auf 0,8% Pferdeserum reduziert und keine Zusätze zugegeben.

2.13.4 Kultivierung der Zelllinie C2C12

C2C12 Zellen sind murine prämyoblastische Vorläuferzellen. Die Kultivierung erfolgte in unbeschichteten Zellkulturflaschen in Kulturmedium (DMEM, 10 % FBS, 1x PSN). Aufgrund der hohen Proliferationsrate wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen mit warmen D-PBS gewaschen und mit 2 ml warmen Trypsin/EDTA für 2-3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinierung mit 8 ml Kulturmedium beendet und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wurden nach einer 1:8 Verdünnung erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.13.5 Stimulation der Primärkulturen mit TGF-β1

Die TGF-β1-Stimulation erfolgte stets in einer Konzentration von 5 ng/ml.

Für die Gewinnung von RNA- und Proteinextrakten wurden die Primärkulturen an DIV2 bzw. DIV10 mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 µM) vorbehandelt, um die TGF-β-Aktivität, ausgelöst durch endogenes TGF-β, auf ein konstant niedriges Ausgangsniveau zu setzen. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen kurz mit Neurobasalmedium gewaschen und mit dem TGF-β1-haltigem Kulturmedium versetzt. Die Isolation der RNA- und Proteinextrakte erfolgte in der Regel nach zwei Stunden bzw. 24 Stunden an DIV4 bzw. DIV12.

Für die Quantifizierung von Markerproteinen für Neurone, deren Subpopulationen, Gliazellen sowie Progenitoren wurden die Primärkulturen standardmäßig ab DIV2 bis zur Fixierung an DIV8 mit TGF- β 1 behandelt.

Für die Experimente zur Visualisierung der Smad-Kerntranslokation wurden die Primärkulturen an DIV3 bzw. DIV11 für 24 Stunden mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit TGF- β 1 stimuliert und danach fixiert.

2.13.6 BrdU-Markierung primärer Zellkulturen

Bromodeoxyuridin (BrdU) wird als Basenanalogen während der S-Phase in die DNA von teilungsaktiven Zellen eingebaut und kann später immunzytochemisch nachgewiesen werden. Für die einfache BrdU-Markierung zur Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen wurden die auf Deckgläschen ausgesäten primären Kulturen des Cortex bzw. des Hippokampus ab DIV2 mit TGF- β 1 behandelt und nach 24 Stunden (DIV3) oder fünf Tagen (DIV7) wurde dem Kulturmedium 20 nM BrdU zugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und das inkorporierte BrdU immunzytochemisch detektiert.

Für die kumulative BrdU-Markierung wurden cortikale Kulturen ab DIV2 mit TGF- β 1 behandelt. Nach 24 Stunden wurde dem Kulturmedium 20 nM BrdU zugefügt. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 und 30 Stunden.

2.13.7 TGF- β -Sekretionsmessung mit MLEC-Zellen

Um die Sekretion von TGF- β in primären kortikalen und hippokampalen Zellkulturen zu ermitteln, wurde ein etablierter und sehr sensibler Bioassay verwendet (Abe et al., 1994; Kriegstein et al., 2000). Dabei handelt es sich um MLEC-Zellen (*mink lung epithel cells*), die als stabile Transfektion einen Luciferase-Reporter unter der Kontrolle einer trunkierten Form des TGF- β responsiven PAI- (*plasminogen activator inhibitor*) Promotors tragen. Wird der PAI-Promotor durch TGF- β aktiviert, führt dies zur Produktion von Luciferase. In dem anschließenden Assay, für den das Luciferase-Detektions-Kit von Promega verwendet wurde, katalysiert die Luciferase die Oxidierung des D-Luciferins in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 556 nm freigesetzt wird. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luciferase im Zelllysat ist, lässt sich somit die Expression des Luciferasereportergens quantifizieren.

Als Testmedien wurde das konditionierte Medium von den Primärkulturen nach vier Tagen Kultivierung gesammelt. In einem Teil des Testmediums wurde zuvor das latent gebundene TGF- β durch Säurebehandlung freigesetzt. Dazu wurden 150 μ l des konditionierten Mediums mit 5 μ l 1N HCl versetzt und nach einer Minute mit 5 μ l 1N NaOH wieder neutralisiert. Als Leerwert wurde nicht-konditioniertes Neuronenkulturmedium verwendet.

Die Kultivierung der MLEC-Zellen erfolgte in DMEM, 10% FCS, 1x PSN, 0,3 mg/ml Geneticin.

Für das Experiment wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte (18.000 Zellen/Well) in Kulturmedium ausgesät und für einige Stunden zum Absetzen kultiviert. Dann wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und pro Well 50 μ l Inkubationsmedium (DMEM, 0,1% BSA, 1x PSN) vorgelegt. Dazu wurden dann 50 μ l des Testmediums gegeben. Nach 18 Stunden Kultivierung wurde das Medium entfernt, mit D-PBS gewaschen und die Zellen mit 20 μ l Passiv-Lysis-Puffer (Promega, 1:5 verdünnt in Aqua dest.) pro Well für 15 min lysiert. Für die Messung der relativen Luciferaseaktivität wurden 10 μ l Lysat direkt in einem Messröhrchen mit 50 μ l Luciferasesubstrat (Promega) vermischt und anschließend sofort im Luminometer (Lumat LB 9507, EG&G Berthold) gemessen (Messzeit 10 sec). Alle Messungen wurden im Duplikat und von jeweils drei unabhängigen Zellpräparationen durchgeführt.

2.13.8 Transfektion von Zelllinien

Die Transfektion der Zelllinien Oli-neu und C2C12 erfolgte mit Lipofectamine 2000 Reagenz nach Angaben des Herstellers in antibiotikafreiem Kulturmedium. Nach fünf Stunden wurde das Transfektionsgemisch entfernt und durch frisches Kulturmedium mit Antibiotika ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationsphase der transgenen Veränderung von 24 bis 72 Stunden wurden die Zellen entsprechend weiterbehandelt und aufgearbeitet.

2.13.9 Transduktion von Primärkulturen mit Adeno-assoziierten Viren

Für die Transduktion mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) wurden die primären Zellen in 24-Well Platten (250.000 Zellen pro Well, jeweils nur die obere und untere Reihe der Platte) oder auf Deckgläschen (100.000 Zellen) ausgesät. Die Infektion der primären Zellkulturen erfolgte jeweils an DIV2. Dazu wurde das Medium auf 250 μ l pro Well reduziert und 5×10^6 infektiöse Partikel zu den Zellen pipettiert. Am folgenden Tag wurde das Medium wieder auf 500 μ l aufgefüllt. Alle drei Tage erfolgte ein halber Mediumwechsel, was zu einer langsamen Ausdünnung der Viruskonzentration führte.

Die TGF- β 1 Behandlung der Zellen für die RNA-Extraktion erfolgte unter den unter 2.13.5 beschriebenen Standardbedingungen für den Aufarbeitungszeitpunkt DIV12.

2.13.10 Transduktion von Primärkulturen mit Lentiviren

Für den *Knock-down* der TGF- β -Zielgene Smad4, Gata2, Runx1 und Nedd9 und wurden die entsprechenden MISSION™ shRNA-Target-Gene Sets von Sigma-Aldrich verwendet. Die Sets umfassten fünf shRNA-Klone je Zielgen, die in einen lentiviralen Vektor (pLKO.1-Puro) integriert waren. Dieser Vektor erlaubt die stabile Transduktion der shRNA und eine Selektion der transduzierten Zellen durch Puromycin.

Zunächst wurde für die hippokampalen und kortikalen Zellen diejenige Konzentration an Puromycin ermittelt, die innerhalb von 24 Stunden zum Absterben aller nicht-resitenten Zellen führt. Dazu wurden in einer 24-Well-Platte jeweils 250.000 Zellen ausgesät und an DIV4 mit 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin behandelt. Die minimale Konzentration, die nötig war, um alle Zellen abzutöten betrug für kortikale Zellen 0,9 $\mu\text{g/ml}$ und für hippokampale Zellen 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Diese Konzentration wurden für die nachfolgenden Puromycin-Selektionen der Virus-transduzierten Primärkulturen verwendet.

Um die erforderliche Viruskonzentration für eine vollständige Transduktion der primären Zellkulturen zu ermitteln, wurden je 250.000 hippokampale Zellen in einer 24-Well Platte ausgesät und an DIV2 mit 0,5; 1,0; 2,5 und 5 MOI (*multiplicity of infection*) infiziert. Ein MOI von 1 entspricht dabei einem infektiösen Partikel pro Zelle. Für die Infektion wurde das Medium auf exakt 250 μl reduziert und erst am folgenden Tag wieder auf 500 μl aufgefüllt. An DIV4 wurde das viruspartikelhaltige Medium entfernt, die Zellen einmal mit Medium gewaschen und für die Selektion der transduzierten Zellen mit der zuvor ermittelten Puromycin-Konzentration für weitere 24 Stunden inkubiert. Danach wurde optisch beurteilt, bei welcher minimalen MOI die Zellen eine größtmögliche Überlebensrate aufwiesen. Dies war bei einem MOI von 2,5 der Fall, sodass diese Viruskonzentration für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

Alle folgenden Experimente mit lentiviraler Transduktion wurden nach dem oben beschriebenen Zeitablauf von Transduktion und Puromycin-Selektion durchgeführt.

Für die Validierung des *Knock-down*-Potentials der individuellen shRNA-Klone wurden je 250.000 hippokampale Zellen in einer 24-Well Platte an DIV2 mit 2,5 MOI des jeweiligen shRNA-Klons transduziert. Nach der Puromycin-Selektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert. Dann wurde die RNA isoliert und die Expression des Zielgens mittels quantitativer Real-Time PCR gegenüber einer nicht-transduzierten Kontrolle überprüft.

Für die Analyse der TGF- β -Zielgenregulationen nach Smad4-*Knock-down* wurden die Kulturen nach der Puromycin-Selektion gemäß den unter 2.13.5 beschriebenen

Standardbedingungen für den Aufarbeitungszeitpunkt DIV12 behandelt. Die RNA-Isolation erfolgte pro Bedingung aus 250.000 ausgesäten Zellen mit dem RNeasy-Micro-Kit der Firma Qiagen.

Für die immunzytochemische Quantifizierung der Neuronenzahl nach *Knock-down* von Smad4, Gata2, Runx1 und Nedd9 wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen (100.000 Zellen/Well) nach der Puromycin-Selektion ab DIV5 für sechs Tage mit TGF- β behandelt und an DIV11 fixiert.

2.14 Zytochemische Methoden

2.14.1 Immunzytochemie

Für die Darstellung von Proteinlokalisationen von Markern für Neurone bzw. deren Subpopulationen, Gliazellen sowie Progenitoren wurden die Zellen wie beschrieben auf 12 mm-Deckgläschen ausgesät und entsprechend des jeweiligen Experimentes behandelt und kultiviert. Die Fixierung erfolgte nach kurzem Waschen mit PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH7.4) in 4% PFA/PBS bei RT für 10 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Aceton bei -20°C für 10 min permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und für die Blockierung unspezifischer Bindungen für mindestens 30 min je nach zu verwendendem Sekundärantikörper entweder in 10% *Normal Goat Serum* (NGS) oder 5% *Normal Donkey Serum* (NDS) in PBS + 0,1% Triton X-100 bei RT inkubiert.

Für die Detektion von BrdU wurden die Zellen nach der Fixierung zunächst für 10 min in 1N HCl auf Eis und anschließend in 2N HCl für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in Boratpuffer (150 mM H_3BO_3 , pH 8,4) neutralisiert, mit PBS gewaschen und wie beschrieben in 5% NDS geblockt.

Die Inkubation mit den Primärantikörpern, verdünnt in der jeweiligen Blocklösung, erfolgte über Nacht bei 4°C . Danach wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit den jeweiligen Sekundärantikörpern verdünnt in PBS bei RT inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen in Fluoromount-G Eindeckmedium, dem im Verhältnis 1:1000 DAPI für die Färbung der Zellkerne zugesetzt war, eingedeckt.

2.14.2 Bestimmung apoptotischer Zellen durch Propidiumiodid-FACS-Analyse

Bei dieser Methode werden fixierte Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Intensität der DNA-Färbung kann anschließend in einem Durchflusszytometer für jede einzelne Zelle gemessen werden. Apoptotische Zellkerne besitzen einen niedrigeren DNA-Gehalt als vitale Zellen und diese Kerne können daher durch die FACS-Analyse erkannt und gezählt werden.

Die primären kortikalen- und hippokampalen Zellen wurden in einer 12-Well Platte (750.000 Zellen/Well) ausgesät und ab DIV2 mit TGF- β 1 behandelt und bis DIV4 bzw. DIV8 weiter kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Für die Fixierung wurden die Zellen zunächst mit 200 μ l Trypsin/EDTA bis zur Ablösung der Zellen bei 37°C inkubiert, mit FBS abgestoppt und in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Dann wurden die Zellen bei 4°C und 1000 x g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen die pelletierten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proben wurden in 600 μ l PBS vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde 700 μ l kaltes 100%iges Ethanol tropfenweise zugegeben und die Zellen für mindestens zwei Stunden bzw. bis zur Analyse bei -20°C fixiert. Kurz vor der Messung wurden die Zellen für 20 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in PI-FACS-Lösung (100 μ g/ml Propidiumiodid, 10 μ g/ml RnaseA in PBS, pH7.4) aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Messungen wurden im Institut für Humangenetik in der Abteilung Immungenetik mit dem Durchflusszytometer FACScan Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Für die statistischen Auswertungen wurden Messungen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten herangezogen.

2.14.3 Bestimmung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung

Die Färbung kultivierter Zellen mittels der TUNEL-Technologie stellt eine weitere Methode zur Bestimmung apoptotischer Prozesse dar. Hierbei werden fragmentierte DNA-Überhänge am 3'-OH-Terminus mit markierten Nukleotiden versehen. Eine anschließende enzymatische Reaktion, die Fluoreszenz erzeugt, ermöglicht die Visualisierung der markierten Zellkerne.

Für diese Methoden wurden die hippokampalen und kortikalen Zellen wie üblich auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Ab DIV2 erfolgte die Behandlung mit TGF- β . Nach zwei Tagen (an DIV4) oder sechs Tagen (an DIV8) wurden die Zellen in 4% PFA/PBS fixiert. Danach wurden die Proben mit PBS gewaschen und für 2 min auf Eis mit einer Permeabilisierungslösung (0,1% TritonX-100, 0,1% Natriumcitrat in PBS) inkubiert. Die

Färbungsreaktion mit dem „*In situ* Cell Death Detection TMR red Kit“ der Firma Roche erfolgte nach Herstellerangaben. Dazu wurden die Deckgläschen mit je 50 µl Markierungslösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und in Fluoromount-G Eindeckmedium eingedeckt. Die fluoreszenzmikroskopische Detektion der markierten Zellkerne erfolgte bei einer Wellenlänge von 540/580 nm.

2.14.4 Quantitativer Nachweis der Smad-Aktivierung mittels des Luciferase-Reporterplasmids pGL3-SBE

Für die Validierung des *Knock-down* Potentials der TβRII-spezifischen shRNAs in den Zelllinien Oli-neu und C2C12 wurde die TGF-β-abhängige Aktivierung des Luciferase-Reporterplasmids pGL3-SBE nach Transfektion der shRNAs überprüft. pGL3-SBE trägt ein Smad-bindendes Element (SBE) vor dem Luciferase-Reportergen. Aktivierte Smad2/3/4-Komplexe binden an das SBE und führen dadurch zur Expression von Luciferase. Um Fehler durch Schwankungen in der Transfektionseffizienz abgleichen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem pCMV-β-Gal-Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid trägt das Gen für das Enzym β-Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors. Mittels chemischer Reaktionen kann die gebildete Luciferase bzw. β-Galaktosidase in Lichtemission umgewandelt werden. Durch Division der gemessenen Luciferasewerte durch die β-Galaktosidasewerte können relative Lichteinheiten (RLU) als Maß der Smad-Aktivierung berechnet werden.

Für die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 100.000 im 48-Well ausgesäte Zellen mit dem shRNA tragendem pSuper-Vektor, pGL3-SBE und pCMV-β-Gal mittels Lipofectamine nach Herstellerangaben transfiziert. Dabei wurde folgendes Mengenverhältnis der Plasmide eingesetzt:

pSuper shRNA	pGL3-SBE	pCMV-β-Gal	Lipofectamine
200 ng	200 ng	25 ng	0,8 µl

Die Zellen wurden jeweils 48 und 72 Stunden nach der Transfektion aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 70 µl Passiv Lysis Puffer (Promega) für 15 min auf dem Schüttler lysiert. Die Extrakte wurden in Reaktionsgefäße überführt, gevortext und kurz abzentrifugiert.

Messung der Luciferaseaktivität

Jeweils 25 µl des Zellextraktes wurden mit 200 µl Luciferase-Reaktionspuffer (25 mM, Glycylglycinpuffer pH 7,8 (25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA) 100 mM

Kaliumphosphat pH 7,8, 500 mM DTT, 200 mM ATP) in einem Messröhrchen vermischt. Durch das Luminometer wurden 100 µl Luciferin-Injektionslösung (1 ml Luciferin-Stocklösung (10 mg D-Luciferin, 55 mg DTT, 37,5 ml Glycylglycinpuffer), 4 ml Glycylglycinpuffer, 80µl DTT) in jedes Messröhrchen injiziert und die Lichtemission nach Verstreichen einer Vorlaufzeit von 20 sec über weitere 20 sec gemessen.

Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit Hilfe des „Galacto Light™ Kits“ der Firma Tropix bestimmt. Das als Stocklösung vorliegende chemilumineszente Substrat Galacton wurde 1:100 mit dem Reaktionspuffer verdünnt und es wurden jeweils 70 µl in Messröhrchen vorgelegt. In einem Abstand von jeweils 30 sec wurden nun je 10 µl des Zellextraktes zugegeben. Mit dem Pipettieren der ersten Probe begann die Inkubationszeit von 60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit begann die Messung am Luminometer. Dabei wurden je 100 µl „Light Emission Accelerator“ in das Messröhrchen injiziert und nach einer Vorlaufzeit von 20 sec über 10 sec gemessen. Da die Signalintensität von der Inkubationszeit abhängt, war es wichtig, die Zeitabstände genau einzuhalten, damit alle Proben eine identische Inkubationszeit hatten.

2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Aufnahmen von fluoreszierenden Antikörper-Markierungen wurden mit einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop bzw. einem Axio Imager Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) mit angeschlossener Digitalkamera (AxioCamMR Kamera, Carl Zeiss AG, Jena) angefertigt. Die Anregungs (Ex)- und Emissionswellenlängen (BA) betragen für den DAPI-Filter: Ex 340-380, BA 435-485, für den FITC-Filter: Ex 465-495, BA 515-555 und für den Cy3-Filter: 510-560, BA 590 (alle Angaben in nm). Für die Quantifizierung von Markerproteinen unter verschiedenen Bedingungen wurden bei 20facher Vergrößerung jeweils 10 Gesichtsfelder unter Konstanthaltung der Belichtungszeit aufgenommen. Die Auszählung der markierten Zellen erfolgte manuell mit Hilfe der AlphaEaseFC™ Software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

2.16 Molekularbiologische Methoden

2.16.1 Herstellen von kompetenten Bakterien für die Elektroporation

Zur Herstellung und Vermehrung von Konstrukten und Plasmiden wurden Bakterienzellen des Stamms *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α benutzt. Für die Vermehrung der shRNA-Konstrukte zur Herstellung der Adeno-assoziierten-Viren wurde eine Variante, so genannte *Sure*-Zellen, verwendet, die besonders geeignet sind, um irreguläre DNA wie z.B. *inverted repeat*- und Sekundärstruktur-bildende Sequenzen zu klonieren. Die *E. coli* wurden auf einer LB-Platte (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1% Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Medium mit der Bakteriensuspension angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde durch eine 15-minütige Inkubation in einem Eisbad gestoppt. Danach wurden die Zellen bei 3500 rpm und 4°C für 20 min pelletiert. Die Bakterien wurden in 500 ml eiskaltem autoklavierten Aqua dest. aufgenommen und nach dem Lösen wieder pelletiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal mit zunächst 500 ml und dann 250 ml eiskalter 10%-Glycerinlösung wiederholt. Das nun erhaltene Pellet wurde in 20 ml 10%-Glycerinlösung aufgenommen und nach dem Mischen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet mit 1 bis 2 ml 10%-Glycerinlösung resuspendiert und nach dem Aliquotieren bei -80°C aufbewahrt.

2.16.2 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien durch Elektroporation

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Für die Elektroporation wurden 45 μ l Bakterien mit 2 μ l DNA aus dem Ligationsansatz vermischt und in eine kalte Elektroporationsküvette überführt. Diese wurde in die Elektroporationskammer eingebracht. Der Gen-Pulser wurde auf 1,8 kV, 25 mF und 200 W eingestellt. Nach Auslösen des Pulses wurden die Bakterien sofort in 1 ml SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 nM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 nM MgCl₂, 10 nM MgSO₄, 20 mM Glukose) resuspendiert und für 45 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 50 μ l und 250 μ l der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (50 mg/l) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.16.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

DNA-Minipräparation

Zur schnellen Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde ein Protokoll verwendet, das auf der Methode der alkalischen Lyse basiert. Dazu wurde 1 ml LB-Selektionsmedium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin) mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNaseA, pH8,0) aufgenommen und die Bakterien durch Zugabe von 150 µl Lysepuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1). An dieser Stelle fielen genomische DNA und ein Großteil der Proteine aus und konnten durch Zentrifugation für 20 min bei 12.000 x g und 4°C von der noch in Lösung befindlichen Plasmid-DNA abgetrennt werden. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und für 10 min bei 12.000 x g bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 600 µl 70% Ethanol und anschließender Zentrifugation (3 min, 12.000 x g, RT) gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes und Luft-Trocknung des DNA-Pellets wurde die DNA in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

DNA-Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma Machery-Nagel eingesetzt. Die Methode basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule. Das Vorgehen erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.16.4 Restriktions-Spaltung von Plasmid- DNA

Für die Restriktionsreaktionen wurde die DNA mit 3-5 Units des entsprechenden Enzyms pro µg DNA bei angegebener Temperatur im entsprechenden Puffersystem für eine Stunde inkubiert. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Fragmente anschließend aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

2.16.5 Ligation von DNA-Fragmenten

In den Vektor einzubauende DNA wurde, nach Kontrolle der Mengen der DNA durch Agarosegelelektrophorese, in dreifach molarem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Ligationen wurden mit 400 Units T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz bei RT für 20 min in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem durchgeführt.

2.16.6 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. DNA wandert aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode.

Für analytische und präparative Zwecke wurden Agarosegele angefertigt. Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA, pH 8,3) verwendet, die vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 6:1 mit 6x Ladepuffer (50% Sukrose, 1% SDS, 0,2% OrangeG) verdünnt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 bis 100 V. Als Laufpuffer diente jeweils 1x TAE. Das Gel wurde bei kurzweiligem UV-Licht (254 nm) betrachtet und photographiert.

2.16.7 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation der DNA-Fragmente wurde unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraktion Kits“ der Firma Qiagen durchgeführt. Dieses arbeitet nach dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an eine Silikon-Gel-Membran. Dabei macht man sich zunutze, dass DNA bei hohen Salzkonzentrationen an der Säulenmatrix haften bleibt, während Kontaminationen gewaschen werden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann die DNA eluiert werden.

Die gesuchten Banden wurden anhand des Größenstandards identifiziert, mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen und nach Herstellerangaben weiter bearbeitet.

2.16.8 Inhibierung der Genexpression mittels shRNA

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die sequenzspezifische, posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression durch den gezielten Einsatz von RNA-Molekülen, welche zur Sequenz des auszuschaltenden Gens homolog sind. In der Zelle wird doppelsträngige RNA

in 21-23 Nukleotide lange Fragmente, den sogenannten siRNAs (*small interfering RNA*) gespalten. Dies erfolgt durch das Enzym *Dicer*, welches eine katalytische RNase III Domäne enthält. Die siRNAs werden daraufhin in den *RNA induced silencing complex* (RISC) integriert, wodurch die Degradation der komplementären RNA induziert wird.

Im Gegensatz zu synthetischen siRNAs ermöglicht der Einsatz vektorbasierender *short-hairpin RNAs* (shRNAs) auch eine längerfristige Hemmung der Genexpression, da die siRNA-Moleküle kontinuierlich in der Zelle synthetisiert werden. Darüber hinaus können die shRNA-tragenden Plasmide in virale Vektoren integriert werden, wodurch das Spektrum an transfizierbaren Zelltypen erheblich erweitert wird.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Virustypen verwendet: Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Lentiviren. Das Adeno-assoziierte Virus ist ein Parvovirus aus der Familie der Dependoviridae. Es infiziert eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, einschließlich neuronaler und glialer Zellen des ZNS. Verschiedenen Serotypen zeigten dabei ein unterschiedliches Spektrum an infizierbaren Zelltypen. Der in dieser Arbeit verwendete Serotyp 2 infiziert mit hoher Effizienz postmitotische Neurone (Shevtsova et al., 2004; Tenenbaum, 2004). Die Lentiviren gehören zu der Familie der Retroviren (Orthoretroviren). Charakteristisch für Retroviren ist die reverse Transkriptase, die es ermöglicht, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und anschließend in das Wirtsgenom stabil zu integrieren. Lentiviren können sowohl proliferierende als auch ruhende bzw. differenzierte Zellen infizieren.

2.16.8.1 Design von shRNA-Sequenzen

Die Generierung T β R11-spezifischer shRNAs erfolgte unter Nutzung der RNAi-Design Software von OligoEngine. Mit Hilfe dieser wurden, basierend auf der cDNA-Sequenz des Zielgens (*Gene Bank Accession No.* NM_009371), spezifische siRNA-Sequenzen von 19 bp Länge ermittelt.

Unter den angezeigten siRNA-Sequenzen wurden fünf aufgrund ihres *Score*-Wertes ausgewählt, welcher ein algorithmischer Indikator für die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Inhibition mit dieser Sequenz darstellt. Zusätzlich wurden die siRNA-Sequenzen mit Hilfe der Suchfunktion "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) analysiert, um signifikante Homologien mit anderen Genen als dem Zielgen ausschließen zu können. Nachfolgend wurden diese dann als Vorlage für die Synthese der shRNA-Oligomere herangezogen. Diese beinhalten neben der dem Zielgen homologen Sequenz eine *Spacer*-Sequenz sowie am 5'-Ende eine *XhoI* und am 3'-Ende die T5-Sequenz und einige Nukleotide der *HindIII*-Sequenz zur Klonierung in den pSuper-Vektor. Die genauen Sequenzen der shRNA-Konstrukte befinden sich im Anhang.

sense:

5'- GATCCCC – Zielsequenz – TTCAAGAGA – Zielsequenz (invers) – TTTTGC – 3'

antisense:

5'-TCGAGAAAA– Zielsequenz – TCTCTTGAA – Zielsequenz (invers) – GGG-3'

2.16.8.2 Klonierung von pSuper-Konstrukten zur Expression der T β RII-shRNAs in Zelllinien

Der Vektor pSuper exprimiert shRNAs unter Kontrolle des H1-RNA-pol III-Promotors (Brummelkamp et al., 2002). Diese können nach Export ins Zytoplasma von dem Enzym *Dicer* zu funktionellen siRNAs prozessiert werden.

Zur Hybridisierung der *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurden jeweils 1 μ g jedes Oligonukleotids und 5 μ l 10x Puffer B (Fermentas, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l H₂O im Thermocycler bei 94°C für 4 min erhitzt und dann schrittweise auf Raumtemperatur abgekühlt (4 min 80°C, 4 min 75°C, 4 min 70°C, 20 min 37°C, RT). Die Oligonukleotide wurden über die Schnittstellen BglIII und XhoI in die *Multiple Cloning Site* des pSuper-Vektors kloniert.

Nach der Elektroporation des Ligationsansatzes in elektrokompente *E. coli* Zellen wurde die Bakteriensuspension auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Zur Überprüfung der Klone wurden Plasmid-Minipräparation angefertigt und die Plasmid-DNA mit EcoRI und XhoI verdaut. Klone mit dem korrekten Insert zeigten nach Agarosegelelektrophorese ein Bande bei 281 bp, negative Klone ohne Insert bei 248 bp.

2.16.8.3 Klonierung der shRNA-Konstrukte zur Verwendung in Adeno-assoziierten Viren

Der Vektor pAAV H1 CytbAS SEWB sowie der die shRNA tragende pSuper-Vektor wurden mit BstBI und HindIII geschnitten und die aufgereinigten, linearisierten Vektoren mit dem shRNA-Insert ligiert. Nach der Elektroporation des Ligationsansatzes in elektrokompente *E. coli* Sure-Zellen wurde die Bakteriensuspension auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht (maximal 10 bis 12 Stunden) wachsen gelassen.

Zur Überprüfung der Klone wurden Plasmid-Minipräparation angefertigt und die Plasmid-DNA der Klone wurden einerseits mit EcoRI und HindIII und andererseits mit SmaI geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt.

2.16.9 DNA-Sequenzierung

Um Punktmutationen in den klonierten shRNA-Konstrukten auszuschließen, wurden die fertig gestellten Konstrukte abschließend sequenziert. Die Sequenzierungs-PCR wurde nach folgendem Ansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl pipettiert:

0,5 µg	DNA
5 pmol	Primer (<i>M13-reverse</i>)
4 µl	ET-Mix
X µl	H ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1	Initiale Denaturierung	5 min 95°C
2	Denaturierung	20 sec 95°C
3	Annealing	15 sec 62°C
4	Elongation	4 min 60°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 25 mal wiederholt. Nach der PCR-Reaktion wurden den Proben je 10 µl H₂O hinzugefügt. Die Analyse wurde vom Institut für Humangenetik der Universität Göttingen übernommen.

2.16.10 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der *Ctgf-Knock-out* Mäuse und Embryonen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Die Biopsien wurden über Nacht in 500 µl Lysispuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl in Aqua dest.) mit 7,5 µl Proteinase K bei 55°C inkubiert, unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, RT) sedimentiert und aus dem Überstand wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt. Für die Gewinnung genomischer DNA aus primären Zellkulturen wurden die Zellen aus einem 24-Well mit 500 µl Lysispuffer + 7,5 µl Proteinase K für einige Stunden bei 55°C inkubiert und die DNA ebenfalls durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt. Durch Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, RT) wurde die DNA pelletiert, das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in Aqua dest. bei 37°C über Nacht gelöst.

2.16.11 Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus primären Zellkulturen und Zelllinien wurden Kits der Firmen Qiagen oder Machery Nagel entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die

Entfernung etwaiger Verunreinigungen mit genomischer DNA erfolgte mit der im Kit enthaltenen DNase.

2.16.12 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA- und DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines UV/VIS-Photometers bestimmt. Dazu wurden Verdünnungen der DNA- bzw. RNA-Lösung in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) hergestellt und bei 260 und 280 nm gegen einen Leerwert (nur TE-Puffer) gemessen. Bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleotide, lässt sich Konzentration von Nukleinsäuren nach folgender Formel ermitteln:

$$c[\text{mg/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor (für RNA: 40, für dsDNA: 50)}$$

Bei 280 nm befindet sich das Absorptionsmaximum von Proteinen und aus dem Quotient von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ kann daher die Reinheit der RNA bestimmt werden. Bei einer reinen RNA-Lösung beträgt der Quotient 2,0, bei einer reinen DNA-Lösung 1,7.

2.16.13 Reverse Transkription

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels Reverser Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Das erfolgte mit Hilfe des „RevertAid™ MMuLVReverse Transkriptase Systems von Fermentas. Dazu wurden zunächst 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und ein Hybridisieren der Primer zu ermöglichen. Dann wurde folgender Ansatz hinzu pipettiert:

4 µl	5 x Reaktionspuffer
1 µl	0,5 µg/µl Oligo(dT)12-18mer
1 µl	80 mM dNTPs
1 µl	RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 U/µl)
0,5 µl	RNase Inhibitor (40U/µl)

Der Mix wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend bei 72°C für 5 min inaktiviert.

2.16.14 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*; (Saiki et al., 1985)) ist eine Methode, die die spezifische Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für Expressionsanalysen in primären Zellkulturen (so genannte Reverse Transkriptase-PCR; RT-PCR), für die Überprüfung des Rekombinationsereignisses in hippokampalen Neuronen aus T β RII (flox/flox) Mäusen nach Transduktion mit AAV-Cre und für die Genotypisierung der *Ctgf-Knock-out* Tiere eingesetzt.

2.16.14.1 PCR zur Überprüfung des Rekombinationsereignisses in hippokampalen Neuronen aus T β RII (flox/flox) Mäusen nach Transduktion mit AAV-Cre

Hierzu wurde die genomische DNA aus hippokampalen Primärkulturen von T β RII (flox/flox) Mäusen nach Transduktion mit AAV-Cre bzw. ohne AAV-Cre an DIV12 gewonnen. Diese genomische DNA wurde dann neben Kontroll-DNA aus T β RII (flox/+) Tieren in folgende PCR eingesetzt:

2 μ l	10x PCR-Puffer (ohne Mg ²⁺)
1,2 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,2 μ l	80 mM dNTPs
1 μ l	Primer <i>forward</i> (10 pmol) (Bam up bzw. Kpn up)
1 μ l	Primer <i>reverse</i> (10 pmol) (Bam down)
1 μ l	DNA
0,1 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l)
13,5 μ l	H ₂ O

Das Amplifizierungsprogramm umfasste folgende Schritte:

1	Initiale Denaturierung	5 min 95°C
2	Denaturierung	1 min 95°C
3	Annealing	30 sec 62°C
4	Elongation	1 min 72°C
5	Finale Elongation	5 min 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden in insgesamt 40 Zyklen wiederholt.

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande des Wildtyp-Allels entspricht einer Größe von 422 bp. Das Amplifikat des geflochten Allels hat eine Größe von 575 bp. Die Bande des KO-Allels nach erfolgreicher Rekombination liegt bei 692 bp.

2.16.14.2 PCR zur Genotypisierung der *Ctgf*-Knock-out Tiere

Zur Genotypisierung wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen und in die nachfolgend beschriebene PCR eingesetzt:

2 µl	10x PCR-Puffer (ohne Mg ²⁺)
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,2 µl	80 mM dNTPs
0,5 µl	Primer P20 (50 pmol)
0,25 µl	Primer P21 (10 pmol)
1 µl	Primer P23 (10 pmol)
1 µl	DNA
0,1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
13,75 µl	H ₂ O

Das Amplifizierungsprogramm umfasste folgende Schritte:

1	Initiale Denaturierung	5 min 95°C
2	Denaturierung	30 sec 95°C
3	Annealing	45 sec 59°C
4	Elongation	75 sec 72°C
5	Finale Elongation	5 min 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden in insgesamt 35 Zyklen wiederholt.

Aus dem Bandenmuster der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Amplifikate wurde der Genotyp ermittelt. Für Wildtypen wurde nur das 400 bp-Fragment, für *Ctgf* (-/-) nur das 560 bp-Fragment amplifiziert. Für heterozygote Tiere ließen sich beide Allele nachweisen.

2.16.14.3 Semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei einem semiquantitativen Vergleich des Gen-Expressionslevels mittels RT-PCR ist es von essentieller Bedeutung, dass sich die PCR im linear ansteigenden Teil der DNA-Amplifikationskurve befindet, um die Unterschiede in der Genexpression zu zeigen.

Deshalb wurden in Vorversuchen für die einzelnen Primerpaare zunächst die optimalen Zykluszahlen ermittelt. Es wurde eine Zykluszahl in dem Bereich gewählt, indem noch eine lineare Steigerung der Amplifikation stattfand. Die Angabe der optimierten Zykluszahlen findet sich zusammen mit den Primersequenzen im Anhang.

Im folgenden ist das Pipettierschema für einen 20 µl Ansatz dargestellt:

2 µl	10x PCR-Puffer (ohne Mg ²⁺)
1,2 µl	MgCl ₂ l (25 mM)
0,2 µl	80 mM dNTPs
1 µl	Primer <i>forward</i> (10 pmol)
1 µl	Primer <i>reverse</i> (10 pmol)
1 µl	cDNA (1 µg /µl)
0,1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
13,5 µl	H ₂ O

Zur Amplifikation diente folgendes Programm:

1	Initiale Denaturierung	5 min 95°C
2	Denaturierung	15 sec 95°C
3	Annealing und Elongation	1 min 59°C
4	Finale Elongation	5 min 72°C

Die Schritte 2 und 3 wurden primerabhängig, gemäß der ermittelten optimalen Zykluszahl, wiederholt.

2.16.15 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit bietet. In einer Real-Time PCR wird, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen Kopien nach jedem Zyklus gemessen. Die Messung kann mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe erfolgen, in dieser Arbeit wurde *SYBR-Green* verwendet. *SYBR-Green* bindet nur an doppelsträngige DNA und ändert dabei sein Emissionsmaximum. Bei der Wellenlänge von 530 nm kann die Zunahme von doppelsträngiger DNA verfolgt werden. Zur Quantifizierung wird der Anfang der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion benutzt, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen mit jedem Zyklus verdoppelt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, als CT-Wert (*threshold cycle*)

angegeben. Die Expression des Zielgens wird mit einem Referenzgen normalisiert, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA-Probe auszugleichen. Als Referenzgen diente hier das *Housekeeping-gene Gapdh*.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen behandelter und unbehandelter Probe erfolgte mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode nach folgender Berechnung:

$$\Delta CT = CT\text{-Zielgen} - CT\text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT\text{ Behandlung} - \Delta CT\text{ unbehandelte Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Voraussetzung für die Anwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ist, dass alle verwendeten Primer annähernd die gleiche Effizienz besitzen. Im optimalen Fall, in dem sich die Zielsequenz mit jedem Zyklus verdoppelt, wäre die Effizienz = 2. In der Praxis sind die Effizienzen jedoch etwas geringer.

Die für die quantitative Real-Time PCR verwendeten Primerpaare wurden mittels einer Standardkurve auf ihre Effizienz überprüft. Dazu wurden vier Verdünnungsstufen der cDNA hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und deren CT-Werte halblogarithmisch über der DNA-Menge aufgetragen. Aus der Steigung (m) der Standardkurve lässt sich dann die Effizienz (E) nach folgender Formel berechnen:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Es wurden nur Primerpaare verwendet deren Effizienzen zwischen 1,7 und 1,9 lagen.

Für die Real-Time PCR wurde ein Mastermix bestehend aus 12,5 μl *SYBR-Green* PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μl cDNA (1:10 verdünnt) und 5,5 μl Aqua dest. pro Reaktion angefertigt. Je 20 μl davon wurden in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert und je 5 μl des Primerpaargemisches hinzugefügt. Die PCR-Platte wurde mit einem optischen Film versiegelt, für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert.

Die Reaktion wurde im Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nach folgendem Programm durchgeführt: 10 min Denaturierung bei 95°C, 40 Zyklen mit 15 sec 95°C, 1 min 59°C. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, um das Vorkommen von Fehlamplifikaten zu kontrollieren.

2.16.16 Primerdesign

Alle Oligonukleotidprimer für die Zielgen-Expressionsanalyse wurden mit dem Programm PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) entworfen und von der Firma Invitrogen bezogen.

Dabei wurden die Primer so gewählt, dass ihr Schmelzpunkt zwischen 58 und 60°C lag und das Amplifikat eine Länge zwischen 100 und 200 bp aufwies. Exon-Intron-Grenzen überspannende Primer wurden nach Möglichkeit bevorzugt. Die Spezifität wurde mittels BLAST-Sequenzvergleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) überprüft.

2.17 Proteinbiochemische Methoden

2.17.1 Zellaufschluss

Um kultivierte Zellen zu lysieren, wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und dann in PBS mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge NP40-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% Nonident P40 Substituent), dem Protease-Inhibitor (1:25) zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Beschallen mit Ultraschall im Ultraschallbad für jeweils 5 min aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm von Debris befreit. Dann wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt.

2.17.2 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Nach der Isolierung wurden die Proteine nach der Bradford-Methode gemessen (Bradford, 1976). Diese Methode basiert auf der proportionalen Bindung von Coomassie-Blue an das Protein. Als Abgleich für die Proteinmengen wurde eine Standardkurve definierter BSA-Mengen erstellt. Die Zellextrakte sowie die BSA-Konzentrationsreihe wurden mit einer Verdünnung von 1:50 in einem Endvolumen von 100 µl in Aqua dest. aufgenommen und anschließend mit 400 µl 1x Bradford-Reagenz vermischt. Die Proben wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mittels eines UV/VIS-Photometers bei einer Absorption von 595 nm gemessen.

2.17.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zum elektrophoretischen Auftrennen von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen.

Zur Auftrennung des flag-markierten T β RIL wurde ein 10%-Polyacrylamidgel verwendet (Sammelgel: 0,12 M Tris (pH 6,8), 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 4 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 0,05 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED; Trenngel: 0,38 M Tris (pH 8,8), 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 10 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 0,05 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED).

Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden mit 4x NuPage® LDS Sample Puffer und 50 mM DTT für 10 min bei 70°C erhitzt um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor sie in die Geltaschen geladen wurden. Die Gelelektrophorese fand in ELPHO-Puffer als Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 1% SDS, pH8.3) bei einer Spannung von 120 V statt und wurde abgestoppt, wenn die blau gefärbte Lauffront des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte.

2.17.4 Western Blot

Es gibt verschiedene Varianten des Western-Blotting. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren ist das so genannte *Semi-Dry-Blotting*, bei dem die im SDS-PAGE aufgetrennten und zu Banden fokussierten Proteine über eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Anschließend erfolgt die Detektion über proteinspezifische Antikörper und Enzym-gekoppelte Sekundäntikörper.

Das Polyacrylamidgel und die in Transferpuffer (250 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 2% SDS, pH8.4; 10% Methanol frisch) angefeuchtete Nitrocellulosemembran wurden zwischen Schichten von mit Transferpuffer befeuchteten Whatman-Papieren gelegt und in die Blot-Apparatur eingebracht. Bei einer konstanten Stromstärke von 4 mA/cm² wurden nun die Proteine für 1,5-2 Stunden übertragen. Nach dem Transfer der Proteine wurden die Membranen für 10 min in TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 0,5% Tween-20) gewaschen. Dann wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockpuffer (5% Magermilchpulver, 0,1% Tween-20 in TBS) zwei bis drei Stunden abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper verdünnt in Blockpuffer über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min mit TBS-T wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Zweit-Antikörper verdünnt in TBS-T inkubiert. Danach wurde wieder dreimal für 15 min mit TBS-T gewaschen und anschließend erfolgte die Signaldetektion mit der verstärkten Chemilumineszenz-Methode. Als Substrat wurde die „Western Lighting Chemilumineszenz Lösung“ der Firma Millipore nach Angaben des Herstellers verwendet. Entsprechend der Signalstärke wurden unterschiedliche Zeiträume für die Belichtung der Röntgenfilme benötigt. Zum Abschluss wurde der Röntgenfilm entwickelt, kurz in Wasser gewaschen und fixiert und nach der Trocknung mit einem Flachbett-Scanner (Epson) eingelesen

2.18 Statistische Auswertung

In allen Untersuchungen wurden Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ($n \geq 3$) erhoben. Diese Werte wurden zur statistischen Prüfung in die GraphPad Prism-Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) importiert. Zum Vergleich zweier Behandlungsgruppen wurde der *Students t-test* verwendet. Die Signifikanzniveaus sind mit * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ angegeben. Alle Werte sind in graphischen Darstellungen als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) wiedergegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung dissoziierter Neurone des Hippokampus und Cortex im Hinblick auf die Responsivität gegenüber TGF- β -Signalen

Als Zellmodell zur Untersuchung von möglichen Funktionen von TGF- β während der Entwicklung von neuronalen Zellen wurden dissoziierte Kulturen des Cortex und Hippokampus aus embryonalen Mäusen der Embryonalstadien 14,5 und 16,5 (E14,5 und E16,5) verwendet. Zunächst sollte überprüft werden, ob in den dissoziierten Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen die charakteristischen Komponenten des TGF- β -Signalweges in funktioneller Form vorhanden sind.

3.1.1 Expression der TGF- β Isoformen und deren Rezeptoren

Aus *in vivo* Studien ist bekannt, dass alle drei TGF- β -Isoformen im zentralen Nervensystem vorkommen. Während TGF- β 2 und TGF- β 3 von Neuronen und Gliazellen gebildet werden, ist TGF- β 1 im intakten, unverletzten zentralen Nervensystem nur in Meningen und im Plexus choroideus zu finden (Flanders et al., 1991; Pelton et al., 1991). Auch die Expression der mRNA des TGF- β -Rezeptors Typ II (T β RII) konnte weit verbreitet im ZNS nachgewiesen werden (Böttner et al., 1996). Um festzustellen, ob die dissoziierten neuronalen Kulturen TGF- β s und deren Rezeptoren besitzen, wurde die Expression der TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 und der TGF- β -Rezeptoren des Typs I und II auf mRNA-Ebene untersucht.

Dazu wurde RNA aus dissoziierten Kulturen des Cortex aus E14,5 und E16,5 embryonalen Mäusen sowie aus Kulturen des Hippokampus von E16,5 Mäusen am vierten Kulturtag (DIV4) gewonnen und mittels RT-PCR auf das Vorhandensein dieser Transkripte überprüft.

Es zeigte sich, dass sowohl alle drei TGF- β -Isoformen (Abbildung 5A), als auch die TGF- β -Rezeptoren Typ I und II (Abbildung 5B) in den cortikalen und hippokampalen Kulturen exprimiert werden.

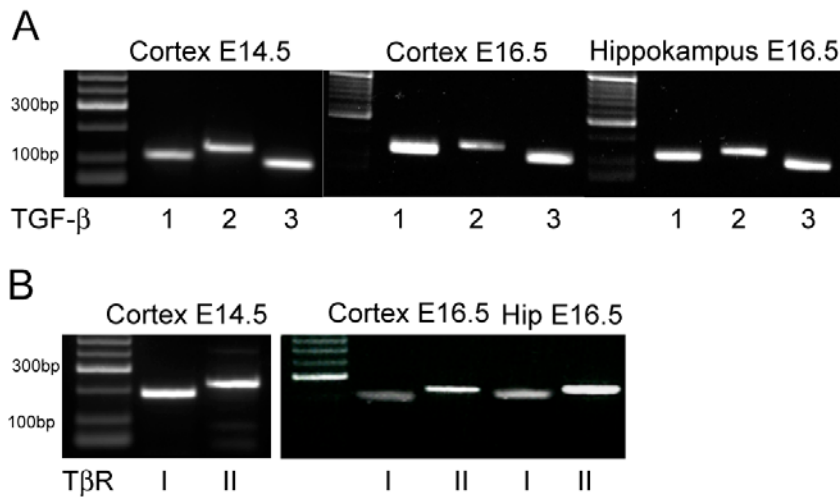


Abbildung 5: Dissoziierte cortikale und hippocampale Kulturen sind mit Molekülen zur TGF- β -Signaltransduktion ausgestattet

Die RT-PCR Analyse zeigt die Expression der TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 (A) sowie der Rezeptoren T β RI und II (B) in cortikalen und hippocampalen Kulturen an DIV4.

3.1.2 Sekretion von TGF- β

Um sicherzustellen, dass diese Komponenten des TGF- β -Signalweges auch funktionell aktiv und die Zellen somit responsiv für TGF- β -Signale sind, wurden weitere Untersuchungen benötigt.

Zunächst wurde die Sekretion von TGF- β aus den neuronalen Kulturen mittels des PAI-1-Luciferase-Assays bestimmt (Abe et al., 1994). Dazu wurde das konditionierte Medium aus Kulturen von jeweils 100.000 ausgesäten Zellen nach vier Tagen Kultivierung gesammelt, in der Hälfte des Mediums wurde das latent gebundene TGF- β durch Säurebehandlung freigesetzt und mit MLEC (*mink lung epithelial cells*) inkubiert. Die mit dem PAI-1-Luciferase-Konstrukt stabil transfizierten MLEC zeigen nach der Stimulation mit TGF- β eine erhöhte Luciferase-Expression, welche in einer chemischen Reaktion in Lumineszenz verwandelt und somit gemessen werden kann. Diese Lumineszenzaktivität kann dann als Maß für die Konzentration von TGF- β im konditionierten Medium verwendet werden. In den cortikalen Kulturen beider Entwicklungsstadien sowie in den hippocampalen Kulturen konnte eine Sekretion von TGF- β in das Kulturmedium nachgewiesen werden (Abbildung 6).

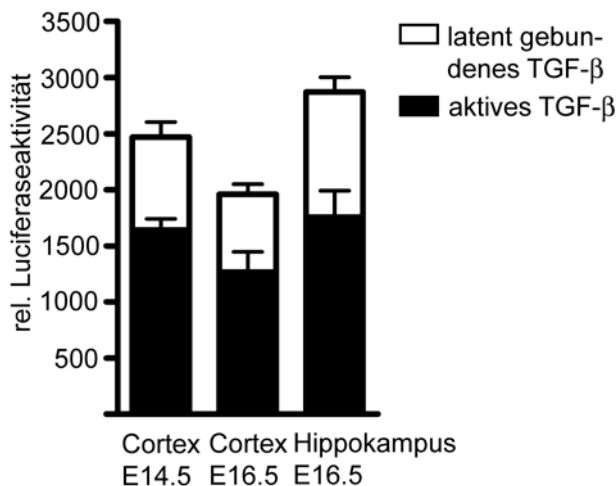


Abbildung 6: TGF- β -Sekretion in dissoziierten kortikalen und hippocampalen Kulturen

Zellkulturüberstände von kortikalen und hippocampalen Kulturen an DIV4 wurden mittels PAI-1-Luciferase-Assay auf ihren Gehalt an aktivem und latent gebundenem TGF- β analysiert. Sowohl kortikale Neurone aus E14,5 und E16,5 Embryonen als auch hippocampale Neurone aus E16,5 Embryonen sekretieren TGF- β in aktiver und latent gebundener Form. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von jeweils drei Messungen \pm SEM.

