

**Analyse von molekularen  
Interaktionen nach Stimulierung  
von Nukleotidrezeptoren während  
der neuronalen Entwicklung**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Ivette Grimm  
aus Chemnitz

Frankfurt am Main 2009

D30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. H. Zimmermann

Prof. Dr. W. Volknandt

Datum der Disputation:

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Adulte Neurogenese	1
1.1.1	Adulte Neurogenese im olfaktorischen System	3
1.1.2	Migration neuraler Vorläuferzellen im adulten Gehirn	6
1.2	Signalwirkung extrazellulärer Nukleotide	10
1.2.1	Nukleotidrezeptoren: P2-Rezeptoren	10
1.2.2	P2-Rezeptor-induzierte Signalwege	14
1.2.3	Signaltermination durch Ektonukleotidasen	21
1.3	RTKs und intrazelluläre Signalkaskaden	23
1.3.1	EGF und der EGF-Rezeptor	23
1.3.2	EGF-induzierte intrazelluläre Signalkaskaden	25
1.3.3	Rezeptortransaktivierung	27
1.4	Zielsetzung der Arbeit	30
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1	Zellkultur	32
2.1.1	Steriles Arbeiten	32
2.1.2	Präparation und Primärkultur adulter NSZ	34
2.1.3	Dissoziation von Neurosphären	34
2.1.4	Zellzahlbestimmung	35
2.1.5	Beschichten von Zellkulturoberflächen	36
2.1.6	Kultivierung adhärenter Monolayer für Westernblot-Studien	37
2.1.7	Kultivierung adhärenter Monolayer für immunzytologische Untersuchungen und F-Aktin-Analysen	37
2.1.8	Kultivierung adhärenter Monolayer für Boyden-Chamber-Assays	38
2.1.9	Immunzytologie	38
2.1.10	RT-PCR-Analyse	39
2.2	Inhibitorstudien zur Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden	41
2.2.1	Stimulation und Inhibition intrazellulärer Signalkaskaden in adulten NSZ	41
2.2.2	SDS-PAGE	43
2.2.3	Westernblot	44
2.2.4	Densitometrische Auswertung	45
2.2.5	Datenpräsentation	47

2.3	Migrationsanalysen .....	47
2.3.1	Zeit- und agonistenabhängige Akt- und FAK-Phosphorylierung ....	48
2.3.2	Agonisten-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes .....	48
2.3.3	Agonisten-stimulierte Migration .....	49
2.4	Materialien .....	50
2.4.1	Versuchstiere .....	50
2.4.2	Chemikalien .....	51
2.4.3	Puffer und Medien .....	53
2.4.4	Inhibitoren .....	57
2.4.5	Antikörper .....	57
2.4.6	Zubehör .....	58
2.4.7	Geräte .....	59
2.4.8	Software .....	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
3.1	Etablierung eines adhärennten NSZ-Kultursystems <i>in vitro</i> .....	61
3.1.1	Kultivierung adhärennter NSZ .....	61
3.1.2	Einfluss der Passagenanzahl auf die Proteinexpression adhärennter NSZ .....	64
3.1.3	Auswirkungen mechanischer Agitation auf die ERK1/2-Phosphorylierung .....	66
3.2	Nukleotid-, Nukleosid- und EGF-vermittelte Signalwege in adulten NSZ .....	67
3.2.1	Dosis- und zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung .....	68
3.2.2	ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte Raf-Phosphorylierung .....	70
3.2.3	Zeit- und dosisabhängige CREB-Phosphorylierung .....	71
3.2.4	Zeitabhängige Akt-Phosphorylierung .....	73
3.2.5	Zeitabhängige Src-Phosphorylierung .....	74
3.2.6	Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren .....	75
3.2.7	UDP-induzierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung .....	76
3.2.8	Adenosin-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung .....	77
3.2.9	MRS2365-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung .....	79
3.2.10	ADP $\beta$ S-vermittelte Aktivierung von P2Y <sub>1</sub> -, P2Y <sub>12</sub> und P2Y <sub>13</sub> -Rezeptoren .....	81
3.2.11	ADP $\beta$ S- und UTP-vermittelte Signalwege zur ERK1/2-Aktivierung	83
3.2.12	ADP $\beta$ S- und UTP-vermittelte Signalwege zur CREB-Aktivierung ..	86
3.2.13	ADP $\beta$ S-vermittelte Transaktivierung des EGF-Rezeptors .....	87

3.2.14	ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y <sub>1</sub> - und P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen	90
3.2.15	Adenosin-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen	93
3.2.16	MRS2365-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen	93
3.2.17	UTP-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in homo- und heterozygoten P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen	96
3.2.18	ERK-, CREB-, Akt- und Src-Grundphosphorylierung in P2Y <sub>1</sub> - und P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen.	98
3.3	Nukleotid- und EGF-vermittelte Migrationsprozesse in adulten NSZ	99
3.3.1	Agonisten-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes	99
3.3.2	Zeitabhängige Akt- und FAK-Phosphorylierung	102
3.3.3	Agonisten-abhängige Akt- und FAK-Aktivierung	102
3.3.4	Agonisten-stimulierte Migration	104
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1	Kultivierung und Charakterisierung adhärenter adulter NSZ <i>in vitro</i>	106
4.2	Adulte NSZ exprimieren Ektonukleotidasen und P2-Rezeptoren	110
4.3	P2-Rezeptor-Agonisten und EGF zeigen Unterschiede in der Aktivierung von Zielproteinen	113
4.4	Nukleotide und EGF aktivieren gleiche Zielproteine über unterschiedliche Signalwege	115
4.5	Nukleotide besitzen das Potenzial zur Transaktivierung des EGFR	116
4.6	Das Antwortverhalten in adulten NSZ ist bei P2Y <sub>1</sub> - und P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor-Knockout-Mäusen verändert	118
4.7	Die Migration adulter NSZ ist Akt- und FAK-abhängig	119
4.8	Mechanismen der Nukleotid- und EGF-induzierten Zellmigration	120
4.9	Migration von Vorläuferzellen	121
4.10	Funktionale Relevanz	122
4.11	Ausblick	124
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>125</b>
<b>A</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>

---

<b>B</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>151</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>156</b>
<b>D</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>157</b>
<b>E</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>159</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Adulte Neurogenese

Die Bildung von Neuronen im Gehirn – ein als Neurogenese bezeichneter Prozess – ist bis zum Zeitpunkt der Geburt weitestgehend abgeschlossen. Es gibt jedoch Ausnahmen: Die subventrikulären Zonen (SVZ) der Seitenventrikel generieren auch im postnatalen und adulten Gehirn große Mengen an olfaktorischen Interneuronen (Doetsch und Hen, 2005). Die neu gebildeten Neuroblasten migrieren hierbei von der SVZ über den rostralen Migrationsstrom (RMS) zum Bulbus olfactorius (OB), differenzieren sich dort oder unterliegen der Apoptose (Abbildung 1.1, Kapitel 1.1.1 und 1.1.2).