3.1.3 Aktivierung von Smad-Proteinen

Die Responsivität der neuronalen Kulturen auf TGF- β -Signale wurde weiterhin durch die Lokalisation von Smad-Proteinen untersucht. Nach Aktivierung der TGF- β -Rezeptoren durch die Bindung von TGF- β kann eine Smad-abhängige Signalkaskade ausgelöst werden, in deren Verlauf es zu einer kurzzeitigen Translokation von Smad2 und Smad3 vom Zytosol in den Zellkern kommt (Derynck und Zhang, 2003). Da TGF- β , wie zuvor gezeigt, von kortikalen und hippocampalen Kulturen konstitutiv sekretiert wird, wurden die Kulturen für 24 Stunden mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) vorbehandelt. SB431542 inhibiert selektiv die Typ I TGF- β -Rezeptoren ALK4, 5 und 7, ohne einen Effekt auf andere ALK-Familienmitglieder zu haben (Inman et al., 2002). Es inhibiert spezifisch TGF- β - oder Aktivinstimulierte Smad-Phosphorylierung, beeinflusst die ERK-, JNK- und p38-MAPK-Signalweg jedoch nicht. Anschließend wurden die Kulturen für eine Stunde mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert und die Lokalisation von Smad-Proteinen mittels eines Antikörpers gegen Smad1, 2 und 3 immunzytochemisch untersucht. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse in hippocampalen und kortikalen Kulturen aus E16,5 Embryonen nach vier oder zwölf Tagen in Kultur dargestellt. Unter Kontroll-Bedingungen war eine diffuse Verteilung von Smad1,2,3 überwiegend im Zytosol zu beobachten. Nach 60-minütiger Behandlung mit TGF- β 1 dagegen, war eine deutliche Lokalisation von Smad1,2,3 Immunreaktivität im Zellkern festzustellen.

Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl junge (DIV4) als auch reife (DIV12) Neuronenpräparationen von Cortex und Hippokampus responsiv für TGF- β -Signale sind.

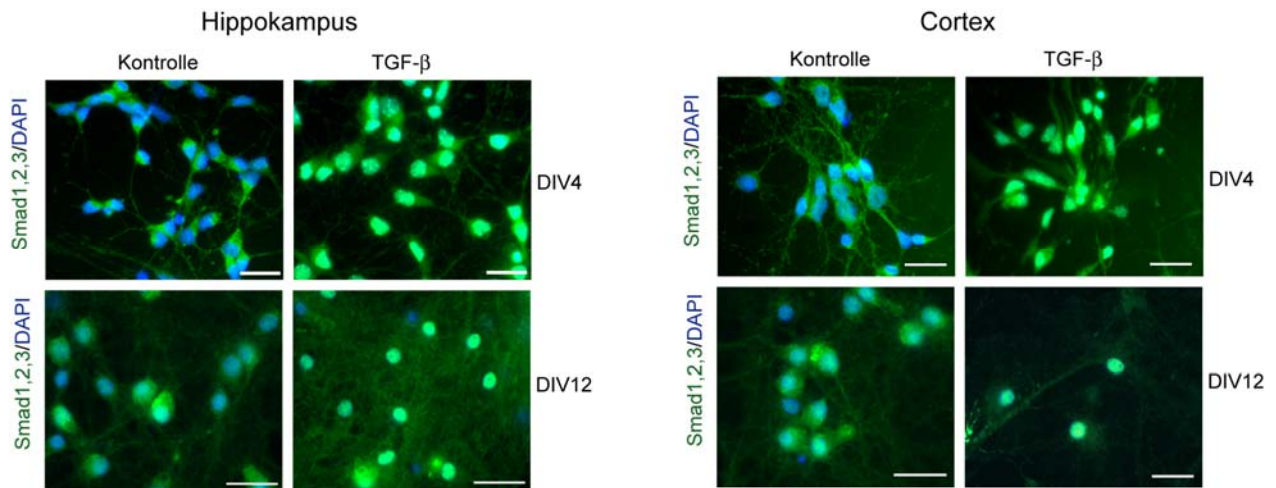


Abbildung 7: Hippokampale und cortikale Kulturen sind responsiv für TGF- β -Signale

Immunocytochemischer Nachweis von Smad1,2,3 in hippokampalen und cortikalen Kulturen an DIV4 und DIV12. Unter Kontroll-Bedingungen war eine Lokalisation von Smad1,2,3 überwiegend außerhalb des Zellkerns im Zytosol zu beobachten. Nach Stimulation mit TGF- β kam es zu einer Translokation der Smad-Proteine in den Zellkern. Maßstab: 50 μ m.

Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse, dass dissoziierte embryonale Neuronenpräparationen des Cortex und Hippokampus eine funktionsfähige TGF- β -Signalkaskade aufweisen und daher ein geeignetes Modell darstellen, TGF- β induzierte Mechanismen in sich entwickelnden neuronalen Zellen des Vorderhirns zu untersuchen.

3.2 Evaluierung von Zielgen-Kandidaten des TGF- β -Signalweges in primären hippokampalen Kulturen

TGF- β ist ein vielfältiges Molekül mit oft sehr gegensätzlichen Wirkungsweisen in einer Vielzahl von Organsystemen. Aber auch innerhalb des zentralen Nervensystems sind differentielle Auswirkungen im Zusammenhang mit TGF- β beschrieben worden (s. Kapitel 1.1.8). Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen desselben Zytokins können nur durch genau aufeinander abgestimmte Regulationen von stromabwärts gelegenen Zielgenen erreicht werden, durch die TGF- β schließlich die jeweiligen Effekte entfaltet.

Eine erste Annäherung an die Funktion von TGF- β für die Entwicklung von Neuronen im embryonalen ZNS kann daher durch das Studium der von TGF- β an- oder abgeschalteten Zielgene erfolgen. In der Literatur sind bereits für viele Organsysteme zahlreiche Gene beschrieben worden, die spezifisch durch TGF- β -Signalwege reguliert werden. Für das zentrale Nervensystem sind allerdings nur sehr wenige Zielgene bekannt. Daher sollten im ersten Teil dieser Arbeit potentielle TGF- β -Zielgenkandidaten auf ihre Regulation in primären

Zellkulturen des Hippokampus mittels semiquantitativer RT-PCR und Real-Time PCR evaluiert werden. Als Ausgangsbasis für diese Analyse wurden 70 Gene ausgewählt, die in der Literatur durch *Microarray*-Studien in endothelialen, mesenchymalen und ependymalen Zellen als potentielle TGF- β -Zielgene beschrieben worden sind (Verrecchia et al., 2001; Zavadil et al., 2001; Ota et al., 2002; Kang et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhao et al., 2004) und eine Bedeutung für das Nervensystem haben. Die Tabelle 2 gibt eine kurze Übersicht über die getesteten Gene. Eine detaillierte Auflistung mit den *Accession numbers* und den Sequenzen der verwendeten Primerpaare befindet sich im Anhang.

Für die Analyse wurden hippokampale Primärkulturen aus E16,5 Mäuseembryonen an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Kultivierung verwendet: an DIV4, wenn die Kultur noch viele Vorläuferzellen sowie junge Neurone enthält und an DIV12, wenn die Kultur überwiegend aus ausdifferenzierten Neuronen besteht. Da die hippokampalen Kulturen konstitutiv TGF- β sekretieren und somit ein gewisses Level an basaler TGF- β -Signalaktivität herrscht, wurden die Kulturen wiederum für 24 Stunden mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 5 ng/ml TGF- β 1 über einen Zeitraum von zwei Stunden, um eher schnelle Regulationen zu erfassen und über 24 Stunden, um auch lang anhaltende und verzögert einsetzende Effekte mit einzuschließen. Als Kontrolle dienten nur mit SB431542 behandelte Kulturen. Aus den Zellen wurde nach Behandlung die Gesamt-RNA gewonnen und daraus cDNA synthetisiert, welche als *Template* für die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Zunächst wurde jedes Gen in allen Bedingungen mindestens dreimal mit cDNAs aus unterschiedlichen Zellpräparationen mittels semiquantitativer RT-PCR getestet. Diejenigen Gene, die in mindestens zwei von drei Fällen eine deutliche Regulation zeigten, wurden anschließend durch Real-Time PCR nochmals verifiziert.

Tabelle 2: Potentielle TGF- β -Zielgene ermittelt in *Microarray*-Analysen in endothelialen, ependymalen und mesenchymalen Zellen (Verrecchia et al., 2001; Zavadil et al., 2001; Ota et al., 2002; Kang et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Zell-Matrix-Interaktion	Zell-Zell-Interaktion	Signalmoleküle und Effektoren	
Decorin	Catenin- β 3	Akap9	Nedd9
Igfbp3	Deltex 1	Anxa2	Nrg1
Igfbp5	Dishevelled 1	Bmp4	Nrg3
Integrin- α 3	Dishevelled 2	Bmpr2	p15Ink4b
Integrin- α 5	Dishevelled 3	c-Myc	p21Cip1
Integrin- β 3	Ephb2	Ctgf	RhoB
Integrin- β 5	Ephrin A1	Fgfr1	Rock1
Laminin B1	Ephrin B1	Fstl3	Smad7
MMP-2	Gja4	Fzd1	Snail2
MMP-3	Smoothened	Fzd7	Sortilin1
MMP-11	Tle3	Gata2	Sox4
MMP-14	Vdac	Hes1	Sox9
MMP-16	Wnt2b	Hgf	Sox10
Neogenin	Wnt8b	Id1	Spry2
Semaphorin 3b		Id2	Tgif
Semaphorin 4c		Id3	
TenascinC		Igf2r	
Timp1		Inhba	
Timp2		Jagged1	
Timp3		Lrrn3	

3.2.1 TGF- β regulierte Zielgene in jungen hippokampalen Kulturen (DIV4)

In jungen hippokampalen Kulturen nach viertägiger Kultivierung konnten neun deutlich regulierte Gene identifiziert werden (Abbildung 8). Davon zeigten fünf (Ctgf, Hes1, Nedd9, Smad7 und Tle3) eine andauernde Hochregulation sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Behandlung mit TGF- β . Fstl3 und Itga5 waren kurzfristig nach zwei Stunden verstärkt exprimiert, nach 24 Stunden sank das Expressionslevel jedoch wieder auf das Kontrollniveau ab. Bei Gata2 war die anfängliche Induktion der mRNA gefolgt von einer starken Repression. Zwei Gene zeigten insgesamt eine Verminderung der Genexpression. Bei Id3 war diese sowohl kurz- als auch langfristig, bei Itga3 war die Repression erst nach 24 Stunden deutlich messbar. In der Tabelle 3 sind die in der Real-Time PCR ermittelten quantifizierten Werte der Expressionsänderungen angegeben.

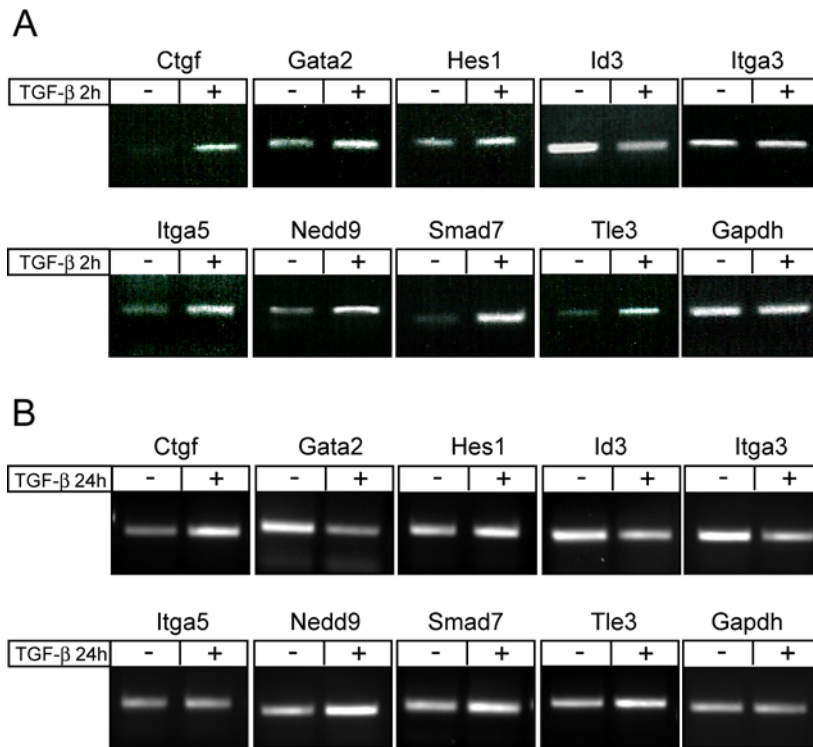


Abbildung 8: Regulation von TGF- β -Zielgenen in jungen hippocampalen Kulturen (DIV4)

Die semiquantitative RT-PCR nach zwei Stunden (A) und 24 Stunden (B) Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/ml) identifiziert neun regulierte Gene.

Tabelle 3: Quantitative Real-Time PCR-Analyse der TGF- β regulierten Zielgene in jungen hippocampalen Kulturen (DIV4) Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode und der Zahlenwert entspricht der x-fachen Expressionsänderung der TGF- β behandelten Probe in Bezug auf die Kontrolle.

Gen	2h TGF- β	24h TGF- β
Ctgf	3,58	1,93
Gata2	3,19	-7,16
Hes1	2,23	3,61
Id3	-2,03	-3,25
Itga3	1,15	-2,07
Itga5	2,49	-1,50
Nedd9	3,79	3,34
Smad7	3,77	2,62
Tle3	2,14	-1,22

3.2.2 TGF- β regulierte Zielgene in reifen hippokampalen Kulturen (DIV12)

In ausgereiften hippokampalen Kulturen (DIV12) konnten 13 deutlich regulierte Gene detektiert werden (Abbildung 9). Ctgf, Nedd9 und Smad7 waren ebenso wie in den jungen Kulturen sowohl kurz- als auch langfristig hochreguliert. Abweichend zu den Beobachtungen an DIV4 war Gata2 an DIV12 nicht nur kurzfristig sondern auch lang anhaltend verstärkt exprimiert, es kam also zu keiner Repression nach fortgesetzter TGF- β -Stimulation von Gata2. Fstl3 und Itga5 waren jeweils nur kurzzeitig nach zwei Stunden hochreguliert, nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung erreichte das Expressionslevel wieder das Ausgangsniveau. Timp3 und TnC zeigten erst nach 24-stündiger Behandlung eine erhöhte Expression. Fünf Gene reagierten auf die TGF- β -Behandlung mit einer Expressionsminderung. Im Fall von Dtx1 und Igf2r trat diese bereits nach der zweistündigen Behandlung auf und war lang anhaltend, während Dvl1, Dvl3 und Itga3 erst verzögert nach 24 Stunden deutlich herabreguliert waren. In der Tabelle 4 sind die in der Real-Time PCR ermittelten quantifizierten Werte der Expressionsänderungen angegeben. Die Expressionsänderung von Dtx1 konnte aufgrund des für die Real-Time PCR ungeeigneten Primers nicht quantifiziert werden.

Insgesamt ergaben sich also Unterschiede in der Komposition der regulierten Gene in jungen und ausgereiften Kulturen. Während Ctgf, Gata2, Itga3, Itga5, Nedd9 und Smad7 in beiden Entwicklungsstadien reguliert waren, zeigten Hes1, Id3 und Tle3 ausschließlich in den jungen Kulturen eine Expressionsänderung, Dtx1, Dvl1, Dvl3, Fstl3, Igf2r, Timp3 und TnC dagegen nur in reifen Kulturen. Aufgrund bekannter Funktionen (s. Kapitel 4.1) können diese Zielgene in verschiedene Gruppen kategorisiert werden. Ctgf (*Connective tissue growth factor*), Timp3 (*Tissue inhibitor of metalloproteases 3*), TnC (*TenascinC*) sowie die Integrine $\alpha 3$ (Itga3) und $\alpha 5$ (Itga5) sind Proteine, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Gata2 (*GATA-binding protein 2*), Id3 (*Inhibitor of differentiation 3*) und Nedd9 (*Neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene 9*) spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung neuronaler Progenitoren. Tle3 (*Transducin like enhancer of split 3*), Dvl1 und Dvl3 (*Dishevelled homolog 1 und 3*), Dtx1 (*Deltex1*) und Hes1 (*Hairy and enhancer of split 1*) sind in Notch-und/oder Wnt-Signalwege involviert.

Ergebnisse

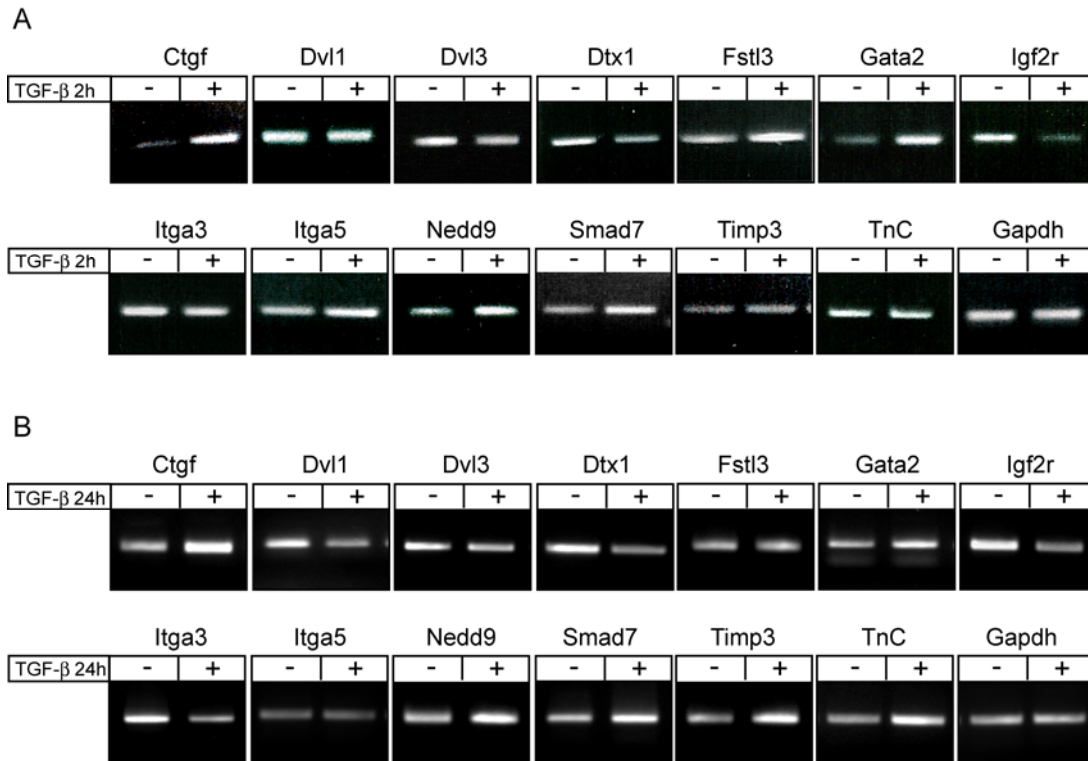


Abbildung 9: Regulation von TGF- β -Zielgenen in reifen hippokampalen Kulturen (DIV12)

Die semiquantitative RT-PCR nach zwei Stunden (A) und 24 Stunden (B) Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/ml) identifiziert 13 regulierte Gene.

Tabelle 4: Quantitative Real-Time PCR Analyse der TGF- β regulierten Zielgene in reifen hippokampalen Kulturen (DIV12) Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode und der Zahlenwert entspricht der x-fachen Expressionsänderung der TGF- β behandelten Probe in Bezug auf die Kontrolle.

Gen	2h TGF- β	24h TGF- β
Ctgf	9,92	12,36
Dvl1	1,1	-4,2
Dvl3	-1,14	-2,55
Fstl3	3,72	1,42
Gata2	2,59	4,61
Igf2r	-1,65	-2,65
Itga3	-1,31	-2,07
Itga5	4,78	1,1
Nedd9	3,45	2,51
Smad7	3,16	3,97
Timp3	1,57	2,72
TnC	1,17	2,27

3.2.3 TGF- β -Zielgene involviert in Notch- und Wnt-Signalwege

Die Entwicklung des Nervensystems wird durch eine Vielzahl von Signalen gesteuert, die aber im Wesentlichen auf wenige, evolutionär hoch konservierte Signalwege zurückzuführen sind. Ein wesentlicher Faktor für den geordneten Ablauf dieser Entwicklungsprozesse ist daher die korrekte Integration der verschiedenen Signalwege. In der Literatur existieren mehrere Hinweise darauf, dass auch die TGF- β -Signalwege in Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen stehen, insbesondere den Notch- und Wnt-Signalkaskaden.

Erste Hinweise auf mögliche Interaktionen zwischen TGF- β -, Notch- und Wnt-Signalwegen in hippokampalen Kulturen konnten auch durch die zuvor beobachteten Regulationen der Gene *Ctgf*, *Dtx1*, *Dvl1*, *Dvl3*, *Tle3* und *Hes1* gefunden werden.

Deshalb sollte innerhalb des Notch- und Wnt-Signalweges gezielt nach weiteren TGF- β -Zielgen-Kandidaten gesucht werden. Die Firma SABiosciences bietet *Pathway*-spezifische Real-Time PCR-Arrays an, bei denen sich in einer 96-Well-Platte Primerpaare für 84 *Pathway*-fokussierte Gene befinden. Es wurden die *RT² ProfilerTM PCR Arrays Mouse Notch Signalling Pathway* (PAMM-059) und *Mouse Wnt Signalling Pathway* (PAMM-043) verwendet. Ein Set besteht aus je zwei Platten, so dass eine mit der cDNA aus den Kontrollzellen und eine mit der cDNA aus den TGF- β stimulierten Zellen analysiert werden konnte. Hierfür wurde cDNA aus hippokampalen Kulturen an DIV4 nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode, dabei ist der Änderungsfaktor in der Expressionsstärke der TGF- β behandelten Probe gegenüber der Kontrolle als x-fache Änderung (*Fold-change*) angegeben. Die kompletten Ergebnisse dieser Arrays sind im Anhang dargestellt. Im Array inbegriffene RNA-Qualitätskontrollen bestätigten jedes Mal, dass die RNA keine Verunreinigungen mit genomischer DNA aufwies und durch die PCR-Qualitätskontrollen konnte sichergestellt werden, dass die Effizienz der PCR selbst in Ordnung war und dass keine Schwankungen zwischen den einzelnen Wells innerhalb der Platte auftraten. Als eindeutig reguliert wurden diejenigen Gene bewertet, bei denen der Änderungsfaktor mindestens 2,0 erreichte. Für diese Gene wurden selbst Primerpaare gesucht und die Regulation durch Wiederholung der quantitativen Real-Time PCR nochmals überprüft. Gleichzeitig wurde der Zeitraum der zweistündigen TGF- β -Behandlung in die Auswertung mit einbezogen. Gene, bei denen der Änderungsfaktor zwischen 1,6 und 2,0 lag, wurden ebenfalls in die Überprüfung aufgenommen. Die Resultate sind in den Tabellen 5A und B dargestellt. Aufgrund der Schwierigkeit, für einige Gene spezifische, Real-Time PCR geeignete Primerpaare zu finden, konnten einige Genregulationen nicht verifiziert werden.

Im Notch-Signalweg konnte eine deutliche Expressionssteigerung der Notch-Rezeptoren *Notch2* und *Notch3* und im geringeren Maße von *Notch4* sowie der Notch-Zielgene und Transkriptionsregulatoren *Hes1* (*Hairy and enhancer of split 1*), *Hey1* (*Hairy/enhancer-of-split*

related with YRPW motif protein 1) und Runx1 (*Runt related transcription factor 1*) sowie des in den *Sonic hedgehog*-Signalweg involvierten Gli1 (*GLI-Krüppel family member GLI1*) beobachtet werden. Eine leichte Expressionserhöhung zeigte auch der Notch-Ligand Dll1 (*Delta-like 1*). Weiterhin kam es zu einer vermehrten Expression der Zytokine Il17b (Interleukin 17B) und Ifng (Interferon gamma) sowie von Krt1 (Keratin1), Lor (Loricrin) und Lmo2 (*LIM domain only 2*).

Der Zellzyklusregulator Ccnd1 (Cyclin D1) zeigte eine positive Regulation nach zweistündiger TGF- β -Stimulation gefolgt von einer Repression nach 24 Stunden TGF- β -Behandlung. Erbb2 (*V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der Transkriptionsfaktor Pparg (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*) wiesen eine reduzierte Expression nach TGF- β -Behandlung auf.

Unter den Wnt-Signalweg assoziierten Genen fiel eine Expressionssteigerung der Transkriptionsfaktoren Lef1 (*Lymphoid enhancer binding factor 1*) und Pitx2 (*Paired-like homeodomain transcription factor 2*) auf. Neben Cyclin D1 war Cyclin D2 ebenso kurzfristig hochreguliert und bei fortgesetzter TGF- β -Behandlung herabreguliert.

Die diversen Wnt-Gene zeigten unterschiedliche Regulationen, während Wnt2, Wnt3a, Wnt5b, und Wnt10a eine erhöhte Expression aufwiesen, war die Expression von Wnt8a, Wnt11 und Wnt16 nach TGF- β -Behandlung reduziert.

Tabelle 5A und B: TGF- β -abhängige Regulation von Notch- und Wnt-Signalweg assoziierten Genen in hippokampalen Kulturen an DIV4

Ergebnisse der Notch- und Wnt-*pathway* fokussierten PCR-Arrays sowie deren Überprüfung mittels Real-Time PCR.

A

Mouse Notch Signalling Pathway (PAMM-059)

Gen	24h TGF- β		2h TGF- β	
	Array	Überprüfung	Überprüfung	
Ccnd1	-2,93	-1,7	3,06	
Dll1	1,67	1,58	1,07	
ErbB2	-1,78			
Gli1	2,13	2,15	1,74	
Hes1	1,69	3,61	3,71	
Hey1	1,78	1,84	2,56	
Ifng	2,23			
Il17b	1,75			
Krt1	2,35	2,03	-1,02	
Lmo2	1,62	1,63	1,82	
Lor	1,78	1,74	2,8	
Notch2	2,95	2,67	1,91	
Notch3	3,78	3,59	2,32	
Notch4	1,88	2,01	2,14	
Pparg	-1,65	-2,01	1,02	
Runx1	4,38	4,91	3,9	

B

Mouse Wnt Signalling Pathway (PAMM-043)

Gen	24h TGF- β		2h TGF- β	
	Array	Überprüfung	Überprüfung	
Ccnd1	-2,79	-1,7	3,06	
Ccnd2	-1,85	-4,68	1,66	
Lef1	1,87	4,2	3,25	
Pitx2	2,23	2,35	1,6	
Wnt2	1,71			
Wnt3a	1,91			
Wnt5b	2	1,22	1,12	
Wnt8a	-2,66			
Wnt10a	2,62	3,29	2,4	
Wnt11	-2,41			
Wnt16	-3,61			

3.2.4 Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation vom TGF- β -Rezeptor

Typ II

Um herauszustellen, dass die untersuchten Genregulationen tatsächlich abhängig von einer funktionierenden TGF- β -Signaltransduktion sind, wurde eine Unterbrechung der Signaltransduktion durch einen experimentellen *Knock-down* des TGF- β -Rezeptors Typ II in hippokampalen Kulturen durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss des Funktionsverlustes auf die Regulation der ermittelten TGF- β -abhängigen Zielgene untersucht. Dafür wurden zwei unterschiedliche Strategien verwendet. Die erste basiert auf dem Prinzip des Cre/loxP-Systems in Verbindung mit der Transduktion durch Adeno-assoziierte Viren (AAV). Für eine weitere Möglichkeit, die TGF- β -Signaltransduktion in kultivierten Neuronen zu inhibieren, wurden gegen den TGF- β -Rezeptor Typ II gerichtete

shRNAs hergestellt. Diese shRNAs wurden zunächst im Zellkulturmodell an C2C12 und Oli-neu Zellen auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Die effektivste wurde ausgewählt und in einen Vektor kloniert, mit dem Adeno-assoziierte Viruspartikel hergestellt werden konnten. Die Herstellung des Virus wurde durch einen Kooperationspartner übernommen (Dr. S. Kügler, Institut für Neurologie, Universitätsmedizin Göttingen).

3.2.4.1 Prinzip des Cre/loxP vermittelten *Knock-downs* des TGF- β -Rezeptor Typs II

Für dieses System standen Mausmutanten zur Verfügung, bei denen das Exon 2 des Gens für den TGF- β -Rezeptor Typ II von loxP-Stellen flankiert ist (Chytil et al., 2002). Aus diesen Tieren wurden primäre hippocampale Kulturen angelegt und mit einem Adeno-assoziierten Virus, der zur neuronenspezifischen Expression von Cre-Rekombinase führt, transduziert. Die Aktivität der Cre-Rekombinase vermittelt den Funktionsverlust des T β RII durch Ausschneiden des Exon 2 des *T β RII*-Gens in den transduzierten Zellen.

Die infektiösen Adeno-assoziierten Viruspartikel, die den Cre-Rekombinase-Expressionsvektor pAAV 6P1 Cre SEWB enthielten (Abbildung 10), wurden von Dr. Sebastian Kügler zu Verfügung gestellt.

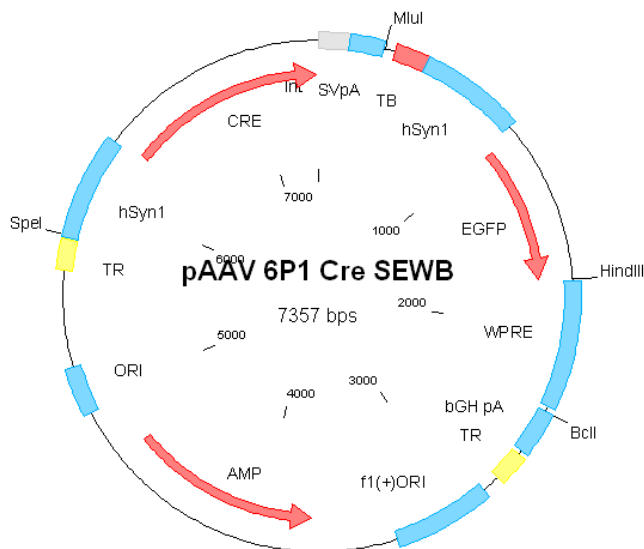


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Cre-Rekombinase Expressionsvektors pAAV 6P1 Cre SEWB

TR: AAV-2 *inverted terminal repeats*; hSyn1: *human synapsin 1* Gen-Promotor; CRE: Cre-Rekombinase-Gen; SvpA: Simian Virus 40 Polyadenylierungsstelle; TB: synthetischer Transkriptionsblocker; EGFP: *Enhanced green fluorescent protein* Reporter gen; WPRE: *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; bGH pA: *bovine growth hormone* Polyadenylierungsstelle; Ori: *origin of replication*; f1(+)-Ori: *origin of single strand-DNA*; AMP: Ampicillinresistenzgen

Dieser Vektor besteht aus einer bicistronischen Expressionskassette, wobei die Expression der Cre-Rekombinase und des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), zur optischen Kontrolle des Transduktionserfolgs, jeweils unabhängig voneinander von dem *human synapsin1*-Promotor (hSyn1) gesteuert werden. Dieser Promotor ist ausschließlich in

Neuronen aktiv (Kügler et al., 2003), so dass durch dieses System ein *Knock-down* des T β RII spezifisch in Neuronen erreicht werden kann. Die Expressionskassette wird durch zwei *inverted terminal repeats* (TR) flankiert, die für die Virusreplikation notwendig sind. Zusätzliche Elemente, die für die korrekte Genexpression erforderlich sind, beinhalten das *woodchuck hepatitis virus posttranslational control element* (WPRE), die *bovine growth hormone* (bGH) Polyadenylierungsstelle und die Simian Virus 40 Polyadenylierungsstelle (SVpA). Ein synthetischer Transkriptionsblocker (TB) sorgt für die getrennte Transkription des EGFP und der Cre-Rekombinase. Es wurde der AAV-Serotyp 2 verwendet, da dieser eine hohe Effizienz bei der Infektion von Neuronen aufweist (Shevtsova et al., 2004; Tenenbaum, 2004). In Abbildung 11A sind die hippokampalen Kulturen sieben Tage nach der Transduktion mit dem AAV 6P1 Cre SEWB (kurz: AAV-Cre) dargestellt. Nahezu alle Zellen exprimieren EGFP, was eine hohe Transduktionseffizienz belegt. Durch PCR-Analyse von genomischer DNA der transduzierten Zellen konnte der Erfolg des Rekombinationsereignisses überprüft werden (Abbildung 11B). In Zellen von Tieren, die heterozygot für das geflochte Allel des T β RII sind (flox/+) erscheinen zwei Banden in der PCR zur Detektion des geflochten Allels, wobei die Bande bei 422 bp dem Wildtyp-Allel entspricht und die Bande bei 575 bp dem geflochten Allel. Zellen aus homozygoten Tieren (flox/flox) zeigen demnach nur die 575 bp-Bande. Nach Transduktion der Cre-Rekombinase in die homozygoten Zellen (flox/flox+Cre) findet ein Ausschneiden des geflochten Allels statt, was durch die Reduzierung der 575 bp-Bande sichtbar wird. In der zweiten PCR für das *Knock-out* (KO) -Allel findet sich kein Amplifikat in den untransduzierten heterozygoten und homozygoten Zellen. Nach Transduktion der Cre-Rekombinase erscheint jedoch die Bande des KO-Allels bei 692 bp. Die Rekombination und das Cre-vermittelte Ausschneiden des T β RII-Gens haben also erfolgreich stattgefunden, wodurch es auch zu einer deutlichen Reduzierung der T β RII-Expression in den transduzierten hippokampalen Kulturen kam (Abbildung 11C).

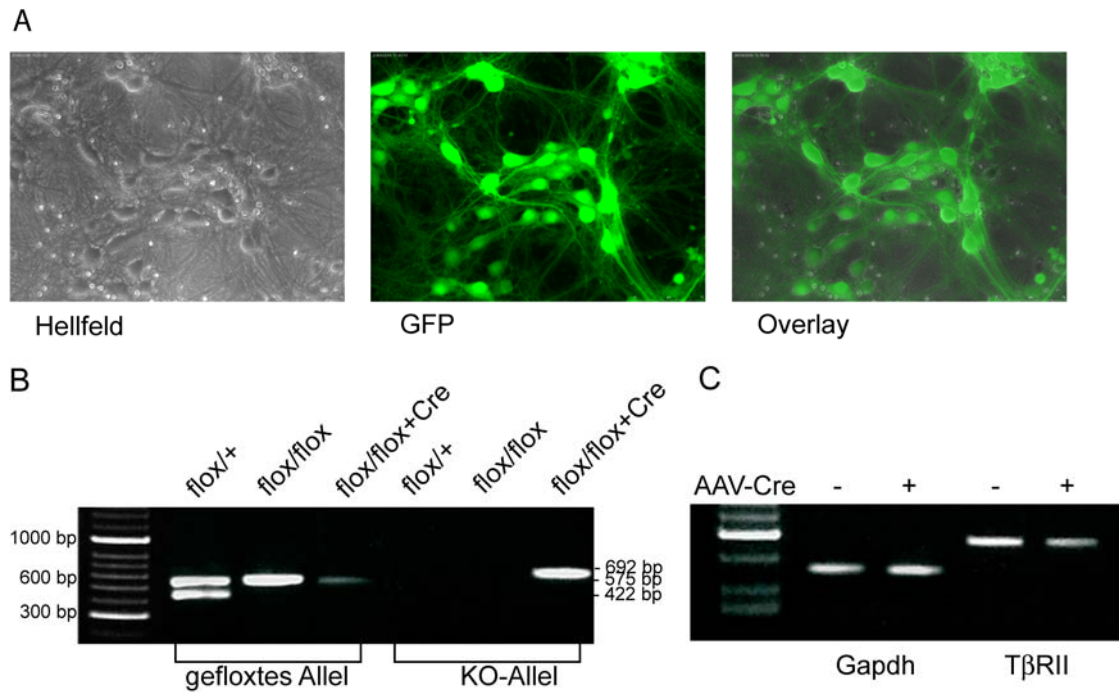


Abbildung 11: Die Transduktion von AAV-Cre in hippocampalen Kulturen aus TβRII (flox/flox)-Embryonen besitzt eine hohe Effizienz und führt zur Reduktion des TβRII

(A) *Live-Imager*-Aufnahmen von hippocampalen Kulturen sieben Tage nach der Transduktion mit AAV-Cre. Die Expression von EGFP in nahezu allen Zellen belegt die hohe Transduktionseffizienz.

(B) PCR-Analysen genomischer DNA belegen den Erfolg der Rekombination und das Ausschneiden des geflochten Allels des TβRII.

(C) Die RT-PCR zeigt eine Reduktion des TβRII in den AAV-Cre transduzierten Zellen.

3.2.4.2 Generierung einer gegen den TGF-β-Rezeptor Typ II gerichteten shRNA

3.2.4.2.1 Validierung TβRII-spezifischer shRNA-Vektoren in Oli-neu und C2C12-Zellen

Mit Hilfe der RNAi-Design Software von OligoEngine wurden fünf unabhängige TβRII-spezifische shRNA-Sequenzen ermittelt, welche gegen unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb der TβRII mRNA gerichtet sind. Vor der Klonierung in die entsprechenden Vektoren zur Herstellung Adeno-assoziiierter Viren, wurde die Effizienz der einzelnen shRNA-Sequenzen zunächst in der murinen oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu und in der murinen prämyoblastischen Vorläuferzelllinie C2C12 auf verschiedenen Ebenen analysiert. Dazu wurden die shRNA-Sequenzen in den shRNA-Expressionsvektor pSuper ligiert. Als Negativkontrolle diente der leere pSuper-Vektor ohne shRNA-Insert.

Zunächst wurde der shRNA-vermittelte *Knock-down* der T β RII-Expression in C2C12-Zellen auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden die C2C12-Zellen mit einem flag-markierten Expressionsplasmid, welches die T β RII-spezifische Ziel-mRNA lieferte und den shRNAs co-transfiziert und die Menge an gebildetem T β RII mit einem gegen die flag-Markierung gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abbildung 12A). Diese Methode besitzt gegenüber dem Nachweis mit dem proteinspezifischen Antikörper den Vorteil, dass nur transfizierte Zellen erfasst werden und somit das Hintergrundsignal von untransfizierten Zellen ausgeblendet werden kann. Mit der T β RII shRNA1 und shRNA3 transfizierte Zellen zeigten 48 Stunden nach der Transfektion ein positives Signal für den flag-markierten T β RII, welches in der Intensität vergleichbar mit dem des Kontrollvektors war. Diese shRNAs waren offenbar ineffizient und wurden daher im folgenden Test nicht mehr berücksichtigt. Mit der shRNA4 konnte bereits ein deutlicher Rückgang des T β RII-Proteinlevels erzielt werden und nach Transfektion der shRNAs 2 und 5 war kein Signal mehr detektierbar.

Um den *Knock-down* des T β RII auch funktionell nachzuweisen, wurde der Effekt der T β RII shRNAs auf die Aktivierung von Smad-Proteinen nach Stimulation mit TGF- β untersucht.

Dazu wurden C2C12- und Oli-neu-Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL3-SBE transfiziert, welches ein Smad-bindendes Element (SBE) vor dem Luciferase-Reportergen trägt. Aktivierte Smad2/3/4-Komplexe binden an das SBE und führen dadurch zur Expression von Luciferase. Um Fehler durch Schwankungen in der Transfektionseffizienz abgleichen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem pCMV- β -Gal-Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid trägt das Gen für das Enzym β -Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors. 24 und 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 5 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Zur Kontrolle der basalen Smad-Aktivität diente eine mit dem Kontrollvektor transfizierte Probe ohne TGF- β -Stimulation. Danach erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luciferaseaktivität und der β -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 12B und C). Durch Division der Luciferasewerte durch die β -Galaktosidasewerte wurden relative Lichteinheiten (RLU) als Maß der Smad-Aktivierung berechnet. Der Wert der mit dem Kontrollvektor transfizierten und mit TGF- β stimulierten Zellen wurde dabei als Maximalwert angesehen und auf 100% gesetzt und die übrigen Werte prozentual auf diesen Wert bezogen. Alle drei in diesem Test verwendeten shRNAs zeigten eine Tendenz, die TGF- β vermittelte Smad-Aktivierung zu reduzieren. Die Reduktion war 72 Stunden nach der Transfektion stärker ausgeprägt als nach 48 Stunden. Die shRNA2 verringerte zu diesem Zeitpunkt die Smad-Aktivität auf 6,5% in C2C12-Zellen und auf 5,5% in Oli-neu-Zellen, shRNA5 erreichte eine Reduktion auf 7% in C2C12-Zellen und auf 25% in Oli-neu Zellen. Die shRNA4 war hingegen weniger effektiv und erzielte nur eine Verminderung auf 39% in C2C12- und Oli-neu-Zellen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die T β RII-spezifische shRNA2 ausgewählt, um einen Adeno-assoziierten Virus zur Verwendung in neuronalen Primärkulturen zu erzeugen.

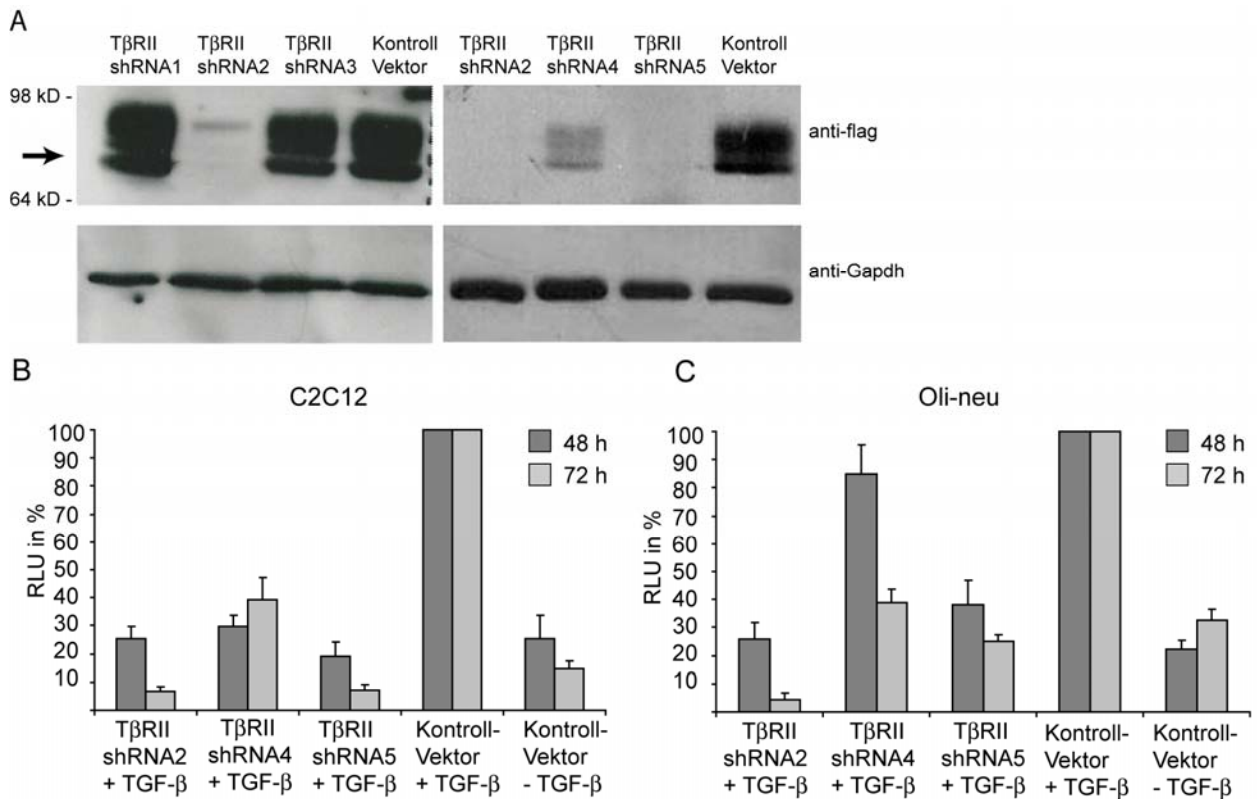


Abbildung 12: Validierung der T β RII-spezifischen shRNA-Konstrukte in C2C12- und Oli-neu-Zellen

(A) Western-Blot von Zelllysaten aus C2C12-Zellen co-transfiziert mit den jeweiligen shRNA-Konstrukten und flag-markiertem T β RII. Der Pfeil gibt die erwartete Größe des T β RII-flag bei ca. 70 kDa an. Die shRNAs 2 und 5 sind in der Lage, die Expression des T β RII unter die Detektionsgrenze zu senken.

(B) und (C) Messung der Luciferaseaktivität vom TGF- β -Reporterkonstrukt pGL3-SBE in C2C12-Zellen (B) und Oli-neu-Zellen (C) 48 und 72 Stunden nach Transfektion der shRNA-Konstrukte. Die shRNAs 2 und 5 besitzen das größte Potential, die durch TGF- β -Stimulation hervorgerufene Smad-Aktivität zu reduzieren. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.2.4.2.2 Klonierung des AAV-shRNA-Expressionsvektors

Der shRNA-Expressionsvektor pAAV H1 CytbAS SEWB wurde von Dr. Sebastian Kügler zu Verfügung gestellt (Abbildung 13A). Er enthält eine bicistronische Expressionskassette mit der shRNA unter der Kontrolle des H1-Promotors und EGFP unter der Kontrolle des *human synapsin1*-Promotors (hSyn1). Da der H1-Promotor grundsätzlich in allen Zellen aktiv ist, kann durch diesen Vektor keine ausschließlich neuronale Spezifität des *Knock-downs* erzielt werden. Das in diesem Vektor enthaltene shRNA-Konstrukt CytbAS wurde durch Restriktionsverdau mit BstBI und HindIII herausgeschnitten und stattdessen das gegen den

T β RII gerichtete shRNA-Konstrukt hineinligiert, welches zuvor ebenfalls durch BstBI und HindIII- Spaltung aus dem pSuper-Vektor entnommen wurde. Abbildung 13B zeigt den shRNA Expressionsvektor pAAV H1 T β RII shRNA2 nach erfolgreicher Umklonierung.

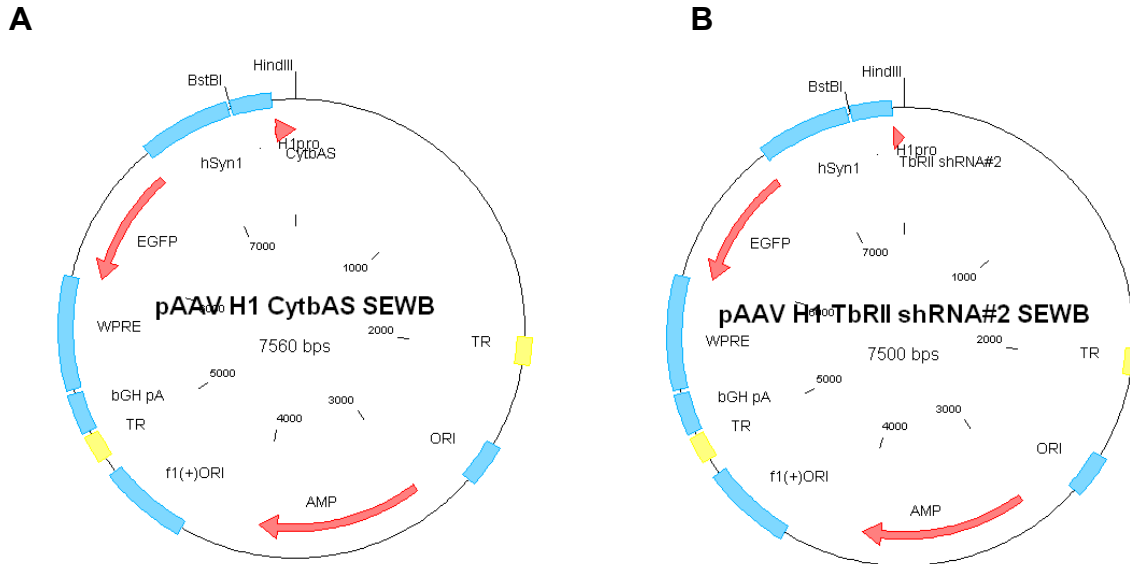


Abbildung 13: Schematische Darstellungen der shRNA-Expressionsvektoren

(A) Der Vektor pAAV H1 CytbAS SEWB wurde als Ausgangsvektor zur Einklonierung des T β RII shRNA Konstruktes verwendet (B) pAAV shRNA Expressionsvektor nach vollendetem Einfügen des T β RII shRNA-Konstruktes.

TR: AAV-2 *inverted terminal repeats*; hSyn1: *human synapsin 1* Gen-Promotor; H1pro: H1-Promotor; SvpA: Simian Virus 40 Polyadenylierungsstelle; TB: synthetischer Transkriptionsblocker; EGFP: *Enhanced green fluorescent protein* Reporter gen; WPRE: *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; bGHpA: *bovine growth hormone* Polyadenylierungsstelle; Ori: *origin of replication*; f1(+) Ori: *origin of single strand-DNA*; AMP: Ampicillinresistenzgen

3.2.4.3 Einfluss des Cre/loxP vermittelten *Knock-downs* des TGF- β -Rezeptor Typs II auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen

Die Transduktion der hippokampalen Kulturen aus T β RII flox/flox Embryonen erfolgte an DIV2. Die Stimulation mit TGF- β wurde wie unter 3.2 beschrieben an DIV11 für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die mRNA isoliert und die Expression der identifizierten TGF- β -Zielgene semiquantitativ mittels RT-PCR analysiert. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse dargestellt, dabei entsprechen die ersten beiden Banden jeweils den Kontrollzellen, transduziert mit einem EGFP-tragenden Kontrollvirus. Sie zeigen die zuvor beschriebenen Expressionsänderungen nach Stimulation mit TGF- β . Die letzten beiden Banden entsprechen Kulturen nach neuronalem *Knock-down* des T β RII ohne und nach TGF- β -Stimulation. Dabei wurde deutlich, dass einige Gene (Ctgf, Dtx1, Dvl1, Smad7, Timp3 und

TnC) auch nach *Knock-down* des T β RII noch eine Regulation aufwiesen. Im Fall der Proteine der extrazellulären Matrix Ctgf, Timp3 und TnC war das Ausgangslevel jedoch stark vermindert, so dass erst nach der TGF- β -Stimulation eine detektierbare Expression erreicht wurde, was auf eine grundsätzlich Beteiligung des T β RII bei der Expression dieser Gene hindeutet. Da durch den neuronenspezifischen Synapsin1-Promotor die Cre-Expression, und damit der *Knock-down* des T β RII, nur in Neuronen, nicht aber in Astrozyten bzw. Vorläuferzellen erreicht wurde, stammt die noch vorhandenen Regulation höchstwahrscheinlich von den in der Kultur gegenwärtigen Astrozyten oder Vorläuferzellen. Fstl3, Itga3 und Nedd9 waren dagegen in den AAV-Cre transduzierten Zellen nicht mehr reguliert, so dass die Regulation dieser Gene von der Signaltransduktion durch den T β RII abhängt und vermutlich zu einem großen Teil in den Neuronen stattfindet. Im Fall von Gata2, Id3 und Itga5 war Expression nach *Knock-down* des T β RII insgesamt kaum noch detektierbar. Möglicherweise ist eine funktionierende TGF- β -Signalkaskade für die Expression dieser Gene essentiell oder der andauernde Verlust des TGF- β -Signals über die Kultivierungsperiode verursacht Änderungen im Zellsystem, die zu diesem Abfall in der Genexpression führen.

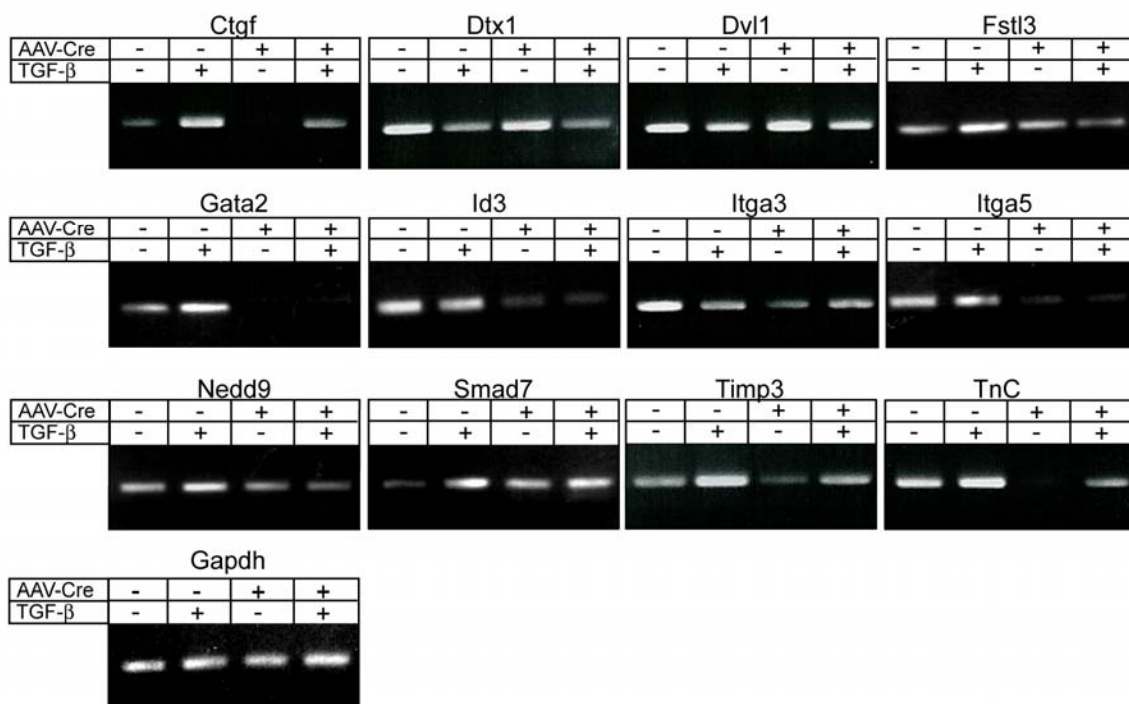


Abbildung 14: Regulation der TGF- β -Zielgene in hippocampalen Kulturen aus T β RII (flox/flox) Embryonen an DIV12 nach *Knock-down* des T β RII durch das Cre/loxP-System

Die semiquantitative RT-PCR zeigt, dass die in den Kontrollzellen nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung auftretenden Genregulationen nach Ausschalten des T β RII durch Transduktion mit dem Cre-exprimierenden AAV im Fall von Fstl3, Itga3 und Nedd9 aufgehoben sind. Ctgf, Dtx1, Dvl1, Smad7, Timp3 und TnC zeigen weiterhin eine, teils abgeschwächte, Regulation. Die Expression von Id3 und Itga5 ist insgesamt unterdrückt.

3.2.4.4 Einfluss des shRNA vermittelten *Knock-downs* des TGF- β -Rezeptor Typs II auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen

Die Transduktion der hippokampalen Kulturen mit der T β RII shRNA sowie die TGF- β -Stimulation und RNA-Isolation erfolgte nach gleichem Schema wie beim Cre/loxP-System. Abbildung 15 zeigt die Genexpressionsänderungen nach Transduktion der shRNA bzw. in den AAV-EGFP transduzierten Kontrollzellen. Die Ergebnisse sind weitestgehend identisch mit denen des durch den Cre/loxP vermittelten *Knock-down* des T β RII. Auch hier zeigten Ctgf, Dtx1, Dvl1, Timp3 und TnC noch immer eine Regulation, während diese bei den übrigen Zielgenen nicht mehr auftrat. Ebenso bestätigte sich die starke allgemeine Expressionsverminderung bei Gata2 und Id3. Itga5 zeigte in diesem Fall keine außergewöhnliche Repression, dafür war das Expressionslevel von Itga3 stark reduziert, aber auch hier waren die Proteine der extrazellulären Matrix Ctgf, Timp3 und TnC in ihrer allgemeinen Expression vermindert. In dem verwendeten shRNA Expressionsvektor wird die Expression der shRNA vom H1-Promotor kontrolliert. Dieser ist grundsätzlich in allen Zellen aktiv, daher ist dieses Modell des T β RII *Knock-downs* nicht strikt neuronenspezifisch. Da der Serotyp 2 des AAV jedoch bevorzugt Neurone infiziert, kann auch hier die verbleibende Regulation auf Astrozyten zurückzuführen sein bzw. von restlichen, nicht transduzierten Neuronen stammen. Bei Dtx1 und Dvl1 ist sowohl die allgemeine Expression als auch die Regulation selbst nach Ausschalten des T β RII unverändert. Dies könnte auf einen Mechanismus unabhängig vom T β RII hindeuten.

Ergebnisse

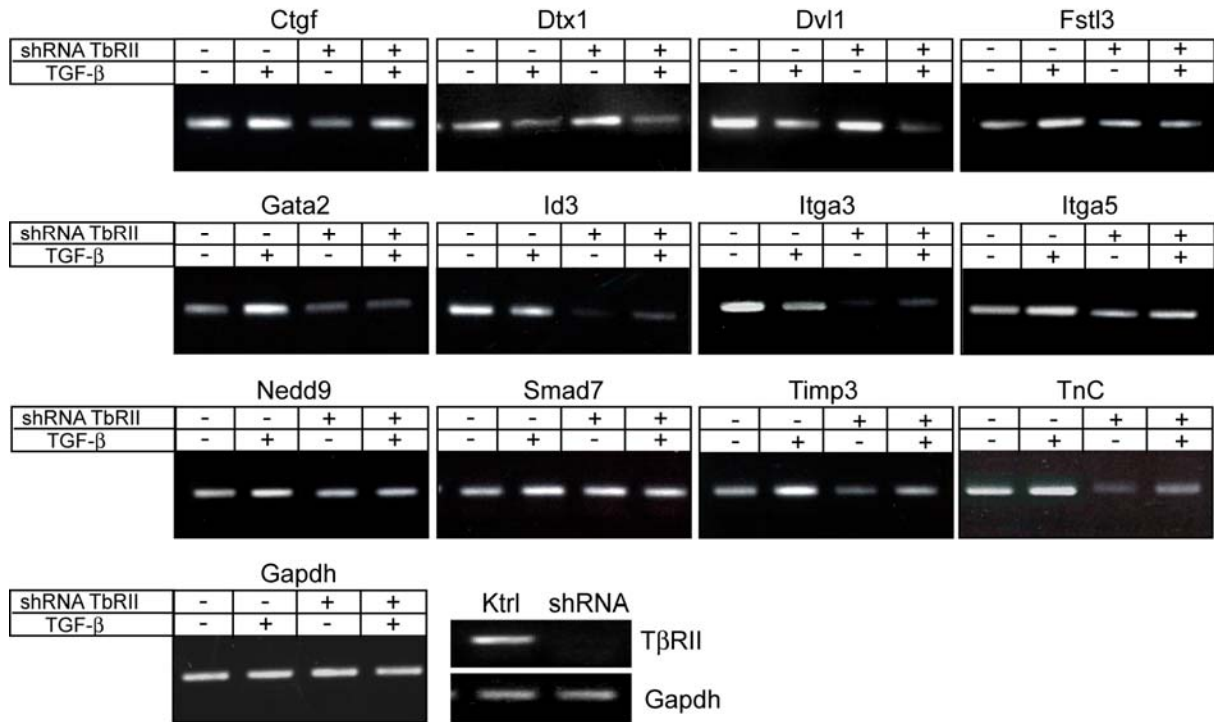


Abbildung 15: Regulation der TGF-β-Zielgene in hippokampalen Kulturen an DIV12 nach shRNA vermitteltem *Knock-down* des TβRII

Die semiquantitative RT-PCR zeigt, dass das shRNA vermittelte Ausschalten des TβRII dazu führt, dass die in den Kontrollzellen nach 24-stündiger TGF-β-Behandlung auftretenden Genregulationen im Fall von Fstl3, Itga5, Nedd9 und Smad7 aufgehoben sind. Ctgf, Dtx1, Dvl1, Timp3 und TnC zeigen weiterhin eine, teils abgeschwächte, Regulation. Die Expression von Gata2, Id3 und Itga3 ist insgesamt stark reduziert.

3.2.5 Regulation der TGF- β -Zielgene in Astrozyten-angereicherten Kulturen

Die vorangegangenen Experimente des neuronenspezifischen *Knock-downs* des T β RII lieferten eine erste Möglichkeit, zu entscheiden, welche der Zielgene eher in Neuronen und welche eher in Astrozyten oder neuronalen Vorläuferzellen durch TGF- β reguliert werden. Um diese Entscheidung noch besser einzugrenzen, wurden Astrozyten-angereicherte Kulturen aus dem Cerebrum embryonaler Mäuse (E16,5) angelegt. Wie in Abbildung 16 dargestellt ist, enthielten diese Kulturen neben GFAP-positiven Zellen (Abbildung 16A) auch viele Zellen, die für Nestin positiv waren (Abbildung 16B). Es handelt sich hierbei also um eine Mischkultur aus glialen Zellen und undifferenzierten Vorläuferzellen bzw. radialen Gliazellen. Neurone, positiv für β -Tubulin, konnten nicht detektiert werden.

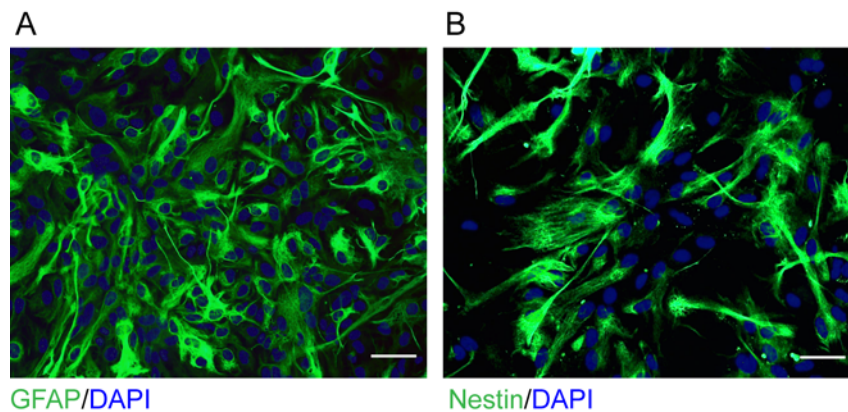


Abbildung 16: Astrozyten-angereicherte Kulturen aus dem Cerebrum embryonaler (E16,5) Mäuse

Die Kulturen beinhalten sowohl GFAP-positive, gliale Zellen (A), als auch Nestin-positive Vorläuferzellen (B). Maßstab: 50 μ m

Die Kulturen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert, was nach 14 Tagen der Fall war, dann wurden sie nach dem gewohnten Schema für zwei und für 24 Stunden mit TGF- β behandelt, die RNA isoliert und die Regulation der TGF- β -Zielgene mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Ctgf war ebenso wie in den hippokampalen Kulturen deutlich hochreguliert, vor allem nach längerer TGF- β -Stimulation. Fstl3, Gata2, Itga5, Smad7 und Tle3 waren ebenfalls analog zu den hippokampalen Kulturen nach zwei Stunden stark induziert. Bei fortgesetzter TGF- β -Stimulation sank das Expressionslevel wieder ab und erreichte im Fall von Gata2 sogar ein Level unterhalb des Kontrollniveaus. Diese Expressionskinetik von Gata2 entspricht also der in den jungen hippokampalen Kulturen beobachteten Kinetik. Id3 war, wie in den hippokampalen Kulturen, vor allem nach 24-stündiger Behandlung herabreguliert. Timp3 und Tnc zeigten eine Induktion nach zwei und 24-Stündiger TGF- β -Behandlung, in den

hippokampalen Kulturen war die Induktion dieser Gene dagegen erst nach der 24-stündigen Behandlung aufgefallen. Für Dtx1, Dvl1, Hes1, Igf2r, Itga3 und Nedd9 konnten keine deutlichen Regulationen festgestellt werden.

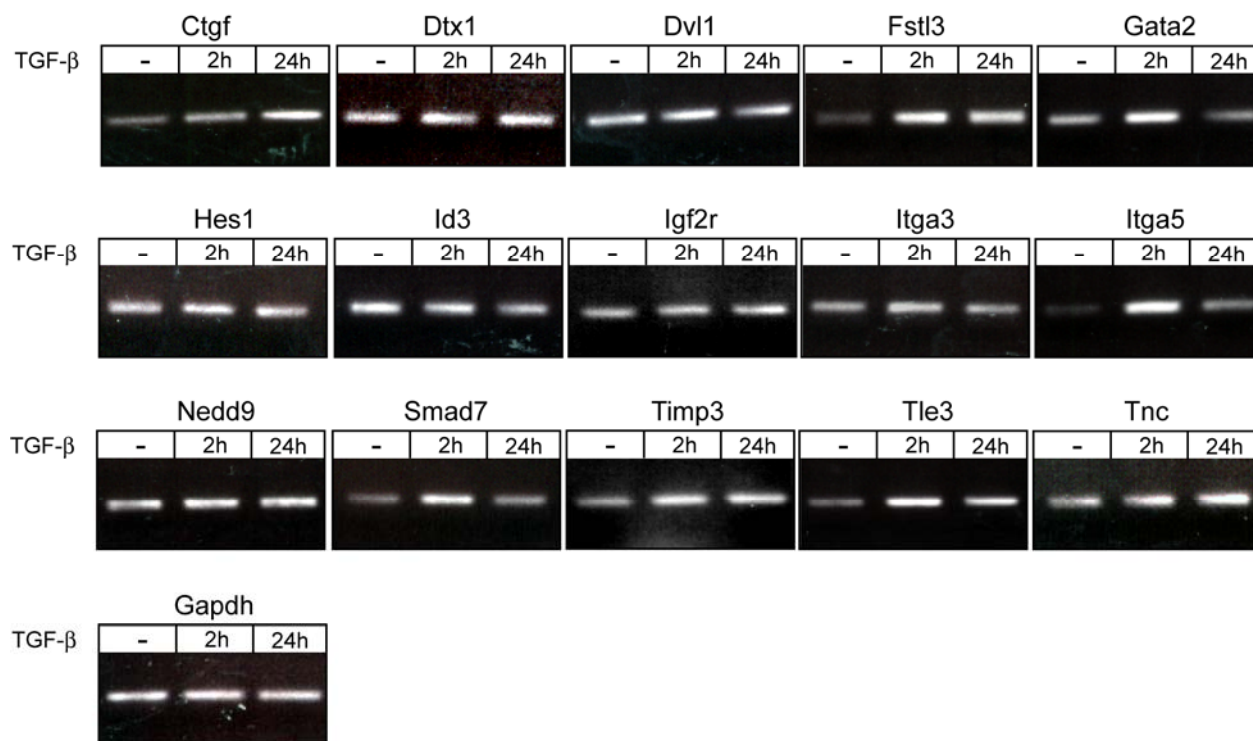


Abbildung 17: Regulation der TGF- β -Zielgene in Astrozyten-angereicherten Kulturen

Die semiquantitative RT-PCR zeigt eine Induktion von Ctgf, Fstl3, Gata2, Itga5, Smad7, Timp3 und TnC nach zwei- bzw. 24-stündiger TGF- β -Behandlung und eine Repression von Id3 analog zu den in den hippocampalen Kulturen beobachteten Regulationen. Dtx1, Dvl1, Hes1, Itga3 und Nedd9 weisen dagegen keine deutlichen Expressionsänderungen auf.

3.2.6 Smad-Abhängigkeit der TGF- β regulierten Zielgene

Die Transduktion von TGF- β -Signalen erfolgt zu einem großen Teil über die Aktivierung von Smad-Proteinen, daneben existieren aber auch Smad-unabhängige Mechanismen (Derynck und Zhang, 2003). Deshalb sollte untersucht werden, welche Genregulationen eine Smad-Abhängigkeit aufweisen. Dazu wurde die Smad-Signaltransduktion durch eine gegen Smad4 gerichtete shRNA inhibiert, die mittels Lenti-Viren in die primären Zellkulturen transduziert wurde. Smad4 ist ein gemeinsamer Bindungspartner für alle Rezeptor-regulierten Smads und essentiell für deren Signaltransduktion. Die *Knock-down*-Effizienz der shRNA wurde bereits durch Vorversuche in der Arbeitsgruppe validiert. Da die virale Transduktion der Zellen und das Wirksamwerden der shRNAs einige Tage in Anspruch nimmt (s. Kapitel 2.13.10), konnten hier nur die an DIV12 regulierten Zielgene untersucht werden. Die Analyse erfolgte mittels Real-Time PCR und ist in Tabelle 6 dargestellt. Die Ergebnisse

demonstrieren eine Smad-abhängige Regulation von *Ctgf*, *Dvl1*, *Dvl3*, *Fstl3*, *Gata2*, *Itga3*, *Nedd9*, *Timp3* und *TnC*, da diese nach dem Ausschalten der Smad4-Aktivität keine bzw. nur noch eine sehr geringfügige Expressionsänderung nach TGF- β -Stimulation zeigten. Bei *Itga5*, *Runx1* und *Smad7* wurde dagegen eine nahezu unverminderte Regulation gefunden, so dass diese Zielgene vermutlich über Smad-unabhängige Signaltransduktionswege beeinflusst werden.

Tabelle 6: Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation von der Smad-Aktivität

Real-Time PCR Auswertung der Regulation von TGF- β -Zielgenen in hippokampalen Kulturen an DIV12 nach shRNA vermitteltem *Knock-down* von *Sma4* bzw. nach Transduktion einer *Non-target*-shRNA-Kontrolle.

	Smad4 shRNA		Kontroll-shRNA	
	2h TGF- β	24h TGF- β	2h TGF- β	24h TGF- β
Ctgf	1,40	2,10	9,82	12,36
Dvl1	-1,40	1,18	1,10	-4,20
Dvl3	1,05	1,31	-1,14	-2,55
Fstl3	1,31	1,53	3,72	1,42
Gata2	-1,06	-1,40	2,59	4,61
Itga3	1,46	1,60	-1,31	-2,07
Itga5	4,08	1,20	4,78	1,10
Nedd9	1,80	1,28	3,45	2,51
Notch2	-1,23	1,52	3,34	2,31
Runx1	17,38	9,80	10,26	8,45
Smad7	2,86	2,92	3,16	3,97
Timp3	1,09	1,50	1,57	2,72
TnC	1,11	1,27	1,17	2,27

3.2.7 Einfluss von *Ctgf* auf die Regulation von TGF- β -Zielgenen

Während des *Screens* nach TGF- β -Zielgenkandidaten ist stets eine starke Induktion des *Connective tissue growth factors* (*Ctgf*) aufgefallen. Eine derartige Expressionssteigerung von *Ctgf* durch TGF- β wurde auch in zahlreichen anderen Studien in verschiedenen Zellsystemen beobachtet und es wurde diskutiert, dass *Ctgf* eine Verstärkung der TGF- β -Signaltransduktion bewirken könnte (Abreu et al., 2002).

Ziel war es daher, zu untersuchen, ob die Regulation der identifizierten TGF- β -Zielgene abhängig von der *Ctgf*-Expression ist. Zu diesem Zweck wurden *Ctgf*-defiziente Mäuse (Ivkovic et al., 2003) verwendet. Diese Mäuse können heterozygot gehalten werden, homozygote Nachkommen weisen starke Skelettmissbildungen auf und sterben kurz nach

der Geburt auf Grund von Atemstörungen. Für die Experimente wurden die Gehirne von E16,5 Embryonen präpariert und die hippokampalen Neurone für jeden einzelnen Embryo eines Wurfes getrennt dissoziiert und kultiviert. Zusätzlich wurde von jedem Embryo eine Schwanzbiopsie zur Feststellung des Genotyps genommen. Da die heterozygot *Ctgf*-deletierten Mäuse subfertil sind, standen nur wenige Embryonen zur Verfügung, weshalb die Analyse auf einen Zeitpunkt beschränkt werden musste. Es wurden reife, bis DIV12 kultivierte Zellen gewählt, weil hier die *Ctgf*-Induktion am stärksten ausgeprägt war. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit TGF- β behandelt und danach die RNA isoliert. In Tabelle 7 sind die Expressionsänderungen der in diesem Zeitfenster regulierten Gene aus Kulturen von zwei unterschiedlichen homozygot *Ctgf*-deletierten Embryonen (-/-) sowie einem heterozygot deletierten (+/-) und einem Wildtyp (+/+) Embryo desselben Wurfes aufgelistet. Dabei konnte bei keinem der getesteten Gene ein Zusammenhang der Regulation mit der *Ctgf*-Expression gefunden werden. Alle Gene waren sowohl in homozygot als auch in heterozygot *Ctgf*-defizienten Kulturen gleichermaßen wie im Wildtyp reguliert. Zwar weisen die absoluten Zahlenwerte der *Fold-Expression* gewisse Schwankungen auf, diese wurden jedoch üblicherweise zwischen verschiedenen Zellpräparationen beobachtet.

Die Regulation dieser TGF- β -Zielgene ist also nicht abhängig von der *Ctgf*-Expression.

Tabelle 7: Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation von der *Ctgf*-Expression

Real-Time PCR Auswertung der Regulation von TGF- β -Zielgenen in hippokampalen Kulturen von homozygot (-/-) bzw. heterozygot (+/-) *Ctgf*-deletierten sowie Wildtyp (+/+) Embryonen an DIV12 nach zweistündiger TGF- β -Behandlung.

Gen	Ctgf (-/-) #1	Ctgf (-/-)#2	Ctgf (+/-)	Ctgf (+/+)
Fstl3	5,41	1,81	2,01	3,77
Gata2	2,06	3,70	2,61	2,63
Itga5	6,06	3,90	3,90	4,74
Smad7	2,21	3,15	5,19	3,27
Nedd9	3,78	5,80	4,02	4,14

3.3 Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung hippokampaler und cortikaler Zellen *in vitro*

Unter den identifizierten TGF- β -Zielgenen in den hippokampalen Kulturen befanden sich zahlreiche Gene, die neuronale Entwicklungsprozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose steuern können. Daher sollten im zweiten Teil dieser Arbeit die Auswirkungen einer exogenen TGF- β -Stimulation auf die Entwicklung embryonaler hippokampaler und cortikaler Zellen *in vitro* untersucht werden.

3.3.1 TGF- β fördert die Neurogenese von hippokampalen und cortikalen Progenitoren

Um die Auswirkungen einer exogenen Stimulation mit TGF- β auf die Entwicklung cortikaler und hippokampaler Neurone zu untersuchen, wurden die dissoziierten Kulturen ab dem zweiten Kultivierungstag mit 5 ng/ml TGF- β 1 behandelt und für weitere sechs Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Expression von Markern für Neurone, Gliazellen und Progenitoren immunzytochemisch detektiert und quantifiziert. Als neuronale Marker wurden HuC/D und NeuN verwendet. Gliazellen wurden über Antikörper gegen GFAP identifiziert und Progenitoren im Hippokampus und Cortex über Nestin-spezifische Antikörper sowie im Cortex zusätzlich über einen gegen Pax6 gerichteten Antikörper. In Abbildung 18 sind beispielhaft die hippokampalen (A) und cortikalen (B) Kulturen aus E16,5 Embryonen mit den genannten Immunfärbungen und einer DAPI-Kernfärbung dargestellt.

Die quantitative Auswertung ergab, dass die TGF- β behandelten Hippokampus-Kulturen (Abbildung 18 C) gegenüber den unbehandelten Kontrollen einen um 34% gesteigerten Anteil HuC/D-positive Neurone (Kontrolle: 58,83% \pm 1,19 ; TGF- β : 79,05% \pm 1,59, n=7) beinhalteten. Die Auszählung des zweiten neuronalen Markers NeuN lieferte ein gleichwertiges Ergebnis mit einer 37%igen Steigerung der Neuronenzahl (Kontrolle: 51,10% \pm 3,20; TGF- β : 69,93% \pm 2,08, n=4).

Die Anzahl GFAP-positiver Astrozyten war dagegen unverändert (Kontrolle: 17,57% \pm 1,69; TGF- β : 16,88% \pm 1,74, n=4). Gleichzeitig mit der Zunahme an differenzierten Neuronen konnte eine Abnahme der Nestin-positiven Progenitoren beobachtet werden, deren Anteil sich um 31% reduzierte (Kontrolle: 27,94% \pm 0,17; TGF- β : 19,29% \pm 0,59, n=3).

Vergleichbare Resultate zeigten sich ebenso in den Cortex-Kulturen aus E16,5 Embryonen (Abbildung 18 D). Hier führte die Behandlung mit TGF- β zu 27% mehr HuC/D-positiven

Ergebnisse

(Kontrolle: 62,52% \pm 2,07; TGF- β : 79,52% \pm 1,02, n=6) und NeuN-positiven (Kontrolle: 62,97% \pm 2,56; TGF- β : 80,35% \pm 0,48, n=4) Neuronen.

Die Menge an Astrozyten war gleichermaßen unverändert (Kontrolle: 5,55% \pm 0,29; TGF- β : 4,64% \pm 0,18, n=3) und auch die Reduzierung der Progenitoren bestätigte sich. So waren Nestin-positive Zellen um fast 47% (Kontrolle: 24,77% \pm 1,47; TGF- β : 13,03% \pm 0,55, n=3) und Pax6-positive Zellen um 32% (Kontrolle: 15,51% \pm 1,51; TGF- β : 10,55% \pm 0,46, n=4) vermindert.

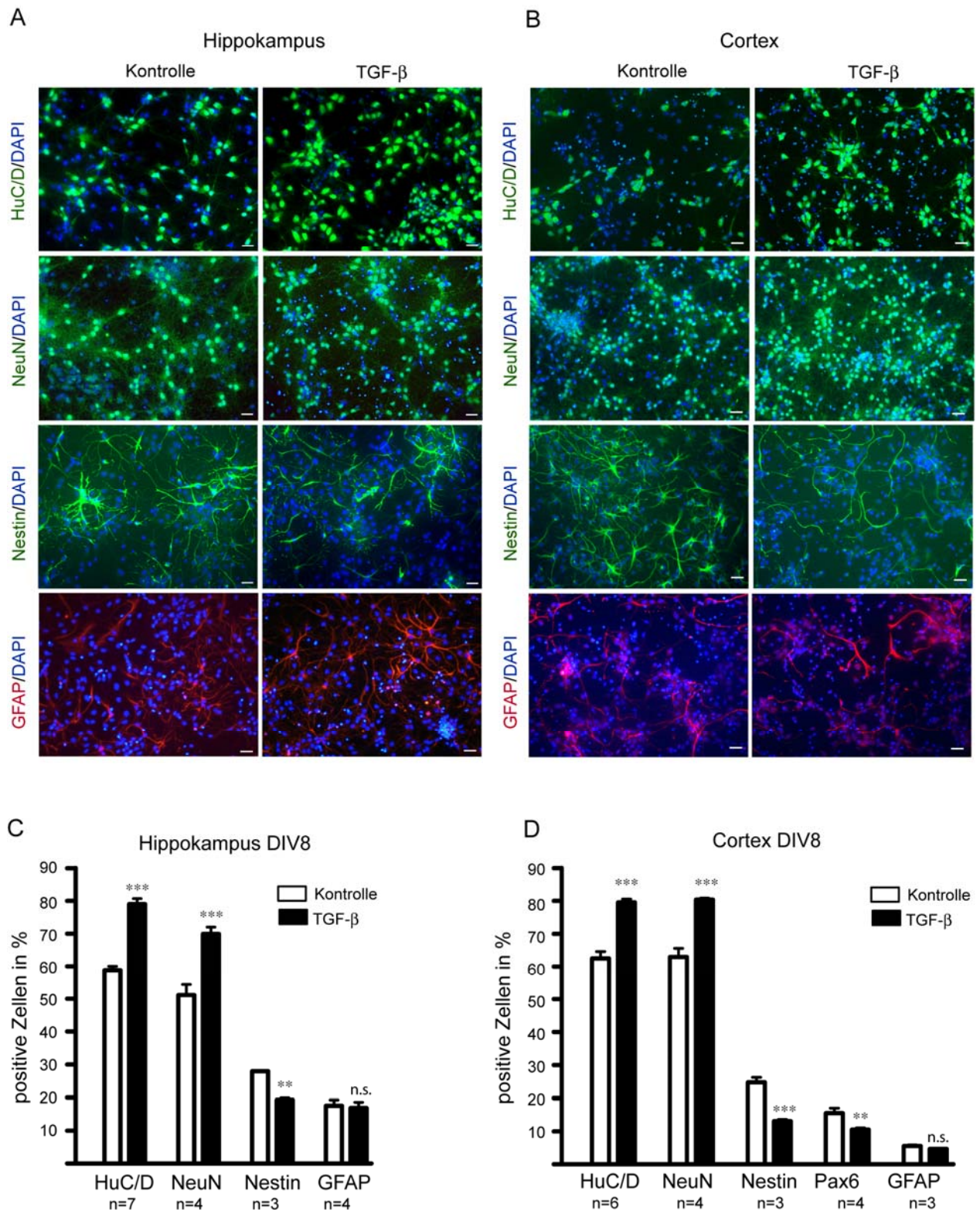


Abbildung 18: TGF- β fördert die Neurogenese von hippocampalen und cortikalen Progenitoren

(A) und (B) Verteilung von Neuronen visualisiert durch immunzytochemische Darstellung von HuC/D und NeuN, Progenitoren markiert durch Nestin und Pax6 sowie von GFAP-positiven Astrozyten nach sechs Tagen TGF- β -Behandlung in hippocampalen (A) und cortikalen (B) Kulturen.

(C) und (D) Quantitative Auswertung der immunzytochemischen Analyse neuronaler, glialer und progenitorspezifischer Markerproteine in hippocampalen und cortikalen Kulturen nach sechstägiger Behandlung mit 5 ng/ml TGF- β 1. Hippokampale (C) und cortikale (D) Kulturen zeigen eine Zunahme an Neuronen,

repräsentiert durch HuC/D und NeuN exprimierende Zellen sowie eine Abnahme von Nestin- bzw. Pax6-positiven Vorläuferzellen. Der Anteil GFAP-positiver Astrozyten ändert sich nicht. Die Werte geben den prozentualen Anteil bezogen auf die Gesamtzellzahl an. Die Daten wurden aus n voneinander unabhängigen Experimenten erhoben und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t -Test verwendet (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant).

Um zu testen, ob der Effekt auf die Bildung von Neuronen durch die Inhibition des TGF- β -Rezeptor Typ I blockiert werden kann, wurden hippocampale Kulturen zusätzlich zu TGF- β allein auch in Kombination mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) behandelt. Dadurch kam es zu keiner Steigerung der HuC/D-positiven Neuronenzahl mehr (Abbildung 19).

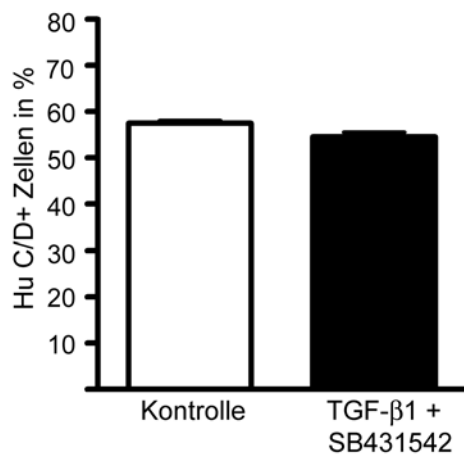


Abbildung 19: Inhibition des TGF- β -Signalweges durch den ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 verhindert die vermehrte Generierung von Neuronen durch TGF- β

Die Graphik zeigt den Anteil HuC/D-positiver Neurone nach sechstägiger Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und SB431542 (10 μ M) bzw. der unbehandelten Kontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus $n=3$ unabhängigen Experimenten \pm SEM (Kontrolle: 57,5% \pm 0,59; TGF- β + SB431542: 54,54% \pm 1,05).

3.3.1.1 Abhängigkeit der TGF- β induzierten Neurogenese von der TGF- β -Isoform

Da TGF- β 1, welches in den vorangegangenen Experimenten zur Stimulation verwendet wurde, *in vivo* überwiegend in mesenchymalen Zellen exprimiert wird und TGF- β 2 und 3 die eigentlich in neuronalen Zellen vorherrschenden Isoformen sind (Flanders et al., 1991; Pelton et al., 1991), wurde überprüft, ob auch diese Isoformen in der Lage sind, die Neurogenese zu induzieren. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Behandlung von hippocampalen Kulturen mit 5 ng/ml TGF- β 2 bzw. 3 dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl TGF- β 2 als auch TGF- β 3 zu einer gleichfalls um etwa. 34% vermehrten Generierung Hu C/D positiver Neurone führten (Kontrolle: 57,5% \pm 0,59; TGF- β 2: 77,0% \pm 0,67; TGF- β 3: 76,14% \pm 0,70, $n=3$). Daher wurde in allen folgenden Experimenten weiterhin TGF- β 1 verwendet.

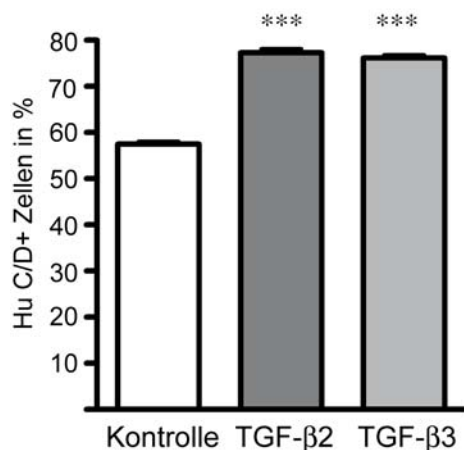


Abbildung 20: Die Induktion der Neurogenese ist nicht abhängig von der TGF-β-Isoform

Die Balken stellen den Anteil HuC/D positiver Neurone nach sechstägiger Behandlung mit TGF-β2 und TGF-β3 (5 ng/ml) dar. Es ist der Mittelwert ± SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten angegeben (Kontrolle: 57,5% ± 0,59; TGF-β2: 77,0% ± 0,67; TGF-β3: 76,14% ± 0,70, n=3). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test verwendet (***) P < 0,001).

3.3.1.2 Abhängigkeit der TGF-β induzierten Neurogenese vom Zeitpunkt und der Dauer der TGF-β-Behandlung

Um herauszustellen, ob die TGF-β induzierte Neurogenese abhängig von der Länge des TGF-β-Pulses ist, wurden hippokampale Kulturen an DIV2 für 24 Stunden mit TGF-β behandelt und anschließend bis DIV8 weiterkultiviert, bevor die Menge HuC/D-positiver Neurone quantifiziert wurde (Abbildung 21, 2). Dieser 24-stündige TGF-β-Puls war ausreichend, um eine Steigerung der Neuronenzahl um 33,74% ± 2,39 zu erzielen. Des Weiteren wurde untersucht, welche Zeitspanne zwischen Behandlungsbeginn und Sichtbarwerden des Effektes nötig ist. Dazu wurden die Kulturen erst ab DIV5 mit TGF-β behandelt und nach drei Tagen Behandlungsdauer an DIV8 analysiert (3). Hier konnte zwar ebenfalls eine Steigerung der Neuronenzahl beobachtet werden, die aber mit 11,69% ± 0,92 deutlicher schwächer ausgeprägt war. Wurde dagegen ab DIV5 wieder für sechs Tage mit TGF-β behandelt und an DIV11 analysiert (4), erreichte die Zunahme 44,14% ± 1,14. Auch hier war der 24-stündige, anfängliche Puls ausreichend und die Steigerungsrate des Neuronenanteils betrug hier 47,86% ± 4,22 (5). Die beiden letztgenannten Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Kulturen zu einem späteren Zeitpunkt ihrer Entwicklung in der Kultur auf die Behandlung mit TGF-β sogar noch mit einer stärkeren Steigerung der Neuronengeneration reagieren. Um dies noch näher zu betrachten, wurde der Startpunkt der Behandlung um drei weitere Tage auf DIV8 verschoben und die Kulturen wiederum entweder für weitere sechs Tage bis DIV14 unter ständigem TGF-β-Einfluss gehalten (6) oder nur für 24 Stunden behandelt und anschließend bis DIV14 kultiviert (7). Auch hier war ein Anstieg der Neuronenpopulation zu erkennen, die Steigerungsrate vergrößerte sich mit 31,70% ± 2,25 bzw. 28,22% ± 1,19 jedoch nicht weiter, sondern sank vielmehr wieder etwas ab. Dies

ist dadurch zu erklären, dass unter den gegebenen Kulturbedingungen die Progenitoren auch spontan ausdifferenzieren und somit der Pool an zur Verfügung stehenden Vorläuferzellen, die auf TGF- β reagieren können, an DIV8 bereits wieder reduziert ist. Nach fünf Tagen Kultivierung scheint dagegen der Anteil an TGF- β responsiven Progenitoren am größten zu sein.

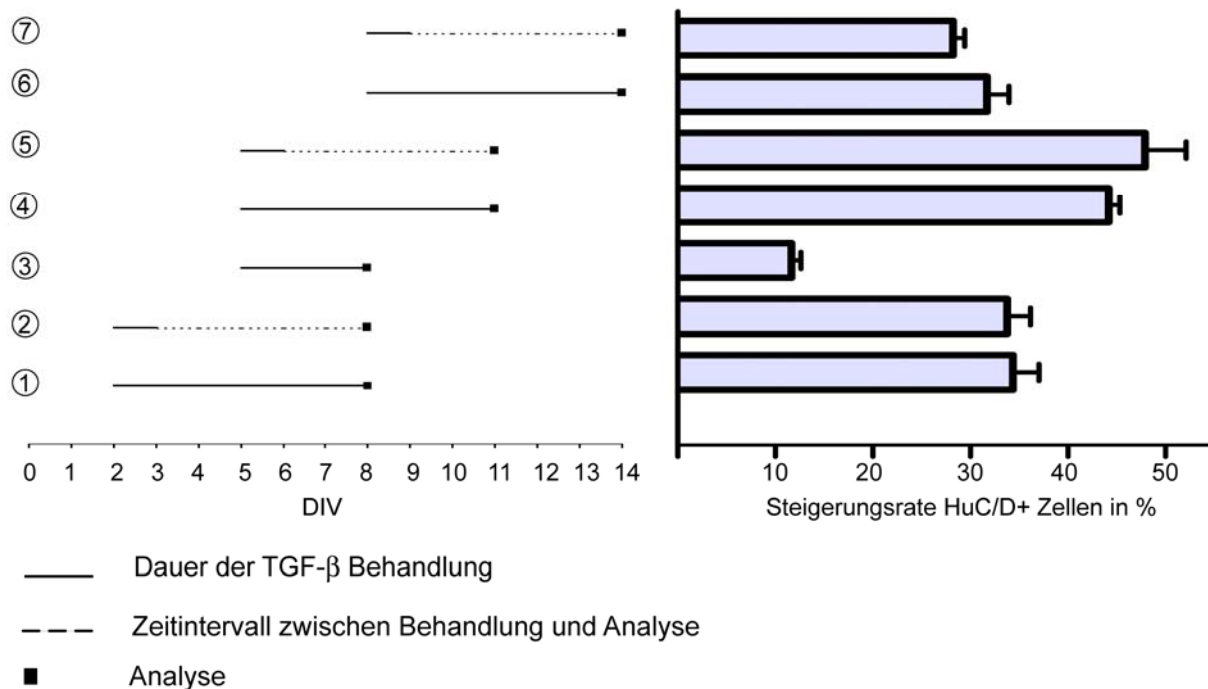


Abbildung 21: Behandlungsschema zur Untersuchung des Einflusses von Zeitpunkt und Dauer der TGF- β -Behandlung

Auf der linken Seite ist jeweils der Start- und Endpunkt der TGF- β -Behandlung dargestellt sowie die Länge der Kultivierungsperiode während bzw. nach dem TGF- β -Puls in Tagen. Die Balken rechts zeigen die korrespondierende prozentuale Steigerungsrate der HuC/D-positiven Neurone, jeweils in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n=3$). (1) 34,33% \pm 2,67; (2) 33,74% \pm 2,39; (3) 11,69% \pm 0,92; (4) 44,14% \pm 1,14; (5) 47,86% \pm 4,22; (6) 31,70% \pm 2,25; (7) 28,22% \pm 1,19

3.3.1.3 Abhängigkeit der TGF- β induzierten Neurogenese von der Smad-Aktivität

Da einer großer Teil der TGF- β -Signaltransduktion über die Aktivierung von Smad-Proteinen vermittelt wird, sollte untersucht werden, ob die TGF- β induzierte Neurogenese in hippokampalen und corticalen Zellen ebenfalls abhängig von einer Aktivierung der Smad-Signalkaskade ist. Zu diesem Zweck wurde die gegen Smad4 gerichtete shRNA verwendet. Da die virale Transduktion der Zellen und das Wirksamwerden der shRNAs einige Tage in Anspruch nimmt, wurde hier das Behandlungsschema Nr.4 aus Abbildung 21 (DIV5 bis

DIV11) verwendet. Als Negativkontrolle diente eine shRNA, deren Sequenz keine Homologie im Mausgenom besitzt, aber zum Anschalten der RNAi-Maschinerie führt (*Non-Target-shRNA Control*). Diese beeinträchtigte die TGF- β induzierte Neurogenese nicht (Abbildung 22). In Kulturen, die mit der Smad4 shRNA infiziert wurden, kam es dagegen zu keinem Anstieg der Neuronenpopulation mehr. Aus diesem Experiment kann daher geschlossen werden, dass die TGF- β vermittelte Neurogenese über den Smad-Signalweg verläuft.

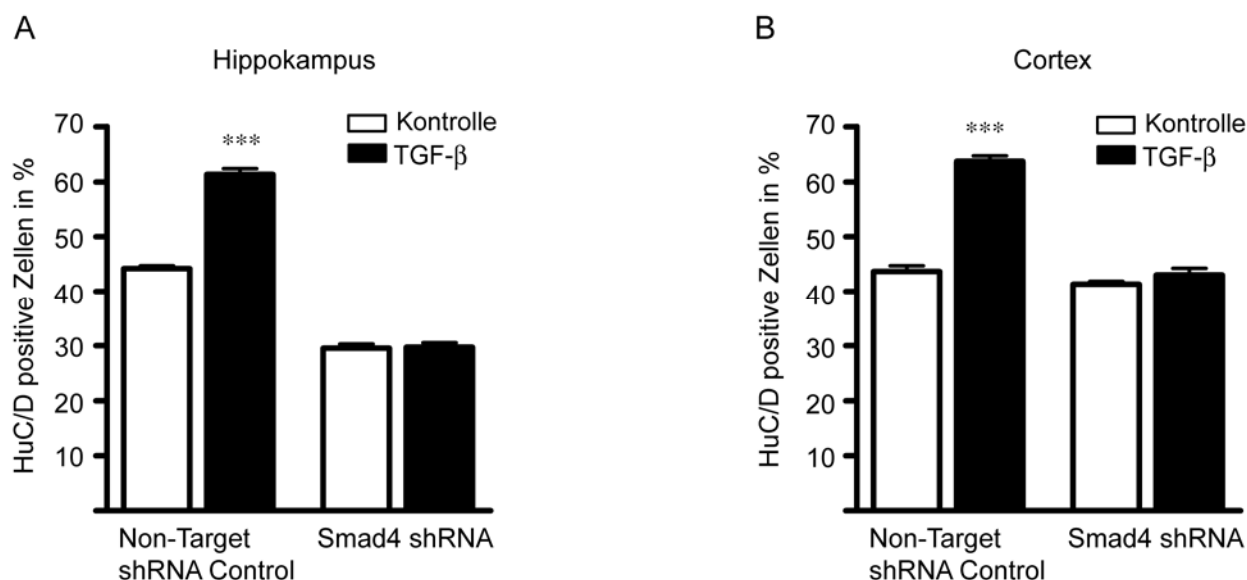


Abbildung 22: Der shRNA vermittelte *Knock-down* der Smad-Aktivierung verhindert die TGF- β induzierte Neurogenese

Quantifizierung der HuC/D-positiven Neurone in hippokampalen (A) und cortikalen (B) Kulturen nach lentiviraler Transduktion einer gegen Smad4 gerichteten shRNA bzw. einer *Non-target* Kontroll-shRNA mit und ohne TGF- β -Behandlung. Es ist der Mittelwert \pm SEM aus $n=3$ unabhängigen Experimenten angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der *t*-Test verwendet (***) $P < 0,001$.

3.3.2 TGF- β fördert den Austritt von Progenitoren aus dem Zellzyklus

Progenitorzellen im ZNS können verschiedene Typen von Zellteilungen durchlaufen: Symmetrisch-proliferative Zellteilungen, bei denen aus einer Vorläuferzelle zwei neue Vorläufer entstehen, führen zur Expansion des Progenitorpools. Neurone können entweder aus asymmetrisch-neurogenen Teilungen hervorgehen, indem sich Progenitoren auf selbsterneuernde Weise teilen, wobei außer einem Neuron ein neuer Progenitor gebildet wird, oder aus einer symmetrisch-neurogenen Teilung. Hierbei werden aus einem Progenitor zwei Neurone gebildet, wodurch der Pool an Progenitoren aufgebraucht wird. Im sich entwickelnden ZNS können alle Typen proliferativer und neurogener Zellteilungen nebeneinander vorkommen und werden vermutlich durch die unterschiedliche Verteilung apikaler und basaler Membranbestandteile bestimmt (Huttner und Kosodo, 2005; Götz und

Huttner, 2005). Eine Zelle, die sich zum Neuron entwickelt, tritt dabei aus dem Zellzyklus aus, das heißt sie wird postmitotisch und beginnt, neuronale Marker zu exprimieren.

Um die Auswirkungen von TGF- β auf den Zellzyklus hippokampaler und kortikaler Kulturen zu untersuchen, wurde der Anteil proliferativer Zellen durch BrdU-Inkorporation und Ki67-Immunfärbung bestimmt. BrdU wird als Basenanalogen während der S-Phase in die DNA von Zellen eingebaut und kann später immunzytochemisch nachgewiesen werden. Bei Ki67 handelt es sich um ein Protein, das in allen teilungsaktiven Zellen während des Zellzyklus exprimiert wird (Scholzen und Gerdes, 2000). Die BrdU-Markierung erfolgte über 24 Stunden, so dass alle zur Proliferation fähigen Zellen mindestens einmal die S-Phase durchlaufen konnten. In den Kulturen, die an DIV8 nach sechstägiger TGF- β -Behandlung analysiert wurden, war eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate zu erkennen (Abbildung 23A). So reduzierte sich die Anzahl BrdU-positiver Zellen in Hippokampus-Kulturen von 24,96% \pm 0,84 auf 12,49% \pm 0,8 und die der Ki67-positiven Zellen von 14,83% \pm 0,93 auf 2,55% \pm 0,6, n=3. In Cortex-Kulturen führte die TGF- β -Behandlung zu einer Reduktion der BrdU-positiven Zellen von 16,34% \pm 0,87 auf 9,33% \pm 0,55 und der Ki67-positiven Zellen von 8,1% \pm 0,48 auf 1,38% \pm 0,92, n=3.

Bei Kulturen, die an DIV4 analysiert wurden, war noch keine signifikante Reduzierung der BrdU-positiven Zellen zu erkennen. Die TGF- β -Behandlung begann in diesem Fall ebenso an DIV2, 24 Stunden später wurde BrdU zugesetzt und nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Fixierung. Das bedeutet, dass direkt 24 Stunden nach dem TGF- β -Stimulus die überwiegende Anzahl der proliferierenden Zellen noch nicht aus dem Zellzyklus ausgetreten war und weiterhin BrdU inkorporierten. Durch eine Co-Färbung von BrdU und Ki67 konnte jedoch der Anteil an BrdU-positiven Zellen ermittelt werden, der am Ende des Behandlungszeitraums, also 48 Stunden nach der Stimulation mit TGF- β , noch immer proliferierte sowie der Anteil an Zellen, der zu diesem Zeitpunkt den Zellzyklus bereits verlassen hatte. Die erstgenannte Fraktion, als *cycling fraction* (CF) benannt, war durch diejenigen Zellen determiniert, die sowohl positiv für BrdU als auch für Ki67 waren, die zweite Fraktion bestand aus Zellen, die zwar BrdU inkorporiert hatten, aber nun nicht mehr teilungsaktiv, also negativ für Ki67 waren. Diese Fraktion wurde als *quitting fraction* (QF) bezeichnet. Die Behandlung mit TGF- β führte dabei zu einer signifikanten Vergrößerung der *quitting fraction* im Hippokampus (Kontrolle: 33,71% \pm 2,93; TGF- β : 56,43% \pm 0,99) und im Cortex (Kontrolle: 32,97% \pm 1,7; TGF- β : 68,26 \pm 2,1) und zu einer damit einhergehenden Verminderung der *cycling fraction* (Abbildung 23B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass TGF- β den Austritt der sich teilenden Progenitoren aus dem Zellzyklus fördert und somit vermutlich den Übergang von proliferativer Zellteilung in neurogene Zellteilung beeinflusst. Ob es sich hierbei um neurogen-asymmetrische oder neurogen-symmetrische Teilung handelt kann anhand dieser Daten nicht eindeutig belegt

werden. Da die Abnahme an Ki67-positiven, proliferierenden Zellen aber, vor allem in corticalen Zellen, sehr drastisch ausfällt und der Pool an Progenitoren daher rasch abnimmt, kann man eine Favorisierung der neurogen-symmetrischen Teilung annehmen.