Auch in der subgranulären Zone (SGZ) des Hippokampus findet adulte Neurogenese statt (Abbildung 1.1, Kempermann et al., 2004b, Abrous et al., 2005, Lledo et al., 2006, Ehninger und Kempermann, 2008 und Mattiesen et al., 2009). Im Bereich des Gyrus dentatus (GD) erhält sich eine Population residueller Radialglia, die als Vorläuferzellen neuer Neuronen der Körnerzellschicht fungieren (Kempermann et al., 2004a). Sie bilden synaptische Kontakte (Markakis und Gage, 1999 und Carleton et al., 2003) und funktionale Verbindungen mit benachbarten Zellen sobald die Migration abgeschlossen ist (Corotto et al., 1993, Carlén et al., 2002, Belluzzi et al., 2003, Yamada et al., 2004, Carleton et al., 2003 und Wang et al., 2005a). Im Vergleich zur SVZ werden hier wesentlich weniger Neurone produziert; dies ist jedoch nicht minder bedeutsam, da im Hippokampus Informationen evaluiert und prozessiert werden, bevor sie im Neocortex ins Langzeitgedächtnis eingehen (Noctor et al., 2001).

Unter pathologischen Bedingungen gibt es zudem in weiteren Regionen Hinweise auf eine Neubildung von Nervenzellen. Zu diesen Gebieten gehören der Neokortex (Huang et al., 1998, Gould et al., 1999, 2001, Bernier et al., 2002 und Dayer et al., 2005), das Striatum (Dayer et al., 2005, Fowler et al., 2005 und Peng et al., 2008), die Amygdala (Bernier et al., 2002, Fowler et al., 2002, 2008, Kokoeva et al., 2005 und Xu et al., 2005), die Substantia nigra (Zhao et al., 2003 und Peng et al., 2008), der Hirnstamm (Bauer et al., 2005 und Charrier et al., 2006), das Tuberculum olfactorium (Bédard et al., 2002) und der piriforme Cortex (Pekcec et al., 2006).

Der Vorgang der adulten Neurogenese beschreibt einen komplexen, zeitlich und molekular genau abgestimmten Prozess. Er beginnt mit der Teilung einer neuralen Stammzelle und beinhaltet die gerichtete Migration der neuronalen Vorläuferzelle in einer noch undifferenzierten Form. Er umfasst die Einleitung der neuronalen Differenzierung im Zielgebiet, die funktionelle Integration in ein vorhandenes neuronales Netzwerk und erstreckt sich bis hin zum Überleben der neu gebildeten Neurone (Abrous et al., 2005, Farin et al., 2009a, 2009b und Basak und Taylor, 2009).

Eine beträchtliche Anzahl von Molekülen reguliert den Prozess der Neurogenese. Dazu zählen Wachstumsfaktoren (Kapitel 1.3.1 bis 1.3.3), Zelladhäsionsmoleküle, Komponenten der extrazellulären Matrix und Neurotransmitter (Riquelme et al., 2008 und Zhao et al., 2008). Studien zeigen die Beteiligung von Nukleotiden an der Regulation der embryonalen und adulten Neurogenese (Kapitel 1.2.2). Nukleotide agieren dabei als extrazelluläre Signalmoleküle über oberflächenständige P2-Rezeptoren (Kapitel 1.2.1). Ektonukleotidasen können extrazelluläre Nukleotide metabolisieren und beeinflussen somit maßgeblich deren räumliche und zeitliche Wirksamkeit (Kapitel 1.2.3).

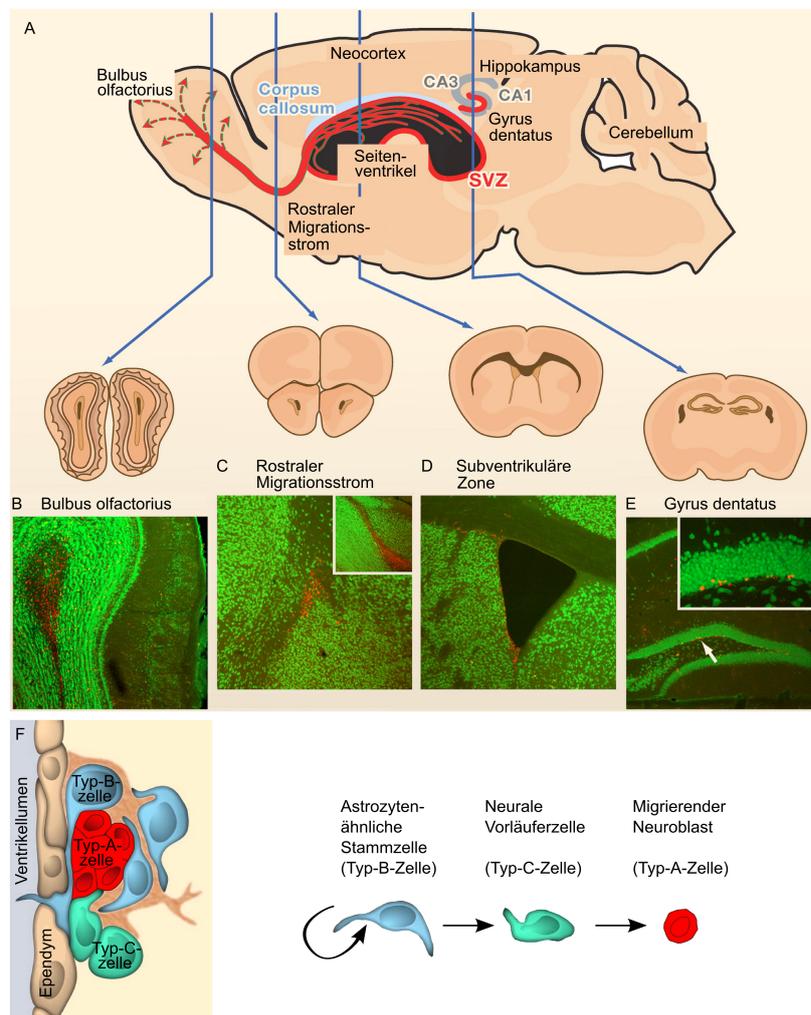
An der Identifizierung der an den verschiedenen Entwicklungsphasen beteiligten Transkriptionsfaktoren wurde intensiv geforscht (Kapitel 1.2.2). Die Komplexität

der damit verbundenen intrazellulären Signalwege ist jedoch bisher nur wenig verstanden (Hsieh und Gage, 2004).

### 1.1.1 Adulte Neurogenese im olfaktorischen System

Die subventrikuläre Zone ist eine wenige Zellen dicke Schicht, direkt unterhalb des einlagigen Ependyms gelegen. In Säugern wird folgender Entwicklungsablauf postuliert (siehe Abbildung 1.1): Eine Subpopulation von Stammzellen mit Eigenschaften von Astrozyten und Radialglia (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996) mit geringer Mitoserate, die sogenannten Typ-B-Zellen, produzieren transiente hochproliferative Vorläuferzellen, die Typ-C-Zellen. Diese wiederum bringen migrierende neuronale Vorläuferzellen, sogenannte Typ-A-Zellen oder Neuroblasten hervor (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996, Doetsch, 2003 und Riquelme et al., 2008).