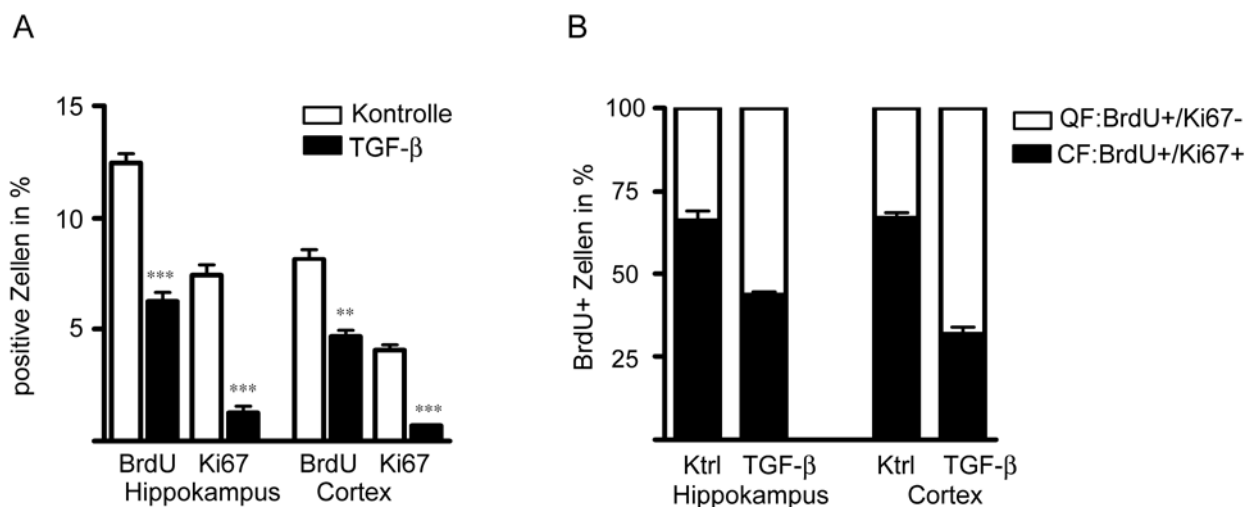


Abbildung 23: TGF-β fördert den Austritt von Progenitoren aus dem Zellzyklus

(A) Nach sechstägiger Behandlung mit TGF-β war der Anteil an proliferierenden Zellen in hippokampalen und corticalen Kulturen, bestimmt durch BrdU Inkorporation und Ki67 Expression, signifikant vermindert (Hippokampus: BrdU Kontrolle: 24,96% ± 0,84; TGF-β: 12,49% ± 0,8; Ki67 Kontrolle: 14,83% ± 0,93; TGF-β: 2,55% ± 0,6; Cortex: BrdU Kontrolle: 16,34% ± 0,87; TGF-β: 9,33% ± 0,55; Ki67 Kontrolle: 8,1% ± 0,48; Ki67 TGFβ: 1,38% ± 0,92; alle n=3)

(B) Bestimmung der Fraktion von Zellen, die den Zellzyklus innerhalb der ersten 48 Stunden der TGF-β-Behandlung verlassen. Die TGF-β-Behandlung startete an DIV2, nach 24 Stunden wurde BrdU hinzugefügt und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und eine Doppelimmunfärbung für Ki67 und BrdU durchgeführt. Die BrdU-Inkorporation war zu diesem Zeitpunkt unverändert, jedoch fand sich eine erhöhte Anzahl an Zellen, die aus dem Zellzyklus austraten, gegeben durch die Anzahl an BrdU+/Ki67-Zellen (QF=quitting fraction (BrdU⁺;Ki67⁻)/(BrdU⁺)); Hippokampus Kontrolle: 33,71% ± 2,93; TGF-β: 56,43% ± 0,99, Cortex Kontrolle: 32,97% ± 1,7; TGFβ: 68,26 ± 2,1) und einer korrespondierenden Verminderung an Zellen, die im Zellzyklus verbleiben (BrdU⁺/Ki67⁺ Zellen) (CF=cycling fraction (BrdU⁺;Ki67⁺)/(BrdU⁺)) (alle n=3), Signifikanz bestimmt durch t-Test (** P < 0,01; *** P < 0,001).

Um sicherzustellen, dass die Reduzierung der proliferationsfähigen Zellen sowie des Pools an Nestin- und Pax6-positiven Progenitoren nicht auf einen Verlust dieser Zellen durch apoptotische Prozesse zurückzuführen ist, wurden die hippokampalen und corticalen Kulturen kurzzeitig für 48 Stunden (DIV2 bis DIV4) oder über einen längeren Zeitraum von sechs Tagen (DIV2 bis DIV8) mit TGF-β behandelt und dann mittels Propidiumiodid-FACS-Analyse und TUNEL-Färbung analysiert (Abbildung 24). Dabei konnte mit beiden Methoden keine verstärkte Apoptose gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden.

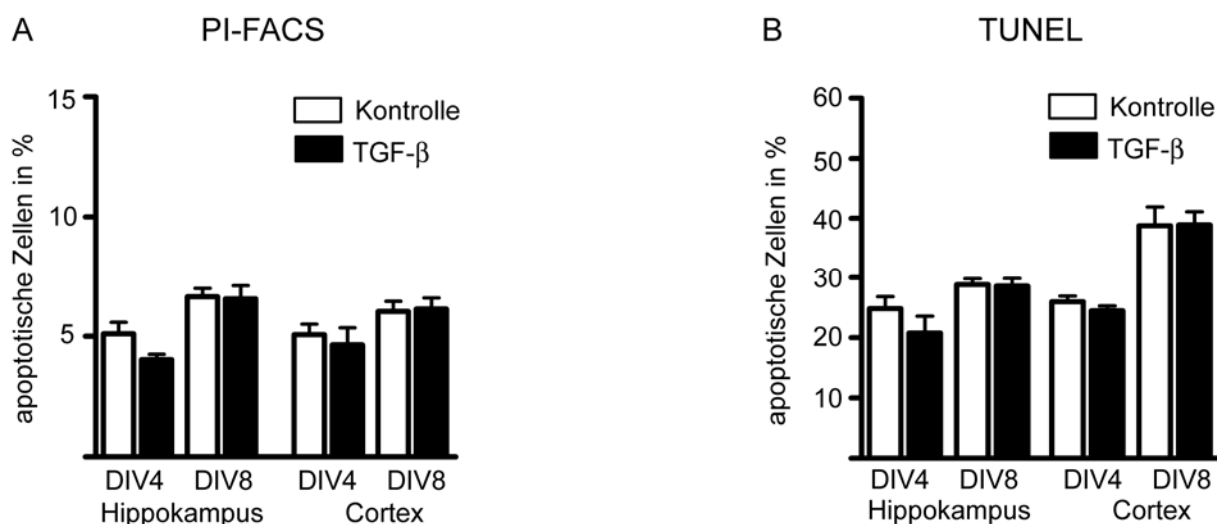


Abbildung 24: Die TGF- β -Behandlung löst keine verstärkte Apoptose in hippokampalen und cortikalen Kulturen aus

Weder eine kurzzeitige TGF- β -Behandlung über 48 Stunden (DIV4) noch eine andauernde Behandlung über sechs Tage (DIV8) führte zu einer erhöhten Apoptose, was durch Propidiumiodid-FACS Analyse (A) und TUNEL-Färbung (B) gezeigt werden konnte. Es ist jeweils der Mittelwert \pm SEM aus $n=3$ unabhängigen Experimenten angegeben.

3.3.3 Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese ist abhängig vom Entwicklungsstadium

Die Entwicklung des Nervensystems in Vertebraten und die Determinierung der neuronalen Vorläuferzellen auf eine neuronale, astrogliale oder oligodendrogliale Linie erfolgt in einer präzisen zeitlichen Abfolge. Die Koordination wird über komplexe Regulationsmechanismen gesteuert und erfordert die Integration zahlreicher Signale. Dabei können dieselben Signale in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium häufig unterschiedliche Auswirkungen haben, da sich die kombinatorische Zusammensetzung Transkriptions- und anderer Faktoren während der Entwicklung ändert.

Die in den vorangegangenen Experimenten beschriebene TGF- β induzierte Neurogenese wurde in neuronalen Zellkulturen isoliert aus E16,5 Embryonen beobachtet. Dies ist ein relativ später Zeitpunkt im Ablauf der Gehirnentwicklung, wenn die Generierung von Neuronen aus den Vorläuferzellen bereits abnimmt und die Gliogenese einsetzt (Bayer und Altmann, 1991). Deshalb sollten die Auswirkungen von TGF- β auch in cortikalen Kulturen isoliert zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt, nämlich an E14,5 untersucht werden, wenn die Neurogenese normalerweise ihren Höhepunkt erreicht.

Die Kulturen wurden, analog zu den bisherigen Experimenten, von DIV2 bis DIV 8 mit TGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die HuC/D-positiven Neurone und die Nestin- und Pax6-

exprimierenden Progenitorzellen immunzytochemisch detektiert und deren relative Anzahl quantifiziert. Außerdem wurde der Anteil an proliferierenden Zellen mittels Ki67-Immunfärbung ermittelt. In diesen Kulturen konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Neuronenzahl beobachtet werden (Abbildung 25). Auch wurde keine signifikante Änderung im Umfang des Progenitorpools und der proliferierenden Zellen gefunden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Fähigkeit der Progenitoren, auf den TGF- β -Stimulus mit vermehrter Neurogenese zu reagieren, vom Zeitpunkt in der Entwicklung abhängt.

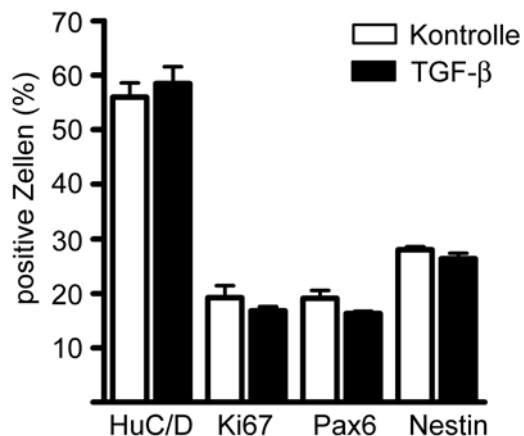


Abbildung 25: Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Progenitoren

Cortikale Kulturen isoliert aus E14,5 Embryonen zeigen keine signifikanten Änderungen in der Anzahl von HuC/D-positiven Neuronen sowie Nestin- und Pax6-positiven Progenitoren nach sechstägiger TGF- β -Behandlung. Auch die Proliferation war nicht negativ beeinflusst, was durch die Quantifizierung von Ki67-positiven Zellen analysiert wurde (alle n=3).

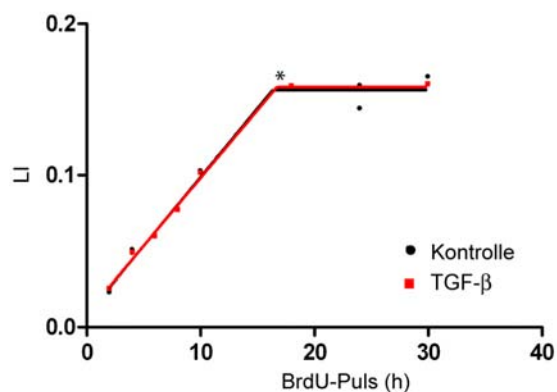
3.3.4 Einfluss von TGF- β auf die Zellzykluslänge

Ein weiterer Mechanismus, der den Übergang von Proliferation zu Neurogenese steuert, könnte der Faktor Zeit sein, denn es wurde beobachtet, dass die Länge des Zellzyklus während der Neurogenese der Maus von ca. 8 auf 16 Stunden zunimmt (Takahashi et al., 1993). Die Zunahme der Zellzykluslänge ist hier ausschließlich durch eine Verlängerung der G1-Phase bedingt (Takahashi et al., 1995). Für die Induktion der Differenzierung cortikaler Progenitoren durch das Zytokin NT-3 konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt ebenfalls mit einer Verlängerung der G1-Phase einhergeht (Lukaszewicz et al. 2002). Eine Vermutung ist, dass mit verlängerter Zellzyklusdauer die zugrunde liegenden biochemischen Reaktionen länger ablaufen. Es entsteht mehr Produkt pro Zellzyklus, was ein entsprechendes Entscheidungsprogramm einleiten könnte. Solche Signale bzw. biochemischen Prozesse könnten schon vor Differenzierungsvorgängen ablaufen, würden aber durch einen zu schnellen Zyklus einfach „überlesen“. Erst bei einer Verlängerung des Zellzyklus, könnten die Produkte einen Schwellenwert erreichen, der für die Differenzierung notwendig ist. Tatsächlich führt alleine die Verlängerung der G1-Phase proliferierender Neuroepithelzellen der Maus zu einer verfrühten Neurogenese (Calegari et al., 2005). Deshalb sollte überprüft

werden, ob auch die TGF- β induzierte Neurogenese von einer Verlängerung der Zellzyklusdauer begleitet ist.

Kumulative BrdU-Markierung ist eine Möglichkeit, die Zellzykluslänge innerhalb einer definierten Zellpopulation zu untersuchen (Nowakowski et al., 1989). Dabei werden die Zellen über zunehmend längere BrdU-Pulse markiert und so kann der Anteil an Zellen bestimmt werden, die zu jedem Zeitpunkt gerade in der S-Phase sind bzw. die während des Pulses mindestens einmal die S-Phase durchlaufen haben. Im Zeitverlauf nimmt der Anteil BrdU-positiver Zellen linear zu und erreicht, wenn alle Zellen genau einmal die S-Phase durchlaufen haben, zum Zeitpunkt t_{\max} ein Plateau. Der maximale Anteil BrdU-positiver Zellen in der Population definiert die *growth fraction* (GF). Der Zeitpunkt t_{\max} entspricht einer Zellzykluslänge (t_c) abzüglich der Dauer der S-Phase (t_s) ($t_{\max}=t_c-t_s$). Der Achsenabschnitt (b) der Regression über den linearen Anstieg entspricht dem prozentualen Anteil der S-Phase an der gesamten Zellzykluslänge ($b=t_s/t_c$). Mit diesen Beziehungen kann die Dauer von Zellzyklus und S-Phase errechnet werden.

Zur Untersuchung dieser Zellzyklusparameter wurden die Kulturen nach dem selben Behandlungsschema wie zuvor für die Bestimmung der *quitting fraction* beschrieben, behandelt. Unter diesen Bedingungen wurde zuvor der Beginn des Zellzyklusaustritts sichtbar, folglich sollte der Übergang von der proliferativen in die neurogene Teilung genau in dieser Zeitspanne stattfinden. Die Kulturen des Cortex bzw. des Hippokampus wurden also ab DIV2 mit TGF- β stimuliert und nach 24 Stunden wurde dem Kulturmedium 20 nM BrdU zugefügt. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 und 30 Stunden. Der Anteil BrdU-positiver Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt bezogen auf die Gesamtzellzahl quantifiziert. Aus der Auswertung der Daten in den kortikalen Kulturen ergab sich eine geringfügige Verminderung der Zellzykluslänge T_c und der Synthese-Phase T_s in den TGF- β behandelten Kulturen (Abbildung 26). Da die Änderung von T_c-T_s , also der Zeitperiode, welche die G1-, G2- und M-Phase umfasst, nur 0,37 Stunden betrug, deutet dies nicht auf einen gravierenden Einfluss von TGF- β auf die Zellzykluslänge hin. Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese scheint daher unabhängig von einer Verlängerung der G1-Phase zu verlaufen. Dieses Ergebnis ist auch konform mit den von Siegenthaler und Miller (2005) veröffentlichten Daten, bei denen TGF- β den Austritt kortikaler Progenitoren aus dem Zellzyklus ebenfalls ohne Beeinflussung der Zellzykluslänge fördert.



Zell-Zyklus-Parameter Cortex DIV 4				
	Tc-Ts	Tc (h)	Ts (h)	GF (%)
Kontrolle	17,17	18,13	0,96	15,82 ± 0,08
TGF-β	16,80	17,24	0,44	15,73 ± 0,14

Abbildung 26: TGF-β hat keinen Einfluß auf die Kinetik des Zellzykus

Die Bestimmung der Länge des Zellzyklus T_c sowie der Länge der Synthesephase T_s durch kumulative BrdU-Markierung ergab keine Beeinflussung dieser Zellzyklusparameter durch TGF-β. Cortikale Kulturen wurden an DIV2 mit TGF-β behandelt und nach 24 Stunden für 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 und 30 Stunden

mit BrdU markiert. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen steigt linear mit zunehmender BrdU-Pulslänge an, bis alle proliferativen Zellen BrdU markiert sind. Der maximale Anteil BrdU-positiver Zellen bildet die *growth fraction* (GF). (*) Übergang von dem linearen Anstieg in die Plateauphase (t_{max}). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus $n=2$ unabhängigen Experimenten.

3.3.5 Einfluss von TGF-β auf die Expression von Zellzyklusregulatoren

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass TGF-β den Austritt von proliferierenden neuronalen Progenitoren aus dem Zellzyklus fördert. Die Kontrolle über Zellzyklusprogression und Arrest wird durch die temporale und Zellzyklusphasen-spezifische Expression von Zellzyklusproteinen wie den Cyclinen und den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) ausgeübt (Sherr and Roberts, 2004). Der Austritt aus dem Zellzyklus wird durch die Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen durch CDK-Inhibitoren (CDKIs) vermittelt (Sherr und Roberts, 1999).

Während der Analyse von TGF-β-Zielgenen im ersten Teil dieser Arbeit war bereits eine Reduzierung der Expression der Cycline D1 und D2 nach 24-stündiger TGF-β-Behandlung aufgefallen. Daher wurden auch weitere Zellzyklus-relevante Gene auf Expressionsänderungen nach zwei- und 24-stündiger TGF-β-Stimulation in hippokampalen Kulturen an DIV4 untersucht. Dies umfasste die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2, Cdk4 und Cdk6, das Cyclin E1 sowie die CDKIs der Ink4 Familie wie p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c, p19Ink4d und der Cip/Kip Familie p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2.

Zusätzlich zu der Regulation der Cycline D1 und D2 konnte noch eine vorübergehende Induktion von p21 und p57 nachgewiesen werden (Abbildung 27). Die Expressionssteigerung dieser Gene war nach zweistündiger TGF-β-Behandlung deutlich und sank nach fortgesetzter TGF-β-Behandlung auf ein Level unterhalb der Kontrollwerte ab.

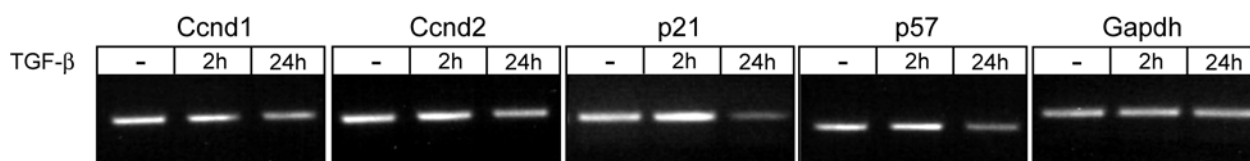


Abbildung 27: Einfluss von TGF-β auf die Expression von Zellzyklusregulatoren

Die Semiquantitative RT-PCR zeigt, dass TGF-β in jungen hippocampalen Kulturen (DIV4) zu einer transienten Expressionssteigerung der Zellzyklusinhibitoren p21Cip1 und p57Kip2 führt sowie zu einer später einsetzenden Reduzierung der Expression der Cycline D1 und D2.

3.3.6 Einfluss der identifizierten TGF-β-Zielgene auf den neurogenen Effekt

Das Verlassen des Zellzyklus ist zwar eine notwendige Voraussetzung für die Einleitung der Differenzierung, aber vermutlich allein nicht ausreichend. Es ist also anzunehmen, dass andere Faktoren mitwirken müssen, um das Schicksal der Progenitoren auf die Generierung von Neuronen festzulegen und die Differenzierung zu vollenden. Welche Faktoren bei der TGF-β induzierten Neurogenese eine Rolle spielen, ist unklar. Daher sollte untersucht werden, ob unter den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten TGF-β-Zielgenen Kandidaten zu finden sind, die für den neurogenen Effekt bedeutsam sind.

Als potentielle Kandidaten wurden Ctgf, Gata2, Runx1 und Nedd9 ausgewählt, da diese eine robuste, mindestens 3-fache Expressionssteigerung nach TGF-β-Behandlung aufwiesen und in der Literatur bereits in Verbindung mit der Regulation von Proliferation und Differenzierung neuronaler Zellen beschrieben worden sind. Auf diese Funktionen dieser Gene wird im Kapitel 4.1 der Diskussion näher eingegangen. Da TGF-β in den hippocampalen Kulturen außerdem den Notch-Signalweg zu aktivieren schien, was durch die Expressionssteigerung von Notch2 und Notch3 sowie des Notch-Mediators Hes1 angenommen werden konnte, sollten auch die Auswirkungen einer Inhibierung des Notch-Signalweges untersucht werden. Hierzu wurden hippocampale Kulturen mit dem Inhibitor der Presenilin-γ-Sekretase DAPT behandelt (Crawford und Roelink, 2007). Die Presenilin-γ-Sekretase sorgt während der Notch-Signaltransduktion für die Abspaltung der intrazellulären Domäne (NICD) aus dem vollständigen transmembranen Notch-Protein. Die NICD kann dann in den Kern wandern und über die Wechselwirkung mit anderen Notch-Mediatoren Regulationen von Notch-Zielgenen bewirken.

Wie in Abbildung 28 gezeigt ist, hatte die Behandlung mit DAPT (1 μM) allein keinen Einfluss auf die Differenzierung der hippocampalen Neurone. Der Anteil an HuC/D-positiven Neuronen war vergleichbar mit den Kontrollwerten. Eine gleichzeitige Gabe von DAPT und TGF-β führte zu einer ebensolchen Erhöhung der Neuronenzahl wie die TGF-β-Behandlung

allein. Die Inhibierung des Notch-Signalweges schien sich daher nicht negativ auf den neurogenen Effekt von TGF- β auszuwirken. Allerdings bewirkte die Inkubation mit DAPT eine starke Reduktion der Ki67-positiven, proliferativen Zellen, die auch signifikant größer als die durch TGF- β hervorgerufene Reduktion war. Die kombinierte Behandlung mit TGF- β und DAPT führte nochmals zu einer signifikanten Verringerung der proliferativ aktiven Zellen im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit TGF- β oder DAPT. Die Inhibition des Notch-Signalweges bewirkte also zusätzlich zu TGF- β einen Arrest des Zellzyklus in den hippocampalen Progenitoren, gleichzeitig war der Verlust des Notch-Signales allein nicht ausreichend, um neuronale Differenzierung zu induzieren.

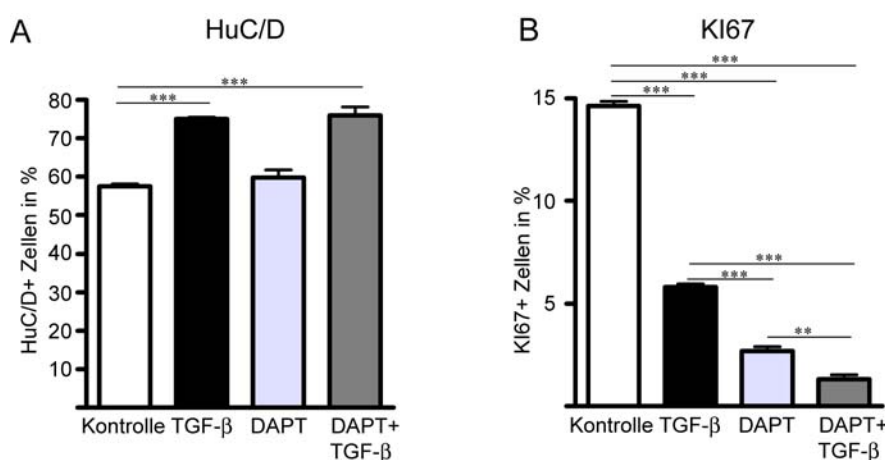


Abbildung 28: Auswirkungen der Inhibition des Notch-Signalweges durch den Presenilin- γ -Sekretase-Inhibitor DAPT auf die Entwicklung hippocampaler Kulturen

(A und B) Hippokampale Kulturen wurden ab DIV2 für sechs Tage mit TGF- β , DAPT oder einer Kombination von TGF- β und DAPT behandelt. Die anschließende Auszählung der HuC/D-positiven Neurone (A) ergab keine signifikanten Auswirkungen von DAPT allein auf die Neuronenzahl. Der Anteil an Neuronen nach DAPT-Behandlung war mit $59,75\% \pm 2,03$ vergleichbar mit den Kontrollwerten ($57,5\% \pm 0,58$). Auch die kombinatorische Gabe von DAPT und TGF- β beeinflusste die durch TGF- β hervorgerufene Steigerung der Neuronenzahl nicht (TGF- β : $75,01\% \pm 0,47$; DAPT + TGF- β : $75,97\% \pm 2,21$). Im Gegensatz dazu bewirkte DAPT eine starke Reduktion der Ki67-positiven proliferativen Zellen (B). Während TGF- β zu einer Reduktion des Anteils proliferativer Zellen gegenüber dem Kontrollwert von $14,63\% \pm 0,22$ auf $5,81\% \pm 0,15$ führte, reduzierte DAPT die Ki67 positiven Zellen auf $2,69\% \pm 0,21$. Eine Kombination von DAPT und TGF- β hatte einen nochmals vermehrten Effekt auf die Proliferation der Zellen und verringerte diese auf $1,32\% \pm 0,20$. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus $n=3$ unabhängigen Experimenten \pm SEM. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der jeweils paarweise verglichenen Behandlungsgruppen wurde der t -Test verwendet (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Zur Klärung der Beteiligung von Gata2, Runx1 und Nedd9 bei der TGF- β induzierten Neurogenese wurden hippocampale Kulturen mit Lentiviren transduziert, die gegen die jeweiligen Gene gerichtete shRNAs trugen und somit zu einem Funktionsverlust dieser

Faktoren führten. Zu jedem der drei Gene wurde ein Set von fünf verschiedenen shRNA Konstrukten eingesetzt, welche zunächst auf ihre Funktionalität überprüft werden mussten. Zu diesem Zweck wurden hippokampale Kulturen an DIV2 mit den shRNAs transduziert, nach 48 Stunden mittels Puromycin selektiert und nach weiteren 48 Stunden wurde die mRNA isoliert und die Suppression der jeweiligen Gen-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Für jedes der drei Gene konnten zwei shRNA Konstrukte identifiziert werden, welche die Expression der Zielgene um mehr als 80% unterdrückten (Abbildung 29A-C). Für den *Knock-down* von *Gata2* wurden die shRNAs mit den TRC-Nummern TRCN0000085418 und TRCN0000085422 ausgewählt, die eine Expressionsminderung auf 19% bzw. 3% gegenüber der Kontrolle zeigten. Für den *Knock-down* von *Runx1* wurden die shRNAs TRCN0000084808 und TRCN0000084810 verwendet, die beide in der Lage waren, die *Runx1* Genexpression unter 2% zu senken. Zum Ausschalten von *Nedd9* wurden die shRNAs TRCN0000009791 und TRCN0000009795 eingesetzt, die eine Reduktion der *Nedd9* Genexpression auf 19% bzw. 17% erreichten.

Die shRNAs wurden in die hippokampalen Kulturen transduziert, die TGF- β -Behandlung nach demselben Schema wie zuvor bei der *Smad4*-shRNA beschrieben (s. Kapitel 3.3.1.3) durchgeführt und die Anzahl HuC/D-positiver Neurone nach Beendigung der Behandlungsperiode ermittelt. Als Kontrolle diente wiederum eine shRNA, deren Sequenz keine Homologie im Mausgenom besitzt.

Der Einfluss von *Ctgf* auf die TGF- β induzierte Neurogenese wurde mit Hilfe der *Ctgf*-defizienten Tiere untersucht, indem hippokampale und cortikale Kulturen aus *Ctgf* (-/-) und *Ctgf* (+/-) Embryonen angelegt und auf ihre Fähigkeit überprüft wurden, auf TGF- β -Behandlung mit vermehrter Bildung von Neuronen zu reagieren.

Wie in Abbildung 29D-H dargestellt ist, beeinträchtigte der Funktionsverlust von *Gata2*, *Runx1* und *Ctgf* den neurogenen Effekt von TGF- β nicht. Das Ausschalten der *Nedd9* Expression dagegen verhinderte die vermehrte Generierung von Neuronen nach TGF- β -Behandlung vollständig. Dieses Ergebnis lässt demnach auf eine Funktion von *Nedd9* im molekularen Prozess der Neurogenese schließen.

Ergebnisse

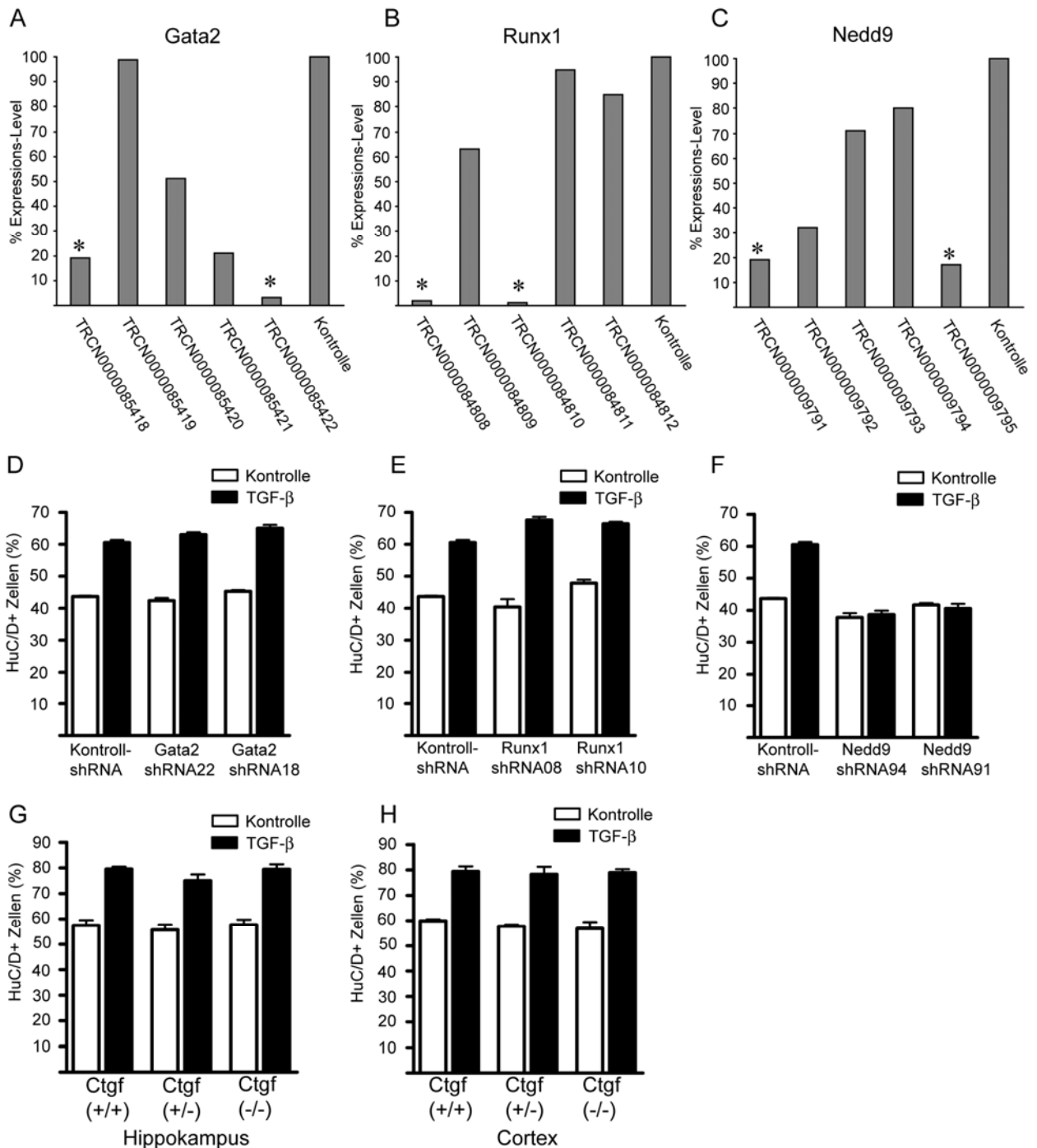


Abbildung 29: Einfluss des Funktionsverlusts von TGF-β-Zielgenen auf den neurogenen Effekt

(A-C) Validierung der Gata2- (A), Runx1- (B) und Nedd9- (C) spezifischen shRNAs in hippocampalen Kulturen mittels Real-Time PCR. Für jedes der drei Gene wurden zwei shRNAs identifiziert, die eine *Knock-down*-Effizienz von mehr als 80% besaßen. Diese sind mit einem Sternchen (*) markiert. (D-F) Quantifizierung der HuC/D-positiven Neurone nach lentiviraler Transduktion von shRNAs gegen Gata2 (D), Runx1 (E) und Nedd9 (F). Der Funktionsverlust von Gata2 und Runx1 beeinträchtigt die TGF-β induzierte Neurogenese nicht, während nach *Knock-down* von Nedd9 keine vermehrte Neurogenese unter TGF-β-Stimulation mehr auftritt (alle n=3). (G und H) Die Quantifizierung der HuC/D-positiven Neurone in hippocampalen (G) und cortikalen (H) Kulturen von homozygot (-/-) und heterozygot (+/-) *Ctgf*-deletierten Embryonen zeigt, dass der Verlust der *Ctgf*-Expression keine Auswirkungen auf die TGF-β induzierte Neurogenese gegenüber dem Wildtyp (+/+) hat (alle n=2). Die Balken geben jeweils den Mittelwert ± SEM an.

3.3.7 Expression von Nedd9 in cortikalen Kulturen

Um die Bedeutung der Nedd9-Expression für den neurogenen Effekt von TGF- β noch weiter zu stützen, wurde die Expression von Nedd9 auch in cortikalen Kulturen überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass in den cortikalen Kulturen aus E16,5 Embryonen Nedd9 ebenfalls eine deutliche Expressionssteigerung nach zwei- und 24-stündiger TGF- β -Behandlung aufwies (Abbildung 30). In den Kulturen aus E14,5 Embryonen kam es dagegen zu keiner Induktion von Nedd9 nach TGF- β -Stimulation. Allerdings schien hier das Ausgangsniveau in den unbehandelten Zellen bereits höher zu sein im Vergleich zu den unbehandelten Zellen aus E16,5 Embryonen. Die unterschiedliche Induzierbarkeit von Nedd9 könnte eine mögliche Begründung für die abweichenden Wirkungen von TGF- β in E14,5 und E16,5 Progenitoren sein.

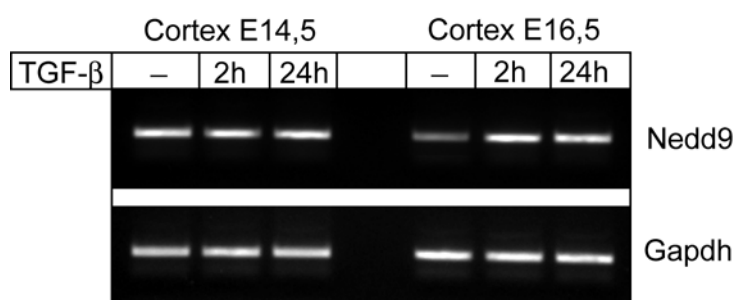


Abbildung 30: Regulation der Nedd9-Expression in cortikalen Kulturen aus E14,5 und E16,5 Embryonen

Die RT-PCR zeigt, dass Nedd9 in den cortikalen Kulturen aus E16,5 Embryonen ebenfalls durch TGF- β kurz- und langfristig induziert ist, während in Kulturen aus E14,5 Embryonen keine Expressionssteigerung von Nedd9 durch TGF- β ersichtlich ist.

3.3.8 TGF- β ändert die Morphologie von Nestin-positiven Progenitorzellen

Im Rahmen der Untersuchungen fiel auf, dass die Behandlung mit TGF- β in hippokampalen Kulturen bereits innerhalb der ersten 48 Stunden zu morphologischen Veränderungen in Nestin-positiven Progenitorzellen führte (Abbildung 31). In den unbehandelten Kulturen lagen die Nestin-positiven Zellen häufig in kompakten Clustern aus großen, flach ausgebreiteten Zellen mit einem großen runden Zellkern vor. Diese Zellen besaßen keinen oder nur einen breiteren Fortsatz. Darüber hinaus existierten schmalere, lang gestreckte Nestin-positive Zellen mit kleinerem Zellkern und Soma und dünnen, häufig bidirektionalen Fortsätzen, die nicht in den kompakten Zellverbänden angeordnet waren. Die Behandlung mit TGF- β favorisierte dabei den Phänotyp der letztgenannten Zellen, während die kompakten Cluster

aus den großen, ausgebreiteten Zellen 48 Stunden nach Beginn der TGF- β -Behandlung kaum noch zu finden waren. Die Behandlung mit dem TGF- β -Inhibitor SB431542 dagegen förderte die Morphologie der großen, flachen Zellen. Um diese morphologischen Veränderungen noch eingehender zu charakterisieren, wurden weitere Immunfärbungen durchgeführt.

Die Co-Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 gab zu erkennen, dass die großen flachen Zellen in den Kontroll- und SB431542 behandelten Kulturen zu einem großen Teil proliferativ aktiv waren, zum Teil sich aber auch in einem Ruhezustand befanden (Abbildung 31A). Die schmalen Zellen in den TGF- β behandelten Kulturen waren ebenfalls überwiegend teilungsaktiv. Des Weiteren waren die flachen Zellen schwach GFAP positiv, wohingegen die schmalen Zellen zu einem geringen Teil eine Co-Lokalisation mit GFAP aufwiesen, zum größten Teil aber GFAP negativ waren (Abbildung 31B). Die Co-Färbung mit dem Marker für junge neuronale Vorläuferzellen PSA-NCAM ergab keine Co-Lokalisation mit den flachen Nestin-positiven Zellen, während die schmalen Nestin-positiven Zellen in den TGF- β behandelten Kulturen zunehmend PSA-NCAM co-exprimierten (Abbildung 31C). Keine der beiden Nestin-positiven Zelltypen zeigte gleichzeitig eine Co-Lokalisation mit Doublecortin (Dcx), einem Marker für junge Neurone und auf die neuronale Linie festgelegter Vorläuferzellen späterer Stadien (Abbildung 31D). Jedoch wird auch *in vivo* selten eine Co-Expression der beiden Proteine beobachtet, da die Nestin-Expression in den spezifizierten Vorläuferzellen abrupt endet, wenn die Expression von Doublecortin beginnt (Couillard-Despres et al., 2005). Zusammenfassend kann man aussagen, dass die durch TGF- β hervorgerufenen morphologischen Veränderungen den Übergang eines Vorläuferzelltyps in einen anderen, möglicherweise in der Entwicklung weiter fortgeschrittenen Zelltyp anzeigen. Die zunehmende Co-Lokalisation mit PSA-NCAM könnte auf neuronal spezifizierte Progenitoren hindeuten, die Co-Expression einiger Zellen mit GFAP demonstriert aber auch die Entstehung von Zellen mit glialer Identität bzw. Progenitoren vom Typ der Radialglia. Ob TGF- β Einfluss auf die Bevorzugung des neuronalen oder glialen Schicksals nimmt, kann anhand dieser statischen Aufnahmen nicht festgestellt werden.

In den vorangegangenen Experimenten wurde Nedd9 als Faktor identifiziert, der für die TGF- β vermittelte Neurogenese eine bedeutsame Rolle spielt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Nedd9 die Zellmorphologie verändern und die Zellmotilität erhöhen kann (O'Neil et al., 2000; Fashena et al., 2002). Außerdem wurde die Expression von Nedd9 in multipotenten Nestin-positiven Zellen *in vivo* beschrieben (Aquino et al., 2008). Daher wurde untersucht, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen der Nestin-positiven Zellen nach TGF- β -Behandlung mit der Expression von Nedd9 korrelieren. Wie in Abbildung 31E zu erkennen ist exprimieren die flachen Nestin-positiven Zellen der unbehandelten und SB431542 behandelten Kulturen kein oder nur sehr wenig Nedd9. In den TGF- β behandelten Kulturen

dagegen konnte eine vermehrte Co-Expression von Nedd9 und Nestin in den morphologisch veränderten Zellen beobachtet werden und nahezu alle Nestin-positiven Zellen des schmalen, langgestreckten Typs zeigten eine Nedd9 Färbung des Zellsomas. Die TGF- β -Behandlung führt also zu einer Erhöhung der Nestin/Nedd9-doppelt-positiven Progenitoren, was auf eine Funktion von Nedd9 bei der Umbildung der Progenitoren hinweisen könnte.

Ergebnisse

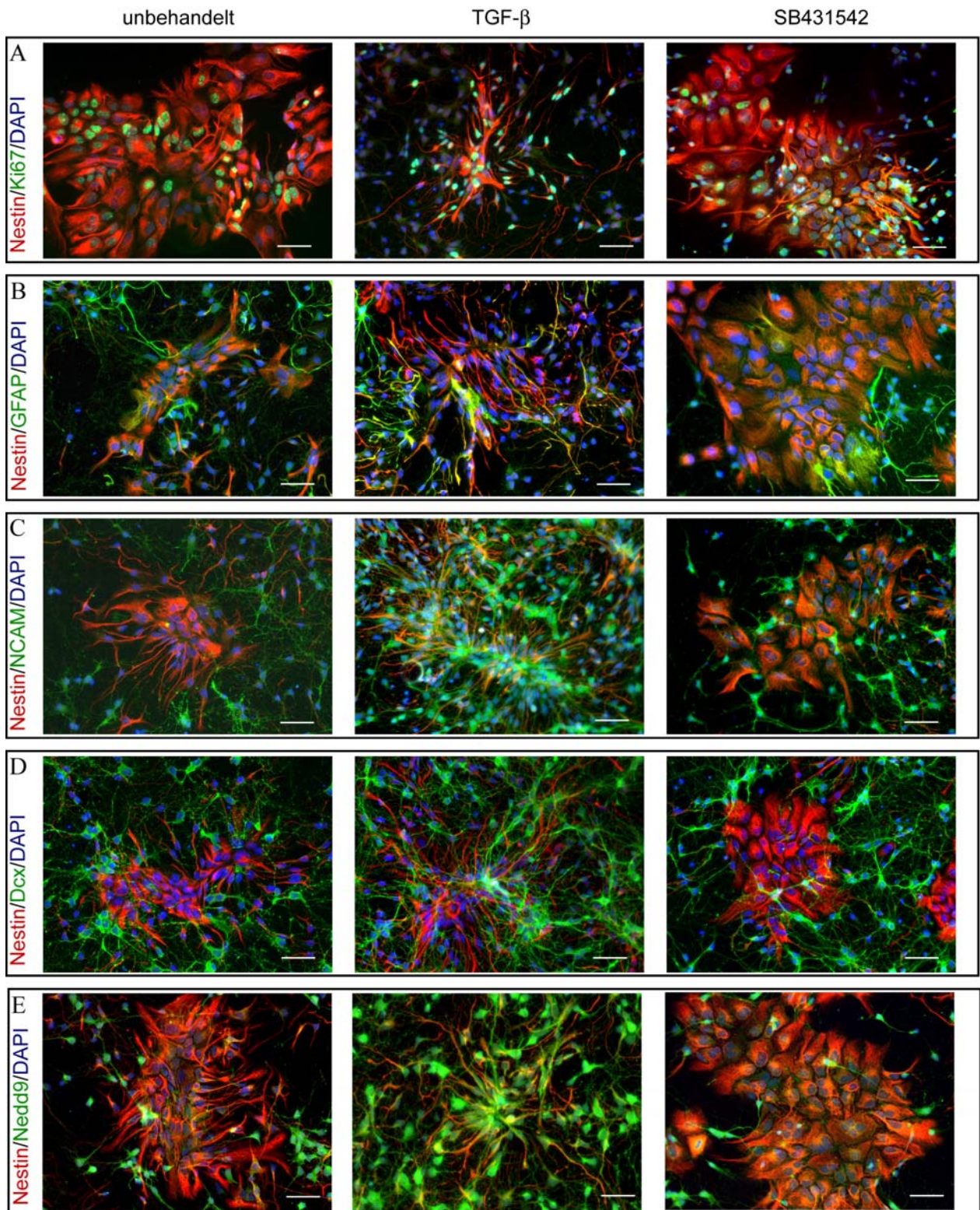


Abbildung 31: Morphologische Veränderungen in Nestin-positiven Progenitoren nach TGF- β -Behandlung

(A-E) Hippokampale Kulturen enthalten Cluster von Nestin-positiven Zellen. In unbehandelten Kontrollen und in höherem Ausmaß in Kulturen behandelt mit dem ALK-Inhibitor SB431542 sind diese Cluster sehr kompakt und bestehen aus großen Zellen mit flach ausgebreitetem Soma und großem Zellkern ohne oder mit nur einem dickeren Fortsatz. Diese Zellen sind schwach GFAP-positiv (B) und teilweise proliferativ aktiv, demonstriert durch Ki67 Immunreaktivität (A). Sie sind außerdem negativ für PSA-NCAM (C) und Doublecortin (D). Die Behandlung mit TGF- β ändert die Morphologie dieser Nestin-positiven Zellen zu kleineren Zellen mit schmalen Fortsätzen, die

länger oder kürzer sein können und häufig bidirektional sind. Diese Zellen sind zum größten Teil Ki67-positiv (A). Einige Zellen, besonders die mit längeren Fortsätzen sind GFAP-positiv, die meisten sind jedoch GFAP-negativ (B). Viele zeigten ebenfalls Co-Lokalisation mit PSA-NCAM (C). Eine Co-Lokalisation mit Doublecortin konnte nicht beobachtet werden (D). Die Expression des TGF- β -Zielgens Nedd9 war in den großen, flach ausgebreiteten Zellen der unbehandelten und der mit SB431542 behandelten Zellen nur sehr schwach ausgeprägt, verstärkte sich jedoch nach TGF- β -Behandlung in den schmalen, Fortsatz-tragenden Zellen. Eine hohe Nedd9-Expression konnte ebenfalls in Nestin-negativen Zellen beobachtet werden (E). Maßstab 50 μ m

3.3.9 Einfluss von TGF- β auf die Spezifizierung neuronaler Subtypen im Cortex

Der Cortex beinhaltet eine Vielzahl neuronaler Subtypen, die innerhalb der sechsschichtigen Struktur des Cortex geordnet vorliegen. Die Spezifizierung von Progenitoren in einen bestimmten Subtyp kann zellautonom durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Pax6 und Emx2 erfolgen (Molyneaux et al., 2007), aber auch extrinsische Signale können das Schicksal der Zellen beeinflussen. Deshalb sollte untersucht werden, ob durch TGF- β die Neurogenese bestimmter kortikaler Subtypen gegenüber anderen bevorzugt wird. Die verschiedenen Subtypen lassen sich aufgrund ihrer Expression bestimmter Markergene unterscheiden. Für die immunzytochemische Analyse von kortikalen Kulturen wurden folgende Marker ausgewählt: Ctip2, der Neurone der tiefen Schichten V und VI markiert; Foxp2, ein Marker für Schicht VI; Tbr1, der überwiegend in Neuronen der Schicht VI exprimiert ist, aber auch in den oberen Schichten II und III zu finden ist; Satb2 markiert die oberen Schichten II bis IV und Reelin, der in den Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone (Schicht I) exprimiert wird (Guillemot et al., 2006, Molyneaux et al., 2007). Die kortikalen Kulturen wurden nach sechstägiger TGF- β -Behandlung an DIV8 fixiert und mit Antikörpern gegen HuC/D und den genannten Markerproteinen gemeinsam gefärbt. Anschließend wurde innerhalb der Population der HuC/D-positiven Neurone der Anteil an denen für die verschiedenen Marker positiven Zellen bestimmt. Dadurch sollten Änderungen in der Subtypen-Zusammensetzung der Neurone mit und ohne TGF- β -Behandlung verglichen werden. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dieser Analyse graphisch dargestellt. Nach TGF- β -Behandlung war eine leichte Erhöhung der Marker tieferer Schichten zu beobachten, die aber im Fall von Ctip2 nicht signifikant war (Kontrolle: 43,80% \pm 1,07, TGF- β : 46,5% \pm 1,7, n=3) und im Fall von Foxp2 zu einem Signifikanzniveau von 0,041 leicht signifikant war (Kontrolle: 7,24% \pm 0,66, TGF- β : 9,52% \pm 0,36, n=3). Über die Hälfte der Neurone exprimierte den Marker Tbr1, jedoch ließ sich hier kein Unterschied zwischen den TGF- β behandelten und den unbehandelten Kontrollzellen feststellen (Kontrolle: 53,29% \pm 1,11, TGF- β : 55,08% \pm 1,96, n=3). Bei dem Marker für die oberen Schichten II bis IV Satb2 konnte eine leichte Reduktion nach TGF- β -Behandlung beobachtet werden (Kontrolle: 58,24% \pm

0,75, TGF- β : 50,27% \pm 1,42, n=4), die zu einem Niveau von 0,0026 signifikant war. Da die Auswertung der Daten die prozentuale Verteilung der Subtypen innerhalb der HuC/D-positiven Neuronenpopulation angibt, und die Neuronenpopulation sich unter TGF- β -Behandlung bezogen auf die Gesamtzellzahl erhöht, bedeutet die Reduktion des Satb2-positiven Anteils nicht unbedingt eine echte Reduzierung dieser Zellen. Vielmehr kann angenommen werden, dass die Population der Satb2-positiven Zellen nicht in einem gleichmäßigem Verhältnis mit der Gesamtneuronenzahl ansteigt, sondern stagniert und die unter TGF- β -Einfluss neu generierten Neurone nicht zu dem Subtyp der Satb2-positiven Neurone gehören. Die Auszählung des Marginalzonenmarkers Reelin ergab keinen Unterschied zwischen TGF- β behandelten und unbehandelten Zellen (Kontrolle: 11,75% \pm 0,33, TGF- β : 12,46 \pm 0,14, n=2).