Alle drei Zelltypen inkorporieren Bromodeoxyuridin (BrdU) sowie  $^3\text{H}$ -Thymidin (Taupin, 2007). Sie exprimieren das Intermediärfilamentprotein Nestin (Doetsch et al., 1997) und die gewebeunspezifische Form der alkalischen Phosphatase (TNAP) (Langer et al., 2007). Typ-B-Zellen sind zudem positiv für das saure gliale Faserprotein (GFAP) (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996), das Intermediärfilamentprotein Vimentin (Doetsch et al., 1997), das Zellmembran-assoziierte Saccharid „*stage specific embryonic antigen-1*“ (LexA/SSEA-1) (Capela und Temple, 2002), den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) (Liu et al., 2006) und die Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase-2 (NTPDase2) (Braun et al., 2003 und Langer et al., 2007). Sie stehen in engem Kontakt mit den Ependymzellen des Ventrikels und besitzen apikal oftmals ein einzelnes Cilium, das bis in die Seitenventrikel reicht (Tramontin et al., 2003). Die Zellen besitzen zudem lange basale Fortsätze, die in Kontakt mit Blutgefäßen stehen und Bündel von Neuroblasten umschließen (Mirzadeh et al., 2008).



**Abbildung 1.1** Neurogenese im adulten Mausgehirn. (A) Sagittale und koronale Ansichten von Gebieten adulten Neurogenese. Dazu zählen die SGZ des GD des Hippokampus und die SVZ der Seitenventrikel. In der SVZ gebildete Neuroblasten migrieren über den RMS in den OB. (B-E) Veranschaulichung der Neurogenese durch Inkorporation von BrdU in (B) den OB, (C) den RMS, (D) die SVZ, (E) den GD. Der Einsatz in (E) zeigt den mit einem Pfeil gekennzeichneten Bereich in höherer Auflösung. Rot, BrdU; grün, NeuN. (F) Zytoarchitektur der SVZ. Typ-B-Zellen sind in der Lage, schnell proliferierende Typ-C-Zellen zu generieren, welche wiederum Typ-A-Zellen (Neuroblasten) hervorbringen. Letztere bilden von Typ-B- und -C-Zellen ummantelte assoziierte Zellketten und wandern im RMS zum OB. Verändert nach Zhao et al., 2008.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Kontakt der B-Zellen mit der Ventrikelflüssigkeit und Blutgefäßen für Proliferation, Überleben und Differenzierung der Zellen nötig ist. So zeigen Studien in Mäusen, dass die Migrationsrichtung neuronaler Vorläuferzellen der SVZ *in vivo* vom Fluss der Cerebrospinalflüssigkeit vorgegeben wird (Sawamoto et al., 2006). Auch in fötalen Rattenhirnen wurde nachgewiesen, dass dieser für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen *in vitro* und *in vivo* essentiell ist (Owen-Lynch et al., 2003). In adulten Ratten wurde weiterhin gezeigt, dass der im Ependym von Blutgefäßen exprimierte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen der SVZ *in vitro* und *in vivo* stimuliert (Jin et al., 2002).

Typ-C-Zellen sind positiv für das Zellmembran-integrierte Proteoglykan NG2. Typ-A-Zellen exprimieren die polysialylierte Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (PSA-NCAM) (Doetsch et al., 1997), das Neuronen-spezifische  $\beta$ -III-Tubulin, das Mikrotubulus-assoziierte Protein *doublecortin* (DCX) und das Neuronen-assoziierte Protein Hu (Ayuso-Sacido et al., 2008).

Das der SVZ direkt angelagerte ventrikuläre Ependym kann die Neurogenese der SVZ beeinflussen. So finden sich das Knochen-morphogenetische Protein (BMP) und dessen Rezeptor in den Zellen der SVZ und inhibieren die Neurogenese *in vitro* und *in vivo* durch Hemmung der Neuronenbildung und direkte Stimulation der glialen Differenzierung. Das Glykoprotein Noggin wird von ependymalen Zellen exprimiert und wirkt diesem Mechanismus als Antagonist des BMP entgegen (Lim et al., 2000). Auch die Expression des neuronalen Wachstumsfaktors „*pigment epithelium-derived factor*“ (PEDF) durch das ventrikuläre Ependym fördert die Selbsterneuerung adulter neuraler Stammzellen der Maus *in vitro* (Ramírez-Castillejo et al., 2006).

Die in der SVZ gebildeten Neuroblasten wandern tangential entlang des RMS in den OB. Die wandernden Zellen bilden dabei dichte Bündel von Typ-A-Zellen, die von

einer Hülle aus langgestreckten Typ-B-Zellen ummantelt sind (Kapitel 1.1.2). Im OB angekommen, wandern die Zellen schließlich radial in die granuläre und periglobuläre Zellschicht der Bulbi ein, um sich hier zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)ergen und dopaminergen Interneuronen zu differenzieren (Lois et al., 1996, Abrous et al., 2005, Farin et al., 2009a, 2009b und Basak und Taylor, 2009).

Neurale Vorläuferzellen in der SVZ adulter Mäuse migrieren zum OB etwa 5 mm weit und es dauert etwa 15 Tage für SVZ-Vorläuferzellen von der Generierung, der Migration bis hin zur Differenzierung in neue olfaktorische Interneurone (Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Im adulten Nager werden so innerhalb von sechs Wochen im OB 65,3 - 76,9% der Neurone ersetzt (Kato et al., 2001). Schätzungen zufolge werden somit im adulten Nager-OB täglich 30 000 bis 60 000 neue Neurone gebildet (Lois und Alvarez-Buylla, 1994 und Biebl et al., 2000). Wie auch in der SGZ unterliegt ein beachtlicher Anteil der in der adulten SVZ neu gebildeten Zellen dem programmierten Zelltod (Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002).

### **1.1.2 Migration neuraler Vorläuferzellen im adulten Gehirn**

Im adulten Gehirn migrieren die in der SVZ geborenen Neuroblasten von den Wänden der Seitenventrikel über den RMS bis hin zum Bulbus olfactorius. Wie orientieren sich die Zellen über diese lange Distanz hinweg? Studien zeigen, dass der Fluss der Cerebrospinalflüssigkeit und die Bildung von Konzentrationsgradienten darin befindlicher Bestandteile die Migration neuraler Vorläuferzellen in fötalen Maushirnen leitet und deren Orientierung vorgibt (Sawamoto et al., 2006). Es wird angenommen, dass Slit-Proteine, welche im Septum (Hu und Rutishauser, 1996 und Wu et al., 1999) und Plexus choroideus (Hu, 1999) exprimiert werden als Chemorepellent wirken.

Studien zeigen, dass die Neuroblastenbündel in der dorsalen SVZ von einem in Migrationsrichtung verlaufenden Geflecht aus Blutgefäßen durchzogen sind, mit dem sie in enger Verbindung stehen (Shen et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass das vaskuläre System eine wichtige Funktion bei der Migration neuraler Stammzellen wahrnimmt. Gefäßzellen spielen in anderen Stammzellnischen eine entscheidende Schlüsselrolle, so zum Beispiel im Hippokampus (Palmer et al., 2000), in der ventrikulären Zone von Singvögeln (Louissaint et al., 2002), im Knochenmark (Kiel et al., 2005), im Darm und in der Haut (Fuchs et al., 2004). Zellen von Hirntumoren migrieren entlang von Blutgefäßen und stimulieren deren Wachstum durch Sekretion von VEGF (Gilbertson und Rich, 2007). Welche Funktion Blutgefäße bei der Migration von NSZ in der SVZ adulter Mäuse spielen, ist bisher jedoch nicht bekannt.