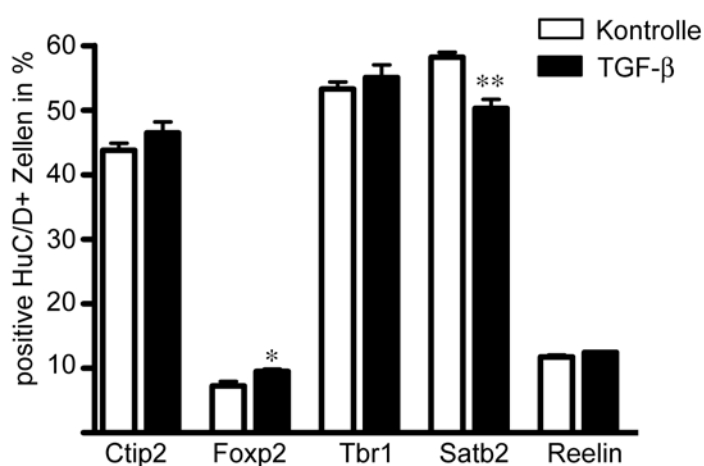


Abbildung 32: Auswirkungen der TGF- β -Behandlung auf die Zusammensetzung neuronaler Subtypen in cortikalen Kulturen

Die Graphik zeigt den Anteil der Neurone positiv für diverse Marker neuronaler Subtypen im Cortex bezogen auf die Gesamtzahl HuC/D-positiver Neurone. Die Behandlung mit TGF- β führte zu einer leichten Steigerung der Neurone positiv für die Marker tieferer Schichten (V und VI) Ctip2 und Foxp2 und zu einer Reduktion des Anteils an Neuronen positiv für den Marker der oberen Schichten (II bis IV) Satb2. Die Auszählung der Neurone positiv für Tbr1 (Schicht VI und II bis III) so wie Reelin (Schicht I) ergab keine Unterschiede zwischen TGF- β behandelten und unbehandelten Zellen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test verwendet (* P < 0,05; ** P < 0,01).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Bedeutungen von TGF- β auf die Entwicklung neuronaler Zellen des Vorderhirns zu untersuchen. Als Modellsystem wurden primäre Kulturen aus dem Hippokampus und Cortex von Mäusen der Embryonalstadien E14,5 und E16,5 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kulturen selbst TGF- β -Signale produzieren, indem sowohl die Expression der mRNA für die Liganden TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, als auch die Sekretion von TGF- β s aus den Zellen in das Medium nachgewiesen wurde. Darüber hinaus konnte die Responsivität der Zellen auf TGF- β -Signale demonstriert werden, da sie die mRNA der TGF- β -Rezeptoren des Typ I und Typ II exprimieren und auf die Stimulation mit TGF- β mit einer Translokation von Smad-Proteinen aus dem Zytosol in den Zellkern reagieren. Diese Befunde legen nahe, dass in kortikalen und hippokampalen Zellen TGF- β -Signalaktivität vorliegt, die auch von funktioneller Bedeutsamkeit sein sollte.

Die Klärung der Frage nach möglichen Funktionen erfolgte sowohl auf molekularer Ebene, durch die Identifizierung von TGF- β -Zielgenen, als auch auf zellulärer Ebene, durch die Betrachtung der Auswirkungen exogener TGF- β -Behandlung auf die Proliferation und Differenzierung der Kulturen. Dabei konnte gezeigt werden, dass TGF- β in den hippokampalen und kortikalen Kulturen, gewonnen zum Zeitpunkt E16,5 der Embryonalentwicklung, die Neurogenese induziert. Dieser Prozess ist abhängig von der Aktivierung von Smad-Proteinen und vom Entwicklungsstatus der Progenitorzellen. Abschließend wurde die Bedeutung einiger der identifizierten TGF- β -Zielgene im Hinblick auf den beobachteten neurogenen Effekt von TGF- β vertiefend untersucht.

4.1 Identifizierung von TGF- β -Zielgenen

Die Aktivierung des TGF- β -Signalweges führt unter der Beteiligung von Smad-Proteinen, sowie über einige Smad-unabhängige Signaltransduktionswege, zur Regulation bestimmter Zielgene, welche die vielfältigen TGF- β induzierten Auswirkungen vermitteln. Die Qualität der regulierten Gene ist dabei stark vom jeweiligen Kontext abhängig und variiert je nach Zelltyp, Umgebung und Entwicklungsstatus der Zelle. Dabei spielt die zellspezifische Komposition an Co-Faktoren eine wichtige Rolle, welche über aktivierende oder inhibierende Wirkungen letztendlich das Antwortverhalten der Zelle bestimmen (Massague, 2000).

Um Funktionen von TGF- β während der Entwicklung des Vorderhirns verstehen zu können, ist es hilfreich, die durch TGF- β regulierten Zielgene in Zellen des embryonalen Vorderhirns

zu kennen. Bisher waren allerdings nur wenige Zielgene von TGF- β im zentralen Nervensystem bekannt. Daher war die Identifizierung von TGF- β regulierten Zielgenen in diesen Zellen ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Screenings nach Zielgenen werden häufig durch die Verwendung von DNA-*Microarrays* durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass eine sehr große Anzahl von Genen untersucht werden kann. Allerdings sind *Microarrays* auch sehr kostenintensiv und liefern zahlreiche falsch-positive Ergebnisse, so dass die Resultate anschließend durch andere Methoden, wie z.B. auf RT-PCR basierende Methoden, verifiziert werden müssen. Da für Zielgene des TGF- β -Signalweges bereits *Microarray*-Studien in anderen Zellsystemen wie epithelialen, mesenchymalen und endothelialen Zellen durchgeführt wurden (Verrecchia et al., 2001; Zavadil et al., 2001; Ota et al., 2002; Kang et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhao et al., 2004), wurde auf die erneute Verwendung eines *Microarrays* verzichtet. Stattdessen wurden innerhalb der in diesen Studien identifizierten regulierten Gene diejenigen ausgewählt, die auch im Nervensystem von Bedeutung sind und die TGF- β -abhängige Regulation dieser Gene in hippokampalen Zellen aus Mäusen des Embryonalstadiums E16,5 mittels semiquantitativer RT-PCR sowie quantitativer Real-Time PCR validiert.

Aus diesem *Screen* konnten insgesamt 16 Zielgene identifiziert werden, die im folgenden näher dargestellt und insbesondere ihre bekannten Funktionen während der Entwicklung des ZNS herausgestellt werden sollen.

4.1.1 TGF- β reguliert die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix

Unter den regulierten Genen befanden sich mehrere Moleküle der extrazellulären Matrix, wie der *Tissue inhibitor of metalloproteinases* (Timp) 3, *TenascinC* (TnC), und der *Connective tissue growth factor* (Ctgf), welche eine positive Regulation nach TGF- β -Behandlung zeigten, sowie die Integrine $\alpha 3$ und $\alpha 5$.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) stellt die Gesamtheit der Makromoleküle außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen dar. Neben der Formgebung von Geweben und Organen besitzt sie weitreichende Funktionen z.B. bei der Signaltransduktion, Zelladhäsion, -migration und -differenzierung. Dazu unterliegt die ECM einem ständigen Umbau. Wichtige Moleküle, die diese Umbauprozesse regulieren, sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sie sorgen in erster Linie für die Degradation der ECM (Bissell et al., 1982; Adams und Watt, 1993), und die Timps, die wiederum die Aktivität der MMPs hemmen (Baker et al., 2002). Die genaue Regulation der Expression von MMPs und Timps ist daher essentiell für das Fließgleichgewicht der ECM. Mittlerweile belegen zahlreiche

Studien, dass die Timps auch in viele Prozesse der neuronalen Entwicklung und Plastizität involviert sind. In Säugern existieren vier Mitglieder der Timp-Familie (Timp1-4) (Brew et al., 2000). Während der Embryonalentwicklung ist Timp3 mRNA im ZNS vor allem in den ventrikulären Zonen und in Kernen des Hirnstamms exprimiert, und im adulten ZNS wird Timp3 von Neuronen und Astrozyten in der subventrikulären Zone, des Thalamus und des Bulbus olfactorius und des rostralen migratorischen Traktes exprimiert (Vaillant et al., 1999; Jaworski und Fager, 2000). Dieses Expressionsmuster in Populationen mit neuronalen Progenitoren könnte auf eine Beteiligung von Timp3 bei der Neurogenese und/oder der zellulären Migration hindeuten. Darüber hinaus wurde eine Induktion von Timp3 nach Verletzungen, wie z.B. cerebraler Ischämie gefunden (Wallace et al., 2002), wobei ihm in diesem Kontext eine Beteiligung bei der Induktion von Apoptose zugeschrieben wird. Für Timp2, welches überwiegend von postmitotischen Neuronen exprimiert wird, wird eine Rolle bei der terminalen Differenzierung von Neuronen angenommen (Jaworski und Leonor Perez-Martinez, 2006). Timp1 wird ebenfalls häufig nach Verletzungen des ZNS verstärkt exprimiert und scheint dort neuroprotektiv zu wirken (Rivera et al., 2002; Tan et al., 2003).

TenascinC ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das überwiegend von Gliazellen und von migrierenden astroglialen Vorläuferzellen exprimiert wird (Chiquet-Ehrisman et al., 1986; Bartsch et al., 1992). Es kann sowohl das axonale Wachstum fördern und als Leitmolekül die Migration des Axons zu ihren Zielen lenken, aber auch repulsiv auf den Wachstumskegel des Axons wirken und das Axonwachstum hemmen (Bourdon und Ruoslahti, 1989; Wehrle-Haller und Chiquet, 1993; Dorries et al., 1996; Faissner und Kruse, 1990; Lochter und Schachner, 1993; Bartsch, 1996). Diese gegensätzlichen Wirkungen werden durch den multimodularen Aufbau von TenascinC ermöglicht, der zu einer großen kombinatorischen Vielfalt des Moleküls und zu Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Rezeptoren führt (Spring et al., 1989; Prieto et al., 1992; Husmann et al., 1995; Dorries et al., 1996; Götz et al., 1996; Strelakova et al., 2002; Rigato et al., 2002). Ebenso wie die Timps ist auch die Expression von TnC in einer Reihe von Verletzungs-Paradigmen des ZNS hochreguliert und vermittelt dort vermutlich regenerative Prozesse (Brodkey et al., 1995; Bartsch, 1996).

Ctgf ist ein Mitglied der Ccn-Proteinfamilie, die neben Ctgf (Ccn2) auch Cyr 61 (Ccn1), Nov (*nephroblastoma-overexpressed gene*, Ccn3) und die *Wnt-induced secreted proteins* Wisp 1-3 (Ccn4-6) umfasst (Brigstock et al., 2003). Es ist ein sekretiertes, mit der extrazellulären Matrix assoziiertes Protein und ist an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt. Abhängig vom Zelltyp kann Ctgf Zellwachstum, Migration, Adhäsion, Überleben, Differenzierung und Synthese der extrazellulären Matrix fördern (Igarashi et al., 1993; Frazier et al., 1996; Moussad und Brigstock, 2000). Darüber hinaus ist es in vielfältige biologische Vorgänge wie

Angiogenese (Babic et al., 1999; Lau und Lam, 1999), Chondrogenese (Ivkovic et al., 2003; Takigawa et al., 2003), Tumorigenese (Frazier und Grotendorst, 1997; Kubo et al., 1998), Wundheilung (Igarashi et al., 1993) und entzündliche und fibrotische Prozesse involviert (Igarashi et al., 1996; Dammeier et al., 1998). Ctgf kann auch modulierend auf viele andere Signalwege wirken. So wurde eine Beeinflussung des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Ctgf beschrieben (Mercurio et al. 2003). Außerdem kann es mit anderen Proteinen der ECM, vor allem mit Integrinen, wechselwirken (Lau und Lam, 1999; Babic et al., 1999; Jedsadayanmata et al., 1999).

Während der Embryonalentwicklung der Maus ist Ctgf in verschiedenen Gewebetypen exprimiert. Im Hinblick auf das ZNS erstreckt sich die Expression auf das Neuroepithel des gesamten Gehirns in den Embryonalstadien von E12 bis E18 und scheint mit der Phase der neurogenen Zellteilungen zu korrelieren (Friedrichsen et al., 2003). Im adulten Gehirn wurde eine besonders starke Ctgf-Expression spezifisch in kortikalen Neuronen der Schicht VII gefunden (Heuer et al., 2003). Über die Funktion von Ctgf im embryonalen und adulten ZNS ist allerdings wenig bekannt.

Die Expressionssteigerung von Ctgf durch TGF- β wurde bereits in zahlreichen Zellen und Geweben außerhalb des Nervensystems beschrieben (Brunner et al., 1991; Igarashi et al., 1993; Frazier und Grotendorst, 1997) und wird über ein TGF- β -responsives Element auf dem Ctgf-Promotor gesteuert (Holmes et al., 2001). Im ZNS wurde für Ctgf, wie für TGF- β , eine verstärkte Expression nach Läsionen beobachtet, und in diesem Zusammenhang wurde Ctgf als Mediator der TGF- β vermittelten glialen Narbenbildung diskutiert (Hertel et al., 2000).

Eine direkte Interaktion zwischen TGF- β und Ctgf fanden Abreu et al. (2002) in Experimenten an *Xenopus* und in diversen Zelllinien. Die Autoren zeigten, dass Ctgf durch seine Cysteinreiche Domäne, die Willebrand Typ C-Domäne, direkt an TGF- β und BMP4 binden kann, wodurch eine antagonistische Wirkung auf BMP4 vermittelte Signale und eine Verstärkung der TGF- β -Signalkaskade erreicht werden kann.

Aufgrund dieser beschriebenen verstärkenden Wirkung von Ctgf auf die TGF- β -Signalkaskade wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Regulation der TGF- β -Zielgene von der Ctgf-Expression abhängig ist. Dies schien jedoch nicht der Fall zu sein, da die Regulation der TGF- β -Zielgene auch in hippokampalen Zellen aus *Ctgf*-deletierten Mäusen auftrat. In der Studie von Abreu et al. wird allerdings darauf hingewiesen, dass die verstärkende Wirkung von Ctgf vor allem bei geringen TGF- β -Konzentrationen zum Tragen kommt und dann die TGF- β -Signale potenzieren kann. In den hier durchgeführten Experimenten wurde mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert, was physiologisch eher einer höheren TGF- β -Konzentration entspricht. Möglicherweise ist der Verlust von Ctgf nur bei der Stimulation mit geringen TGF- β -Konzentrationen von Bedeutung, was durch Experimente mit Konzentrationsreihen überprüft werden müsste. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde

auch der Einfluss von Ctgf auf den neurogenen Effekt von TGF- β in hippokampalen und cortikalen Kulturen untersucht, doch auch hier konnte kein Zusammenhang mit der Ctgf-Expression gefunden werden. Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese trat auch in hippokampalen und cortikalen Kulturen Ctgf-defizienter Mäuseembryonen auf.

Eine modulierende Aktivität von TGF- β auf die Produktion der extrazellulären Matrix im ZNS ist auch im Kontext mit anderen Molekülen beschrieben worden. In Kulturen primärer Astrozyten und in transgenen Mäusen, die TGF- β 1 spezifisch in Astrozyten überexprimieren, steigert TGF- β die Expression von Laminin und Fibronectin sowie deren Integration in die ECM (Wyss-Coray et al., 1995) und TGF- β 1-Knock-out Mäuse zeigen eine verminderte Expression von Laminin (Brionne et al., 2003).

Die Beeinflussung der extrazellulären Matrix durch TGF- β wird häufig im Zusammenhang mit der Reaktion auf Verletzungen des ZNS gesehen, bei denen TGF- β verstärkt exprimiert wird (Flanders et al., 1998). Dabei soll TGF- β durch seinen stimulierenden Einfluss auf die Produktion von ECM-Molekülen eine bedeutende Rolle für die Bildung der Glianarbe nach Läsionen des ZNS spielen (Wang et al., 2007; Moon und Fawcett, 2001). In diesen Studien führte die Neutralisation von TGF- β 1 und 2 durch Antikörper (Moon und Fawcett, 2001) bzw. der Knock-out von Smad3 (Wang et al., 2007) zu einer Verminderung der glialen Narbenbildung nach Verletzungen des ZNS.

Auch bei den hier betrachteten Genen Timp3, TnC und Ctgf wurde eine verstärkte Expression nach Schädigungen des ZNS beschrieben (Wallace et al., 2002; Brodkey et al., 1995; Bartsch, 1996; Hertel et al., 2000). Die TGF- β -abhängige Regulation dieser Gene in den hier verwendeten hippokampalen Kulturen weist darauf hin, dass die Induktion dieser Gene nach Verletzungen durch die verstärkte TGF- β -Expression vermittelt werden könnte. Da die Expressionssteigerung von Ctgf, Timp3 und TnC innerhalb der hippokampalen Kulturen überwiegend den Astrozyten zugeordnet werden konnte (s. Kapitel 4.2), kann angenommen werden, dass diese Moleküle in die Prozesse der TGF- β vermittelten glialen Narbenbildung involviert sind.

Integrine sind hauptverantwortlich für die Zell-Matrix-Adhäsion und bilden als funktionelle Einheit Heterodimere aus, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen (Übersicht in Hynes, 2002). In Säugern wurden bisher 18 α - und 8 β -Untereinheiten gefunden, die gemeinsam 24 unterschiedliche Integrine bilden können. Neben der Adhäsion können Integrine auch die Migration, das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Zellen steuern (Giancotti und Ruoslathi, 1999; Miyamoto et al., 1995; Sheetz et al., 1998). Diese Funktionen werden von Signal- und Adaptermolekülen vermittelt, die mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrine assoziieren und dabei einerseits chemische

Signale erzeugen und andererseits die Integrine mit dem Aktingerüst der Zelle verknüpfen. Die Integrin-Aktin-Interaktion führt dann zu einer Aggregation der Integrine und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionsstellen. Diese sind Verankerungs- und Schaltstellen der Zelle, die nicht nur stabile Adhäsion garantieren, das Aktingerüst reorganisieren und Aktinfilamente an der Zellmembran verankern, sondern auch als Signalzentren wirken, um so die Informationen von der Peripherie zu den Effektormolekülen weiterzuleiten (Dedhar und Hannigan, 1996).

TGF- β führte sowohl in jungen, als auch in reifen hippokampalen Kulturen zu einer schnellen Induktion von Itga5 und zu einer Repression von Itga3 nach 24-stündiger Behandlung. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Integrine ist es schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, welche Auswirkungen diese Beeinflussung der Integrin-Expression auf die Zellen haben könnte. In einer Studie von Siegenthaler und Miller (2004) wurde ebenso von einer Regulation der Integrin-Expression durch TGF- β in cortikalen Schnittkulturen embryonaler Ratten berichtet. TGF- β steigerte hier gleichfalls das Level der Itga5-Proteinexpression nach sechsständiger TGF- β -Behandlung. Gleichzeitig wurde in dieser Studie eine Expressionssteigerung von Itga3 nach sechsständiger TGF- β -Behandlung und eine Reduktion von Itga3 nach zwölfständiger Behandlung beobachtet. Da in der vorliegenden Arbeit die Regulation in den hippokampalen Kulturen nur nach jeweils zwei bzw. 24 Stunden TGF- β -Behandlung erfasst wurde, könnte die mittelfristige Induktion von Itga3 auf diese Weise entgangen sein. Die Autoren der zuvor erwähnten Studie brachten die Induktion der Integrin-Expression durch TGF- β mit dem von ihnen beobachteten Effekt einer Migrationssteigerung postmitotischer Neurone in den cortikalen Schnittkulturen in Verbindung. Ein solcher migrationsfördernder Effekt auf die postmitotischen Neurone könnte auch in den hier verwendeten hippokampalen Kulturen eine Rolle spielen und sollte in folgenden Experimenten überprüft werden.

4.1.2 TGF- β reguliert die Expression von Molekülen involviert in die Differenzierung neuronaler Zellen

Unter den weiteren identifizierten Zielgenen befinden sich einige Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, die für die Differenzierung neuronaler Zellen von besonderer Bedeutung sind. Dazu gehören das *GATA-binding protein 2* (Gata2), der *Inhibitor of differentiation 3* (Id3) und das *Neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene 9* (Nedd9).

Gata-Transkriptionsfaktoren sind in Vertebraten eine Gruppe von sechs Zinkfinger-Proteinen (Gata1 bis 6), die an die (T/A)GATA(G/A) Konsensus-Sequenz binden und eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen spielen (Lowry und Atchley, 2000). Gata2, 3, 4 und 6 werden in unterschiedlichen Arealen des ZNS exprimiert, während Gata1 und Gata5 nicht im ZNS vorkommen. Transgene Mäuse mit einer homozygoten *Gata2*-Deletion sterben um den Embryonaltag E10,5 bis E11,5 aufgrund einer ausbleibenden Hämatopoese (Tsai et al., 1994). Diese Embryonen weisen auch einen schwerwiegenden Defekt in der frühen Neurogenese auf (Nardelli et al., 1999). Ein spezifisches und entwicklungsabhängiges Expressionsmuster von Gata2 konnte in neuronalen Zelltypen gezeigt werden. Im Rhombencephalon von Mäuseembryonen wird Gata2 mRNA im Entwicklungsstadium E9 im Rhombomer 4 und temporär im Rhombomer 2 exprimiert (Pata et al., 1999; Nardelli et al., 1999). Zwischen den Tagen E9,5 und E11,5 ist Gata2 in verschiedenen Bereichen mit früher neuronaler Differenzierung aktiv, z.B. im Bulbus olfactorius, im Prätektum, im Nucleus oculomotorius des Mittelhirns und in der Bodenplatte des Mittelhirns (Nardelli et al., 1999; Zhou et al., 2000). In Einklang mit diesen Expressionsdaten belegen weitere Studien eine Beteiligung von Gata2 an der Differenzierung vieler Neuronentypen des ZNS, wie z.B. an der Differenzierung cranialer Nerven des ventralen Rhombencephalons und Rückenmarks (Nardelli et al., 1999; Pata et al., 1999) sowie an Moto- und V2-Interneuronen des Rückenmarks (Karunaratne et al., 2002; Zhou et al., 2000). Gata2 ist ebenfalls für die Entwicklung serotonerger Neurone relevant (Craven et al., 2004). Außerdem inhibiert es die Proliferation neuronaler Progenitoren des Rückenmarks *in vivo* und neuroepithelialer Progenitoren *in vitro* (El Wakil et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit war Gata2 sowohl in den jungen als auch in den reifen hippokampalen Kulturen bereits nach zwei Stunden TGF- β -Behandlung hochreguliert. Während in den jungen Kulturen das Expressionslevel nach fortgesetzter TGF- β -Behandlung wieder stark abfiel und sogar deutlich unterhalb des Kontrollniveaus blieb, zeigten die reifen Kulturen eine anhaltend erhöhte Expression. Die Induktion von Gata2 könnte also in Einklang mit den beschriebenen Funktionen ein Faktor sein, der die differenzierungsfördernde Wirkung auf die Progenitoren in den hippokampalen Kulturen ausübt. Deshalb wurden die Konsequenzen eines shRNA vermittelten Verlustes von Gata2 auf den TGF- β induzierten neurogenen Effekt in den hippokampalen Kulturen im Weiteren noch näher untersucht. Die TGF- β vermittelte Steigerung der Neuronenzahl fand jedoch auch nach dem Ausschalten der Gata2-Expression statt, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen gesteigerter Neurogenese und induzierter Gata2-Expression nicht bestätigt werden konnte.

Die Familienmitglieder der Id-Proteine sind strukturverwandt mit *basic helix loop helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen ebenso eine HLH-Domäne, es fehlt ihnen jedoch die basische DNA-Bindungsdomäne. Über die HLH-Domäne können sie an andere bHLH-Proteine wie z.B. E2-2 und E47 binden, die darauf hin nicht mehr die DNA kontaktieren können. Somit stellen die Id-Proteine Inhibitoren für die bHLH vermittelte Transkription dar (Benezra et al., 1990). In Säugern existieren vier Mitglieder der Id-Familie (Id1 bis Id4). Im Nervensystem ist für die Id-Proteine vor allem eine inhibierende Wirkung auf die Differenzierung von Neuronen beschrieben worden (Lyden et al., 1999; Tzeng et al., 2003), da sie die Funktion von neurogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren hemmen. Id-Proteine werden in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und im Zuge des neuronalen Differenzierungsprogramms findet eine Reduzierung der Id-Expression statt, die nötig ist, um die inhibierende Wirkung der Id-Proteine auf die proneuralen Gene aufzuheben (Jögi et al., 2002). In epithelialen Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β die Expression von Id2 und Id3 unterdrücken kann und dass diese Repression für den wachstumshemmenden und differenzierungsfördernden Effekt von TGF- β auf diese Zellen verantwortlich ist (Kowanetz et al., 2004).

Eine TGF- β -abhängige Reduzierung der Id3-Expression konnte auch in den in dieser Arbeit verwendeten Hippokampuskulturen beobachtet werden, die in jungen Kulturen nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung auftrat. Reife Kulturen zeigten dagegen keine Expressionsänderungen von Id3 mehr, was darauf hindeutet, dass hier vor allem Progenitoren und/oder junge postmitotische Zellen von der Id3-Reduktion betroffen sind. Der beobachtete proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Effekt von TGF- β auf die Progenitoren in hippokampalen und kortikalen Kulturen könnte also unter anderem durch die Repression von Id3 und der damit verbundenen Aufhebung der Inhibierung proneuraler Gentranskription vermittelt werden. Um die Notwendigkeit der Id3-Repression im Rahmen der TGF- β induzierten Neurogenese zu belegen, könnte man die Auswirkungen einer Id3-Überexpression untersuchen.

Nedd9 ist ein zytoplasmatisches Gerüstprotein des β 1-Integrin Signalweges und ist besonders an den fokalen Adhäsionsstellen lokalisiert (O'Neill et al., 2000).

Nedd9 ist ursprünglich im embryonalen Gehirn als Gen identifiziert worden, dessen Expression mit fortschreitender Entwicklung herabreguliert wird (Kumar et al., 1992). Dabei ist die Expression von Nedd9 hauptsächlich auf Progenitoren beschränkt und die Verminderung der Expression findet statt, wenn die Zellen in die neuronale Differenzierung eintreten (Aquino et al., 2008). Im adulten Gehirn ist dann die Nedd9 Expression normalerweise nicht mehr zu detektieren, wird aber nach cerebraler Ischämie in Neuronen reaktiviert und hat dort vermutlich eine Funktion bei der Differenzierung neuer Neurone

(Sasaki et al., 2005). Hinweise auf eine Funktion von Nedd9 bei der Entwicklung von Neuronen stammen auch aus *in vitro* Experimenten, wo Nedd9 das Neuritenwachstum in PC12 Zellen fördern kann (Sasaki et al., 2005). Darüber hinaus sind Mutationen im *Nedd9*-Gen mit einem verstärkten Auftreten der Alzheimerschen und Parkinsonschen Erkrankung in Verbindung gebracht worden (Chapuis et al., 2008).

In den hippokampalen Kulturen war Nedd9 nach TGF- β -Stimulation sowohl in den jungen, als auch in den reifen Kulturen kurz- und langfristig hochreguliert. Auch für dieses Gen wurde die Beteiligung am Prozess der TGF- β induzierten Neurogenese durch shRNA vermitteltem *Knock-down* der Genexpression näher untersucht. Die Reduktion der Nedd9-Expression führte zu einem Verlust des neurogenen Potentials von TGF- β . Die möglichen Funktionen von Nedd9 im Rahmen der TGF- β induzierten Neurogenese werden in Kapitel 4.5 eingehender diskutiert.

4.1.3 TGF- β reguliert die Expression von Molekülen, die ihrerseits auf Signalwege von Mitgliedern der TGF- β -Familie einwirken

Einige der regulierten Gene, nämlich *Smad7*, *Follistatin-like-3* (*Fstl3*) und der *Insulin-like growth factor receptor 2* (*Igf2r*), können die Signalwege von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie selbst beeinflussen.

Smad7 ist ein inhibitorisches Smad-Protein für den TGF- β /Aktivin/BMP-Signalweg. Es interagiert mit dem aktivierten Typ I Rezeptor, wodurch eine Bindung und Phosphorylierung von *Smad2* bzw. *Smad3* verhindert wird (Nakao et al., 1997 ; Hayashi et al., 1997). Daneben interagiert *Smad7* auch mit den E3-Ubiquitinligasen *Smurf1* bzw. *Smurf2*, die eine Degradation der TGF- β -Rezeptoren bewirken (Ebisawa et al., 2001). Eine schnelle Induktion der *Smad7*-Expression durch Mitglieder der TGF- β -Familie wird in vielen Zellsystemen beobachtet und scheint im Sinne einer negativen Rückkopplungs-Reaktion zu funktionieren (Nakao et al., 1997; Afrakhte et al., 1998; Ishisaki et al., 1999). Konform mit diesem in der Literatur beschriebenen Antwortverhalten war *Smad7* in den jungen und reifen hippokampalen Kulturen bereits nach zweistündiger Stimulation langanhaltend hochreguliert.

Fstl3 ist ein sekretiertes Glykoprotein und weist eine starke Homologie zu Follistatin auf (Hayette et al., 1998). Ebenso wie Follistatin kann es an Aktivin und BMP2, 6, und 7 binden (Tsuchida et al., 2000; Tortoriello et al., 2001) und dadurch deren Aktivität inhibieren. Eine Induktion von *Fstl3* durch TGF- β wurde bereits in verschiedenen Zellsystemen, beschrieben und ist abhängig von Smad-Proteinen (Bartholin et al., 2001; Maguer-Satta et al., 2001; Maguer-Satta und Rimokh, 2004). *In vivo* wurde bisher eine Beteiligung von *Fstl3* an der

Entwicklung der Gonaden (Xia et al., 2004) und der Plazenta (Ciarmela et al., 2003) und bei der Regulation der Hämatopoese (Maguer-Satta und Rimokh, 2004) nachgewiesen.

Eine Studie von Zhang et al. (2003) demonstriert, dass Fstl3 vermehrt nach Verletzungen des Gehirns in reaktiven Astrozyten exprimiert wird. Die Autoren zeigten auch, dass TGF- β die Expression und Sekretion von Fstl3 in kultivierten Astrozyten, aber nicht in kultivierten Neuronen induziert. Die Bedeutung von Fstl3 im Zusammenhang mit Verletzungen des ZNS ist bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine transiente Induktion von Fstl3 in den reifen hippokampalen Kulturen und in den Astrozytenangereicherten Kulturen, was auch hier für die überwiegende Regulation in Astrozyten sprechen würde. Über die Expressionssteigerung und Sekretion von Fstl3 könnte die astrozytäre TGF- β -Signalaktivität Einfluss auf Aktivin- und/oder BMP-Signalkaskaden in den umgebenden Zellen nehmen.

Igf2r kann durch die Bindung an den latenten TGF- β -Komplex zur Aktivierung von latent gebundenem TGF- β beitragen (Dennis et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Repression der Igf2r Expression ausschließlich in den reifen hippokampalen Kulturen nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung beobachtet. Möglicherweise besteht die Funktion ebenfalls in einer Art negativen Rückkopplung, so dass eine vermehrte Freisetzung von latent gebundenem TGF- β verhindert wird.

Die Regulationen von Smad7 und Igf2r legen also nahe, dass die TGF- β -Antwort in den hippokampalen Zellen schnell wieder unterbunden wird. Derartige Regulationsmechanismen existieren in vielen Systemen und ermöglichen eine Feinabstimmung der Signalaktivität in Bezug auf ihre Dauer und/oder Intensität und eine zeitliche Koordination von Zellantworten. Der in dieser Arbeit beobachtete neurogene Effekt von TGF- β war unabhängig davon, ob der TGF- β -Stimulus über die gesamte sechstägige Zeitspanne der Kultivierung oder nur innerhalb der ersten 24 Stunden anwesend war. Eine längere TGF- β -Stimulation führte also weder zu einer Steigerung des Effektes, noch schien es, durch eventuelle verstärkte negative Gegenregulation, den Effekt zu mindern. Das externe TGF- β -Signal liefert den Anstoß für den Ablauf einer Signalkaskade und intrazelluläre Regulationsmechanismen sorgen dafür, diesen Ablauf zu koordinieren und auszubalancieren.

4.1.4 TGF- β reguliert die Expression von Molekülen involviert in Notch-und Wnt-Signalwege

Eine weitere Gruppe innerhalb der identifizierten TGF- β -Zielgene stellen Gene dar, die bei der Übertragung von Notch- und Wnt-Signalen mitwirken können. Notch- und Wnt-Signale sind ihrerseits wieder an Prozessen der Proliferation und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen maßgeblich beteiligt (s. Kapitel 1.2.3).

Zu denen im initialen Screen in dieser Arbeit identifizierten Zielgenen gehören der *Transducin like enhancer of split 3* (Tle3), *Dishevelled homolog 1 und 3* (Dvl1, 3), *Hairy and enhancer of split 1* (Hes1) und *Deltex 1* (Dtx1).

Die Familie der Tle-Proteine sind als Säuger-Homologe der Groucho-Proteine in Drosophila beschrieben worden (Stifani et al., 1992) und fungieren als transkriptionelle Co-Repressoren in einer Vielzahl von Entwicklungs- und anderen zellulären Prozessen. Sie besitzen selbst keine DNA-Bindungsdomänen und entfalten ihre Wirkung daher durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. So reprimieren sie z.B. im Zusammenspiel mit Tcf/Lef-Faktoren die Transkription von Wnt-Zielgenen (Brannon et al., 1997; Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998). Der repressive Effekt dieses Komplexes wird durch die Interaktion mit Histondeacetylasen vermittelt, die dazu führen, dass das Chromatin in kompaktem Zustand vorliegt und somit keine transkriptionelle Aktivierung stattfinden kann (Chen et al., 1999).

Eine Studie der Expression von Tle-Proteinen in Mäuseembryonen zeigte, dass ihre Expression im sich entwickelnden Nervensystem mit der Neurogenese korreliert (Dehni et al., 1995). So konnten sie sowohl in Stammzellen der ventrikulären und subventrikulären Zone, als auch in Progenitoren und jungen postmitotischen Neuronen in der kortikalen Platte nachgewiesen werden, was auf eine Rolle bei der terminalen Differenzierung und der Aufrechterhaltung des differenzierten Status hindeuten könnte. Diese differenzierungsfördernde Eigenschaft könnte auch in den Progenitoren der in dieser Arbeit untersuchten hippokampalen Kulturen im Vordergrund stehen, denn Tle3 war in den jungen hippokampalen, nicht jedoch in den reifen Kulturen nach zweistündiger TGF- β -Behandlung induziert.

Dishevelled ist ein zytoplasmatisches Protein und an der Regulation von Wnt- und Notch-Signalwegen beteiligt. Im Notch-Signalweg wirkt es als Repressor während es als positiver Regulator in kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen auftritt (Klingensmith et al., 1994; Noordermeer et al., 1994; Siegfried et al., 1994; Axelrod et al., 1996; Boutros und Mlodzik, 1999). In der Maus wurden drei *Dishevelled*-Gene, *Dvl1*, *Dvl2* und *Dvl3*, identifiziert. Dvl1 und 3 sind ubiquitär während der Embryonalentwicklung exprimiert, besonders stark

jedoch im Nervensystem (Sussman et al., 1994; Tsang et al., 1996). Im adulten ZNS ist Dvl1 vor allem in Neuronen des Cortex, Hippokampus, Pons und in Körnerzellen des Cerebellums zu finden (Sussman et al., 1994). *Dvl1*-defiziente Mäuse weisen neurologische Defizite und Verhaltensanomalien auf, was auf eine Beteiligung von Dvl1 in neuronalen Funktionen hindeutet (Lijam et al., 1997). In der Rolle als wichtiger Bestandteil des Wnt-Signalweges wurde Dvl1 im Zusammenhang mit der Entwicklung von Dendriten (Rosso et al., 2005) und der Entwicklung von Synapsen (Ahmad-Annur, 2006) genannt.

Eine Interaktion des TGF- β -Signalweges mit Dvl wurde durch die Fähigkeit von Smad3, an alle drei Dvl-Isoformen zu binden, beschrieben (Warner et al., 2005).

In den hippokampalen Zellen waren Dvl1 und Dvl3 ausschließlich in reifen Kulturen nach 24-stündiger TGF- β herabreguliert. Aufgrund der verschiedenen Funktionen der Dvls sowohl im Rahmen des Notch- als auch des Wnt-Signalweges wären weitere Untersuchungen, wie Überexpressions- bzw. *Knock-down*-Experimente nötig, um die Bedeutung dieser Regulation in den hippokampalen Zellen zu klären.

Hes1 gehört zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren und wirkt über die Bindung an spezifische Bereiche der DNA als transkriptioneller Repressor (Sasai et al., 1992; Takebayashi et al., 1994). Die Expression von Hes1 wird durch Notch-Signale reguliert, und Hes1 vermittelt einen großen Teil der Funktionen von Notch.

Auf die Bedeutung des Notch-Signalweges und die Funktion von Hes1 wird im Folgenden noch näher eingegangen.

Deltex ist in *Drosophila* als positiver Regulator des Notch-Signalweges beschrieben worden (Busseau et al., 1994; Diederich et al., 1994; Matsuno et al., 1995). In Vertebraten existieren drei Homologe (Dtx1, Dtx2, Dtx3) (Kishi et al., 2001). Auch für diese Vertebratenhomologe konnte gezeigt werden, dass sie an Notch binden und somit die Notch-Signaltransduktion modulieren können (Kishi et al., 2001). Dabei kann Deltex Notch-Signale scheinbar abhängig von Bindungspartnern positiv oder negativ beeinflussen (Kishi et al., 2001; Matsuno et al., 1998; Ordentlich et al., 1998; Deftos et al., 2000; Izon et al., 2002; Sestan et al., 1999). Im Nervensystem wurde eine Beteiligung von Deltex bei der Differenzierung von Oligodendrozyten beschrieben (Cui et al., 2004). Auch Dtx1 war ebenso wie Dvl1 und 3 in den reifen hippokampalen Kulturen nach 24-stündiger TGF- β -Behandlung herabreguliert.

Eine Wechselwirkung von TGF- β mit Wnt- und Notch-Signalwegen wird in neuerer Zeit mehrfach diskutiert. So wurde ein Zusammenhang zwischen der TGF- β induzierten Epithelial-Mesenchym-Transition und Aktivierung des Notch-Liganden Jagged-1 durch TGF- β beschrieben (Zavadil et al., 2004). Blokzijl et al. (2003) zeigten in der myogenen Zelllinie

C2C12, dass TGF- β die Expression des Notch-Mediators Hes1 stimuliert, was offenbar durch direkte Wechselwirkung der intrazellulären Domäne von Notch mit Smad3 geschieht. Des Weiteren fanden Niimi et al. (2007), dass Notch-Signale notwendig für die TGF- β vermittelte zytostatische Funktion in Epithelzellen sind und eine Inhibition des Notch-Signalwegs zu einer Änderung des durch TGF- β regulierten Genprofils führt. Auch eine Interaktion zwischen TGF- β - und Wnt-Signalwegen konnte bereits auf verschiedenen Ebenen demonstriert werden. In *Xenopus* interagieren Wnt und TGF- β bei der Formation des Spemann Organisators (Nishita et al., 2000). Für den negativen Regulator des Wnt-Signalweges Axin konnte gezeigt werden, dass dieser die T β RI abhängige Smad-Phosphorylierung verstärkt (Furuhashi et al.; 2001). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Falk et al (2008) weisen darauf hin, dass TGF- β und Wnt-Signale die Proliferation und Differenzierung von neuroepithelialen Stammzellen im Mittelhirn steuern, denn ein *Knock-out* des T β RII in diesen Zellen führte zu ektopischer Expression von Wnt1 und einer Aktivierung von Wnt-Zielgenen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher mit Hilfe auf Real-Time PCR basierender *Arrays* nach weiteren TGF- β -Zielgenen innerhalb der Notch- und Wnt-Signalwege gesucht. Diese *Arrays* umfassten jeweils 84 Gene und konnten initial für das Zielgen-*Screening* eines Zeitpunktes herangezogen werden. Da angenommen wurde, dass die Funktionen der Wnt- und Notch-Signale eher die neuronalen Zellen betreffen würden, die sich noch in der Entwicklung befinden, wurden junge Kulturen an DIV4 verwendet, die für 24 Stunden mit TGF- β behandelt worden waren. Anschließend wurden die durch diesen *Array* gewonnenen Daten mittels Real-Time PCR auch für die zweistündige TGF- β -Behandlung validiert, jedoch konnten auf diese Weise Regulationen, die möglicherweise nur kurzfristig auftraten, nicht erfasst werden.

Unter den Wnt-Signalweg-assoziierten Genen wurde eine Expressionssteigerung der Transkriptionsfaktoren Lef1 (*Lymphoid enhancer binding factor 1*) und Pitx2 (*Paired-like homeodomain transcription factor 2*) beobachtet.

Lef1 ist an der Signalübertragung des kanonischen Wnt-Signalweges maßgeblich beteiligt. In Abwesenheit eines Wnt-Signals reprimiert ein Komplex aus Tcf/Lef-Faktoren zusammen mit Tle-Proteinen die Transkription von Wnt-Zielgenen (Brannon et al., 1997; Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998). Die Wnt vermittelte Akkumulation von β -Catenin führt im Kern zur Interaktion mit Tcf/Lef-Proteinen und somit zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Dabei verdrängt β -Catenin nach gegenwärtigen Modellvorstellungen Tle von den Tcf/Lef-Faktoren und wandelt den Repressorkomplex in einen Aktivator-Komplex um (Daniels und Weis, 2005). Da es in den hippokampalen Kulturen, wie zuvor beschrieben, ebenso zu einer Induktion von Tle3 kam, könnte das darauf hindeuten, dass in diesen Zellen ein repressiver Effekt auf den Wnt-Signalweg vorliegt. Untersuchungen in *Xenopus* zeigten aber auch, dass TGF- β die Aktivierung von Lef1-

Zielgenen unabhängig von Wnt-Signalen oder aber synergistisch mit diesen bewirken kann (Labbé et al., 2000).

Pitx2 kann die Expression von Lef1 steigern und zwar speziell der Lef1-Isoformen, die eine Bindungsdomäne für β -Catenin besitzen (Amen et al., 2007). Pitx2 ist in Nestin-positiven neuronalen Progenitoren exprimiert und es wurde ihm eine Beteiligung an der Differenzierung bestimmter Subtypen von Neuronen im Diencephalon und Mesencephalon zugeschrieben (Martin et al., 2002).

Innerhalb der verschiedenen Mitglieder der Wnt-Familie kam es zu unterschiedlichen Regulationen. Während Wnt2, Wnt3a, Wnt5b, und Wnt10a eine erhöhte Expression aufwiesen, war die Expression von Wnt8a, Wnt11 und Wnt16 nach TGF- β -Behandlung reduziert. Allerdings konnten diese Regulationen aufgrund der Problematik, spezifische Real-Time PCR geeignete Primer zu finden, nicht zufrieden stellend verifiziert werden. Daher sollte ein Nachweise der Regulation der Wnt-Familienmitglieder auf Proteinebene erfolgen, um die Daten abzusichern. Um die Frage zu klären, ob es unter TGF- β -Behandlung zu einer verstärkten Aktivierung oder Deaktivierung des Wnt-Signalweges kommt, könnte auch die Auswirkung auf die Aktivierung von Wnt-Reporterkonstrukten untersucht werden. Dass die unterschiedlichen Wnt-Familienmitglieder differentielle Funktionen auf die Entwicklung von Neuronen ausüben können, ist bereits bekannt. Während der Entwicklung dopaminerger Neurone des Mittelhirns fördert Wnt3a die Proliferation von Nurr1-positiven Progenitoren, vermindert aber die Anzahl dopaminerger Neurone. Wnt1 verstärkt sowohl die Proliferation von Nurr1-positiven Progenitoren als auch deren Differenzierung zu dopaminergen Neuronen. Wnt5a wirkt in diesem Kontext nur schwach mitogen, hat aber eine fördernde Wirkung auf die Erlangung des dopaminergen Phänotyps von Nurr1-positiven Progenitoren (Castelo-Branco et al., 2003). In einer als *cortical hem* bezeichneten Struktur des embryonalen Cortex, die sich zwischen dem sich entwickelnden Hippokampus und dem telencephalen Plexus choroideus befindet, wurde eine zeitlich und räumlich differenzierte Expression von Wnt2b, Wnt3a, Wnt5a, Wnt7b, and Wnt8b beobachtet (Grove et al., 1998). In postmitotischen Neuronen existieren Hinweise darauf, dass TGF- β und Wnts gemeinsam die Entwicklung und Funktion von Synapsen beeinflussen können (Packard et al., 2003; Salinas, 2003). Durch die unterschiedliche Regulation von Wnt-Proteinen sowie positiven (Lef1) und negativen (Tle3) Mediatoren des Wnt-Signalweges, könnte TGF- β auch im Vorderhirn eine feine Abstimmung von Entwicklungsprozessen in Progenitoren bewirken. Dabei könnte die Induktion bzw. Repression bestimmter Wnt-Signalfaktoren durch TGF- β unterschiedliche Typen bzw. Entwicklungsstadien von Progenitoren betreffen. In den hier verwendeten hippokampalen Kulturen liegen die Progenitoren in einem ihrem Entwicklungsprozess betreffenden gemischten Zustand vor, so dass eine genaue zeitliche, bzw. zellspezifische Auflösung der Genregulationen nicht getroffen werden kann.

Im Notch-Signalweg fiel in den jungen hippocampalen Kulturen vor allem eine Induktion der Notch-Rezeptoren Notch2 und Notch3 und des Transkriptionsfaktors *Runt related transcription factor 1* (Runx1) auf, die bereits nach zweistündiger TGF- β -Behandlung vorhanden war und persistierte. Notch2 und Runx1 waren ebenso in den reifen hippocampalen Kulturen induziert.

Runx1 ist als Regulator für die Differenzierung und das Überleben von motorischen und sensorischen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems beschrieben worden (Theriault et al., 2004). Darüber hinaus wird eine Funktion von Runx1 beim Übergang von Proliferation zu Differenzierung cortikaler Progenitoren angenommen (Theriault et al., 2005). Aufgrund dieser bekannten Funktionen von Runx1 wurden die Konsequenzen des shRNA vermittelten *Knock-downs* der Runx1-Expression auf den TGF- β induzierten neurogenen Effekt in hippocampalen Kulturen überprüft. Der Verlust von Runx1 interferierte jedoch nicht mit der Neurogenese nach TGF- β -Behandlung, sodass Runx1 scheinbar keinen notwendigen Faktor in diesem Prozess darstellt.

Die Funktionen von Notch-Signalen im Nervensystem werden in erster Linie mit der Inhibierung der Differenzierung von Neuronen und der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status von Stammzellen während der proliferativen Phasen der ZNS-Entwicklung in Verbindung gebracht (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mizutani und Saito, 2005). In neuerer Zeit wurde jedoch deutlich, dass Notch-Signale komplexere Funktionen bei der neuralen Entwicklung haben, indem sie die Transformation von neuroepithelialen Progenitoren zu radialen Gliazellen unterstützen (Anthony et al., 2005; Gaiano et al., 2000). Im adulten Gehirn und in adulten Stammzellen und Progenitoren des Hippokampus fördern Notch-Signale die Generierung von Astrozyten (Gaiano et al., 2000; Tanigaki et al., 2001). Ein wichtiger Mediator von Notch-Signalen sind die schon zuvor angesprochenen Hes-Proteine. Hes1 wird in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert und inhibiert dort die neuronale Differenzierung und fördert die Aufrechterhaltung von radialen Gliazellen (Ishibashi et al., 1994). Als Hes1-Zielgen ist z.B. der proneurale bHLH-Transkriptionsfaktor Mash1 zu nennen. Hes1 inhibiert die Transkription von Mash1, in dem es direkt an den Mash1-Promotor bindet (Chen et al., 1997). In *Hes1/Hes5* Doppel-*Knock-out* Mäusen kommt es zu verfrühter Neurogenese (Ohtsuka et al., 1999). Hes1 kommt also eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung und der zeitlichen Koordination dieser Prozesse zu. In den jungen hippocampalen Kulturen, nicht jedoch in den reifen Kulturen, war die Hes1-Expression nach TGF- β -Behandlung hochreguliert. Im Kontrast zu den bekannten Funktionen von Hes1 kam es jedoch weder zu einer Inhibierung der neuronalen Differenzierung noch zu einer vermehrten Gliogenese.

Um die Auswirkungen der Notch-Signalaktivität im Hinblick auf den TGF- β vermittelten neurogenen Effekt zu untersuchen, wurden hippocampale Kulturen mit dem Notch-Inhibitor DAPT behandelt. Dieser inhibiert die Aktivität der Presenilin- γ -Sekretase (Dovey et al., 2001) und verhindert in der Konsequenz die Aktivierung von Notch-Signalen (Sastre et al., 2001; Geling et al., 2002). Die Inhibierung des Notch-Signalweges durch DAPT wirkte sich jedoch nicht auf die Differenzierung von Neuronen in den Kulturen aus. Nach der Behandlung mit DAPT allein blieb der Anteil an Neuronen in der Kultur im Bereich des Kontrollwertes. Auch störte die DAPT-Behandlung den neurogenen Effekt von TGF- β nicht. Allerdings zeigten die mit DAPT behandelten Kulturen eine starke Reduktion des Anteils proliferativer Zellen und diese Reduktion war noch deutlich stärker als die durch TGF- β -Stimulation hervorgerufene Reduktion der Proliferation. Dies zeigt, dass die Aktivität des Notch-Signalweges auch in den hier verwendeten hippocampalen Kulturen notwendig ist, um eine Proliferation der Progenitoren aufrecht zu erhalten. Möglicherweise verhindert die Notch-Aktivität ein vollständiges Arretieren des Zellzyklus aller Progenitoren und vermittelt somit eine Balance zwischen Proliferation und Zellzyklusaustritt, denn nach kombinierter Gabe von TGF- β und DAPT sank der Anteil an proliferativen Zellen nochmals signifikant im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit DAPT bzw. TGF- β und nur noch etwa 1% der gesamten Zellen war proliferativ aktiv. Interessanterweise war aber dieser durch die Inhibition des Notch-Signalweges hervorgerufene Arretierung des Zellzyklus allein nicht ausreichend, um eine Differenzierung der Progenitoren zu Neuronen auszulösen.