Die Migration entlang des RMS in den OB wird durch Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Interaktionen reguliert. Eines der ersten entdeckten Moleküle, welches die Migration neuraler Stammzellen durch den RMS reguliert, ist PSA-NCAM (Ono et al., 1994, Hu et al., 1996 und Chazal et al., 2000). Es wird von Neuroblasten der SVZ und des RMS exprimiert und reguliert die Migration positiv. Das Fehlen dieses Moleküls durch Einsatz von PSA-spaltender Endoneuramidase und NCAM-Knockout-Mäusen resultiert in einer gestörten Bildung der Migrationsbündel. Außerdem akkumulieren die Zellen in der SVZ (Hu, 2000).

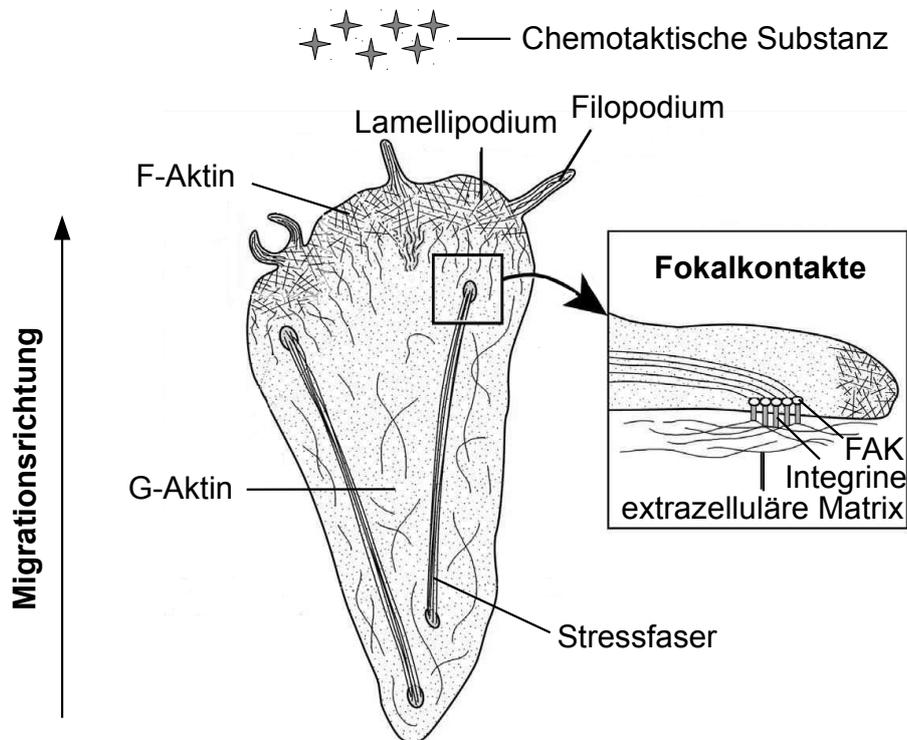
DCX ist ein weiteres Protein, welches von migrierenden Neuroblasten exprimiert wird (Brown et al., 2003). Es ist ein entscheidender Faktor der Mikrotubuli-Polymerisation und -Stabilisierung während der Zellmigration und Mitose (Moores et al., 2004). *In vitro*-Studien zeigen, dass die Inhibierung von DCX durch RNA-Interferenz (RNAi) die Zellmigration von Neurosphären reduziert (Ocbina et al., 2006). Adulte Mäuse zeigen dann einen vergrößerten RMS und eine gestörte Neuroblasten-Migration (Koizumi et al., 2006).

Integrine stellen eine wichtige Familie heterodimerer Zelloberflächenproteine dar, die an Komponenten der extrazellulären Matrix und an Rezeptoren benachbarter Zellen binden. In der postnatalen und adulten SVZ finden sich eine Vielzahl verschiedener Mitglieder der Integrinfamilie. Blockierende Antikörper gegen  $\alpha 6$ - oder  $\beta 1$ -Integrine stören die Migration massiv (Emsley und Hagg, 2003).

Die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors induziert sowohl die Proliferation neuraler Vorläuferzellen der SVZ (Craig et al., 1996), als auch deren Migration (Aguirre et al., 2005).

Die Zellmigration wird durch motilitätsfördernde oder chemotaktische Substanzen eingeleitet, was zur Festlegung der Zellpolarität führt (Abbildung 1.2). Die Migration ist ein zyklischer Prozess mit ständigem Auf- und Abbau des Aktin- und Mikrotubuliskelettes und den Kontakten mit der extrazellulären Matrix benachbarter Zellen bzw. der Unterlage. An der Vorderkante der Zelle wird ein Gerüst aus hochmolekularem filamentösen Aktin (F-Aktin) aufgebaut, was die Bildung von Filopodien und Lamellipodien zur Folge hat. Dieses Gerüst wächst durch Einbau niedermolekularen globulären Aktins (G-Aktin) weiter, während es an der Zellhinterseite wieder zu G-Aktin zerfällt. Gleichzeitig wird die Zellvorderseite mit Hilfe zelleigener Vesikel, die sich entlang von Mikrotubuli bewegen, mit Membranmaterial erweitert. Während Filopodien an der Front des Leitsaumes die Umgebung sondieren, schiebt sich die Zelle voran. Fokale Komplexe der Filopodien stellen erste Kontakte mit der extrazellulären Matrix benachbarter Zellen oder der Unterlage her, die sich mit weiterem Vorankriechen der Zelle im Lamellipodium zu stabilen Fokalkontakten ausbilden (Pantaloni et al., 2001, Carlier et al., 2003 und Wiesner et al., 2003).

Eines der Proteine, das am Auf- und Umbau der Fokalkontakte beteiligt ist, ist die Protein-Tyrosinkinase „Fokale Adhäsionskinase“ (FAK). Sie wird während der



**Abbildung 1.2** Schematische Repräsentation der zellulären Organisation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellmigration. Erläuterungen im Text (Kapitel 1.1.2). Verändert nach Bähler, 2009.

frühen Phase des Migrationsprozesses aus dem Zellinneren herangezogen und in neu entstehenden Haftstrukturen angereichert. Die 125 kDa schwere zytoplasmatische FAK stellt die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix über transmembranäre Integrine dar. Der Tyrosinrest 397 von FAK wird als erste Reaktion bei Anheftung auf die extrazelluläre Matrix phosphoryliert (Autophosphorylierungsstelle) und bindet im phosphorylierten Zustand an die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src, welches an die *Src-homology 2* (SH2)-Bindestelle der aktivierten FAK andockt (Eliceiri et al., 2002). Danach stimuliert FAK ihrerseits Mitglieder von Signalkaskaden, die den lokalen Aufbau des Zellskeletts regulieren. Dazu zählen das Adapter-Protein „Wachstumsfaktor-gebundenes Protein 2“ (Grb2)

und p85 und somit nachgeschaltet der ERK-Signalweg (Franchini et al., 2000) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg (Chen und Guan, 1994).