Die Inhibierung der Presenilin- γ -Sekretase verursacht eine relativ unspezifische Deaktivierung des Notch-Signalweges. Die TGF- β -Behandlung führte jedoch zu einer selektiven Regulation der Notch-Rezeptoren Notch2 und Notch3. Um die Bedeutung dieser speziellen Kombination an Notch-Rezeptoren im Hinblick auf TGF- β -abhängige Funktionen genauer zu untersuchen, müssten Experimente mit einer gezielten Ausschaltung dieser Notch-Isoformen durchgeführt werden.

Unabhängig von ihrer Wirkung auf Progenitoren können Notch-Signale aber auch Effekte in postmitotischen Neuronen entfalten. Erste Hinweise darauf entstammen der Beobachtung, dass, im Gegensatz zu Vorläuferzellen, in denen Notch-Immunreaktionen überwiegend im Zytoplasma zu finden sind, postmitotische cortikale Neurone eine Akkumulation von Notch im Zellkern aufweisen (Sestan et al., 1999; Redmond et al., 2000). Diese Beobachtung führte zu der Spekulation, dass Notch-Signale eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des differenzierten Status von Neuronen besitzen könnten. Dabei berichten mehrere Autoren von einem Effekt von Notch-Signalen auf die Morphologie von Dendriten in postmitotischen Neuronen. In kultivierten cortikalen Neuronen der Ratte führt eine Überexpression von Notch1 zu einer Verkürzung der Neuriten und zu einer komplexeren Verzweigung der

Dendritenbäume (Redmond et al., 2000). Die Behandlung von kortikalen und hippocampalen Kulturen mit Notch-Antagonisten dagegen führt zu einer Verlängerung der Neuriten mit geringerer Verzweigung (Sestan et al., 1999; Berezovska et al., 1999). Diese Erscheinung konnte auch *in vivo* bestätigt werden, da die Überexpression von Notch1 in frühen postnatalen Mäusen eine erhöhte Komplexität des Dendritenbaums verursacht, der Verlust von Notch1 dagegen vermindert die Anzahl der Verzweigungen der Dendriten (Breunig et al., 2007).

Aus diesen Gründen ist auch denkbar, dass die Notch-Aktivierung in den hippocampalen Kulturen sich auf ebensolche Entwicklungsprozesse der postmitotischen Neurone auswirkt. Daher könnte weiterhin überprüft werden, ob die TGF- β -Behandlung die Kernlokalisierung der Notch-Proteine oder die Morphologie der Dendriten in den hippocampalen und kortikalen Kulturen verändert.

4.2 Zuordnung der TGF- β vermittelten Genregulationen zu den verschiedenen Zelltypen innerhalb der hippocampalen Kulturen

Da es sich bei den verwendeten hippocampalen Kulturen um Mischkulturen handelt, die neben reifen Neuronen auch Astrozyten sowie neurale Vorläuferzellen enthält, sollte durch weitergehende Experimente versucht werden, die Expressionsänderungen der Zielgene, den verschiedenen Zelltypen zuzuordnen. Dabei wurden folgende Kriterien zur Bewertung herangezogen:

1. Das Alter der Zellen in Kultur: Junge hippocampale Kulturen nach viertägiger Kultivierung enthalten noch einen größeren Anteil an Progenitoren sowie junge Neurone und nur wenige Astrozyten. Die Regulation in diesen Zellen stammt also vermutlich überwiegend von Vorläufern und jungen Neuronen. Reife hippocampale Kulturen nach zwölftägiger Kultivierung bestehen dagegen überwiegend aus postmitotischen, ausdifferenzierten Neuronen, aber auch der Anteil an reifen Astrozyten ist gegenüber den jungen Kulturen deutlich höher. Der Anteil an Progenitoren ist geringer. Die Regulation in diesen DIV12 Kulturen ist daher eher auf reife Neurone und/oder Astrozyten zurückzuführen.
2. Die Regulation in Astrozyten-angereicherten Kulturen: Diese Kulturen beinhalten sowohl Astrozyten als auch Nestin-positive Vorläuferzellen, jedoch keine Neurone. Daher kann die Regulation in diesen Kulturen nur in Progenitoren oder Astrozyten stattfinden.
3. Die Regulation nach Cre-loxP-vermitteltem *Knock-down* des T β RII: Durch die Neuronenspezifität des T β RII-Verlustes in diesem Experiment entstammt die residual vorhandene Regulation der Zielgene mit großer Wahrscheinlichkeit von den nicht

vom *Knock-down* des T β RII betroffenen Astrozyten oder Progenitoren. Da dieses Experiment an reifen Kulturen an DIV12 durchgeführt wurde, überwiegt eher der Anteil an Astrozyten im Vergleich zu den Progenitoren.

Die Tabelle 8 listet die in den oben genannten Experimenten erlangten Resultate auf und gibt eine abschließende Bewertung, in welchem Zelltyp die Regulation des jeweiligen Gens vermutlich überwiegend stattfindet.

Anhand der oben genannten Kriterien scheint die Regulation von Ctgf, Timp3 und TnC überwiegend von Astrozyten zu stammen. Im Hinblick auf Ctgf und TnC finden sich unterstützende Angaben in der Literatur. So wurde die wahrscheinlich TGF- β induzierte Expressionssteigerung von Ctgf nach Verletzungen des ZNS auch zu einem großen Teil in reaktiven Astrozyten lokalisiert (Schwab et al., 2001, Hertel et al., 2000), findet aber auch in Neuronen statt (Hertel et al., 2000). Ebenso wurde für TenascinC eine TGF- β -abhängige Hochregulation in Astrozyten nach Verletzungen des ZNS beschrieben (Smith und Hale, 1997). Für Dvl1 und Dtx1 ist die Situation nicht ganz eindeutig. Die Regulation nach Ausschaltung des T β RII in Neuronen an DIV12 würde auf eine Regulation in Astrozyten hindeuten, dagegen spricht jedoch, dass in den Astrozyten-angereicherten Kulturen keine Regulation stattfand. Möglich wäre auch, dass die Regulation in Neuronen vorkommt, aber unabhängig vom TGF- β - Rezeptor Typ II ist.

Id3 und Tle3 sind vornehmlich in Progenitoren reguliert, während Igf2r insbesondere in Neuronen reguliert zu sein scheint. Im Fall von Gata2, Hes1, Itga3, Itga5 und Nedd9 findet die Regulation offenbar in Progenitoren und (jungen) Neuronen statt, Fstl3 dagegen könnte in Astrozyten und Neuronen reguliert sein. In der Literatur existieren bisher Hinweise auf eine TGF- β -abhängige Regulation von Fstl3 in Astrozyten *in vitro* und in reaktiven Astrozyten nach Verletzungen des ZNS *in vivo* (Zhang et al., 2003). Die Regulation von Smad7 scheint alle drei Zelltypen zu betreffen.

Tabelle 8: Zuordnung der TGF- β -Zielgenregulation zu Neuronen, Astrozyten und Progenitoren in den hippokampalen Kulturen

Gen	Regulation an DIV4	Regulation an DIV12	Regulation in Astrozyten-angereicherten Kulturen	Regulation nach Cre-loxP-vermitteltem Knock-down des T β RII	Bewertung
Ctgf	gering	stark	Ja	Ja	Astrozyten (Neurone)
Dtx1	Nein	Ja	Nein	Ja	Neurone (Astrozyten)
Dvl1	Nein	Ja	Nein	Ja	Neurone (Astrozyten)
Fstl3	Nein	Ja	Ja	Nein	Astrozyten/Neurone
Gata2	Ja	Ja	Ja	Nein	Progenitoren/Neurone
Hes1	Ja	Nein	Nein	N. untersucht	Progenitoren/Neurone
Id3	Ja	Nein	Ja	Nein	Progenitoren
Igf2r	Nein	Ja	Nein	N. untersucht	Neurone
Itga3	Ja	Ja	Nein	Nein	Progenitoren/Neurone
Itga5	Ja	Ja	Ja	Nein	Progenitoren/Neurone
Nedc9	Ja	Ja	Nein	Nein	Progenitoren/Neurone
Smad7	Ja	Ja	Ja	Ja	Astrozyten/Neurone/ Progenitoren
Timp3	Nein	Ja	Ja	Ja	Astrozyten
Tle3	Ja	Nein	Ja	N. untersucht	Progenitoren
TnC	Nein	Ja	Ja	Ja	Astrozyten

Während dieser Arbeit wurden noch weitere Versuche unternommen, speziell die Regulation in postmitotischen Neuronen nachweisen zu können. Dazu wurden hippokampale Kulturen aus Mäuseembryonen angelegt, die GFP in Tau-positiven Neuronen exprimieren. Dies wurde durch die Verpaarung eines Mausstamms, in dem die Aktivierung des *GFP*-Gens von loxP-flankierten Stopp-Sequenzen reguliert ist (Schindehütte et al., 2005), mit einem anderen Mausstamm erreicht, bei dem die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Tau-Promotors steht (Korets-Smith et al., 2004). Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und in Neuronen lokalisiert (Binder et al., 1985). Bei einigen aus dieser Verpaarung hervorgehenden Nachkommen führt die Expression der Cre-Rekombinase in den Tau-positiven Neuronen zum Ausschneiden der loxP-flankierten Stopp-Sequenzen und somit zur Aktivierung der GFP-Expression. Diese Kulturen wurden wie gewohnt für vier bzw. zwölf Tage kultiviert und mit TGF- β stimuliert. Anschließend wurde mittels FACS

versucht, die Neurone anhand ihrer GFP-Expression zu selektieren und deren RNA zu isolieren. Leider erwies sich die GFP-Expression als zu schwach, um eine deutlich abgrenzbare Sortierung der Zellen zu ermöglichen.

4.3 Smad-Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulationen

TGF- β kann die Genexpression über Smad-abhängige und Smad-unabhängige Mechanismen beeinflussen. Durch den shRNA vermittelten *Knock-down* des Co-Smads Smad4, was zu einem Verlust der Signaltransduktion über Smad-Proteine führt, wurden diejenigen Gene identifiziert, deren Regulation durch TGF- β über Smad-abhängige Signaltransduktionsmechanismen verläuft.

Dazu gehörten die meisten der untersuchten Gene, nämlich *Ctgf*, *Dvl1*, *Dvl3*, *Fstl3*, *Gata2*, *Itga3*, *Nedd9*, *Notch2*, *Timp3* und *TnC*. Die Induktion von *Itga5*, *Smad7* und *Runx1* scheint dagegen unabhängig von der Aktivität von Smad-Proteinen zu sein.

Diese Ergebnisse lassen sich auch durch Literaturhinweise unterstützen. Eine Abhängigkeit der TGF- β induzierten *Ctgf*-Expressionsteigerung von der Smad-Aktivierung wurde bereits in Fibroblasten beschrieben (Holmes et al., 2001). Hier führte eine Überexpression von *Smad3* und *Smad4*, nicht jedoch von *Smad2* und *Smad4*, zu einer Induktion von *Ctgf*. Die Überexpression des inhibitorischen *Smad7* und der Smad-Antagonisten *Ski* und *SnoN* unterdrückten dagegen die TGF- β vermittelte *Ctgf*-Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Osteoblasten erzielt, wo der siRNA vermittelte Verlust von *Smad3* und *Smad4*, aber nicht von *Smad2*, zu einem Ausbleiben der *Ctgf*-Induktion nach TGF- β -Stimulation führte (Arnott et al., 2008).

Hinweise auf eine Abhängigkeit der *TenascinC*-Induktion von Smad-Proteinen wurden in dermalen Fibroblasten gefunden. Dort wurde die Existenz eines Smad-bindenden Elementes auf dem *TnC*-Promotor beschrieben, welches im Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren *Sp1*, *Ets1* und *CBP/p300* für die TGF- β induzierte *TnC*-Expression notwendig war (Jinnin et al., 2004).

Die Promotorregion von *Fstl3* enthält ebenfalls ein Smad-bindendes Element und das Ausschalten der *Smad3* und *Smad4* Funktion führte in humanen Hepatoma-Zellen zu einem Verlust der TGF- β -abhängigen Induktion von *Fstl3* (Bartholin et al., 2001).

In einer Studie an Fibroblasten mit einer genetischen Deletion von *Smad2* oder *Smad3* wurde festgestellt, dass die TGF- β -abhängige Expressionssteigerung von *Nedd9* in diesen Zellen die Aktivität von *Smad3*, aber nicht von *Smad2* voraussetzt (Yang et al., 2003).

Für die Smad-Unabhängigkeit der Regulationen von *Itga5* und *Runx1* existieren ebenso bestätigende Befunde anderer Arbeitsgruppen. In Osteoblasten wurde für die TGF- β -

abhängige Stimulation der Itga5-Expression ein Smad-unabhängiger Mechanismus identifiziert, der die Beteiligung von intrazellulären Ca^{2+} -Signalen erfordert (Nesti et al., 2002).

Studien an C2C12-Zellen belegen, dass die TGF- β -abhängige Induktion von Mitgliedern der Runx-Familie auch über Smad-unabhängige Mechanismen verlaufen kann. Hier wurde zusätzlich zu einem Smad-JunB-abhängigen Mechanismus eine Beteiligung des durch TGF- β aktivierbaren p38-MAP-Kinase-Signalweges an der Induktion von Runx2 nachgewiesen (Lee et al., 2002).

Für die Induktion von Smad7 durch TGF- β sind in der Literatur jedoch überwiegend Smad-abhängige Mechanismen beschrieben worden. Brodin et al. (2000) identifizierten ein Smad-bindendes Element auf der Promotor-Region des *Smad7*-Gens und berichteten, dass die Anwesenheit von Smad-Proteinen und der Co-Aktivatoren AP-1 und Sp1 notwendig für die TGF- β vermittelte Smad7-Expression in der Maus-Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 sind. Eine Studie von Gersdorff et al. (1999) kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier führte die Deletion von Smad3 und Smad4 in embryonalen Fibroblasten der Maus zu einem Verlust der Smad7-Induktion nach TGF- β -Stimulation, während das Fehlen von Smad2 keine Auswirkungen hatte. In den hier verwendeten hippocampalen Kulturen war die Induktion der Smad7-Expression nach Transduktion der Smad4 shRNA zwar leicht reduziert gegenüber den Kontrollzellen, jedoch betrug der Änderungsfaktor noch immer mehr als 2,0. Möglicherweise sind residuale Mengen an Smad4 ausreichend, um noch eine Induktion der Smad7-Expression zu erzielen. Allerdings kann auch die Möglichkeit der Smad-unabhängigen Smad7-Induktion nicht ausgeschlossen werden, die möglicherweise zusätzlich zu der Smad-abhängigen wirkt.

4.4 TGF- β beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Morphologie neuraler Progenitoren

Aus früheren Studien war bekannt, dass TGF- β die Entwicklung des cerebralen Cortex beeinflussen kann. *TGF- β 1-Knock-out* Mäuse weisen einen dünneren cerebralen Cortex auf (Brionne et al., 2003). Obwohl die Autoren dieser Studie eine vermehrte Apoptose von TGF- β (-/-) Neuronen festgestellt haben, geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise darauf, dass auch ein Defekt während der Neurogenese zu dem Verlust von Neuronen führen könnte. Siegenthaler und Miller (2005) zeigten in organotypischen Hirnschnittkulturen des Cortex von E17,5 Ratten, dass TGF- β den Austritt aus dem Zellzyklus von Progenitoren der kortikalen Ventrikularzone fördert und dass dies mit einer Beeinflussung von Zellzyklusregulatoren verbunden ist. Als Schlüsselmolekül wurde hier p21Cip1

herausgestellt, dessen Expression nach TGF- β -Behandlung anstieg. Frühere Studien an *Foxg1-Knock-out* Mäusen berichteten ebenfalls von einem Zusammenhang zwischen der TGF- β -Signalaktivität und der p21Cip1 Expression. Der Vorderhirn-spezifische Transkriptionsfaktor Foxg1 wirkt als Gegenspieler der TGF- β -Aktivität (Dou et al., 2000; Rodriguez et al., 2001). In *Foxg1*-defizienten Mäusen kommt es, vermutlich durch eine ungehemmte TGF- β -Aktivität, zu einer verstärkten Expression von p21 und einem damit verbundenen verfrühten Austritt aus dem Zellzyklus von Progenitoren der Ventrikularzone (Seoane et al., 2004).

Auch in den in dieser Arbeit verwendeten hippokampalen Kulturen konnte eine Regulation von Zellzyklus-assoziierten Genen durch TGF- β beobachtet werden. In jungen hippokampalen Kulturen kam es nach TGF- β -Behandlung zu einer transienten Expressionssteigerung der Zellzyklusinhibitoren p21Cip1 und p57Kip1 und gleichzeitig zu einer Reduktion der Cycline D1 und D2, die für eine Progression des Zellzyklus wichtig sind. Wie in Kapitel 1.1.8 beschrieben, bewirkt die vermehrte Expression dieser Zellzyklusinhibitoren durch Interaktionen mit CDKs eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Massague et al., 2000; Reynisdottir et al., 1995).

Der Austritt der neuronalen Progenitoren aus dem Zellzyklus, ist zwar eine notwendige Voraussetzung auf dem Weg zur Generierung von Neuronen, aber allein noch nicht ausreichend. Die Überexpression von p21Cip1 und p57Kip1 im Cortex von E14,5 Mäuseembryonen durch *in utero* Elektroporation belegt zwar den antiproliferativen Effekt von p21Cip1 auf cortikale Progenitoren, führt jedoch nicht zu vermehrter neuronaler Differenzierung (Nguyen et al., 2006). Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese muss daher noch durch andere Signale reguliert werden.

In dieser Arbeit konnten Hinweise gefunden werden, dass TGF- β seine Auswirkungen auf die Progenitoren nicht nur durch ein einfaches Arretieren des Zellzyklus entfaltet und sie daraufhin differenzieren, sondern sie vielmehr in einen Status versetzt, in dem sie neurogene Zellteilungen durchlaufen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse des Experimentes zur Bestimmung des Zellzyklusaustritts der Progenitoren unterstützt. In diesem Experiment waren die Kulturen zunächst für 24 Stunden mit TGF- β behandelt worden und danach erfolgte für weitere 24 Stunden zusätzlich die Applikation von BrdU. Während dieser Zeitspanne war der Anteil der BrdU inkorporierenden Progenitoren in den TGF- β behandelten und unbehandelten Kulturen noch gleich. Wie aus dem Experiment des kumulativen BrdU-Markierens hervorging, benötigte das vollständige Markieren aller proliferativen Progenitoren mit BrdU etwa 17 Stunden. Das bedeutet, dass die Proliferation noch bis etwa 40 Stunden nach Beginn der TGF- β -Behandlung unverändert gegenüber der Kontrolle war. Erst 48 Stunden nach der Behandlung mit TGF- β konnte der Austritt der Progenitoren aus dem Zellzyklus durch die Reduzierung der Ki67/BrdU- doppelt-positiven

Zellen beobachtet werden. Diese Zeitspanne umfasst die Dauer von ein bis zwei Zellzyklen, dessen Länge in den cortikalen Kulturen durch kumulative BrdU-Markierung auf etwa 18 Stunden bestimmt wurde. Während dieser Zeit durchlaufen die Progenitoren vermutlich neurogene Zellteilungen und treten dann nach Verlassen des Zellzyklus in die neuronale Differenzierung ein. Die Bestimmung der *quitting fraction* zeigte, dass nach TGF- β -Behandlung mehr als die Hälfte der zuvor proliferativen Progenitoren aus dem Zellzyklus austrat, nämlich in den hippokampalen Kulturen 56% und in den cortikalen Kulturen 68%. Das lässt zusätzlich die Schlussfolgerung zu, dass es sich, vor allem in den cortikalen Kulturen, auch um symmetrisch-neurogene Zellteilungen handelt, da der Pool an proliferativen Progenitoren stark abnimmt.

Dass sich TGF- β neben der Vermittlung des Zellzyklusarrests weitreichender auf die Progenitoren auswirkt, kann durch die Beobachtung untermauert werden, dass eine TGF- β -Behandlung zu morphologischen Veränderungen in Nestin-positiven Progenitoren führt. Große, flach ausgebreitete Nestin-positive Vorläuferzellen wandeln sich innerhalb der ersten 48 Stunden der TGF- β -Behandlung zu schmalen Zellen mit oft bidirektionalen, dünnen Fortsätzen um. Diese Zellen sind, ebenso wie die flachen Zellen der unbehandelten Kulturen, noch stark proliferativ aktiv, was ein weiteres Indiz für die Hypothese ist, dass der durch die TGF- β -Behandlung eingeleitete Prozess der Neurogenese mit weiteren neurogenen Teilungen der Progenitoren verbunden ist. Diese schmalen Zellen in den TGF- β behandelten Kulturen zeigen auch im Gegensatz zu den flach ausgebreiteten Zellen der Kontrollgruppen häufiger eine Co-Lokalisation mit PSA-NCAM, einem Marker der von neuronal spezifizierten Progenitoren exprimiert wird, oder auch zu einem geringeren Anteil mit GFAP, einem Marker von glialen Zellen bzw. Progenitoren des Typs der Radialglia. Diese Zellen scheinen daher einen anderen, möglicherweise weiter in der Differenzierung fortgeschrittenen, Vorläuferzelltyp darzustellen. Dies könnte dann der Zelltyp sein, der durch eine letzte (symmetrisch)-neurogene Zellteilung zu der erhöhten Produktion von Neuronen beiträgt.

72 Stunden nach Beginn der TGF- β -Behandlung wurde die Steigerung der Neuronenzahl in den TGF- β behandelten Kulturen evident, betrug zu diesem Zeitpunkt aber noch weniger als 12%. Nach weiteren 72 Stunden konnte schließlich eine Steigerung der Neuronenzahl um 34% beobachtet werden. Dieser Zeitverlauf war unabhängig davon, ob TGF- β während des gesamten Zeitraums oder nur in einer initialen Phase von 24 Stunden anwesend war. Der anfängliche, 24-stündige TGF- β -Puls war ausreichend, um den Prozess der Neurogenese auszulösen. Das spricht dafür, dass TGF- β über die Regulation von stromabwärts gelegenen Zielgenen Signalkaskaden aktiviert, die zu der beschriebenen Umwandlung der Progenitoren und zur Vollendung der neuronalen Differenzierung führt.

Hinweise, um welche Faktoren es sich dabei handeln könnte, lieferten die Resultate der Suche nach möglichen TGF- β -Zielgenen. Neben den bereits erwähnten Zellzyklusregulatoren wurden weitere durch TGF- β regulierte Zielgene identifiziert, die bekanntermaßen eine Funktion bei der Generierung und Differenzierung von Neuronen besitzen. Diese Zielgene wurden bereits im vorangegangenen Kapitel eingehend besprochen. Aufgrund der bekannten Funktionen wurden Ctgf, Gata2, Runx1 und Nedd9 für eine nähere Betrachtung hinsichtlich ihrer Beteiligung an der TGF- β induzierten Neurogenese ausgewählt. Während für Ctgf, Gata2 und Runx1 keine direkte Beteiligung an diesem Prozess nachgewiesen werden konnte, führte die siRNA vermittelte Reduktion von Nedd9 zu einem Verlust des neurogenen Potentials des TGF- β -Signalweges.

4.5 Die Bedeutung von Nedd9 während des Prozesses der TGF- β induzierten Neurogenese

Nedd9 (auch bekannt als Hef1 und CasL) ist ein Mitglied der Familie der Cas-Adapterproteine, zu der ebenso p130Cas und Efs/Sin gehören. Diese Proteine sind aus verschiedenen Protein-Interaktionsdomänen aufgebaut, die Wechselwirkungen mit zahlreichen Partnermolekülen ermöglichen. Eine SH3-Domäne vermittelt Interaktionen mit Proteinen, die ein Poly-Prolin-Motiv aufweisen und ist auch am Kontakt mit der *focal adhesion kinase* (FAK) beteiligt. Die so genannte Substrat-Domäne besteht aus Tyrosin-haltigen Motiven und stellt eine Bindungsstelle für Proteine mit SH2-Domänen dar (Singh et al., 2007). Die Carboxy-terminale Domäne besitzt ein HLH-Motiv und vermittelt die Homodimerisation von Nedd9 und Heterodimerisation mit bestimmten HLH-Proteinen (Law et al., 1999). Studien haben gezeigt, dass Nedd9 an fokalen Adhäsionsstellen lokalisiert und an der Übertragung von Integrin-Signalen beteiligt ist (O'Neill et al., 2000; O'Neill und Golemis, 2001). Fokale Adhäsionspunkte sind Integrin-basierte Kontaktpunkte des Aktinzytoskeletts mit der ECM. Über fokale Adhäsionspunkte können zahlreiche Funktionen vermittelt werden, denn neben der reinen Anheftung von Zellen an die ECM agieren die fokalen Adhäsionspunkte als Signalzentren und übertragen Informationen von der Peripherie auf die Effektormoleküle im Inneren der Zelle. Dabei sind eine Vielzahl an Adapter- und Signalproteinen innerhalb der fokalen Adhäsionskomplexe beteiligt und Nedd9 stellt ein solches Protein dar. Aufgrund der sehr komplexen Funktionen der fokalen Adhäsionspunkte sind auch die Bedeutungen von Nedd9 vielfältig und kontextabhängig. Bisher wurden verschiedene Klassen von biologischen Prozessen beschrieben, bei denen Nedd9 eine wichtige Rolle spielt. Diese beinhalten Zellanheftung, Migration und morphologische Veränderungen von Zellen (Fashena et al., 2002; Natarajan et al., 2006; van Seventer et al.,

2001), Apoptose (Law et al., 2000; O'Neill und Golemis, 2001) und Regulation des Zellzyklus (Law et al., 1998, Pugacheva und Golemis, 2005; Dadke et al., 2006).

Diese scheinbar sehr unterschiedlichen Funktionen von Nedd9 haben doch grundlegende Gemeinsamkeiten. Sie erfordern die Integration von Informationen aus der extrazellulären Umgebung mit der Regulation von Adhäsionsdynamiken, die wiederum Morphologien der Zellen beeinflussen.

Während der Migration von Zellen müssen die Adhäsionspunkte schnell auf- und abgebaut werden, um die Kräfte für den Vorschub der Zelle zu entwickeln (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Bei apoptotischen Prozessen kommt es zu einem Verlust der Verbindungen des Zytoskeletts mit den Adhäsionspunkten, wodurch sich die Zellen abrunden. Beim Eintritt in die Mitose runden sich die Zellen ebenfalls ab und verringern die Adhäsion an die ECM. Am Ende der Mitose bauen sich die Anheftungspunkte wieder auf und tragen zu der Kraftentfaltung bei, die für das Fortschreiten der Zellteilung und das Eintreten in die G1-Phase nötig sind.

Neuere Studien zeigen, dass Nedd9 durch die Aktivität von Caspasen in ein 55 kDa- und ein 28 kDa-Fragment gespalten werden kann, welche für die unterschiedlichen Funktionen von Nedd9 verantwortlich sind (Law et al., 2000). Das Volllängen-Protein assoziiert mit den fokalen Adhäsionspunkten und wird nach der Aktivierung von Integrinen durch FAK und Kinasen der Src-Familie phosphoryliert (Law et al., 1996; Alexandropoulos und Baltimore, 1996). Diese Phosphorylierung aktiviert die SH2-Bindungsstellen und führt zur Rekrutierung des Adapterproteins Crk welches die Ras/Raf/JNK-Signalkaskade stimuliert (Übersicht bei O'Neil et al., 2000). Dieser Prozess ist hauptsächlich für die migrationsfördernde Funktion von Nedd9 bedeutsam (Natarajan et al., 2006; van Seventer et al., 2001; Ohashi et al., 1999).

Das 55 kDa-Fragment wird zu Beginn der Mitose-Phase generiert und assoziiert mit dem mitotischen Spindelapparat (Law et al., 1998). Diese Spaltung und Translokation von Nedd9 während der Mitose könnte eine Rolle spielen bei der Koordination von Zellkontakt-basierenden Signalen, erzeugt an fokalen Adhäsionsstellen, mit der Regulation von Zellzyklus-Vorgängen wie dem Übergang von Substrat-angehefteten Interphasezellen zu abgerundeten mitotischen Zellen (Law et al., 2000).

Das 28 kDa-Fragment wird häufig schnell der proteasomalen Degradation zugeführt, es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Anwesenheit des 28 kDa-Fragments ausreichend ist, um Apoptose auszulösen (Law et al., 2000).

Welche Funktionen von Nedd9 im Rahmen des TGF- β -Signalweges im Vordergrund stehen, ist bisher nicht bekannt. Einige Studien haben Wechselwirkungen von Nedd9 mit TGF- β -Signaleffektoren beschrieben. So kann Nedd9 durch die Interaktion mit den inhibitorischen

Smad-Proteinen Smad6 und Smad7 die TGF- β -Signalaktivität potenzieren (Inamoto et al., 2007). Liu et al. (2000) zeigten, dass die Aktivität von Smad3 zu einer proteasomalen Degradation von Nedd9 führen kann. Diese Degradation war allerdings direkt von einer Induktion des mRNA und Proteinlevels von Nedd9 gefolgt und das erhöhte Nedd9-Level führte wiederum zu einer Inhibition der TGF- β induzierten und durch Smad3 vermittelten Genexpression. Auf diese Weise könnte Nedd9 eine regulatorische Funktion der TGF- β -Signalaktivität zukommen.

Eine Induktion von Nedd9 durch TGF- β im Nervensystem ist bisher noch nicht beschrieben worden. Jedoch wurde in einer Studie von Sasaki et al. (2005) eine Expressionssteigerung von Nedd9 in Neuronen des cerebralen Cortex und Hippokampus von Ratten nach globaler Ischämie gefunden. Da auch TGF- β nach Ischämie im ZNS induziert ist (Flanders et al., 1998), könnte die Expressionssteigerung von Nedd9 nach einer solchen Verletzung eine Folge der erhöhten TGF- β -Sekretion sein.

Die genauen Funktionen von Nedd9 im Nervensystem sind noch weitgehend unklar, jedoch mehren sich die Hinweise, dass es für die korrekte Differenzierung von Neuronen bedeutsam sein könnte. Bei der Entdeckung von Nedd9 im ZNS wurde festgestellt, dass es während der frühen Entwicklung im Gehirn von Mäusen exprimiert ist und etwa ab dem Embryonaltag 10 herunterreguliert wird (Kumar et al., 1992). Der erste experimentelle Anhaltspunkt für eine Funktion von Nedd9 in der neuronalen Entwicklung kam von Untersuchungen von Merrill et al. (2004), die Nedd9 als Gen identifizierten, dass in der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y durch *all-trans*-Retinsäure (atRA), einem etablierten Regulator der Gehirnentwicklung, induziert ist. Die Autoren zeigten weiterhin, dass Nedd9 im sich entwickelnden Rhombencephalon von Rattenembryonen vor dem Beginn der Segmentierung sowie im proliferierenden Neuroepithel des Rückenmarks exprimiert ist. Die Behandlung der Rattenembryonen mit einem Überschuss an atRA führte zu veränderter Nedd9-Expression im Rhombencephalon und auch in Vitamin-A defizienten Embryonen war die Nedd9-Expression gestört. Aufgrund dieser hohen Sensibilität gegenüber Retinsäure vermuteten die Autoren eine Funktion von Nedd9 bei der Segmentierung und/oder Zellspezifizierung im Rhombencephalon. Basierend auf diesen Ergebnissen und der bekannten Fähigkeit von Nedd9, Zellmorphologien zu beeinflussen, könnte die Regulation von Nedd9 durch atRA auch die Grundlage für das durch atRA ausgelöste gesteigerte Neuritenwachstum in kultivierten Neuroblastoma-Zellen sein (Merrill et al., 2004).

Eine Studie von Bargon et al. (2005) zeigte ebenfalls, dass Nedd9 zur Bildung von Neuriten-ähnlichen Membranausstülpungen in kultivierten epithelialen Krebszellen führen kann und Sasaki et al. (2005) demonstrierten, dass die Überexpression von Nedd9 in PC12 Zellen das Auswachsen von Neuriten fördert.

Wie bereits erwähnt wurden in den in dieser Arbeit verwendeten primären hippocampalen Zellen gleichfalls morphologische Veränderungen an Nestin-positiven Progenitorzellen festgestellt, die durch TGF- β -Behandlung induziert und durch Behandlung mit dem TGF- β -Inhibitor SB431542 unterdrückt waren. Da es sich bei diesen morphologischen Veränderungen genauso um einen Übergang von flachen, eher polygonal geformten und überwiegend fortsatzlosen Zellen zu Zellen mit längeren, schmalen Ausläufern handelt, wurde untersucht, ob auch diese Veränderungen mit der Nedd9-Expression assoziiert sind. Dabei zeigte sich, dass die polygonalen Zellen der unbehandelten bzw. TGF- β -Inhibitor behandelten Kulturen kaum positiv für Nedd9 waren, während die nach TGF- β -Behandlung vermehrt in Erscheinung tretenden Ausläufer-tragenden Zellen eine erhöhte Immunresponsivität für Nedd9 aufwiesen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Nedd9 an dem TGF- β induzierten Umbau der Nestin-positiven Progenitoren beteiligt ist.

Nedd9 könnte den Übergang der Progenitoren in einen Status fördern, in dem sie kompetent werden, Neurone zu generieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass Nedd9 über seine Carboxy-Domäne mit bestimmten HLH-Transkriptionsfaktoren, insbesondere Id2, interagieren kann (Law et al. 1999). Proteine der Id-Familie inhibieren normalerweise die Differenzierung von Zellen durch transkriptionelle Regulation und die Bindung von Id2 an Nedd9 verhindert möglicherweise den Eintritt von Id2 in den Nukleus (Law et al., 1999). Eine Einflussnahme von TGF- β auf die Funktion von Id-Proteinen konnte in der vorliegenden Arbeit bereits durch die Reduzierung der mRNA-Expression von Id3 in den jungen hippocampalen Kulturen gefunden werden. Über die Regulation von Nedd9 könnte sich demnach eventuell ein zweiter TGF- β -abhängiger Mechanismus ergeben, der die Aktivität von Id-Proteinen beeinträchtigt.

Mit fortschreitender Entwicklung, wenn die Progenitoren von der Neurogenese zur Gliogenese übergehen, wird Nedd9 normalerweise herabreguliert. Die TGF- β -abhängige Induktion von Nedd9 in Progenitoren aus späteren Stadien der Entwicklung, wie den hier verwendeten Zellen aus E16,5 Embryonen, könnte deren Kompetenz bewahren, Neurogenese anstelle von Gliogenese einzugehen. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass die TGF- β induzierte Neurogenese nur in den corticalen Kulturen aus E16,5 Embryonen, nicht jedoch in denen aus E14,5 Embryonen in Erscheinung trat. Progenitoren zum Zeitpunkt E14,5 in der Entwicklung produzieren normalerweise fast ausschließlich Neurone (s. Kapitel 1.2) und die Nedd9 Expression in diesen Kulturen war insgesamt hoch. Die TGF- β -Behandlung dieser Kulturen steigerte weder zusätzlich die Nedd9-Expression, noch den Anteil an Neuronen. Am Zeitpunkt E16,5 der Cortexentwicklung ist die Neurogenese bereits reduziert und die Gliogenese setzt ein. Das Basis-Level der Nedd9-Expression in diesen Kulturen war insgesamt geringer und zeigte eine deutliche Steigerung nach TGF- β -Stimulation. Die Reaktivierung von Nedd9 durch TGF- β in späten corticalen

Progenitoren könnte somit für eine anhaltende bzw. wieder einsetzende Bevorzugung der neuronalen Differenzierung verantwortlich sein.

Um die Bedeutungen von Nedd9 im Hinblick auf die Neurogenese eingehender zu klären, sind noch weitere Experimente nötig. So sollte untersucht werden, ob die Überexpression von Nedd9 in den hippokampalen und cortikalen Kulturen aus E16,5 Embryonen allein zur einer vermehrten neuronalen Differenzierung führt, oder ob noch andere, durch die TGF- β -Signalaktivität hervorgerufene und Nedd9-unabhängige Mechanismen notwendig sind.

Um zu bestätigen, dass Nedd9 für die morphologischen Umbildungen der Nestin-positiven Progenitoren verantwortlich ist, sollte untersucht werden, ob und inwiefern das Fehlen von Nedd9 diese Umbauprozesse beeinflusst.

4.6 TGF- β beeinflusst nicht grundlegend die Spezifizierung cortikaler Subtypen

Unter den in dieser Arbeit angewendeten Kulturbedingungen konnte keine eindeutige Bevorzugung eines bestimmten Subtyps von cortikalen Neuronen festgestellt werden. Es wurde lediglich eine geringfügige Erhöhung des Anteils an Neuronen positiv für Foxp2, eines Markers für tiefere Schichten, und eine leicht reduzierte bzw. stagnierende Generierung von Neuronen, die den Marker oberer Schichten Satb2 exprimierten, gefunden.

Die Neurone der oberen Schichten werden in der Entwicklung später als die der unteren Schichten gebildet. Mit Hilfe von *Time-lapse* Mikroskopie konnte festgestellt werden, dass auch kultivierte, auf die neuronale Linie festgelegte cortikale Progenitoren die Neurone der verschiedenen Schichten in der gleichen Reihenfolge wie *in vivo* produzieren (Shen et al., 2006). Durch die Verfolgung individueller Klone zeigten die Autoren, dass die zuerst aus dem Zellzyklus austretenden Zellen zu Neuronen positiv für Marker tieferer Schichten differenzierten, während die später geborenen ein Schicksal der oberen Schichten annahmen.

Wie in dieser Arbeit beobachtet wurde, schien die Behandlung mit TGF- β in diesen Prozess nicht grundlegend einzugreifen und änderte die Zusammensetzung der Subtypen nicht maßgeblich. Aus einer geringen Anzahl von Progenitoren schienen jedoch eher Neurone der tieferen Schichten als solch der oberen Schichten hervorzugehen. Diese Beobachtung ist insofern eher unerwartet, da zum Zeitpunkt E16,5 die Progenitoren unter normalen Bedingungen nur noch Neurone der oberen Schichten hervorbringen und nicht mehr solche der tieferen Schichten. In der Studie von Shen et al. wurde jedoch auch gezeigt, dass ein *Knock-down* von Foxg1, der wie bereits erwähnt ein Inhibitor des TGF- β -Signalweges darstellt, zu einer Zurücksetzung dieser Zeitsteuerung führt und späten cortikalen Progenitoren erlaubt, dass Schicksal von frühen Progenitoren anzunehmen. Einen

ebensolchen Effekt könnte die exogene Stimulation mit TGF- β , zumindest auf einen Teil der Progenitoren, in den kortikalen Kulturen ausüben.

4.7 Zusammenfassende Darstellung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten Hinweise liefern, dass TGF- β Entwicklungsprozesse des embryonalen Vorderhirns beeinflussen kann. Konkret wurde eine Hemmung der Proliferation und eine vermehrte neuronale Differenzierung nach neurogenen Zellteilungen von kultivierten Progenitoren des embryonalen Vorderhirns beobachtet.

Die Identität einiger der in dieser Arbeit identifizierten TGF- β -Zielgene unterstützen diese Beobachtung. In Abbildung 33 sind diese Zielgenregulationen, zugeordnet zu den Zelltypen in denen sie vermutlich überwiegend stattfinden, und ihre mögliche Funktionen schematisch dargestellt. So kam es in den Progenitoren zu einer Regulation von Zellzykluskontrollgenen wie p21, p57 und CyclinD1/2, die zum Zellzyklusarrest der Progenitoren beitragen. Darüber hinaus waren in den Progenitoren und/oder jungen Neuronen Gene induziert, die bekanntermaßen differenzierungsfördernd wirken können. Dazu gehörten Nedd9, Gata2, Tle3 und Runx1 sowie die Reduzierung des inhibitorisch auf die Differenzierung wirkenden Faktors Id3.

Für Nedd9 konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der TGF- β -abhängigen Expressionssteigerung dieses Gens und der Induktion der Neurogenese gefunden werden, da der shRNA vermittelte Verlust der Nedd9-Expression die vermehrte Differenzierung von Neuronen durch TGF- β verhinderte. Ein zweiter Hinweis ergab sich daraus, dass Nedd9 nicht in kortikalen Kulturen aus E14,5 Embryonen durch TGF- β induzierbar war und diese Kulturen auf TGF- β auch nicht mit einer vermehrten neuronalen Differenzierung reagierten, wie es in den Kulturen von E16,5 Embryonen der Fall war. In adulten Mäusen wurde dagegen ebenfalls eine Induktion von Nedd9 nach Verletzungen des Gehirns beschrieben, die mit der vermehrten Generierung neuer Neurone korrelierte (Sasaki et al., 2005). Nedd9 könnte also ein Zell-intrinsischer Faktor sein, der das unterschiedliche Antwortverhalten von Progenitoren des Stadiums E14,5 gegenüber späteren Stadien erklärt.

Ein positiver Effekt von TGF- β auf die Differenzierung von Neuronen ist auch bei der Entwicklung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns beschrieben worden (Roussa et al., 2006). Hier führte die Behandlung von kultivierten Progenitoren des ventralen und dorsalen Mittelhirns aus E12,5 Mäuseembryonen mit TGF- β zur Generierung von dopaminergen Neuronen. In Einklang damit war die Entwicklung dopaminerger Neurone in *TGF- β 2/TGF- β 3* Doppelmutanten an E14,5 gestört (Roussa et al., 2006). Welche molekularen Mechanismen zu diesem Effekt führen, konnte allerdings noch nicht gezeigt

werden. Daher wäre ein zukünftiges Ziel, zu überprüfen, ob Nedd9 auch in diesem Kontext eine Rolle spielt.

Aufgrund der Tatsache, dass TGF- β nicht nur die Genexpression der Progenitoren, sondern auch die der Astrozyten und Neurone beeinflussen kann, deuten sich, neben der in dieser Arbeit beobachteten differenzierungsfördernden Wirkung auf Progenitoren zu Neuronen, noch weitere Funktionen von TGF- β an (Abbildung 33). Über die Regulation der ECM-Moleküle, insbesondere der Integrine, TenascinC und auch des Fokal-Adhäsionsproteins Nedd9, könnte TGF- β migrationsfördernde Eigenschaften ausüben, wofür bereits Hinweise aus Experimenten in kortikalen Schnittkulturen existieren (Siegenthaler und Miller, 2004). Auch Auswirkungen auf die Entwicklung postmitotischer Neurone, wie z.B. die Beeinflussung von Dendritenwachstum oder Synapsenbildung durch Notch- und Wnt-Signale und Deltex1 wären denkbar. Diese möglichen Funktionen müssten in weiteren Studien überprüft werden.

In den verschiedenen Zelltypen des Vorderhirns, wie Progenitoren, Neuronen und Astrozyten scheinen die intrazellulären Signalkaskaden von TGF- β zu differieren, da unterschiedliche Gene reguliert werden und somit unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden. Dabei spielen Zell-intrinsische Faktoren eine Rolle, wie die Zusammensetzung bestimmter transkriptioneller Co-Faktoren, aber auch die Intergration zahlreicher anderer Signale, die von außen auf die Zelle einwirken. Da Progenitoren, Astrozyten und Neurone mit einem unterschiedlichen Repertoire an Rezeptoren und internen Mediatoren für solche Signale ausgestattet sind, die sich auch in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Zelle noch ändern können, kann es zu Zelltyp- und Entwicklungsstadien-spezifischen Interaktionen der verschiedenen Signalwege kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *Cross-talk* von TGF- β mit Notch- und Wnt-Signalwegen festgestellt. Durch die Fähigkeit von TGF- β , mit diesen in der Entwicklung sehr bedeutsamen Signalwegen zu interagieren, ergibt sich ein erheblich vergrößertes Potential von genau aufeinander abgestimmten Antworten der Zelle in ihren jeweiligen temporalen und spatialen Kontext. Dabei schien TGF- β auch innerhalb dieser Signalwege sehr differentiell einzugreifen, da im Fall von Notch nur bestimmte Notch-Liganden (Notch2 und 3) induziert wurden und auch innerhalb der Familie der Wnt-Proteine kam es zu Induktionen oder Repressionen verschiedener Wnt-Familienmitglieder. Diese Regulationen könnten ebenso bei TGF- β vermittelten Entwicklungsprozessen von Progenitoren des Vorderhirns von Bedeutung sein bzw. postmitotische Entwicklungsprozesse betreffen. Die genaue Bedeutung konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Für eine mehr detaillierte Untersuchung der Bedeutung dieses *Cross-talks* wäre eine höhere zeitlich und räumliche Auflösung der verschiedenen Genexpressionen nötig, um sequentielle Wirkungen der entsprechenden Faktoren mit fortschreitender Entwicklung zu erfassen.

Durch die getroffene Vorauswahl der überprüften Zielgen-Kandidaten auf der Basis von *Microarray*-Studien in nicht-neuronalen Zellen, konnten in dieser Arbeit mit Sicherheit noch nicht alle durch TGF- β beeinflussten Gene erfasst werden. Im Hinblick auf den neurogenen Effekt von TGF- β wäre daher insbesondere die Expressionsanalyse der für die neuronale Entwicklung wichtigen proneuralen und neuronalen bHLH Faktoren interessant (s. Kapitel 1.2.2).

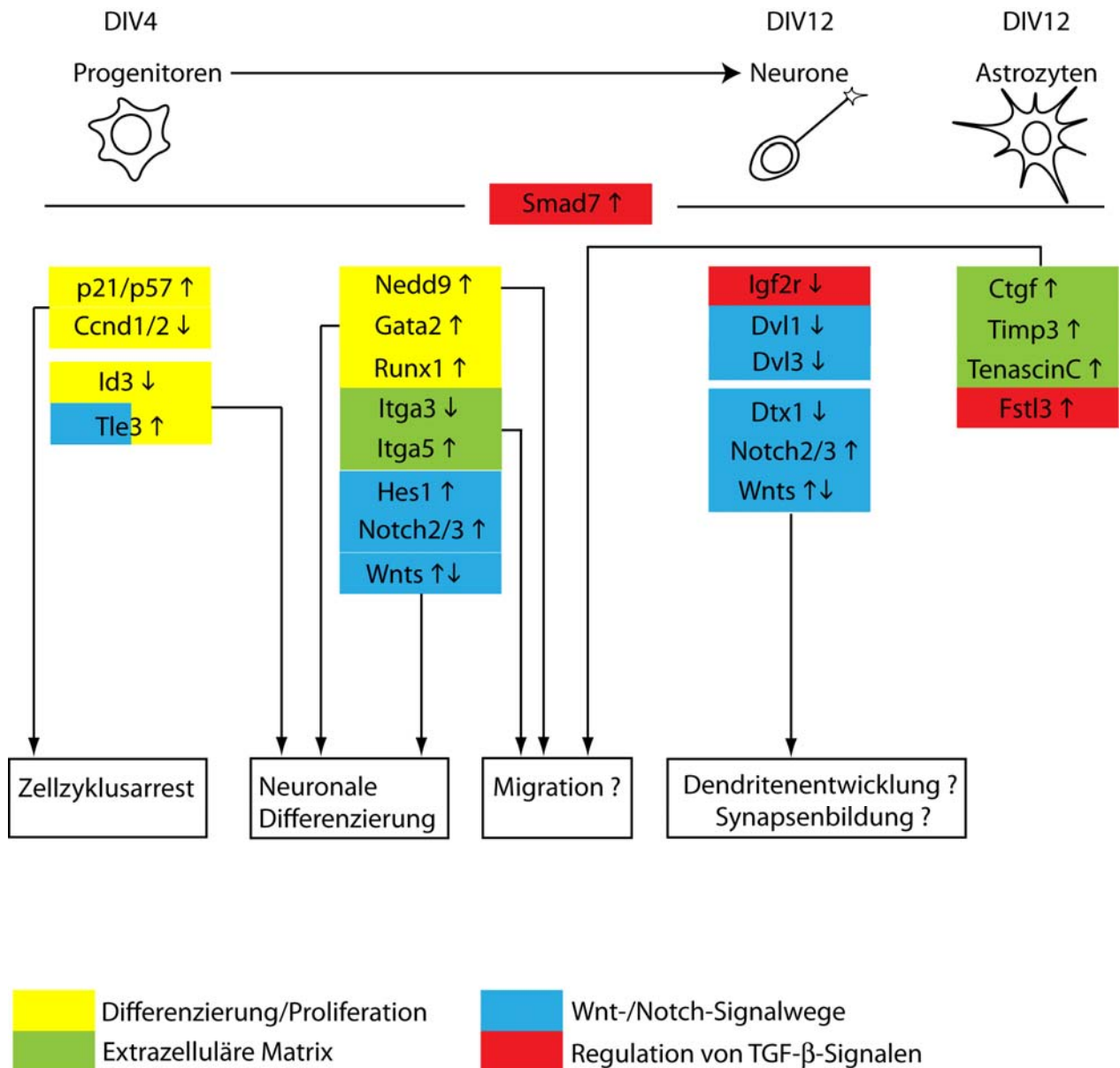


Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung der TGF- β -Zielgenregulationen in den verschiedenen Zelltypen der hippocampalen Kulturen und ihre möglichen Funktionen

Durch die Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p57 sowie die Reduktion der Cycline D1 und D2 bewirkt TGF- β einen Austritt der Progenitoren aus dem Zellzyklus. Die Regulationen weiterer Faktoren in Progenitoren und jungen Neuronen bzw. deren Übergangsstadien, welche bekanntermaßen in die neuronale Differenzierung

involviert sind wie Nedd9, Gata2, Runx1, Id3 und Tle3 unterstützen die beobachtete vermehrte Neurogenese in hippokampalen und kortikalen Kulturen nach TGF- β -Behandlung. Die Regulation von Molekülen der extrazellulären Matrix, die im Fall der Intergrine α 3 und α 5 vermutlich in Progenitoren und/oder Neuronen stattfindet und im Fall von Ctgf, Timp3 und TenascinC überwiegend in Astrozyten, sowie ebenfalls von Nedd9, könnten an Prozessen der Migration neuronaler Zellen beteiligt sein. Über die Beeinflussung von Notch- und Wnt-Signalen in Progenitoren und Neuronen könnte TGF- β einerseits ebenfalls in die Entwicklung von Progenitoren eingreifen, aber auch in postmitotischen Neuronen Prozesse wie Synapsenbildung oder Dendritenwachstum steuern. Daneben kam es zur Regulation von Faktoren, die TGF- β -Signale selbst wieder beeinflussen können, wie Smad7, Igf2r und Fstl3.