## **1.2 Signalwirkung extrazellulärer Nukleotide**

Der Ablauf der Neurogenese verlangt eine Vielzahl komplexer Prozesse der intra- und interzellulären Kommunikation. Während der letzten Jahre wurden zahlreiche der beteiligten Transkriptionsfaktoren untersucht. Die damit verbundene Komplexität der intrazellulären Signalwege ist jedoch nur wenig verstanden. Nukleotide können die Neurogenese regulieren und durch Interaktion mit anderen Signalwegen, inklusive Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Komponenten der extrazellulären Matrix diese vielschichtigen Prozesse modulieren.

### **1.2.1 Nukleotidrezeptoren: P2-Rezeptoren**

Extrazelluläre Nukleotide wie Adenosintriphosphat (ATP) und Uridintriphosphat (UTP) steuern zelluläre Funktionen als auto- oder parakrine Signalmoleküle, die von verschiedenen Zellsystemen sowohl konstitutiv als auch auf einen Stimulus hin freigesetzt werden können. Sie werden durch Zellyse, Exozytose, Vesikelfreisetzung, zellulären Stress wie Änderung der Osmolarität und mechanische Beanspruchung in den Extrazellulärraum entlassen.

Ihre Wirkung entfalten sie durch Bindung und Aktivierung von P2-Rezeptoren der Plasmamembran (Burnstock, 2009). Diese gliedern sich in zwei Proteinfamilien: ionotrope P2X-Rezeptoren und metabotrope P2Y-Rezeptoren. Sieben P2X-Rezeptorsubtypen (P2X<sub>1-7</sub>) (Khakh et al., 2001 und Jarvis und Khakh, 2009) und acht P2Y-Rezeptorsubtypen (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) (von K ugelgen, 2006 und Abbraccio et al., 2006a) wurden bisher im Sugler kloniert und funktionell beschrieben.

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die aus drei homo- oder heterologen Untereinheiten assembliert sind. Jede Untereinheit besitzt zwei membran-durchspannende Domänen, eine große extrazelluläre Schleife und intrazellulär gelegene C- und N-Termini. In der Zellmembran formen sie nach ATP-Bindung Kationenkanäle. Geöffnet lässt der P2X-Ionenkanal vor allem  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle ein- und  $\text{K}^+$  ausströmen (North und Barnard, 1997).

Die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren besitzen sieben hydrophobe Transmembrandomänen, drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen; der N-Terminus befindet sich dabei extra-, der C-Terminus intrazellulär. Alle bekannten P2Y-Rezeptoren besitzen an ihren extrazellulären Domänen vier Cysteinreste, die zwei Disulfidbrücken ausbilden: eine zwischen der N-terminalen Domäne und der dritten extrazellulären Schleife und eine weitere zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (Hoffmann et al., 1999 und Ding et al., 2003).

Natürliche P2Y-Rezeptorliganden binden nicht ausschließlich an einen Rezeptor-subtyp (Tabelle 1.1). Adenosindiphosphat (ADP) fungiert als Agonist für P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>11</sub>- (wird in der Maus nicht exprimiert), P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren. ATP ist ein voller Agonist der P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>11</sub>-Rezeptoren, jedoch ein partieller Agonist oder Antagonist für P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren. Obwohl die pharmakologischen Eigenschaften der P2Y-Rezeptoren zwischen den Spezies stark konserviert sind, können interessante Unterschiede festgestellt werden. Während UTP als Agonist des P2Y<sub>4</sub>-Rezeptors im Mensch und in der Ratte fungiert, wirkt ATP als Agonist des P2Y<sub>4</sub>-Rezeptors der Ratte, jedoch als Antagonist des menschlichen P2Y<sub>4</sub>-Rezeptors.

Die Bindung von Liganden aktiviert den entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor und das an den Rezeptor gekoppelte trimere G-Protein. Jeder Rezeptor-

P2-Rezeptor-subtyp	Agonisten	Antagonisten	Transduktionsmechanismen
P2Y <sub>1</sub>	ADP, ADP $\beta$ S, MRS2365 (spezifisch), 2-MeSADP, ATP, ATP $\gamma$ S, 2-MeSATP	Reactive Blue 2, MRS2179 (spezifisch)	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , PLC-Aktivierung
P2Y <sub>2</sub>	UTP, ATP, ATP $\gamma$ S, Ap4A	Suramin	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> und möglicherweise G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> , PLC- $\beta$ -Aktivierung
P2Y <sub>4</sub>	UTP, ATP, ITP	PPADS, Reactive Blue 2	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , PLC- $\beta$ -Aktivierung
P2Y <sub>6</sub>	UDP, UTP	PPADS, Reactive Blue 2, Suramin	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , PLC- $\beta$ -Aktivierung
P2Y <sub>12</sub>	ATP, ATP $\gamma$ S, 2-MeSATP, ADP, ADP $\beta$ S, 2-MeSADP	Reactive Blue 2, Suramin, MRS2365 (spezifisch), AR-C69931MX (Cangrelor)	G <sub>i</sub> , Inhibierung der Adenylylzyklase
P2Y <sub>13</sub>	ADP, ADP $\beta$ S, 2-MeSADP, ATP, 2-MeSATP, IDP	PPADS, Suramin, AR-C69931MX (Cangrelor)	G <sub>i</sub> und G <sub>16</sub> , Inhibierung der Adenylylzyklase
P2Y <sub>14</sub>	UDP-Glukose, UDP-Galaktose		G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> , Inhibierung der Adenylylzyklase

**Tabelle 1.1** Ausgewählte Agonisten, Antagonisten und intrazelluläre Transduktionsmechanismen der P2Y-Rezeptorfamilie der Maus (Abbraccio et al., 2006a und von Kügelgen, 2006).

Subtyp kann an mehrere Typen von G-Proteinen koppeln und diese aktivieren, wobei jedes verschiedene nachgeschaltete Signalwege vermittelt (Tabelle 1.1). Trimere G-Proteine bestehen aus drei assoziierten Untereinheiten, welche als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden (Hamm und Gilchrist, 1996). Trimere G-Proteine werden anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheiten klassifiziert. Bisher wurden 15 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten entdeckt, welche aufgrund von Gemeinsamkeiten in Sequenz- und Funktion in die

vier Unterfamilien  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$ , und  $G_{12/13}$  untergliedert werden. Zudem sind fünf  $\beta$  und 14  $\gamma$  Proteine bekannt.

Agonistenbindung an G-Protein-gekoppelte Proteine (GPCR) aktiviert den Rezeptor, was zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit und des  $\beta\gamma$ -Komplexes führt. Sowohl  $\alpha$ , als auch  $\beta\gamma$  können an intrazelluläre Effektoren binden und diese aktivieren. Dies können second-messenger-generierende Enzyme oder Ionenkanäle sein (Wickman und Clapham, 1995 und Krapivinsky et al., 1995). So stimuliert aktiviertes  $G_s$  die Adenylylzyklase, welche die Umwandlung von ATP zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert.  $G_s$ -Proteine sind durch Cholera toxin inhibierbar. Aktiviertes  $G_{i/o}$  verringert die cAMP-Konzentration zum einen durch Hemmung der Adenylylzyklase und zum anderen durch Stimulation von Phosphodiesterasen, die cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysieren.  $G_{i/o}$ -Proteine können durch Pertussis toxin gehemmt werden. Aktiviertes  $G_q$  induziert die Stimulation der Phospholipase C, was zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) führt und so unter anderem die Aktivierung von Proteinkinasen des Typs C (PKC) auslöst.  $G_q$ -Proteine sind durch RGS2/G0S8 hemmbar. Aktivierte  $G_{12/13}$  stimulieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des kleinen GTP-bindenden Proteins Rho (von K\u00fcgelgen, 2006).

Auch der nach Aktivierung des P2Y-Rezeptors freigesetzte  $\beta\gamma$ -Komplex kann die Adenylylzyklase sowohl aktivieren, als auch inhibieren. Zudem kann er die Phospholipase C, Phospholipase A<sub>2</sub>, PI3K und Raf1 aktivieren (Tang und Gilman, 1991).

GPCR können Homo- oder Heteromere bilden, was zu einer komplexen Vielfalt an Signalereignissen f\u00fchrt (Angers et al., 2002). Tabelle 1.1 zeigt eine Auswahl der P2Y-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten, der gekoppelten G-Proteine und die bei Aktivierung angesprochenen intrazellul\u00e4ren Zielproteine.

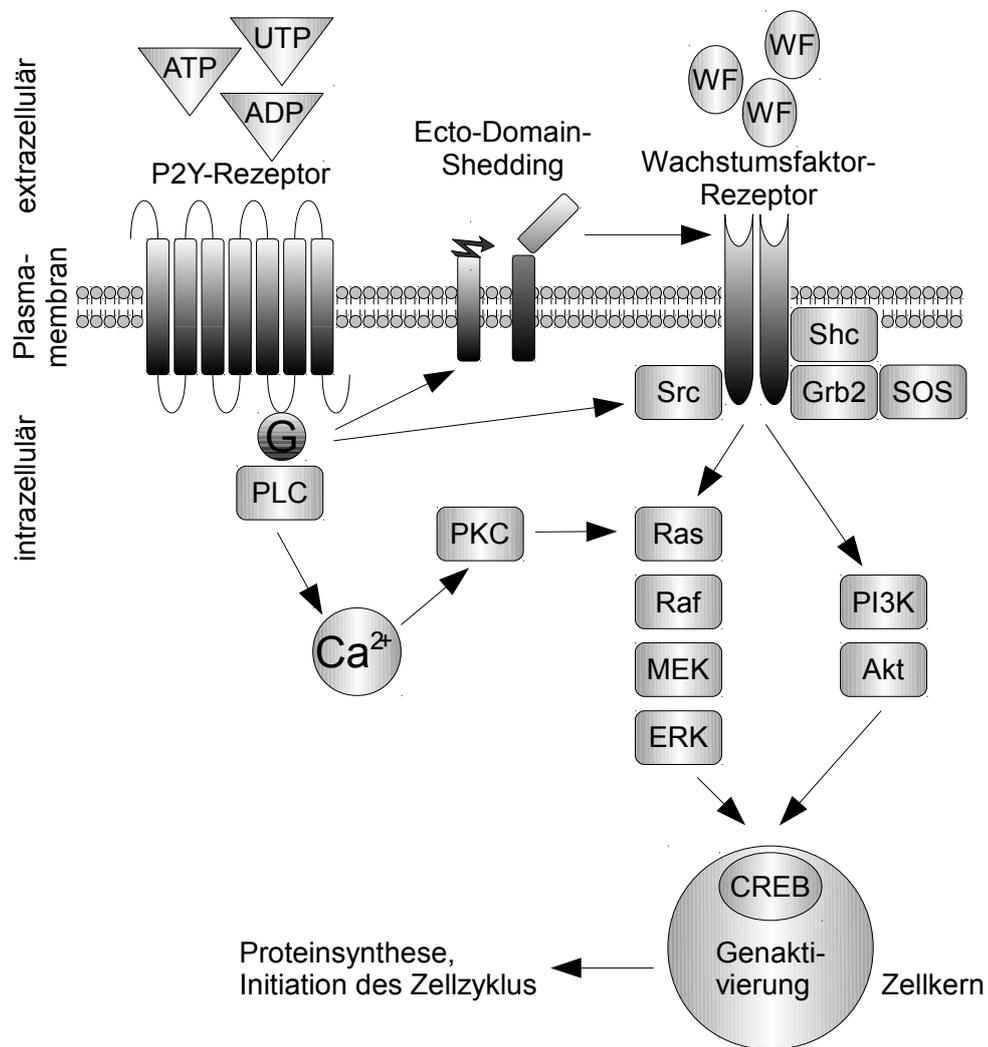
## 1.2.2 P2-Rezeptor-induzierte Signalwege

Intrazelluläre Signalkaskaden ermöglichen die Kommunikation zwischen G-Proteingekoppelten Rezeptoren und regulatorisch agierenden Zielproteinen innerhalb der Zelle. Diese Signalwege laufen vornehmlich über die sequenzielle Aktivierung oder Deaktivierung heterotrimerer und monomerer G-Proteine, Phospholipasen, Protein-kinasen, Adenylyl- und Guanylylzyklasen und Phosphodiesterasen ab, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren. Dazu zählen Zellproliferation, -differenzierung, -apoptose, -metabolismus, -sekretion und -migration. Zudem existiert eine große Anzahl verschiedener Ionenkanäle, Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptortyrosinkinasen, die durch P2Y-Rezeptoren moduliert und zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden angeregt werden. Abbildung 1.3 zeigt exemplarisch eine Übersicht möglicher P2-Rezeptor-induzierter Signalwege, die zur Zellproliferation führen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass als sekundäre Neurosphären kultivierte Neurale Stammzellen (NSZ) funktionelle Nukleotid-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>) aufweisen, über die intrazelluläre Kalzium-Transienten und eine gesteigerte Zellproliferation ausgelöst werden können. Dabei kommt es zu einer synergistischen Wechselwirkung mit dem Signalweg über den EGF-Rezeptor. Weiterhin konnte indirekt gezeigt werden, dass Neurosphären konstitutiv ATP freisetzen (Mishra et al., 2006). In einer weiteren Studie wurde die spontane Freisetzung von ATP in Neurosphären direkt nachgewiesen (Lin et al., 2007)

### 1.2.2.1 Ca<sup>2+</sup>- und PKC-abhängige Signalwege

Die Aktivierung von GPCR löst im Allgemeinen einen schnellen intrazellulären Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus. In diesen Vorgang sind verschiedene Isoformen der Phospholipase (PLC)-Familie involviert. Nach Aktivierung von G<sub>q</sub> oder aber auch G<sub>i/o</sub> aktiviert



**Abbildung 1.3** Überblick möglicher P2-Rezeptor-induzierter Signalkaskaden, die zur Proliferation führen.

sowohl die  $\alpha$ , als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins die  $\beta$ -Isoform der PLC durch Interaktion mit der C-terminalen Region des Enzyms (Rhee, 2001). Aktivierte PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu  $\text{IP}_3$  und DAG.  $\text{IP}_3$  bindet an intrazelluläre Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) und löst eine schnelle Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER ins Zytosol aus (Berridge et al., 2000, Kahl und Means, 2003 und Parekh und Putney, 2005).