↑ Hochregulation des Gens; ↓ Herabregulation des Gens

5 Literaturverzeichnis

- Abe, M., Harpel, J. G., Metz, C. N., Nunes, I., Loskutoff, D. J. & Rifkin, D. B. (1994) An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal.Biochem.*, **216**, 276-284.
- Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B. & De Robertis, E. M. (2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat.Cell Biol.*, **4**, 599-604.
- Adams, J. C. & Watt, F. M. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, **117**, 1183-1198.
- Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermarck, B., Heldin, C. H., Heldin, N. E. & ten Dijke, P. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **249**, 505-511.
- Ahmad-Annuar, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N. B., Rosso, S. B., Hall, A., Brickley, S. & Salinas, P. C. (2006) Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J.Cell Biol.*, **174**, 127-139.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C. & Soriano, E. (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J.Neurosci.*, **18**, 7779-7799.
- Alexandropoulos, K. & Baltimore, D. (1996) Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes Dev.*, **10**, 1341-1355.
- Altman, J. & Das, G. D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J.Comp Neurol.*, **124**, 319-335.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J.Comp Neurol.*, **301**, 365-381.
- Amen, M., Liu, X., Vadlamudi, U., Elizondo, G., Diamond, E., Engelhardt, J. F. & Amendt, B. A. (2007) PITX2 and beta-catenin interactions regulate Lef-1 isoform expression. *Mol.Cell Biol.*, **27**, 7560-7573.
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G. & Heintz, N. (2005) Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev.*, **19**, 1028-1033.
- Aquino, J. B., Marmigere, F., Lallemand, F., Lundgren, T. K., Villar, M. J., Wegner, M. & Ernfors, P. (2008) Differential expression and dynamic changes of murine NEDD9 in progenitor cells of diverse tissues. *Gene Expr.Patterns.*, **8**, 217-226.
- Arnott, J. A., Zhang, X., Sanjay, A., Owen, T. A., Smock, S. L., Rehman, S., DeLong, W. G., Safadi, F. F. & Popoff, S. N. (2008) Molecular requirements for induction of CTGF expression by TGF-beta1 in primary osteoblasts. *Bone*, **42**, 871-885.
- Arora, K. & Warrior, R. (2001) A new Smurf in the village. *Dev.Cell*, **1**, 441-442.

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**, 770-776.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. & Sporn, M. B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J.Biol.Chem.*, **258**, 7155-7160.
- Ata, K. A., Lennmyr, F., Funa, K., Olsson, Y. & Terent, A. (1999) Expression of transforming growth factor-beta1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery. *Acta Neuropathol.*, **97**, 447-455.
- Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. & Perrimon, N. (1996) Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science*, **271**, 1826-1832.
- Babic, A. M., Chen, C. C. & Lau, L. F. (1999) Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 2958-2966.
- Backman, M., Machon, O., Mygland, L., van den Bout, C. J., Zhong, W., Taketo, M. M. & Krauss, S. (2005) Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev.Biol.*, **279**, 155-168.
- Baker, A. H., Edwards, D. R. & Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J.Cell Sci.*, **115**, 3719-3727.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J.Biol.Chem.*, **275**, 36803-36810.
- Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K. & Arteaga, C. L. (2002) p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J.Cell Sci.*, **115**, 3193-3206.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C. & Mandel, G. (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, **121**, 645-657.
- Bargon, S. D., Gunning, P. W. & O'Neill, G. M. (2005) The Cas family docking protein, HEF1, promotes the formation of neurite-like membrane extensions. *Biochim.Biophys.Acta*, **1746**, 143-154.
- Barnabe-Heider, F. & Miller, F. D. (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J.Neurosci.*, **23**, 5149-5160.
- Bartholin, L., Maguer-Satta, V., Hayette, S., Martel, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Corbo, L., Lamadon, C., Morera, A. M., Magaud, J. P. & Rimokh, R. (2001) FLRG, an activin-binding protein, is a new target of TGFbeta transcription activation through Smad proteins. *Oncogene*, **20**, 5409-5419.
- Bartsch, S., Bartsch, U., Dorries, U., Faissner, A., Weller, A., Ekblom, P. & Schachner, M. (1992) Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J.Neurosci.*, **12**, 736-749.

- Bartsch, U. (1996) The extracellular matrix molecule tenascin-C: expression in vivo and functional characterization in vitro. *Prog.Neurobiol.*, **49**, 145-168.
- Battista, D., Ferrari, C. C., Gage, F. H. & Pitossi, F. J. (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur.J.Neurosci.*, **23**, 83-93.
- Bayer, S. A. & Altman, J. (1991) *Neocortical development*. New York: Raven Press.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. & Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. & Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49-59.
- Berezovska, O., McLean, P., Knowles, R., Frosh, M., Lu, F. M., Lux, S. E. & Hyman, B. T. (1999) Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience*, **93**, 433-439.
- Bertrand, N., Castro, D. S. & Guillemot, F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat.Rev.Neurosci.*, **3**, 517-530.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L. & Moses, H. L. (2001) Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol.Biol.Cell*, **12**, 27-36.
- Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J.Cell Biol.*, **101**, 1371-1378.
- Bissell, M. J., Hall, H. G. & Parry, G. (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? *J.Theor.Biol.*, **99**, 31-68.
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C. & Webster, C. (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science*, **230**, 758-766.
- Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U. & Ibanez, C. F. (2003) Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J.Cell Biol.*, **163**, 723-728.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. & Greenberg, M. E. (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, **278**, 477-483.
- Borrell, V., Del Rio, J. A., Alcantara, S., Derer, M., Martinez, A., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Derer, P., Curran, T. & Soriano, E. (1999) Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J.Neurosci.*, **19**, 1345-1358.
- Bottner, M., Unsicker, K. & Suter-Crazzolara, C. (1996) Expression of TGF-beta type II receptor mRNA in the CNS. *Neuroreport*, **7**, 2903-2907.
- Bottner, M., Kriegstein, K. & Unsicker, K. (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J.Neurochem.*, **75**, 2227-2240.

- Bourdon, M. A. & Ruoslahti, E. (1989) Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. *J. Cell Biol.*, **108**, 1149-1155.
- Boutros, M. & Mlodzik, M. (1999) Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech. Dev.*, **83**, 27-37.
- Bradford, M. M. (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.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. & Kimelman, D. (1997) A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.*, **11**, 2359-2370.
- Breunig, J. J., Silbereis, J., Vaccarino, F. M., Sestan, N. & Rakic, P. (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 20558-20563.
- Brew, K., Dinakarandian, D. & Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 267-283.
- Brigstock, D. R., Goldschmeding, R., Katsube, K. I., Lam, S. C., Lau, L. F., Lyons, K., Naus, C., Perbal, B., Riser, B., Takigawa, M. & Yeger, H. (2003) Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol. Pathol.*, **56**, 127-128.
- Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E. & Wyss-Coray, T. (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, **40**, 1133-1145.
- Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C. H. & Heuchel, R. (2000) Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29023-29030.
- Brodkey, J. A., Laywell, E. D., O'Brien, T. F., Faissner, A., Stefansson, K., Dorries, H. U., Schachner, M. & Steindler, D. A. (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J. Neurosurg.*, **82**, 106-112.
- Brown, P. D., Wakefield, L. M., Levinson, A. D. & Sporn, M. B. (1990) Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors*, **3**, 35-43.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Brunner, A., Chinn, J., Neubauer, M. & Purchio, A. F. (1991) Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol.*, **10**, 293-300.
- Burrows, R. C., 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.
- Busseau, I., Diederich, R. J., Xu, T. & Artavanis-Tsakonas, S. (1994) A member of the Notch group of interacting loci, *deltex* encodes a cytoplasmic basic protein. *Genetics*, **136**, 585-596.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B. G. & Muhr, J. (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1162-1168.

- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C. & Huttner, W. B. (2005) Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J.Neurosci.*, **25**, 6533-6538.
- Campbell, K. & Gotz, M. (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.*, **25**, 235-238.
- Casarosa, S., Fode, C. & Guillemot, F. (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*, **126**, 525-534.
- Castelo-Branco, G., Wagner, J., Rodriguez, F. J., Kele, J., Sousa, K., Rawal, N., Pasolli, H. A., Fuchs, E., Kitajewski, J. & Arenas, E. (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 12747-12752.
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. & Bejsovec, A. (1998) Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, **395**, 604-608.
- Chapuis, J., Moisan, F., Mellick, G., Elbaz, A., Silburn, P., Pasquier, F., Hannequin, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P. & Lambert, J. C. (2008) Association study of the NEDD9 gene with the risk of developing Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum.Mol.Genet.*, **17**, 2863-2867.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. & Letarte, M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **267**, 19027-19030.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. & Courey, A. J. (1999) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev.*, **13**, 2218-2230.
- Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M. W., Feder, J. N., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. & Ball, D. W. (1997) Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94**, 5355-5360.
- Chen, X., Rubock, M. J. & Whitman, M. (1996) A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature*, **383**, 691-696.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G. & Whitman, M. (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*, **389**, 85-89.
- Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N. & Massague, J. (1998) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.*, **12**, 2144-2152.
- Chenn, A. & Walsh, C. A. (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb.Cortex*, **13**, 599-606.
- Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E. J., Pearson, C. A. & Sakakura, T. (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*, **47**, 131-139.

- Choy, L. & Derynck, R. (1998) The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J.Biol.Chem.*, **273**, 31455-31462.
- Chytil, A., Magnuson, M. A., Wright, C. V. & Moses, H. L. (2002) Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis.*, **32**, 73-75.
- Ciarmela, P., Florio, P., Toti, P., Franchini, A., Maguer-Satta, V., Ginanneschi, C., Ottaviani, E. & Petraglia, F. (2003) Human placenta and fetal membranes express follistatin-related gene mRNA and protein. *J.Endocrinol.Invest*, **26**, 641-645.
- Close, J. L., Gumuscu, B. & Reh, T. A. (2005) Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development*, **132**, 3015-3026.
- Constam, D. B., Philipp, J., Malipiero, U. V., ten Dijke, P., Schachner, M. & Fontana, A. (1992) Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J.Immunol.*, **148**, 1404-1410.
- Constam, D. B., Schmid, P., Aguzzi, A., Schachner, M. & Fontana, A. (1994) Transient production of TGF-beta 2 by postnatal cerebellar neurons and its effect on neuroblast proliferation. *Eur.J.Neurosci.*, **6**, 766-778.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H. G. & Aigner, L. (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.*, **21**, 1-14.
- Cowan, W. M., Stanfield, B. B. & Kishi, K. (1980) The development of the dentate gyrus. *Curr.Top.Dev.Biol.*, **15 Pt 1**, 103-157.
- Craven, S. E., Lim, K. C., Ye, W., Engel, J. D., de Sauvage, F. & Rosenthal, A. (2004) Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development*, **131**, 1165-1173.
- Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P. & Bouck, N. (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, **93**, 1159-1170.
- Crawford, T. Q. & Roelink, H. (2007) The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev.Dyn.*, **236**, 886-892.
- Cui, X. Y., Hu, Q. D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B. T., Nie, D. Y., Sun, L., Hu, W. P., Karsak, M., Duka, T., Takeda, Y., Ou, L. Y., Dawe, G. S., Yu, F. G., Ahmed, S., Jin, L. H., Schachner, M., Watanabe, K., Arsenijevic, Y. & Xiao, Z. C. (2004) NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J.Biol.Chem.*, **279**, 25858-25865.
- Dadke, D., Jarnik, M., Pugacheva, E. N., Singh, M. K. & Golemis, E. A. (2006) Deregulation of HEF1 impairs M-phase progression by disrupting the RhoA activation cycle. *Mol.Biol.Cell*, **17**, 1204-1217.
- Dammeier, J., Brauchle, M., Falk, W., Grotendorst, G. R. & Werner, S. (1998) Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **30**, 909-922.

- Daniels, D. L. & Weis, W. I. (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 364-371.
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. & Wang, X. F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5545-5549.
- De Groot, C. J., Montagne, L., Barten, A. D., Sminia, P. & Van, D., V (1999) Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**, 174-187.
- de Sampaio e Spohr TC, Martinez, R., da Silva, E. F., Neto, V. M. & Gomes, F. C. (2002) Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 2059-2069.
- Dedhar, S. & Hannigan, G. E. (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 657-669.
- Deftos, M. L., Huang, E., Ojala, E. W., Forbush, K. A. & Bevan, M. J. (2000) Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity.*, **13**, 73-84.
- Dehni, G., Liu, Y., Husain, J. & Stifani, S. (1995) TLE expression correlates with mouse embryonic segmentation, neurogenesis, and epithelial determination. *Mech. Dev.*, **53**, 369-381.
- Del Rio, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano, E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, **385**, 70-74.
- Dennis, P. A. & Rifkin, D. B. (1991) Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 580-584.
- Dennler, S., Goumans, M. J. & ten Dijke, P. (2002) Transforming growth factor beta signal transduction. *J. Leukoc. Biol.*, **71**, 731-740.
- Derynck, R., Lindquist, P. B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J. L., Rhee, L., Mason, A. J., Miller, D. A., Coffey, R. J. & . (1988) A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J.*, **7**, 3737-3743.
- Derynck, R. & Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- Diederich, R. J., Matsuno, K., Hing, H. & Artavanis-Tsakonas, S. (1994) Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. *Development*, **120**, 473-481.
- Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D. & Schachner, M. (1996) Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.*, **43**, 420-438.
- Dou, C., Lee, J., Liu, B., Liu, F., Massague, J., Xuan, S. & Lai, E. (2000) BF-1 interferes with transforming growth factor beta signaling by associating with Smad partners. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 6201-6211.

- Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint, A. P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D. & Audia, J. E. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J.Neurochem.*, **76**, 173-181.
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. & Leduc, R. (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J.Biol.Chem.*, **270**, 10618-10624.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. & Miyazono, K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 12477-12480.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H. & Aspenstrom, P. (2002) Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol.Biol.Cell*, **13**, 902-914.
- El Wakil, A., Francius, C., Wolff, A., Pleau-Varet, J. & Nardelli, J. (2006) The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors. *Development*, **133**, 2155-2165.
- Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. & Moses, H. L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J.Biol.Chem.*, **274**, 37413-37420.
- Faissner, A. & Kruse, J. (1990) J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron*, **5**, 627-637.
- Falk, S., Wurdak, H., Ittner, L. M., Ille, F., Sumara, G., Schmid, M. T., Draganova, K., Lang, K. S., Paratore, C., Leveen, P., Suter, U., Karlsson, S., Born, W., Ricci, R., Gotz, M. & Sommer, L. (2008) Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion. *Cell Stem Cell*, **2**, 472-483.
- Farkas, L. M., Dunker, N., Roussa, E., Unsicker, K. & Kriegstein, K. (2003) Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J.Neurosci.*, **23**, 5178-5186.
- Fashena, S. J., Einarson, M. B., O'Neill, G. M., Patriotis, C. & Golemis, E. A. (2002) Dissection of HEF1-dependent functions in motility and transcriptional regulation. *J.Cell Sci.*, **115**, 99-111.
- Feng, X. H. & Derynck, R. (1997) A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.*, **16**, 3912-3923.
- Flanders, K. C., Ludecke, G., Engels, S., Cissel, D. S., Roberts, A. B., Kondaiah, P., Lafyatis, R., Sporn, M. B. & Unsicker, K. (1991) Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development*, **113**, 183-191.
- Flanders, K. C., Ren, R. F. & Lippa, C. F. (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog.Neurobiol.*, **54**, 71-85.

- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J. & Guillemot, F. (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.*, **14**, 67-80.
- Frantz, G. D. & McConnell, S. K. (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*, **17**, 55-61.
- Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. & Grotendorst, G. R. (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest Dermatol.*, **107**, 404-411.
- Frazier, K. S. & Grotendorst, G. R. (1997) Expression of connective tissue growth factor mRNA in the fibrous stroma of mammary tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 153-161.
- Friedrichsen, S., Heuer, H., Christ, S., Winckler, M., Brauer, D., Bauer, K. & Raivich, G. (2003) CTGF expression during mouse embryonic development. *Cell Tissue Res.*, **312**, 175-188.
- Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. (2002) Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41361-41368.
- Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K. & Kato, M. (2001) Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 5132-5141.
- Gaiano, N., Nye, J. S. & Fishell, G. (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*, **26**, 395-404.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L. & Grosschedl, R. (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development*, **127**, 469-482.
- Galichet, C., Guillemot, F. & Parras, C. M. (2008) Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development*, **135**, 2031-2041.
- Galter, D., Bottner, M. & Unsicker, K. (1999) Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas. *J. Neurosci. Res.*, **56**, 531-538.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L. & Haass, C. (2002) A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.*, **3**, 688-694.
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G. M. & Hill, C. S. (2000) Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev.*, **14**, 435-451.
- Ghosh, A. & Greenberg, M. E. (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron*, **15**, 89-103.
- Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.
- Gillies, K. & Price, D. J. (1993) Cell migration and subplate loss in explant cultures of murine cerebral cortex. *Neuroreport*, **4**, 911-914.

- Gotz, B., Scholze, A., Clement, A., Joester, A., Schutte, K., Wigger, F., Frank, R., Spiess, E., Ekblom, P. & Faissner, A. (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J.Cell Biol.*, **132**, 681-699.
- Gotz, M. & Huttner, W. B. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **6**, 777-788.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, **39**, 749-765.
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L. & Kessler, J. A. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*, **17**, 595-606.
- Grove, E. A., Tole, S., Limon, J., Yip, L. & Ragsdale, C. W. (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*, **125**, 2315-2325.
- Guillemot, F., Molnar, Z., Tarabykin, V. & Stoykova, A. (2006) Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur.J.Neurosci.*, **23**, 857-868.
- Hack, M. A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P. M. & Gotz, M. (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat.Neurosci.*, **8**, 865-872.
- Hannon, G. J. & Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257-261.
- Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Lagna, G. & Massague, J. (1997) Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature*, **388**, 82-87.
- Hata, A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo, E., Hemmati-Brivanlou, A. & Massague, J. (2000) OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*, **100**, 229-240.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J. L. & Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*, **89**, 1165-1173.
- Hayette, S., Gadoux, M., Martel, S., Bertrand, S., Tigaud, I., Magaud, J. P. & Rimokh, R. (1998) FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene*, **16**, 2949-2954.
- Heins, N., Cremisi, F., Malatesta, P., Gangemi, R. M., Corte, G., Price, J., Goudreau, G., Gruss, P. & Gotz, M. (2001) Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol.Cell Neurosci.*, **18**, 485-502.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A. & Gotz, M. (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat.Neurosci.*, **5**, 308-315.
- Hertel, M., Tretter, Y., Alzheimer, C. & Werner, S. (2000) Connective tissue growth factor: a novel player in tissue reorganization after brain injury? *Eur.J.Neurosci.*, **12**, 376-380.

- Heuer, H., Christ, S., Friedrichsen, S., Brauer, D., Winckler, M., Bauer, K. & Raivich, G. (2003) Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, **119**, 43-52.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, **131**, 2791-2801.
- Hirabayashi, Y. & Gotoh, Y. (2005) Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci.Res.*, **51**, 331-336.
- Holmes, A., Abraham, D. J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C. M. & Leask, A. (2001) CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J.Biol.Chem.*, **276**, 10594-10601.
- Hunter, K. E., Sporn, M. B. & Davies, A. M. (1993) Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes. *Glia*, **7**, 203-211.
- Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J. & Kuriyan, J. (1999) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell*, **96**, 425-436.
- Husmann, K., Carbonetto, S. & Schachner, M. (1995) Distinct sites on tenascin-C mediate repellent or adhesive interactions with different neuronal cell types. *Cell Adhes.Commun.*, **3**, 293-310.
- Huttner, W. B. & Kosodo, Y. (2005) Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **17**, 648-657.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M. & Grotendorst, G. R. (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol.Biol.Cell*, **4**, 637-645.
- Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Fujimoto, M., Grotendorst, G. R. & Takehara, K. (1996) Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J.Invest Dermatol.*, **106**, 729-733.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. & Miyazono, K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, **389**, 622-626.
- Inamoto, S., Iwata, S., Inamoto, T., Nomura, S., Sasaki, T., Urasaki, Y., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Dang, N. H. & Morimoto, C. (2007) Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7. *Oncogene*, **26**, 893-904.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. & Hill, C. S. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol.Pharmacol.*, **62**, 65-74.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S. & Kageyama, R. (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.*, **13**, 1799-1805.

- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H. & Nishihara, T. (1999) Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J.Biol.Chem.*, **274**, 13637-13642.
- Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L. & Kessler, J. A. (2004) The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev.Biol.*, **268**, 220-231.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. & ten Dijke, P. (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur.J.Biochem.*, **267**, 6954-6967.
- Ivkovic, S., Yoon, B. S., Popoff, S. N., Safadi, F. F., Libuda, D. E., Stephenson, R. C., Daluiski, A. & Lyons, K. M. (2003) Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*, **130**, 2779-2791.
- Izon, D. J., Aster, J. C., He, Y., Weng, A., Karnell, F. G., Patriub, V., Xu, L., Bakkour, S., Rodriguez, C., Allman, D. & Pear, W. S. (2002) Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity.*, **16**, 231-243.
- Jakowlew, S. B., Dillard, P. J., Sporn, M. B. & Roberts, A. B. (1988) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol.Endocrinol.*, **2**, 1186-1195.
- Janknecht, R., Wells, N. J. & Hunter, T. (1998) TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.*, **12**, 2114-2119.
- Jaworski, D. M. & Fager, N. (2000) Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *J.Neurosci.Res.*, **61**, 396-408.
- Jaworski, D. M. & Perez-Martinez, L. (2006) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals. *J.Neurochem.*, **98**, 234-247.
- Jedsadayanmata, A., Chen, C. C., Kireeva, M. L., Lau, L. F. & Lam, S. C. (1999) Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J.Biol.Chem.*, **274**, 24321-24327.
- Jinnin, M., Ihn, H., Asano, Y., Yamane, K., Trojanowska, M. & Tamaki, K. (2004) Tenascin-C upregulation by transforming growth factor-beta in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene*, **23**, 1656-1667.
- Jogi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pahlman, S. & Axelson, H. (2002) Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J.Biol.Chem.*, **277**, 9118-9126.
- Kageyama, R. & Ohtsuka, T. (1999) The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res.*, **9**, 179-188.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A. & Massague, J. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, **3**, 537-549.

- Karunaratne, A., Hargrave, M., Poh, A. & Yamada, T. (2002) GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev.Biol.*, **249**, 30-43.
- Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Nakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T., Hui, C., Artavanis-Tsakonas, S., Okano, H. & Matsuno, K. (2001) Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int.J.Dev.Neurosci.*, **19**, 21-35.
- Klingensmith, J., Nusse, R. & Perrimon, N. (1994) The Drosophila segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev.*, **8**, 118-130.
- Knoblich, J. A. (2001) Asymmetric cell division during animal development. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **2**, 11-20.
- Kondaiah, P., Sands, M. J., Smith, J. M., Fields, A., Roberts, A. B., Sporn, M. B. & Melton, D. A. (1990) Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J.Biol.Chem.*, **265**, 1089-1093.
- Korets-Smith, E., Lindemann, L., Tucker, K. L., Jiang, C., Kabacs, N., Belteki, G., Haigh, J., Gertsenstein, M. & Nagy, A. (2004) Cre recombinase specificity defined by the tau locus. *Genesis.*, **40**, 131-138.
- Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A. M., Corbeil, D. & Huttner, W. B. (2004) Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.*, **23**, 2314-2324.
- Kowanetz, M., Valcourt, U., Bergstrom, R., Heldin, C. H. & Moustakas, A. (2004) Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol.Cell Biol.*, **24**, 4241-4254.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.*, **13**, 804-816.
- Kriegstein, K. & Unsicker, K. (1994) Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience*, **63**, 1189-1196.
- Kriegstein, K., Rufer, M., Suter-Crazzolara, C. & Unsicker, K. (1995a) Neural functions of the transforming growth factors beta. *Int.J.Dev.Neurosci.*, **13**, 301-315.
- Kriegstein, K., Suter-Crazzolara, C., Fischer, W. H. & Unsicker, K. (1995b) TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *EMBO J.*, **14**, 736-742.
- Kriegstein, K. & Unsicker, K. (1996) Distinct modulatory actions of TGF-beta and LIF on neurotrophin-mediated survival of developing sensory neurons. *Neurochem.Res.*, **21**, 843-850.
- Kriegstein, K., Farkas, L. & Unsicker, K. (1998a) TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J.Neurobiol.*, **37**, 563-572.
- Kriegstein, K., Henheik, P., Farkas, L., Jaszai, J., Galter, D., Krohn, K. & Unsicker, K. (1998b) Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-

- beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J.Neurosci.*, **18**, 9822-9834.
- Kriegelstein, K., Richter, S., Farkas, L., Schuster, N., Dunker, N., Oppenheim, R. W. & Unsicker, K. (2000) Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nat.Neurosci.*, **3**, 1085-1090.
- Kriegelstein, K. (2006) Cell death in the nervous system. *Adv.Exp.Med.Biol.*, **557**, 1-10.
- Kubo, M., Kikuchi, K., Nashiro, K., Kakinuma, T., Hayashi, N., Nanko, H. & Tamaki, K. (1998) Expression of fibrogenic cytokines in desmoplastic malignant melanoma. *Br.J.Dermatol.*, **139**, 192-197.
- Kumar, S., Tomooka, Y. & Noda, M. (1992) Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **185**, 1155-1161.
- Labbe, E., Letamendia, A. & Attisano, L. (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 8358-8363.
- Landrieu, P. & Goffinet, A. (1979) Mitotic spindle fiber orientation in relation to cell migration in the neo-cortex of normal and reeler mouse. *Neurosci.Lett.*, **13**, 69-72.
- Lau, L. F. & Lam, S. C. (1999) The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp.Cell Res.*, **248**, 44-57.
- Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.
- Law, S. F., Estojak, J., Wang, B., Mysliwiec, T., Kruh, G. & Golemis, E. A. (1996) Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, **16**, 3327-3337.
- Law, S. F., Zhang, Y. Z., Klein-Szanto, A. J. & Golemis, E. A. (1998) Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 3540-3551.
- Law, S. F., Zhang, Y. Z., Fashena, S. J., Toby, G., Estojak, J. & Golemis, E. A. (1999) Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain. *Exp.Cell Res.*, **252**, 224-235.
- Law, S. F., O'Neill, G. M., Fashena, S. J., Einarson, M. B. & Golemis, E. A. (2000) The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 5184-5195.
- Lee, K. S., Hong, S. H. & Bae, S. C. (2002) Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*, **21**, 7156-7163.
- Lee, S. M., Tole, S., Grove, E. & McMahon, A. P. (2000) A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development*, **127**, 457-467.
- Li, W., Cogswell, C. A. & LoTurco, J. J. (1998) Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J.Neurosci.*, **18**, 8853-8862.

- Lijam, N., Paylor, R., McDonald, M. P., Crawley, J. N., Deng, C. X., Herrup, K., Stevens, K. E., Maccaferri, G., McBain, C. J., Sussman, D. J. & Wynshaw-Boris, A. (1997) Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell*, **90**, 895-905.
- Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F. & Thoenen, H. (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J.Cell Biol.*, **117**, 395-400.
- Liu, M., Pleasure, S. J., Collins, A. E., Noebels, J. L., Naya, F. J., Tsai, M. J. & Lowenstein, D. H. (2000) Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 865-870.
- Liu, X., Elia, A. E., Law, S. F., Golemis, E. A., Farley, J. & Wang, T. (2000) A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *EMBO J.*, **19**, 6759-6769.
- Lochter, A. & Schachner, M. (1993) Tenascin and extracellular matrix glycoproteins: from promotion to polarization of neurite growth in vitro. *J.Neurosci.*, **13**, 3986-4000.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. & Massague, J. (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J.Cell Biol.*, **124**, 557-568.
- Lowry, J. A. & Atchley, W. R. (2000) Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J.Mol.Evol.*, **50**, 103-115.
- Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H. & Dehay, C. (2002) Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *J.Neurosci.*, **22**, 6610-6622.
- Luo, K., Stroschein, S. L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. & Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.*, **13**, 2196-2206.
- Lutz, M. & Knaus, P. (2002) Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.*, **14**, 977-988.
- Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. & Benezra, R. (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, **401**, 670-677.
- Machon, O., van den Bout, C. J., Backman, M., Kemler, R. & Krauss, S. (2003) Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience*, **122**, 129-143.
- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L. & Krauss, S. (2007) A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev.Biol.*, **311**, 223-237.
- Maguer-Satta, V., Bartholin, L., Jeanpierre, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Martel, S., Magaud, J. P. & Rimokh, R. (2001) Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected]. *Exp.Hematol.*, **29**, 301-308.

- Maguer-Satta, V. & Rimokh, R. (2004) FLRG, member of the follistatin family, a new player in hematopoiesis. *Mol.Cell Endocrinol.*, **225**, 109-118.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. & Gotz, M. (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, **37**, 751-764.
- Martin, D. M., Skidmore, J. M., Fox, S. E., Gage, P. J. & Camper, S. A. (2002) Pitx2 distinguishes subtypes of terminally differentiated neurons in the developing mouse neuroepithelium. *Dev.Biol.*, **252**, 84-99.
- Massague, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu.Rev.Cell Biol.*, **6**, 597-641.
- Massague, J. (1992) Receptors for the TGF-beta family. *Cell*, **69**, 1067-1070.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.*, **67**, 753-791.
- Massague, J. & Chen, Y. G. (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.*, **14**, 627-644.
- Massague, J. & Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.*, **19**, 1745-1754.
- Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **1**, 169-178.
- Massague, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, **103**, 295-309.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. & Artavanis-Tsakonas, S. (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development*, **121**, 2633-2644.
- Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A. M., Carcanciu, M. L., Ordentlich, P., Kadesch, T. & Artavanis-Tsakonas, S. (1998) Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat.Genet.*, **19**, 74-78.
- Matsuzaki, F. (2000) Asymmetric division of Drosophila neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **10**, 38-44.
- Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G. & Affi, A. (2001) Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.*, **276**, 36797-36803.
- McConnell, S. K. (1988) Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res.*, **472**, 1-23.
- McGonigle, S., Beall, M. J. & Pearce, E. J. (2002) Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response. *Biochemistry*, **41**, 579-587.
- Menard, C., Hein, P., Paquin, A., Savelson, A., Yang, X. M., Lederfein, D., Barnabe-Heider, F., Mir, A. A., Sterneck, E., Peterson, A. C., Johnson, P. F., Vinson, C. & Miller, F. D. (2002) An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron*, **36**, 597-610.

- Mercurio, S., Latinkic, B., Itasaki, N., Krumlauf, R. & Smith, J. C. (2004) Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development*, **131**, 2137-2147.
- Merrill, R. A., See, A. W., Wertheim, M. L. & Clagett-Dame, M. (2004) Crk-associated substrate (Cas) family member, NEDD9, is regulated in human neuroblastoma cells and in the embryonic hindbrain by all-trans retinoic acid. *Dev.Dyn.*, **231**, 564-575.
- Miller, M. W. & Luo, J. (2002) Effects of ethanol and transforming growth factor beta (TGF beta) on neuronal proliferation and nCAM expression. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, **26**, 1281-1285.
- Miller, M. W. (2003) Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. *J.Comp Neurol.*, **460**, 410-424.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K. & Yamada, K. M. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J.Cell Biol.*, **131**, 791-805.
- Miyata, T., Maeda, T. & Lee, J. E. (1999) NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.*, **13**, 1647-1652.
- Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. & Heldin, C. H. (1988) Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J.Biol.Chem.*, **263**, 6407-6415.
- Mizutani, K. & Saito, T. (2005) Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development*, **132**, 1295-1304.
- Molenaar, M., van de, W. M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. & Clevers, H. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, **86**, 391-399.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. & Macklis, J. D. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.*, **8**, 427-437.
- Moon, L. D. & Fawcett, J. W. (2001) Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur.J.Neurosci.*, **14**, 1667-1677.
- Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T., Brandes, M. E., Mergenhagen, S. E. & Wahl, S. M. (1992) Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta. *J.Neuroimmunol.*, **39**, 163-173.
- Morita, N., Takumi, T. & Kiyama, H. (1996) Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, **42**, 263-271.
- Morrow, T., Song, M. R. & Ghosh, A. (2001) Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development*, **128**, 3585-3594.
- Moussad, E. E. & Brigstock, D. R. (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol.Genet.Metab*, **71**, 276-292.

- Munger, J. S., Harpel, J. G., Gleizes, P. E., Mazziere, R., Nunes, I. & Rifkin, D. B. (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.*, **51**, 1376-1382.
- Muzio, L., Soria, J. M., Pannese, M., Piccolo, S. & Mallamaci, A. (2005) A mutually stimulating loop involving emx2 and canonical wnt signalling specifically promotes expansion of occipital cortex and hippocampus. *Cereb. Cortex*, **15**, 2021-2028.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. (1997) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.*, **16**, 5353-5362.
- Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R. & Taga, T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 5868-5873.
- Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. & Orkin, S. H. (1999) Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev.Biol.*, **210**, 305-321.
- Natarajan, M., Stewart, J. E., Golemis, E. A., Pugacheva, E. N., Alexandropoulos, K., Cox, B. D., Wang, W., Grammer, J. R. & Gladson, C. L. (2006) HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*, **25**, 1721-1732.
- Nesti, L. J., Caterson, E. J., Wang, M., Chang, R., Chapovsky, F., Hoek, J. B. & Tuan, R. S. (2002) TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J.Orthop.Res.*, **20**, 1042-1049.
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J. M. & Guillemot, F. (2006) p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.*, **20**, 1511-1524.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. & Guillemot, F. (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron*, **29**, 401-413.
- Niimi, H., Pardali, K., Vanlandewijck, M., Heldin, C. H. & Moustakas, A. (2007) Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF-beta. *J.Cell Biol.*, **176**, 695-707.
- Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H. & Cho, K. W. (2000) Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*, **403**, 781-785.
- Noordermeer, J., Klingensmith, J., Perrimon, N. & Nusse, R. (1994) dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in Drosophila. *Nature*, **367**, 80-83.
- Nowakowski, R. S., Lewin, S. B. & Miller, M. W. (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J.Neurocytol.*, **18**, 311-318.
- O'Neill, G. M., Fashena, S. J. & Golemis, E. A. (2000) Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol.*, **10**, 111-119.
- O'Neill, G. M. & Golemis, E. A. (2001) Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol.Cell Biol.*, **21**, 5094-5108.

- Ohashi, Y., Iwata, S., Kamiguchi, K. & Morimoto, C. (1999) Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte-type is a critical element in TCR- and beta 1 integrin-induced T lymphocyte migration. *J.Immunol.*, **163**, 3727-3734.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. & Kageyama, R. (1999) Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.*, **18**, 2196-2207.
- Oldekamp, J., Kraemer, N., Alvarez-Bolado, G. & Skutella, T. (2004) bHLH gene expression in the Emx2-deficient dentate gyrus reveals defective granule cells and absence of migrating precursors. *Cereb.Cortex*, **14**, 1045-1058.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. & Niehrs, C. (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**, 480-485.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. & Kadesch, T. (1998) Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 2230-2239.
- Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H. & Miyazono, K. (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J.Cell Physiol*, **193**, 299-318.
- Packard, M., Mathew, D. & Budnik, V. (2003) Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places. *Nat.Rev.Neurosci.*, **4**, 113-120.
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A. & Guillemot, F. (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.*, **23**, 4495-4505.
- Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., Grosveld, F. & Karis, A. (1999) The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development*, **126**, 5523-5531.
- Pellegrini, M., Mansouri, A., Simeone, A., Boncinelli, E. & Gruss, P. (1996) Dentate gyrus formation requires Emx2. *Development*, **122**, 3893-3898.
- Pelton, R. W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H. L. & Gold, L. I. (1991) Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J.Cell Biol.*, **115**, 1091-1105.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C. H., Funahashi, K. & ten Dijke, P. (1998) The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.*, **434**, 83-87.
- Pleasure, S. J., Collins, A. E. & Lowenstein, D. H. (2000) Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J.Neurosci.*, **20**, 6095-6105.
- Prieto, A. L., Andersson-Fisone, C. & Crossin, K. L. (1992) Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytotactin. *J.Cell Biol.*, **119**, 663-678.

- Pugacheva, E. N. & Golemis, E. A. (2005) The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 937-946.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A. & Temple, S. (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, **28**, 69-80.
- Rafferty, L. A., Twombly, V., Wharton, K. & Gelbart, W. M. (1995) Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics*, **139**, 241-254.
- Redmond, L., Oh, S. R., Hicks, C., Weinmaster, G. & Ghosh, A. (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat. Neurosci.*, **3**, 30-40.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.*, **9**, 1831-1845.
- Rich, J. N., Zhang, M., Datto, M. B., Bigner, D. D. & Wang, X. F. (1999) Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35053-35058.
- Rickmann, M., Amaral, D. G. & Cowan, W. M. (1987) Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, **264**, 449-479.
- Rigato, F., Garwood, J., Calco, V., Heck, N., Faivre-Sarrailh, C. & Faissner, A. (2002) Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. *J. Neurosci.*, **22**, 6596-6609.
- Rivera, S., Ogier, C., Jourquin, J., Timsit, S., Szklarczyk, A. W., Miller, K., Gearing, A. J., Kaczmarek, L. & Khrestchatsky, M. (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 19-32.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M. & Sporn, M. B. (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 5339-5343.
- Rodriguez, C., Huang, L. J., Son, J. K., McKee, A., Xiao, Z. & Lodish, H. F. (2001) Functional cloning of the proto-oncogene brain factor-1 (BF-1) as a Smad-binding antagonist of transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30224-30230.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de, W. M., Destree, O. & Clevers, H. (1998) The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, **395**, 608-612.
- Rosso, S. B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A. & Salinas, P. C. (2005) Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci.*, **8**, 34-42.
- Roussa, E., Wiehle, M., Dunker, N., Becker-Katins, S., Oehlke, O. & Kriegstein, K. (2006) Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells*, **24**, 2120-2129.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salinas, P. C. (2003) Synaptogenesis: Wnt and TGF-beta take centre stage. *Curr.Biol.*, **13**, R60-R62.
- Sandhu, C., Garbe, J., Bhattacharya, N., Daksis, J., Pan, C. H., Yaswen, P., Koh, J., Slingerland, J. M. & Stampfer, M. R. (1997) Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 2458-2467.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. (1992) Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.*, **6**, 2620-2634.
- Sasaki, T., Iwata, S., Okano, H. J., Urasaki, Y., Hamada, J., Tanaka, H., Dang, N. H., Okano, H. & Morimoto, C. (2005) Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke*, **36**, 2457-2462.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M. M., Teplow, D. B. & Haass, C. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.*, **2**, 835-841.
- Sauvageot, C. M. & Stiles, C. D. (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **12**, 244-249.
- Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E. & Padgett, R. W. (1996) *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 790-794.
- Schindehutte, J., Fukumitsu, H., Collombat, P., Griesel, G., Brink, C., Baier, P. C., Capecchi, M. R. & Mansouri, A. (2005) In vivo and in vitro tissue-specific expression of green fluorescent protein using the cre-lox system in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, **23**, 10-15.
- Schmechel, D. E. & Rakic, P. (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat.Embryol.(Berl)*, **156**, 115-152.
- Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol*, **182**, 311-322.
- Schwab, J. M., Beschoner, R., Nguyen, T. D., Meyermann, R. & Schluesener, H. J. (2001) Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans. *J.Neurotrauma*, **18**, 377-388.
- Schwab, M. H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F. J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M. J. & Nave, K. A. (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J.Neurosci.*, **20**, 3714-3724.

- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. & Gelbart, W. M. (1995) Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **139**, 1347-1358.
- Seo, S., Herr, A., Lim, J. W., Richardson, G. A., Richardson, H. & Kroll, K. L. (2005) Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev.*, **19**, 1723-1734.
- Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massague, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, **117**, 211-223.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. & Rakic, P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*, **286**, 741-746.
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. & Galbraith, C. G. (1998) Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.*, **8**, 51-54.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrissey, E. E. & Temple, S. (2006) The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat. Neurosci.*, **9**, 743-751.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13**, 1501-1512.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **18**, 2699-2711.
- Shevtsova, Z., Malik, J. M., Michel, U., Bahr, M. & Kugler, S. (2005) Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp. Physiol*, **90**, 53-59.
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. & Pavletich, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, **94**, 585-594.
- Siegenthaler, J. A. & Miller, M. W. (2004) Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb. Cortex*, **14**, 791-802.
- Siegenthaler, J. A. & Miller, M. W. (2005) Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **25**, 8627-8636.
- Siegfried, E., Wilder, E. L. & Perrimon, N. (1994) Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature*, **367**, 76-80.
- Singh, M., Cowell, L., Seo, S., O'Neill, G. & Golemis, E. (2007) Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle. *Cell Biochem. Biophys.*, **48**, 54-72.
- Smart, I. H. (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.

- Smith, G. M. & Hale, J. H. (1997) Macrophage/Microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *J.Neurosci.*, **17**, 9624-9633.
- Sousa, V. O., Romao, L., Neto, V. M. & Gomes, F. C. (2004) Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur.J.Neurosci.*, **19**, 1721-1730.
- Spring, J., Beck, K. & Chiquet-Ehrismann, R. (1989) Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell*, **59**, 325-334.
- Stifani, S., Blaumueller, C. M., Redhead, N. J., Hill, R. E. & Artavanis-Tsakonas, S. (1992) Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat.Genet.*, **2**, 119-127.
- Strekalova, T., Sun, M., Sibbe, M., Evers, M., Dityatev, A., Gass, P. & Schachner, M. (2002) Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. *Mol.Cell Neurosci.*, **21**, 173-187.
- Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. & Luo, K. (1999) Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*, **286**, 771-774.
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H. F. & Weinberg, R. A. (1999) SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 12442-12447.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. & Greenberg, M. E. (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell*, **104**, 365-376.
- Sussman, D. J., Klingensmith, J., Salinas, P., Adams, P. S., Nusse, R. & Perrimon, N. (1994) Isolation and characterization of a mouse homolog of the Drosophila segment polarity gene dishevelled. *Dev.Biol.*, **166**, 73-86.
- Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H. & Marunouchi, T. (1993) Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J.Immunol.*, **151**, 2150-2158.
- Taipale, J. & Keski-Oja, J. (1997) Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.*, **11**, 51-59.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S. & Caviness, V. S., Jr. (1993) Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J.Neurosci.*, **13**, 820-833.
- Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S. & Kageyama, R. (1994) Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J.Biol.Chem.*, **269**, 5150-5156.
- Takigawa, M., Nakanishi, T., Kubota, S. & Nishida, T. (2003) Role of CTGF/HCS24/ecogenin in skeletal growth control. *J.Cell Physiol*, **194**, 256-266.
- Tan, H. K., Heywood, D., Ralph, G. S., Bienemann, A., Baker, A. H. & Uney, J. B. (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 inhibits excitotoxic cell death in neurons. *Mol.Cell Neurosci.*, **22**, 98-106.

- Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H. & Honjo, T. (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron*, **29**, 45-55.
- ten Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K. K., Pieler, C. & Foulkes, J. G. (1988) Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 4715-4719.
- Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J. & Levivier, M. (2004) Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J.Gene Med.*, **6 Suppl 1**, S212-S222.
- Theil, T., Aydin, S., Koch, S., Grotewold, L. & Ruther, U. (2002) Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development*, **129**, 3045-3054.
- Theriault, F. M., Roy, P. & Stifani, S. (2004) AML1/Runx1 is important for the development of hindbrain cholinergic branchiovisceral motor neurons and selected cranial sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 10343-10348.
- Theriault, F. M., Nuthall, H. N., Dong, Z., Lo, R., Barnabe-Heider, F., Miller, F. D. & Stifani, S. (2005) Role for Runx1 in the proliferation and neuronal differentiation of selected progenitor cells in the mammalian nervous system. *J.Neurosci.*, **25**, 2050-2061.
- Tole, S., Goudreau, G., Assimacopoulos, S. & Grove, E. A. (2000) Emx2 is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification. *J.Neurosci.*, **20**, 2618-2625.
- Tortoriello, D. V., Sidis, Y., Holtzman, D. A., Holmes, W. E. & Schneyer, A. L. (2001) Human follistatin-related protein: a structural homologue of follistatin with nuclear localization. *Endocrinology*, **142**, 3426-3434.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W. & Orkin, S. H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221-226.
- Tsang, M., Lijam, N., Yang, Y., Beier, D. R., Wynshaw-Boris, A. & Sussman, D. J. (1996) Isolation and characterization of mouse dishevelled-3. *Dev.Dyn.*, **207**, 253-262.
- Tsuchida, K., Arai, K. Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y. & Sugino, H. (2000) Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J.Biol.Chem.*, **275**, 40788-40796.
- Tzeng, S. F. (2003) Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation. *Neurochem.Res.*, **28**, 45-52.
- Unsicker, K., Flanders, K. C., Cissel, D. S., Lafyatis, R. & Sporn, M. B. (1991) Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience*, **44**, 613-625.
- Unsicker, K. & Strelau, J. (2000) Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur.J.Biochem.*, **267**, 6972-6975.
- Unsicker, K. & Krieglstein, K. (2002) TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv.Exp.Med.Biol.*, **513**, 353-374.

- Vaillant, C., Didier-Bazes, M., Hutter, A., Belin, M. F. & Thomasset, N. (1999) Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J.Neurosci.*, **19**, 4994-5004.
- Van Seventer, G. A., Salmen, H. J., Law, S. F., O'Neill, G. M., Mullen, M. M., Franz, A. M., Kanner, S. B., Golemis, E. A. & van Seventer, J. M. (2001) Focal adhesion kinase regulates beta1 integrin-dependent T cell migration through an HEF1 effector pathway. *Eur.J.Immunol.*, **31**, 1417-1427.
- Vergeli, M., mazzanti, B., Ballerini, C., Gran, B., Amaducci, L. & Massacesi, L. (1995) Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J.Neurosci.Res.*, **40**, 127-133.
- Verrecchia, F., Chu, M. L. & Mauviel, A. (2001) Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J.Biol.Chem.*, **276**, 17058-17062.
- Viti, J., Gulacsi, A. & Lillien, L. (2003) Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J.Neurosci.*, **23**, 5919-5927.
- von Gersdorff, G., Susztak, K., Rezvani, F., Bitzer, M., Liang, D. & Bottinger, E. P. (2000) Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J.Biol.Chem.*, **275**, 11320-11326.
- Wachs, F. P., Winner, B., Couillard-Despres, S., Schiller, T., Aigner, R., Winkler, J., Bogdahn, U. & Aigner, L. (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, **65**, 358-370.
- Wallace, J. A., Alexander, S., Estrada, E. Y., Hines, C., Cunningham, L. A. & Rosenberg, G. A. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab*, **22**, 1303-1310.
- Wang, Y., Moges, H., Bharucha, Y. & Symes, A. (2007) Smad3 null mice display more rapid wound closure and reduced scar formation after a stab wound to the cerebral cortex. *Exp.Neurol.*, **203**, 168-184.
- Warner, D. R., Greene, R. M. & Pisano, M. M. (2005) Interaction between Smad 3 and Dishevelled in murine embryonic craniofacial mesenchymal cells. *Orthod.Craniofac.Res.*, **8**, 123-130.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. & Nishida, E. (2000) Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.*, **1**, 176-182.
- Wehrle-Haller, B. & Chiquet, M. (1993) Dual function of tenascin: simultaneous promotion of neurite growth and inhibition of glial migration. *J.Cell Sci.*, **106 (Pt 2)**, 597-610.
- Wodarz, A. & Huttner, W. B. (2003) Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech.Dev.*, **120**, 1297-1309.
- Wotton, D., Lo, R. S., Lee, S. & Massague, J. (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell*, **97**, 29-39.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**, 341-347.

- Wrann, M., Bodmer, S., de Martin, R., Siepl, C., Hofer-Warbinek, R., Frei, K., Hofer, E. & Fontana, A. (1987) T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta. *EMBO J.*, **6**, 1633-1636.
- Wurthner, J. U., Frank, D. B., Felici, A., Green, H. M., Cao, Z., Schneider, M. D., McNally, J. G., Lechleider, R. J. & Roberts, A. B. (2001) Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *J.Biol.Chem.*, **276**, 19495-19502.
- Wyss-Coray, T., Feng, L., Masliah, E., Ruppe, M. D., Lee, H. S., Toggas, S. M., Rockenstein, E. M. & Mucke, L. (1995) Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Am.J.Pathol.*, **147**, 53-67.
- Xia, Y., Sidis, Y. & Schneyer, A. (2004) Overexpression of follistatin-like 3 in gonads causes defects in gonadal development and function in transgenic mice. *Mol.Endocrinol.*, **18**, 979-994.
- Xu, L., Chen, Y. G. & Massague, J. (2000) The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat.Cell Biol.*, **2**, 559-562.
- Yaffe, D. & Saxel, O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, **270**, 725-727.
- Yang, Y. C., Piek, E., Zavadil, J., Liang, D., Xie, D., Heyer, J., Pavlidis, P., Kucherlapati, R., Roberts, A. B. & Bottinger, E. P. (2003) Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 10269-10274.
- Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T. & Wang, X. F. (1997) Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 7019-7028.
- Yu, L., Hebert, M. C. & Zhang, Y. E. (2002) TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.*, **21**, 3749-3759.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.*, **14**, 163-176.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E. & Bottinger, E. P. (2001) Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 6686-6691.
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N. & Bottinger, E. P. (2004) Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.*, **23**, 1155-1165.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., III, Birchmeier, W. & Birchmeier, C. (2003) beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev.Biol.*, **258**, 406-418.
- Zhang, G., Ohsawa, Y., Kametaka, S., Shibata, M., Waguri, S. & Uchiyama, Y. (2003) Regulation of FLRG expression in rat primary astroglial cells and injured brain tissue by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1). *J.Neurosci.Res.*, **72**, 33-45.