Ziele für DAG sind die klassischen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und neuen ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) Isoformen der PKC, einer Phospholipid-abhängigen Proteinkinasefamilie. Sowohl konventionelle, als auch neue PKCs enthalten ein sich wiederholendes cysteinreiches Zinkfingermotiv, welches die Bindung von DAG und Phospholipid ermöglicht (Hurley et al., 1997). Im Gegensatz dazu binden atypische PKCs weder Phospholipid, noch DAG. Konventionelle PKCs haben zudem eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomäne, so dass DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  am Enzym synergistisch zusammen wirken können. Gleichzeitig bindet an dieser Domäne  $\text{PIP}_2$ , woraufhin das Enzym zur Plasmamembran transloziert wird (Evans et al., 2006).

Eine große Anzahl an Studien zeigt, dass GPCR-aktivierte PKCs in vielfältiger Weise zelluläre Funktionen regulieren. Sie zeigen dabei sowohl positive, als auch negative Effekte bei der Regulation des Zellzyklus und der Karzinogenese (Livneh und Fishman, 1997, Rozengurt, 1998, Di Mari et al., 2005 und Griner und Kazanietz, 2007). So inhibiert  $\text{PKC}_\delta$  die epitheliale Zellproliferation durch Eingriff in den Zellzyklus und apoptotische Vorgänge (Cerda et al., 2006), wohingegen  $\text{PKC}_\beta$  die epitheliale Zellproliferation fördert (Yu et al., 2003 und Li und Weinstein, 2006). Zwar spielen PKCs eine große Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, die Effekte sind jedoch von den PKC-Isoformen und dem Zellkontext-abhängig (Tan und Parker, 2003, Parker und Murray-Rust, 2004 und Griner und Kazanietz, 2007).

### 1.2.2.2 PI3K/Akt-abhängige Signalwege

Klassisch vermittelt der PI3K-Signalweg zelluläre Wirkungen von Insulin und Wachstumsfaktoren. Auf der einen Seite schützt die Aktivierung des PI3K-Signalweges dabei vor Apoptose, auf der anderen Seite spielt der PI3K-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels durch Insulin. Aber auch P2-Rezeptoren sind in der Lage die PI3K zu aktivieren.

Aktiviert werden PI3K durch Zelloberflächenrezeptoren. Die katalytische Untereinheit der PI3K vermittelt die Aktivierung dabei durch direkte Interaktion der SH2-Domäne mit Phosphotyrosin-Resten des aktivierten Rezeptors oder eines Adapterproteins. PI3Ks können auch mit  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen interagieren (Luo et al., 2003). Des Weiteren ist die direkte Aktivierung der PI3K durch Src beschrieben worden (Haynes et al., 2003). Als Antwort kommt es zu einer Akkumulation von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P3) innerhalb der Zelle. Spezifische Inhibitoren der PI3K sind Wortmannin und sein synthetisches Analogon LY294002.

Gut untersuchte Zielproteine der PI3K sind die Serin/Threonin-Kinase „Phosphoinositid-abhängige Kinase“ (PDK1) und die Proteinkinase Akt/PKB. Letztere ist eine Serin/Threonin-Kinase mit onkogener und antiapoptotischer Aktivität, welche durch angehäuften PI(3,4,5)P3 phosphoryliert und aktiviert wird und ihrerseits eine Reihe von Proteinen wie BAD, Forkhead, ERK, CREB, MDM2 und NF- $\kappa$ B aktiviert, was zur Verminderung apoptotischer Vorgänge führt. Auch eine Regulation der Proteinkinase C über einen Akt/PKB-unabhängigen Weg wurde beschrieben (Luo et al., 2003). Die PI3K ist in der Lage Ras und die damit assoziierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade zu aktivieren. Ras seinerseits kann aktivierend auf die PI3K zurückwirken (Sasaki et al., 2004). Auch die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges über Cdc42 durch die PI3K ist gezeigt worden (Timokhina et al., 1998).

### **1.2.2.3 GPCR-induzierte ERK-Aktivierung**

Einer der Hauptsignalwege, welcher durch Aktivierung von GPCR ausgelöst wird, ist der extrazellulär regulierte Kinase (ERK)-Signalweg (Rozengurt, 1998, Johnson und Lapadat, 2002 und Meloche und Pouyssegur, 2007). Die Dauer und Intensität

der ERK-Aktivierung scheint in Proliferation- und Differenzierung verschiedenster Zellsysteme von großer Bedeutung zu sein (Marshall, 1995 und Pouyssegur und Lenormand, 2003). Die Dauer des ERK-Signals wird von Zellen über die Produkte früh exprimierter Gene, wie c-Fos, wahrgenommen (Murphy et al., 2002, 2004). Ist die ERK-Aktivierung transient, schwächt sich dessen Aktivität ab, da c-Fos-Protein schnell abgebaut wird und nicht akkumulieren kann. Wird die Aktivierung von ERK jedoch aufrecht erhalten, wird c-Fos-Protein nicht abgebaut, es wird von ERK und RSK phosphoryliert, so dass sich dessen Stabilität stark erhöht und es akkumulieren kann (Murphy et al., 2002, 2004 und Sinnott-Smith et al., 2004).

Die Stimulation von P2-Rezeptoren führt mit Hilfe von Adapterproteinen wie SOS und Grb2 zur Aktivierung des in der Membran verankerten G-Proteins Ras. Aktiviertes Ras rekrutiert die Serin/Threonin-Kinase Raf zur Plasmamembran und aktiviert diese. Aktiviertes Raf führt zur Phosphorylierung von MEK1/2, welches seinerseits die Serin/Threonin-Kinase ERK1/2 phosphoryliert. Für eine vollständige Aktivierung von ERK1/2 ist die Phosphorylierung sowohl des Threoninrestes 183 als auch des Tyrosinrestes 185 des Threonin-X-Tyrosin-Motivs erforderlich. Aktiviertes ERK1/2 wirkt inhibitorisch auf den Grb/SOS-Komplex, so dass sich Grb von SOS löst und die Aktivierung von Ras beendet. Die Aktivierung von ERK1/2 führt zu seiner schnellen Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, CREB, ELK-1 und c-Myc durch Phosphorylierung an Serin- oder Threonin-Resten aktiviert und so in ihrer Aktivität reguliert werden (Segger und Krebs, 1995).

#### **1.2.2.4 Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB**

Extrazelluläre Stimuli aktivieren intrazelluläre Proteinkinasen, welche Transkriptionsfaktoren im Zellkern phosphorylieren und Veränderungen in der Genexpression der Zelle auslösen. Einige der am besten untersuchten Stimulus-aktivierten

Transkriptionsfaktoren sind das CRE-Bindeprotein (CREB) und andere Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie, wie der CRE-Modulator (CREM) und der aktivierende Transkriptionsfaktor 1 (ATF1). CREB bindet mit seinem Leucin-Zipper-Strukturmotiv unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand an Desoxyribonucleinsäuren (DNA). Die Aktivierung von CREB mit Hilfe des Transkriptionskoaktivators „CREB-Bindeprotein“ (CBP) erfolgt durch Phosphorylierung des Serinrestes 133 durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Mitogene, Neutrophine und andere neuronale Wachstumsfaktoren (Lonze und Ginty, 2002).