- Zhao, Q., Chen, N., Wang, W. M., Lu, J. & Dai, B. B. (2004) Effect of transforming growth factor-beta on activity of connective tissue growth factor gene promoter in mouse NIH/3T3 fibroblasts. *Acta Pharmacol.Sin.*, **25**, 485-489.
- Zhou, Y., Yamamoto, M. & Engel, J. D. (2000) GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development*, **127**, 3829-3838.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. & Thomsen, G. H. (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, **400**, 687-693.
- Zhu, Y., Roth-Eichhorn, S., Braun, N., Culmsee, C., Rami, A. & Kriegstein, J. (2000) The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.*, **866**, 286-298.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Smad-abhängigen und die Smad-unabhängigen Signaltransduktionswege
- Abbildung 2: Die Entwicklung cortikaler Progenitoren erfolgt in einer zeitlich koordinierten Abfolge
- Abbildung 3: Typen der Zellteilung während der Neurogenese
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtenbildung im Cortex
- Abbildung 5: Dissoziierte cortikale und hippocampale Kulturen sind mit Molekülen zur TGF- β -Signaltransduktion ausgestattet
- Abbildung 6: TGF- β -Sekretion in dissoziierten cortikalen und hippocampalen Kulturen
- Abbildung 7: Hippokampale und cortikale Kulturen sind responsiv für TGF- β -Signale
- Abbildung 8: Regulation von TGF- β -Zielgenen in jungen hippocampalen Kulturen (DIV4)
- Abbildung 9: Regulation von TGF- β -Zielgenen in reifen hippocampalen Kulturen (DIV12)
- Abbildung 10: Schematische Darstellung des Cre-Rekombinase Expressionsvektors pAAV 6P1 Cre SEWB
- Abbildung 11: Die Transduktion von AAV-Cre in hippocampale Kulturen aus T β RII flox/flox-Embryonen besitzt eine hohe Effizienz und führt zur Reduktion des T β RII
- Abbildung 12: Validierung der T β RII spezifischen shRNA-Konstrukte in C2C12- und Oli-neu-Zellen
- Abbildung 13: Schematische Darstellungen der shRNA-Expressionsvektoren
- Abbildung 14: Regulation der TGF- β -Zielgene in hippocampalen Kulturen an DIV12 nach *Knock-down* des T β RII durch das Cre/loxP-System
- Abbildung 15: Regulation der TGF- β -Zielgene in hippocampalen Kulturen an DIV12 nach shRNA vermitteltem *Knock-down* des T β RII
- Abbildung 16: Astrozyten-angereicherte Kulturen aus dem Cerebrum embryonaler Mäuse
- Abbildung 17: Regulation der TGF- β -Zielgene in Astrozyten-angereicherten Kulturen
- Abbildung 18: TGF- β fördert die Neurogenese in hippocampalen und cortikalen Progenitoren
- Abbildung 19: Inhibition des TGF- β -Signalweges durch den ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 verhindert die vermehrte Generierung von Neuronen durch TGF- β
- Abbildung 20 Die Induktion der Neurogenese ist nicht abhängig von der TGF- β -Isoform
- Abbildung 21: Behandlungsschema zur Untersuchung des Einflusses von Zeitpunkt und Dauer der TGF- β -Behandlung

- Abbildung 22: Der shRNA vermittelte *Knock-down* der Smad-Aktivierung verhindert die TGF- β induzierte Neurogenese
- Abbildung 23: TGF- β fördert den Austritt von Progenitoren aus dem Zellzyklus
- Abbildung 24: Die TGF- β -Behandlung löst keine verstärkte Apoptose in hippokampalen und cortikalen Kulturen aus
- Abbildung 25: Die TGF- β vermittelte Induktion der Neurogenese ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Progenitoren
- Abbildung 26: TGF- β hat keinen Einfluß auf die Kinetik des Zellzyklus
- Abbildung 27: Einfluss von TGF- β auf die Expression von Zellzyklusregulatoren
- Abbildung 28: Auswirkungen der Inhibition des Notch-Signalweges durch den Presenilin- γ -Sekretase-Inhibitor DAPT auf die Entwicklung hippokampaler Kulturen
- Abbildung 29: Einfluss des Funktionsverlustes von TGF- β -Zielgenen auf den neurogenen Effekt
- Abbildung 30: Regulation der Nedd9-Expression in cortikalen Kulturen aus E14,5 und E16,5 Embryonen
- Abbildung 31: Morphologische Veränderungen in Nestin-positiven Progenitoren nach TGF- β -Behandlung
- Abbildung 32: Auswirkungen der TGF- β -Behandlung auf die Zusammensetzung neuronaler Subtypen in cortikalen Kulturen
- Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung der TGF- β -Zielgenregulationen in den verschiedenen Zelltypen der hippokampalen Kulturen und ihre möglichen Funktionen

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Kombination der verschiedenen TGF- β -Rezeptoren und die Signalweiterleitung über R-Smads
- Tabelle 2: Potentielle TGF- β -Zielgene ermittelt in *Microarray*-Analysen in endothelialen, ependymalen und mesenchymalen Zellen
- Tabelle 3: Quantitative Real-Time PCR Analyse der TGF- β regulierten Zielgene in jungen hippokampalen Kulturen (DIV4)
- Tabelle 4: Quantitative Real-Time PCR Analyse der TGF- β regulierten Zielgene in reifen hippokampalen Kulturen (DIV12)
- Tabelle 5: TGF- β -abhängige Regulation von Notch- und Wnt-Signalweg assoziierten Genen in hippokampalen Kulturen an DIV4
- Tabelle 6: Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation von der Smad-Aktivität

Tabelle 7: Abhängigkeit der TGF- β -Zielgenregulation von der Ctgf-Expression

Tabelle 8: Zuordnung der TGF- β -Zielgenregulation zu Neuronen, Astrozyten und Progenitoren in den hippokampalen Kulturen

6.3 Primersequenzen

6.3.1 Sequenzen der Primer für die TGF- β -Zielgen-Analyse

Symbol	Acession No. und Definition	Primersequenz	Zyklen
Akap9	NM_194462 Mus musculus A kinase anchor protein 9	F: GCAGAACGAGCGGAAGTGTT R: GCACGGCGCTAGTTTCCA	28
Anxa2	NM_007585 Mus musculus annexin A2	F: CTCAGCGATACGTGCCCCG R: GTAGGGTTTGACTGACCCGTAGG	28
Bmp4	NM_007554 Mus musculus bone morphogenetic protein 4	F: TGGGCT GGAATGATTGGATT R: CAGTCCCCATGGCAGTAGAAG	37
Bmpr2	NM_007561 Mus musculus bone morphogenetic protein receptor, type II	F: TTGGTTTATCCATGAGGCTAACTG R: TGGTGCCATATAGCGAATTGTG	32
Ccnd1	NM_007631 Mus musculus cyclin D1	F: CCAGAGGCGGATGAGAACAA R: ATGGAGGGTGGGTTGGAAAT	34
Ccnd2	NM_009829 Mus musculus cyclin D2	F: CCCTGTACACTCGAACCGTTATT R: ATGTTGCAGGTACGCACACTCT	29
Ccne1	NM_007633 Mus musculus cyclin E1	F: GTGGCTCCGACCTTTCAGTC R: CACAGTCTTGCAATCTTGGCA	31
Cdk2-t1	NM_183417 Mus musculus cyclin-dependent kinase 2, transcript variant 1	F: TGTACCCAGCACCATGCTAAG R: CCGGAAGAGTTGGTCAATCTCA	32
Cdk2-t2	NM_016756 Mus musculus cyclin-dependent kinase 2, transcript variant 2	F: TTTGCTGAAATGGTGACCCG R: TCCCCAGAGTCCGAAAGATCC	32
Cdk4	NM_009870 Mus musculus cyclin-dependent kinase 4	F: ATGGCTGCCACTCGATATGAA R: TCCTCCATTAGGAACTCTCACAC	27
Cdk6	NM_009873 Mus musculus cyclin-dependent kinase 6	F: GTTCAGACGTGGATCAACTAGG R: GAGCAGATTTGGAATGAAAAGCC	37
Cdkn1a	NM_001111099 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	F: CCTGACAGATTTCTATCACTCC R: CTGACCCACAGCAGAAGAGG	25
Cdkn1b	NM_009875 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)	F: TCAAACGTGAGAGTGTCTAACG R: CCGGGCCGAAGAGATTTCTG	32
Cdkn1c	NM_009876 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57)	F: CACTCTGTACCATGTGCAAGGAGTA R: TTTCTCTTTTGTGTTTGCAGTGA	30
Cdkn2a	NM_009877 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	F: CGCAGGTTCTTGGTCACTGT R: TGTTACGAAAGCCAGAGCG	32

Anhang

Cdkn2b	NM_007670 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	F: TGCAGATGATCCACAGGCTAAA R: GCCATTTTGCAGGTGAATCC	33
Cdkn2c	NM_007671 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)	F: AAAGATGGAAGTGGTTTTGCTGT R: TGTGCTTCATAAGGAACTCCAC	30
Cdkn2d	NM_009878 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)	F: CTGAACCGCTTTGGCAAGAC R: GCCCTCTCTTATCGCCAGAT	26
c-myc	NM_010849 Mus musculus myelocytomatosis oncogene	F: AGGCCCCCAAGGTAGTGATC R: GTGCTCGTCTGCTTGAATGG	30
Ctgf	NM_010217 Mus musculus connective tissue growth factor	F: CCACCAAAGTGAGAACGTTATGTC R: TGCCTAATGAACAAGTGTCAA	30
Ctnnb1	NM_007614 Mus musculus catenin (cadherin associated protein), beta 1	F: GAAGGCGTGGCAACATACGC R: AGAGGGAACTGGTCAGCTCG	30
Dcn	NM_007833 Mus musculus decorin	F: TCTTGGGCTGGACCATTGAA R: CATCGGTAGGGGCACATAGA	31
Dkk1	NM_010051 Mus musculus dickkopf homolog 1	F: TCCGTCTGCCTCCGATCA R: CTTGGACCAGAAGTGTCTTGCA	38
Dll1	NM_007865 Mus musculus delta-like 1 (Drosophila) (Dll1)	F: TTAAATGGACGAGTGACTTGATTCA R: CAGTTGTGTTTCTAGTTCAAGGAAAGA	30
Dtx1	NM_008052 Mus musculus deltex 1 homolog (Drosophila)	F: AGACACAGGTACCATGCGGC R: GTGATGCAGATGTCCATGTCC	28
Dvl1	NM_010091 Mus musculus dishevelled homolog 1	F: CCATCCCAAGGGCTGACCC R: AGCTGGTTAGTGAGGAAGAGC	29
Dvl2	NM_007888 Mus musculus dishevelled homolog 2	F: CATTGTGGGCCAAAGTAACGA R: ATCATTACCTGCAAAAGCATGTC	36
Dvl3	NM_007889 Mus musculus dishevelled homolog 3	F: CCTGATACAGAGCGCCTAGAT R: GGTAATCTTGAGCCACATGCG	31
Efna2	NM_007909 Mus musculus ephrin A2	F: CCCTGACATTGCTGGTGACA R: GCTGGAGGCCCTGGAT	31
Efnb1	NM_010110 Mus musculus ephrin B1	F: TTAATACATTACATCAACGTCC R: GGCTGGTAGTCAACTGCTCG	35
Ephb2	NM_010142 Mus musculus Eph receptor B2	F: CAGAGGAACCCATCATCAGTCA R: TTTCCATTCAATTCACTAACCATT	31
ErbB2	NM_001003817 Mus musculus v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	F: GAACGTGAAAATCCCCGTGG R: ACTGTGGATGTCAGGCAGATG	36
Fgfr1	NM_010206 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 1	F: AGGCTACAAGGTTCCGCTATGC R: CTCCATACTCATTCTCCACG	34
foslike	NM_008037 Mus musculus fos-like antigen 2	F: TGCAGTGGGAGGTGTATATATCGTATT R: CCGCGGAGCCATAAAACC	30
Fstl3	NM_031380 Mus musculus follistatin-like 3	F: CACATGGACATTTCCCAAACCT R: CAACTATTATAAAAATCTCCCTTCAGTCCTT	32
Fzd1	NM_021457 Mus musculus frizzled homolog 1 (Drosophila)	F: AGTAGAACATACACAGAGTATGGAAACCTAA R: CTAATTGCAGTTTGGCTAAAACCA	29
Fzd7	NM_008057 Mus musculus frizzled homolog 7 (Drosophila)	F: GAAGTCTGGTTCTTTGGCATAATGTAA R: AACATTGCAAAATTGGAGGACAGT	32

Anhang

Gapdh	NM_008084 Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: CGGCCGCATCTTCTTGTG R: TGACCAGGCGCCCAATAC	26
Gata2	NM_008090 Mus musculus GATA binding protein 2	F: ACCAAGTGCAATATCGGTGTCCAG R: ACTGCCGATTCTTCCTTATGCGG	32
Gbp2	NM_010260 Mus musculus guanylate nucleotide binding protein 2	F: GAAAACCCGTCACCTTCTGATGA R: AGAATTTCTGATGCACAGTCG	40
Gja4	NM_008120 Mus musculus gap junction membrane channel protein alpha 4	F: CTCAAAGGCACCTCAGAGACAA R: CATCACAAAGGCTCCAGGTATTC	36
Gli1	NM_010296 Mus musculus GLI-Kruppel family member GLI1	F: TCCTATTCACGCCTTGAAAACC R: CAACCTTCTTGCTCACACATGTAAG	34
Hes1	NM_008235 Mus musculus hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	F: TCTAAGCCAAGTAAAACACTGATTT R: GCTTCACAGTCATTTCCAGAATGTC	36
Hey1	NM_010423 Mus musculus hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	F: GGCAGCCCTAAGCACTCTCA R: GTGTTTCACAGGCACCAAGCT	33
Hgf	NM_010427 Mus musculus hepatocyte growth factor	F: TCCCATGGATCACACAGAATCA R: AGCCCTTGTCGGGATATCTTTC	36
Id1	NM_010495 Mus musculus inhibitor of DNA binding 1	F: CTCAGCACCTGAACGGCG R: AAGGGCTGGAGTCCATCTGG	27
Id2	NM_010496 Mus musculus inhibitor of DNA binding 2	F: CACAAAGGTGGAGCGTGAATT R: AGCATTACAGTAGGCTCGTGTC	30
Id3	NM_008321 Mus musculus inhibitor of DNA binding 3	F: CCTCTTAGCCTCTTGGACGACAT R: AGGATTTCCACCTGGCTAAGC	26
Ifng	NM_008337 Mus musculus interferon gamma	F: ACAATGAACGCTACACACTGCAT R: TGGCAGTAACAGCCAGAAACA	34
Igf2r	NM_010515 Mus musculus insulin-like growth factor 2 receptor	F: GCAAACCAGGTGATCTAGAAAG R: GGACCGTGCAGTTCTCTCCT	31
Igfbp3	NM_008343 Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 3	F: CCCTTCCAAGGCAGAAAGC R: GGCAATGTACGTCTCTTTCC	26
Igfbp5	NM_010518 Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5	F: GCAAACCAAGATAGAGAGAGAC R: GCCTCAGCCTTCAGCTCGG	29
Il17b	NM_019508 Mus musculus interleukin 17B	F: GCCAAGAAGAAATGTGAAGTCAATC R: GGGTCGTGGTTGATGCTGTA	36
Inhba	NM_008380 Mus musculus inhibin beta-A	F: GGAGGGCCGAAATGAATGA R: CTTGGAAATCTCAAAGTGCAAGTGT	32
Itga3	NM_013565 Mus musculus integrin alpha 3	F: GTCTGGGACCTGCCAAGCTA R: CGATGACCTCAAAGGCAATGA	31
Itga5	NM_010577 Mus musculus integrin alpha 5	F: CGAAGAGCCAGTCCAATACCTT R: CTTCAAGTATGTCTCTGGGCTAGGA	34
Itgb3	NM_016780 Mus musculus integrin beta 3	F: GCTCAGATGAGACTTTGTCTCA R: GCTGAGTGGCCTAGCCTCC	38
Itgb5	NM_010580 Mus musculus integrin beta 5	F: CCAGATGGACTATCCATCGCT R: GGCTGTAAAATTCTTGATAGAGCA	31

Anhang

Jag1	NM_013822 Mus musculus jagged 1	F: GTTTTAAGGGAACAGACTGAGCTATATG R: ATGCTTCCAACCTTCACACAATTAATT	38
Krt1	NM_008473 Mus musculus keratin 1	F: AGGCTCTGCTGGCCTAGTCA R: AGAAGCCTCCTCCTGAAAATCTC	38
Lamb1-1	NM_008482 Mus musculus laminin B1 subunit 1	F: CACTGAAAAACATTGGCATTCTCT R: TGTTACTCTGTGAAGCTGTATCAGTTAATT	38
Lef1	NM_010703 Mus musculus lymphoid enhancer binding factor 1	F: CTGGCTACATAATGATGCCCAAT R: CACCACGGGCACTTTATTTGA	34
Lmo2	NM_008505 Mus musculus LIM domain only 2	F: ATGCGGGTGAAAGACAAAGTGT R: TCGGAGTTGATGAGAAGGTATCTG	36
Lor	NM_008508 Mus musculus loricrin	F: CGATGGGCTTAACTTTCTCATGA R: ACACCTTGAGCGACTCAATGG	35
LRRN3	NM_010733 Mus musculus leucine rich repeat protein 3, neuronal	F: GCAAGCATCTTTCCTCCACG R: TTGTGGGTGTTTCCTTCATGG	29
MMP2	NM_008610 Mus musculus matrix metalloproteinase 2	F: GGAGATACAATGAAGTGAAGAAGAAAATG R: GTCCACGACGGCATCCA	34
MMP3	NM_010809 Mus musculus matrix metalloproteinase 3	F: TGCTCATCCTACCCATTGCAT R: ACATCTTTTGCAAGGCCATAGTAGT	35
MMP11	NM_008606 Mus musculus matrix metalloproteinase 11	F: ACTCAGGAATCACCTGCAATGA R: AGATACTGGTCCAGTTGCTTAGCA	34
MMP14	NM_008608 Mus musculus matrix metalloproteinase 14	F: CTGTCCAAAATGAGGATCTAAATGG R: GGCGGAGGGATC GTTAGAAT	31
MMP16	NM_019724 Mus musculus matrix metalloproteinase 16	F: AACTTCAACACTCTAGCTATTCTTCGAA R: GCATTGGGTATCCATCCATCAC	34
Nedd9	NM_017464 Mus musculus neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	F: ATGCAGCTGGTCCCTGAATATT R: CGTCGTCTGGCACTGTCTTG	34
Neo1	NM_008684 Mus musculus neogenin	F: TGGTTTAAAGCCAAATACGCTCTA R: CTAATTCAAAGGTAGCGCCATGA	30
Notch2	NM_010928 Mus musculus Notch gene homolog 2	F: CCACCTGCCTGGATAAGATCG R: CTGCCCGTTGTTCCACACAC	32
Notch3	NM_008716 Mus musculus Notch gene homolog 3	F: CTGCCAAAGTGACATAGATGAGT R: GCCCTGTATAACCAAGAGGACA	32
Notch4	NM_010929 Mus musculus Notch gene homolog 4	F: AAGGCCAAAATAACCGTTAAGCT R: GCTGCCCTATTTCCAGGAAA	32
Nrg1	NM_178591 Mus musculus neuregulin 1	F: CCTAAACTTTCCACATCTACATC R: GGTTTGACAGGTCCTTCACCA	32
Nrg3	NM_008734 Mus musculus neuregulin 3	F: GAAGACTATATCCCACCTGCCTATACA R: TTGATGCATTTTGTGGGTTCT	32
Nrg4	NM_032002 Mus musculus neuregulin 4	F: CCCAGGCACAGGTCATTTTG R: CGTGCTCCGGTGTAATTTTCA	32
Pparg	NM_011146 Mus musculus peroxisome proliferator activated receptor gamma	F: GCAGCTACTGCATGTGATCAAGA R: GGGTGGGACTTTCTGCTAATAC	35
Pitx2	NM_001042502 Mus musculus paired-like homeodomain transcription factor 2	F: CCGAGTCCGGGTTTGGTT R: GGTTGCGTTCCCGCTTT	33
RhoB	NM_007483 Mus musculus ras homolog gene family member B	F: CGCTGAAGCTTTTTGTTGTTGA R: TGGTCAGAATGCTGTCTTATGCA	26

Anhang

Rock1	NM_009071 Mus musculus Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1	F: AGGCGGTGATGGCTATTATGG R: CAACCAAAGAATCTGCATAGAAAGG	32
Runx1	NM_009821 Mus musculus runt related transcription factor 1	F: CATGAAGAACCAGGTAGCGAGAT R: GCGGATTTGTAAAGACGGTGAT	34
Sema3b	NM_009153 Mus musculus semaphorin 3B	F: CGCATGTCTGTGTCTCGTGT T R: ACAAGCCGCGCCTTCA	33
Sema4c	NM_001126047 Mus musculus semaphorin 4C	F: TGCCAATGGTTATGTGCGTTTTA R: CGCTGTTGTAGTTTCCGTCGTA	36
Smad7	NM_001042660 Mus musculus MAD homolog 7 (Drosophila)	F: GTTTCTCCATCAAGGCTTTTGACT R: GTCCATGGTTGCTGCATGAAC	32
Smo	NM_176996 Mus musculus smoothened homolog (Drosophila)	F : GGACTATGTGCTATGCCAAGC R : AATGCCAGTGCCAAACATGGC	32
Snai2	NM_011415 Mus musculus snail homolog 2 (Drosophila)	F: CAGACACTATCTCAGGTGCCTTATAAA R: GGTAATCCAGAAAAGGCTGTCATT	36
Sort1	NM_019972 Mus musculus sortilin 1	F: TGGCAAATGACGTTGGTTCTAG R: ACAACTCAGGCCACTATGGATTTT	38
Sox4	NM_009238 Mus musculus SRY-box containing gene 4	F: TGC GTTTGGAAGATACTCCGG R: CGCCAACCTAGAGTCCCGG	35
Sox9	NM_011448 Mus musculus SRY-box containing gene 9	F: GTTTCAGATGCAGTGAGGAGCACT R: CAACACACGCACACATCCACATAC	28
Sox10	XM_900992 Mus musculus SRY-box containing gene 10, transcript variant 2	F: TCCATAGTCGCCATGTTCTATC R: GCAACCAGAAGCATTGATTTTATTAC	34
Spry2	NM_011897 Mus musculus sprouty homolog 2 (Drosophila)	F: ATAATCCGAGTGCAGCCTAAATC R: CGCAGTCCTCACACCTGTAG	32
Tgif	NM_009372 Mus musculus TG interacting factor	F: TTCTGCGAGACTGGCTGTATGA R: AGACCTGTAGTGTGGACAGGTGTGT	35
Tgfb1	NM_011577 Mus musculus transforming growth factor beta 1	F: CGCAACAACGCCATCTATGAG R: GCTCTGCACGGGACAGCAAT	34
Tgfb2	NM_009367 Mus musculus transforming growth factor beta 2	F: TTGCCCTCCTACAGACTGGA R: TGTTGATCTTGGGCGTATT	34
Tgfb3	NM_009368 Mus musculus transforming growth factor beta 3	F: GGAAATCAAATTC AAAGGAGGTGG R: AGTTGGCATAGTAACCCTTAGG	34
Tgfr1	NM_009370 Mus musculus transforming growth factor, beta receptor I	F: ATTGCTGGTCCAGTCTGCTT R: CCTGATCCAGACCCTGATGT	34
Tgfr2	NM_009371 Mus musculus transforming growth factor, beta receptor II	F: TTAACAGTGATGTCATGGCC R: CCGTGGTAGGTGAGCTTGGG	34
Timp1	NM_011593 Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 1	F: CTCACTGTTTGTGGACGGATCA R: TCTCCAAGTGCACAAGCCTAGAT	38
Timp2	NM_011594 Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 2	F: CCAGAAGAAGAGCCTGAACCA R: GTCCATCCAGAGGCACTCATC	30
Timp3	NM_011595 Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 3	F: CTCAAGTGCCCTCCCATATGTAT R: TGTCCATGTAAAAGGGAGGTGAT	26

Tle3	NM_009389 Mus musculus transducin-like enhancer of split 3	F: TGGACCCGATAGCCTCGGC R: TGGGATGGGATGTTGTGTAGG	30
TnC	NM_011607 Mus musculus tenascin C	F: GCTACCGACGGGATCTTCG R: TAGCCGTGGTACTGATGGTTT	28
Vadc	NM_011694 Mus musculus voltage-dependent anion channel 1	F: AGCCTGGAAACCAAGTACAGATGG R: ATCAAAGGTGAGCTTCAGTCCACG	26
Wnt2	NM_023653 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 2	F: CTGGCTCTGGCTCCCTCTG R: GGAAGTGGTGTGGCACTCTG	33
Wnt2b	NM_009520 Mus musculus wingless related MMTV integration site 2b	F: GACACGTCCTGGTGGTACATAGG R: TGGGTAGCGTTGACACAAGT	35
Wnt3a	NM_009522 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 3A	F: CACCACCGTCAGCAACAGCC R: AGGAGCGTGTCACTGCGAAAG	36
Wnt5b	NM_009525 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 5B	F: ATGCCCGAGAGCGTGAGAAG R: ACATTTGCAGGCGACATCAGC	36
Wnt8a	NM_009290 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 8A	F: ACGGTGGAATTGTCCTGAGCATG R: GATGGCAGCAGAGCGGATGG	36
Wnt8b	NM_011720 Mus musculus wingless related MMTV integration site 8b	F: GGACTTCGAAGCGCTAACCG R: CATTTCGGGAGCATCACAGC	32
Wnt10a	NM_009518 Mus musculus wingless related MMTV integration site 10a	F: CCTGTTCTTCCTACTGCTGCTGG R: CGATCTGGATGCCCTGGATAGC	34
Wnt11	NM_009519 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 11	F: CTGAATCAGACGCAACACTGTAAAC R: CTCTCTCCAGGTCAAGCAGGTAG	36
Wnt16	NM_053116 Mus musculus wingless-related MMTV integration site 16	F: AGTAGCGGCACCAAGGAGAC R: GAAACTTTCTGCTGAACCACATGC	36

6.3.2 Sequenzen der Primer für Genotypisierungen

Bam up	TATGGACTGGCTGCTGCTTTTGTATTC
Bam down	TGGGGATAGAGGTAGAAAGACATA
Kpn up	TATTGGGTGTGGTTGTGGACTTTA
P20	TGTGTAGGACTTCATTCAGTTCT
P21	GTCTGTGATCGCAGCTCACTC
P23	ATGGCCGCTTTTCTGGATTC

6.4 Sequenzen der T β RII-spezifischen shRNAs

TβRII shRNA1:
5'-GATCCCCCTCCTGCATGAGCAACTGCATTCAAGAGATGCAGTTGCTCATGCAGGATTTTTTC-3'
TβRII shRNA2:
5'-GATCCCCGAAGTCCTGCATGAGCAACTTCAAGAGAGTTGCTCATGCAGGACTTCTTTTTTC-3'
TβRII shRNA3:
5'-GATCCCCATGAGTAATTGTAGTCACCTTCAAGAGAGGTGATGCTGCAGTTGCTCATTTTTTC-3'
TβRII shRNA4:
5'-GATCCCCCGTGCGCCAACAACATCAATTCAAGAGATTGATGTTGTTGGCGCACGTTTTTC-3'
TβRII shRNA5:
5'-GATCCCCAGAACGACAAGAACATTACTTCAAGAGAGTAATGTTCTTGTCGTTCTTTTTTC-3'

6.5 Sequenzen der MISSION™ shRNAs von Sigma-Aldrich

Smad4	
TRCN0000025885	5'-CCGGGCGATTGTGCATTCTCAGGATCTCGAGATCCTGAGAATGCAC AATCGCTTTTT-3'
Gata2	
TRCN0000085421	5'-CCGGCCTGCAACACACCACCCGATACTCGAGTATCGGGTGGTGTGT TGCAGGTTTTTG-3'
TRCN0000085422	5'-CCGGGAATCGGAAGATGTCCAGCAACTCGAGTTGCTGGACATCTTC CGATTCTTTTTG-3'
Runx1	
TRCN0000084808	5'-CCGGCCACAAAGAAATCCCTAGATACTCGAGTATCTAGGGATTTCTT TGTGGTTTTTG-3'
TRCN0000084810	5'-CCGGGCCCTCCTACCATCTATACTACTCGAGTAGTATAGTAGGTAGG AGGGCTTTTTTG-3'
Nedd9	
TRCN0000009791	5'-CCGGGCTGAGCTATTGGAGAGCAATCTCGAGATTGCTCTCCAATAG CTCAGCTTTTT-3'
TRCN0000009795	5'-CCGGGCAGTTGCTTTGCTTCTACTACTCGAGTAGTAGAAGCAAAGC AACTGCTTTTT-3'
Non-target shRNA-Kontrolle	
SHC002V	5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGTCTTTCATC TTGTTGTTTTT-3'

6.6 Ergebnisse der PCR-Arrays

6.6.1 Mouse Notch Signalling Pathway (PAMM-059)

Symbol	RefSeq	AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Difference	Fold Up- or Down- Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	Test Sample /Control Sample
Adam10	NM_007399	5,45	5,51	2,3E-02	2,2E-02	1,04	1,04
Adam17	NM_009615	6,70	6,66	9,6E-03	9,9E-03	0,97	-1,03
Aes	NM_010347	2,28	2,22	2,1E-01	2,1E-01	0,96	-1,04
Axin1	NM_009733	5,90	5,92	1,7E-02	1,7E-02	1,01	1,01
Cbl	NM_007619	6,05	6,13	1,5E-02	1,4E-02	1,06	1,06
Ccnd1	NM_007631	5,76	4,21	1,8E-02	5,4E-02	0,34	-2,93
Ccne1	NM_007633	18,02	7,17	3,8E-06	6,9E-03	0,00	-1845,76
Cd44	NM_009851	5,05	5,01	3,0E-02	3,1E-02	0,97	-1,03
Cdc16	NM_027276	4,07	4,24	6,0E-02	5,3E-02	1,13	1,13
Cdkn1a	NM_007669	4,76	4,69	3,7E-02	3,9E-02	0,95	-1,05
Cflar	NM_009805	7,03	6,64	7,7E-03	1,0E-02	0,76	-1,31
Chuk	NM_007700	6,23	6,44	1,3E-02	1,2E-02	1,16	1,16
Ctnnb1	NM_007614	1,68	2,09	3,1E-01	2,3E-01	1,33	1,33
Dll1	NM_007865	6,81	7,55	8,9E-03	5,3E-03	1,67	1,67
Dtx1	NM_008052	4,37	4,63	4,8E-02	4,0E-02	1,20	1,20
Ep300	NM_177821	8,83	8,69	2,2E-03	2,4E-03	0,91	-1,10
ErbB2	NM_001003817	9,22	8,39	1,7E-03	3,0E-03	0,56	-1,78
Figf	NM_010216	9,21	9,29	1,7E-03	1,6E-03	1,06	1,06
Fos	NM_010234	8,05	8,27	3,8E-03	3,2E-03	1,16	1,16
Fosl1	NM_010235	12,84	13,12	1,4E-04	1,1E-04	1,21	1,21
Fzd1	NM_021457	5,01	4,90	3,1E-02	3,3E-02	0,93	-1,08
Fzd2	NM_020510	5,46	5,45	2,3E-02	2,3E-02	0,99	-1,01
Fzd3	NM_021458	5,78	5,61	1,8E-02	2,0E-02	0,89	-1,13
Fzd4	NM_008055	7,65	7,38	5,0E-03	6,0E-03	0,83	-1,21
Fzd5	NM_022721	9,63	9,47	1,3E-03	1,4E-03	0,90	-1,12
Fzd6	NM_008056	7,28	7,85	6,4E-03	4,3E-03	1,48	1,48
Fzd7	NM_008057	7,55	7,53	5,3E-03	5,4E-03	0,99	-1,01
Gbp2	NM_010260	10,43	9,70	7,2E-04	1,2E-03	0,60	-1,66
Gli1	NM_010296	10,24	11,33	8,3E-04	3,9E-04	2,13	2,13
Gsk3b	NM_019827	2,94	2,96	1,3E-01	1,3E-01	1,01	1,01
Hes1	NM_008235	5,84	6,60	1,7E-02	1,0E-02	1,69	1,69
Hey1	NM_010423	6,13	6,96	1,4E-02	8,0E-03	1,78	1,78
Hoxb4	NM_010459	7,74	8,07	4,7E-03	3,7E-03	1,26	1,26
hr	NM_021877	11,37	11,35	3,8E-04	3,8E-04	0,99	-1,01
lfn3	NM_008337	14,45	15,61	4,5E-05	2,0E-05	2,23	2,23
Il17b	NM_019508	10,11	10,92	9,0E-04	5,2E-04	1,75	1,75
Il2ra	NM_008367	14,20	14,16	5,3E-05	5,5E-05	0,97	-1,03
Il6st	NM_010560	5,24	5,12	2,6E-02	2,9E-02	0,92	-1,09
Jag1	NM_013822	7,07	7,50	7,4E-03	5,5E-03	1,35	1,35
Jag2	NM_010588	6,11	6,35	1,4E-02	1,2E-02	1,18	1,18
Krt1	NM_008473	11,21	12,44	4,2E-04	1,8E-04	2,35	2,35

Anhang

Lfng	NM_008494	6,23	5,98	1,3E-02	1,6E-02	0,84	-1,19
Lmo2	NM_008505	7,02	7,72	7,7E-03	4,7E-03	1,62	1,62
Mycl1	NM_008506	4,10	4,44	5,8E-02	4,6E-02	1,27	1,27
Lor	NM_008508	7,50	8,33	5,5E-03	3,1E-03	1,78	1,78
Lrp5	NM_008513	6,32	6,99	1,3E-02	7,9E-03	1,59	1,59
Map2k7	NM_011944	11,76	12,30	2,9E-04	2,0E-04	1,45	1,45
Mfng	NM_008595	7,70	8,25	4,8E-03	3,3E-03	1,46	1,46
Mmp7	NM_010810	12,02	12,28	2,4E-04	2,0E-04	1,20	1,20
Mtap1b	NM_008634	2,07	2,24	2,4E-01	2,1E-01	1,13	1,13
Ncor2	NM_011424	9,10	9,46	1,8E-03	1,4E-03	1,28	1,28
Neurl	NM_021360	6,08	6,33	1,5E-02	1,2E-02	1,19	1,19
Nfkb1	NM_008689	7,23	7,06	6,7E-03	7,5E-03	0,89	-1,13
Nfkb2	NM_019408	8,50	8,12	2,8E-03	3,6E-03	0,77	-1,30
Notch1	NM_008714	6,16	6,41	1,4E-02	1,2E-02	1,19	1,19
Notch2	NM_010928	5,19	6,75	2,7E-02	9,3E-03	2,95	2,95
Notch3	NM_008716	8,10	10,02	3,6E-03	9,6E-04	3,78	3,78
Notch4	NM_010929	12,22	13,13	2,1E-04	1,1E-04	1,88	1,88
Nr4a2	NM_013613	7,07	6,74	7,4E-03	9,4E-03	0,80	-1,26
Numb	NM_010949	7,94	7,89	4,1E-03	4,2E-03	0,97	-1,04
Pax5	NM_008782	14,17	14,54	5,4E-05	4,2E-05	1,29	1,29
Pcaf	NM_020005	6,49	6,53	1,1E-02	1,1E-02	1,03	1,03
Pdpk1	NM_011062	4,50	4,78	4,4E-02	3,6E-02	1,21	1,21
Pofut1	NM_080463	7,06	6,83	7,5E-03	8,8E-03	0,85	-1,17
Pparg	NM_011146	10,18	9,46	8,6E-04	1,4E-03	0,61	-1,65
Psen1	NM_008943	5,44	5,49	2,3E-02	2,2E-02	1,04	1,04
Psen2	NM_011183	10,01	10,54	9,7E-04	6,7E-04	1,44	1,44
Psenen	NM_025498	4,38	4,37	4,8E-02	4,8E-02	0,99	-1,01
Ptcra	NM_011195	7,07	7,55	7,4E-03	5,3E-03	1,39	1,39
Rfng	NM_009053	5,15	5,13	2,8E-02	2,9E-02	0,99	-1,01
Runx1	NM_009821	9,75	11,88	1,2E-03	2,7E-04	4,38	4,38
Sel1l	NM_001039089	5,22	5,19	2,7E-02	2,7E-02	0,98	-1,02
Shh	NM_009170	10,79	10,72	5,6E-04	5,9E-04	0,95	-1,05
Stil	NM_009185	7,71	7,97	4,8E-03	4,0E-03	1,20	1,20
Snw1	NM_025507	3,48	3,64	9,0E-02	8,0E-02	1,12	1,12
Smo	NM_176996	4,84	4,97	3,5E-02	3,2E-02	1,09	1,09
Stat6	NM_009284	9,41	8,84	1,5E-03	2,2E-03	0,67	-1,48
Sufu	NM_015752	6,81	6,75	8,9E-03	9,3E-03	0,96	-1,04
Supt6h	NM_009297	4,68	4,66	3,9E-02	4,0E-02	0,99	-1,01
Tead1	NM_009346	6,27	6,25	1,3E-02	1,3E-02	0,99	-1,01
Tle1	NM_011599	4,71	5,05	3,8E-02	3,0E-02	1,27	1,27
Wisp1	NM_018865	8,68	8,30	2,4E-03	3,2E-03	0,77	-1,30
Wnt11	NM_009519	10,62	10,09	6,4E-04	9,2E-04	0,69	-1,44
Zic2	NM_009574	4,80	4,66	3,6E-02	4,0E-02	0,91	-1,10
Gusb	NM_010368	7,03	6,71	7,7E-03	9,6E-03	0,80	-1,25
Hprt1	NM_013556	4,21	4,24	5,4E-02	5,3E-02	1,02	1,02
Hsp90ab1	NM_008302	-0,49	-0,35	1,4E+00	1,3E+00	1,10	1,10
Gapdh	NM_008084	0,00	0,00	1,0E+00	1,0E+00	1,00	-1,00
Actb	NM_007393	-1,59	-1,65	3,0E+00	3,1E+00	0,96	-1,04

6.6.2 Mouse Wnt Signalling Pathway (PAMM-043)

Symbol	Well	AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Difference	Fold Up- or Down-Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	Test Sample /Control Sample
		Aes	NM_010347	2,82	2,73	1,4E-01	1,5E-01
Apc	NM_007462	5,00	5,14	3,1E-02	2,8E-02	1,10	1,10
Axin1	NM_009733	6,03	6,07	1,5E-02	1,5E-02	1,03	1,03
Bcl9	NM_029933	6,81	6,99	8,9E-03	7,9E-03	1,13	1,13
Btrc	NM_009771	6,17	6,25	1,4E-02	1,3E-02	1,06	1,06
Ctnnbip1	NM_023465	10,91	11,61	5,2E-04	3,2E-04	1,62	1,62
Ccnd1	NM_007631	6,04	4,56	1,5E-02	4,2E-02	0,36	-2,79
Ccnd2	NM_009829	1,78	0,89	2,9E-01	5,4E-01	0,54	-1,85
Ccnd3	NM_007632	4,11	3,80	5,8E-02	7,2E-02	0,81	-1,24
Csnk1a1	NM_146087	3,03	3,18	1,2E-01	1,1E-01	1,11	1,11
Csnk1d	NM_139059	4,33	3,98	5,0E-02	6,3E-02	0,78	-1,27
Csnk2a1	NM_007788	3,87	3,88	6,8E-02	6,8E-02	1,01	1,01
Ctbp1	NM_013502	3,29	3,37	1,0E-01	9,7E-02	1,06	1,06
Ctbp2	NM_009980	4,37	4,39	4,8E-02	4,8E-02	1,01	1,01
Ctnnb1	NM_007614	2,10	2,42	2,3E-01	1,9E-01	1,25	1,25
Daam1	NM_172464	4,42	4,36	4,7E-02	4,9E-02	0,96	-1,04
Dixdc1	NM_178118	6,73	6,78	9,4E-03	9,1E-03	1,04	1,04
Dkk1	NM_010051	13,11	13,80	1,1E-04	7,0E-05	1,61	1,61
Dvl1	NM_010091	8,30	8,44	3,2E-03	2,9E-03	1,10	1,10
Dvl2	NM_007888	6,85	6,79	8,7E-03	9,0E-03	0,96	-1,04
Ep300	NM_177821	9,19	9,12	1,7E-03	1,8E-03	0,95	-1,05
Fbxw11	NM_134015	5,31	5,44	2,5E-02	2,3E-02	1,09	1,09
Fbxw2	NM_013890	5,14	5,00	2,8E-02	3,1E-02	0,91	-1,10
Fbxw4	NM_013907	5,96	6,13	1,6E-02	1,4E-02	1,13	1,13
Fgf4	NM_010202	16,31	16,27	1,2E-05	1,3E-05	0,97	-1,03
Fosl1	NM_010235	14,06	14,10	5,9E-05	5,7E-05	1,03	1,03
Foxn1	NM_008238	10,94	11,02	5,1E-04	4,8E-04	1,06	1,06
Frat1	NM_008043	7,42	7,66	5,8E-03	4,9E-03	1,18	1,18
Frzb	NM_011356	11,00	11,43	4,9E-04	3,6E-04	1,35	1,35
Fshb	NM_008045	12,02	12,38	2,4E-04	1,9E-04	1,28	1,28
Fzd1	NM_021457	5,23	5,13	2,7E-02	2,9E-02	0,93	-1,07
Fzd2	NM_020510	5,96	5,80	1,6E-02	1,8E-02	0,90	-1,12
Fzd3	NM_021458	5,96	5,88	1,6E-02	1,7E-02	0,95	-1,06
Fzd4	NM_008055	7,75	7,63	4,6E-03	5,0E-03	0,92	-1,09
Fzd5	NM_022721	10,56	9,76	6,6E-04	1,2E-03	0,57	-1,74
Fzd6	NM_008056	7,56	7,78	5,3E-03	4,5E-03	1,16	1,16
Fzd7	NM_008057	8,07	8,06	3,7E-03	3,7E-03	0,99	-1,01
Fzd8	NM_008058	8,55	8,98	2,7E-03	2,0E-03	1,35	1,35
Gsk3b	NM_019827	3,03	3,09	1,2E-01	1,2E-01	1,04	1,04
Jun	NM_010591	5,13	4,71	2,9E-02	3,8E-02	0,75	-1,34
Kremen1	NM_032396	7,74	7,85	4,7E-03	4,3E-03	1,08	1,08
Lef1	NM_010703	7,20	8,10	6,8E-03	3,6E-03	1,87	1,87
Lrp5	NM_008513	7,05	7,26	7,5E-03	6,5E-03	1,16	1,16

Anhang

Lrp6	NM_008514	6,87	7,01	8,5E-03	7,8E-03	1,10	1,10
Myc	NM_010849	5,29	5,48	2,6E-02	2,2E-02	1,14	1,14
Nkd1	NM_027280	6,19	5,83	1,4E-02	1,8E-02	0,78	-1,28
Nlk	NM_008702	5,77	6,08	1,8E-02	1,5E-02	1,24	1,24
Pitx2	NM_011098	14,24	15,40	5,2E-05	2,3E-05	2,23	2,23
Porcn	NM_023638	6,37	6,64	1,2E-02	1,0E-02	1,21	1,21
Ppp2ca	NM_019411	2,31	2,24	2,0E-01	2,1E-01	0,95	-1,05
Ppp2r1a	NM_016891	1,81	1,97	2,9E-01	2,6E-01	1,12	1,12
Ppp2r5d	NM_009358	4,71	4,74	3,8E-02	3,7E-02	1,02	1,02
Pygo1	XM_134865	6,97	7,21	8,0E-03	6,8E-03	1,18	1,18
Rhou	NM_133955	6,11	5,70	1,4E-02	1,9E-02	0,75	-1,33
Senp2	NM_029457	5,37	5,30	2,4E-02	2,5E-02	0,95	-1,05
Sfrp1	NM_013834	3,91	3,18	6,7E-02	1,1E-01	0,60	-1,66
Sfrp2	NM_009144	8,52	9,09	2,7E-03	1,8E-03	1,48	1,48
Sfrp4	NM_016687	10,72	10,60	5,9E-04	6,4E-04	0,92	-1,09
Slc9a3r1	NM_012030	4,55	3,75	4,3E-02	7,4E-02	0,57	-1,74
Sox17	NM_011441	12,00	12,32	2,4E-04	2,0E-04	1,25	1,25
T	NM_009309	12,52	12,90	1,7E-04	1,3E-04	1,30	1,30
Tcf3	NM_009332	10,09	9,62	9,2E-04	1,3E-03	0,72	-1,39
Tcf7	NM_009331	8,68	8,53	2,4E-03	2,7E-03	0,90	-1,11
Tle1	NM_011599	5,19	5,56	2,7E-02	2,1E-02	1,29	1,29
Tle2	NM_019725	6,35	6,36	1,2E-02	1,2E-02	1,01	1,01
Wif1	NM_011915	8,53	8,75	2,7E-03	2,3E-03	1,16	1,16
Wisp1	NM_018865	8,58	9,01	2,6E-03	1,9E-03	1,35	1,35
Wnt1	NM_021279	12,97	13,15	1,2E-04	1,1E-04	1,13	1,13
Wnt10a	NM_009518	12,90	14,29	1,3E-04	5,0E-05	2,62	2,62
Wnt11	NM_009519	11,13	9,86	4,5E-04	1,1E-03	0,41	-2,41
Wnt16	NM_053116	14,77	12,92	3,6E-05	1,3E-04	0,28	-3,61
Wnt2	NM_023653	13,07	13,84	1,2E-04	6,8E-05	1,71	1,71
Wnt2b	NM_009520	10,59	10,03	6,5E-04	9,6E-04	0,68	-1,47
Wnt3	NM_009521	11,76	12,23	2,9E-04	2,1E-04	1,39	1,39
Wnt3a	NM_009522	7,44	8,37	5,8E-03	3,0E-03	1,91	1,91
Wnt4	NM_009523	7,98	7,91	4,0E-03	4,2E-03	0,95	-1,05
Wnt5a	NM_009524	7,29	7,50	6,4E-03	5,5E-03	1,16	1,16
Wnt5b	NM_009525	8,66	9,66	2,5E-03	1,2E-03	2,00	2,00
Wnt6	NM_009526	11,18	11,71	4,3E-04	3,0E-04	1,44	1,44
Wnt7a	NM_009527	7,35	6,82	6,1E-03	8,9E-03	0,69	-1,44
Wnt7b	NM_009528	5,72	6,18	1,9E-02	1,4E-02	1,38	1,38
Wnt8a	NM_009290	17,23	15,82	6,5E-06	1,7E-05	0,38	-2,66
Wnt8b	NM_011720	5,51	5,75	2,2E-02	1,9E-02	1,18	1,18
Wnt9a	NM_139298	8,95	9,54	2,0E-03	1,3E-03	1,51	1,51
Gusb	NM_010368	7,03	6,67	7,7E-03	9,8E-03	0,78	-1,28
Hprt1	NM_013556	4,25	4,29	5,3E-02	5,1E-02	1,03	1,03
Hsp90ab1	NM_008302	-0,30	-0,21	1,2E+00	1,2E+00	1,06	1,06
Gapdh	NM_008084	0,00	0,00	1,0E+00	1,0E+00	1,00	-1,00
Actb	NM_007393	-1,45	-1,49	2,7E+00	2,8E+00	0,97	-1,03

7 Veröffentlichungen

S. Ahrens*, T. Vogel*, K. Krieglstein

Transforming growth factor β induces neurogenesis from cortical and hippocampal progenitors through activation of Nedd9

Journal of Neuroscience (Manuskript eingereicht)

* geteilte Erstautorenschaft

Posterbeiträge

S. Ahrens, T. Vogel, K. Krieglstein

Evaluation of TGF- β target genes in primary cortical and hippocampal neurons

23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, September 2006, Würzburg.

S. Ahrens, T. Vogel, K. Krieglstein

Evaluation of TGF- β target genes in primary hippocampal cultures

31. Göttinger Neurobiologen-Tagung /7th Meeting of the German Neuroscience Society, März 2007, Göttingen.

S. Ahrens, T. Vogel, K. Krieglstein

TGF- β function in primary hippocampal and cortical neurons

31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie/31th Meeting of the German Society for Cell Biology, März 2008, Marburg

8 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Kerstin Krieglstein dafür, dass sie mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Arbeit unter den hervorragenden Laborbedingungen ihres Institutes anfertigen zu können. Darüber hinaus danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen sowie für ihre stets freundliche Unterstützung.

Frau Dr. Tanja Vogel danke ich für die engagierte Betreuung, die Durchsicht des Manuskriptes sowie ihre Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Fragen, die wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Wimmer und Herrn Prof. Dr. Pieler danke ich für die Übernahme des Erst- bzw. Zweit-Gutachtens meiner Dissertation sowie für ihre kritischen und hilfreichen Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Heinrich, Herrn Prof. Dr. Wodarz, Herrn Prof. Dr. Doenecke und Herrn Prof. Dr. Bucher danke ich für ihre Bereitschaft, die Prüfungskommission zu bilden.

Mein herzlicher Dank gilt auch Sandra Heinzl und Marion Pieper, die mir auf vielfältige Weise hilfreich zur Seite standen. Außerdem möchte ich mich bei Helmut Gerlach bedanken, für seine geduldige und kompetente Hilfestellung bei allen PC-Angelegenheiten.

Frau Dr. Anke Lacman und Gabi Curdt-Hollmann danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der Präparation hippokampaler Primärkulturen.

Dr. Sebastian Kügler danke ich für die Bereitstellung der Adeno-assoziierten Viren und Manuel Garrido für die Unterstützung bei der Klonierung der shRNA-Vektoren.

Den Tierpflegern der zentralen tierexperimentellen Einrichtung danke ich für die angenehme und problemlose Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die vielen Dinge, die ich von ihnen lernen konnte.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen meine Eltern, denen ich viel zu verdanken habe.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sandra Ahrens
Geburtsdatum und Ort: 03.08.1977 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

09/2005 – 12/2008
Institut für Neuroanatomie, Georg-August-Universität Göttingen
(Prof. Dr. K. Krieglstein)
Thema: Untersuchungen zur Bedeutung von TGF- β während
der Entwicklung des Vorderhirns

Wissenschaftliche Tätigkeit

02/2005 – 08/2005
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Allgemeine
Zoologie der Universität Kaiserslautern

Studium

10/1997 – 02/2004
Studium der Biologie an der Leibniz Universität Hannover
Prüfungsfächer: Neurobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie,
Spezielle Physiologie

03/2003 – 11/2003
Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Experimentelle
Endokrinologie in Hannover (Prof. Dr. G. Eichele)
Thema: Etablierung einer Elektroporationsmethode zur *in vitro*-
Transfektion von Gehirnexplantaten

02/2004
Abschluss: Diplom-Biologin (Note: sehr gut)

Schulbildung

1984 – 1988
Grundschule, Sehnde
1988 – 1997
Gymnasium Andreanum, Hildesheim
Abschluss: Abitur (Note: 1,9)