Signalwege, welche zur Phosphorylierung von CREB führen, beinhalten die Aktivierung von cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  und des PI3K/Akt-Signalweges. GPCRs aktivieren klassischerweise Adenylylzyklasen, die die Bildung des intrazellulären Botenstoffes cAMP katalysieren, welches seinerseits die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktivieren kann (Nichols et al., 1992). Einige Subtypen der Adenylylzyklase werden zudem durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert (Poser und Storm, 2001), welches mit einer großen Anzahl intrazellulärer Moleküle, wie dem gut charakterisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein CaM interagiert.  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM aktiviert die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen CaMKI, CaMKII und CaMKIV, welche alle die Fähigkeit besitzen, CREB zu phosphorylieren (Dash et al., 1991, Sheng et al., 1991, Ho et al., 2000, West et al., 2001, Kang et al., 2001, Anderson und Means, 2002 und Wei et al., 2002). Wachstumsfaktor-Rezeptoren können über Aktivierung des PI3K/Akt- (Du und Montminy, 1998) und MAPK-Signalweges (Böhm et al., 1995) ebenfalls zur CREB-Aktivierung führen. Bei Stress oder Wachstumsfaktorentzug kann CREB auch über den Signalweg der MAPK p38 durch Msk1 aktiviert werden (Wiggin et al., 2002).

Die Liste der möglichen CREB-Ziele beinhaltet Gene, welche Neurotransmission, Zellstruktur, Signaltransduktion, Transkription und Metabolismus kontrollieren.

Lonze und Kollegen haben eine Zusammenfassung von CREB-aktivierten Genen erstellt (Lonze et al., 2002). Die CREB-vermittelte Genexpression ist notwendig für das Überleben verschiedener neuronaler Subtypen (Riccio et al., 1999, 1999, Bonni et al., 1999 und Walton et al., 1999) und ist involviert in die Prozesse der Differenzierung und synaptischen Plastizität (Lonze et al., 2002).

Nach immunzytochemischer Markierung weist CREB eine starke, ubiquitäre Verteilung in der gesamten SVZ und im OB auf. Im Gegensatz dazu zeigt die phosphorylierte Form von CREB keine gleichmäßige Verteilung, sondern einen posterior-anterioren Gradienten entlang der SVZ. Phospho-CREB-positive Zellen sind nicht proliferative Zellen, und sie exprimieren kein GFAP, jedoch PSA-NCAM und DCX und zeigen eine bipolare Morphologie, Merkmale typisch für Neuroblasten (Giachino et al., 2005). Junge, neu generierte, jedoch keine reifen Neurone in der adulten SGZ und SVZ sind immunreaktiv für Ser133-phosphoryliertes CREB, (Bender et al., 2001, Nakagawa et al., 2002a und Giachino et al., 2005). Die Aktivierung von CREB führt zur Erhöhung von Proliferation, Differenzierung und Überleben im adulten Hippokampus, wohingegen die Proliferation und Differenzierung in induzierbaren dominant-negativen CREB-Mutanten reduziert wird (Nakagawa et al., 2002b, 2002a und Fujioka et al., 2004). In der SVZ konnten ähnliche Effekte gezeigt werden (Giachino et al., 2005).

Neben der Fähigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ , CaMK zu aktivieren, kann auch der Ras/ERK-Signalweg induziert werden, welcher letztendlich auch in der Phosphorylierung von CREB enden kann (Bading und Greenberg, 1991, Davis et al., 2000, Dolmetsch et al., 2001 und Sweatt, 2001). Die Ras/MAPK-abhängige CREB-Phosphorylierung kann durch Kinasen der RSK- (RSK1, RSK2, RSK3) (De Cesare et al., 1998 und Xing et al., 1996, 1998) und MSK-Familien (MSK1, MSK2) (Deak et al., 1998) vollzogen werden.

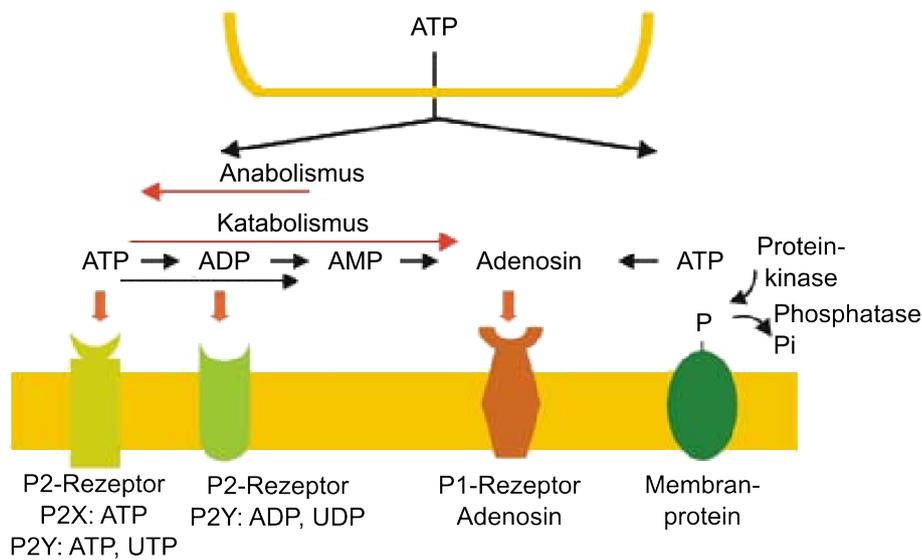
CREB kann durch Phosphatasen negativ reguliert werden. Die Phosphatasen PP1 und PP2 sind in der Lage CREB am Serinrest 133 direkt zu dephosphorylieren (Alberts et al., 1994, Hagiwara et al., 1992, Wadzinski et al., 1993 und Genoux et al., 2002).

### **1.2.3 Signaltermination durch Ektonukleotidasen**

Die Wirkung von Nukleotiden wird reguliert und moduliert durch membranständige Ektonukleotidasen, die, je nach Subtyp, extrazelluläre Nukleotide bis zum Nucleosid abbauen können (Zimmermann, 2000 und Robson et al., 2006). Die Hydrolyse durch Ektoenzyme terminiert die durch Nukleotide ausgelöste Signalwirkung bzw. stellt mit den entstandenen Hydrolyseprodukten, wie Adenosin, neue Signalmoleküle zur Verfügung, die ihrerseits Signalkaskaden auslösen und regulieren können (Abbildung 1.4).

Im zentralen Nervensystem von Nagern erscheint die NTPDase2 erstmals perinatal und wird von der Ventrikelwand begrenzenden Zellen exprimiert. Mit der Entwicklung des Ependyms wechseln NTPDase-positive Zellen in den subependymalen Bereich, wo das Enzym schließlich im adulten Gehirn von Typ-B-Zellen, den vermutlichen Stammzellen, der SVZ kräftig exprimiert wird (Langer et al., 2007). Die NTPDase2 hydrolysiert präferentiell Nucleosidtriphosphate zu Nucleosiddiphosphaten. Sie wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals kloniert und funktionell charakterisiert (Kegel et al., 1997 und Heine et al., 1999). Zudem wurden über genetische Immunisierung spezifische Antikörper hergestellt.

Zudem exprimieren NSZ der SVZ adulter Mäuse die TNAP. Dieses Ektoenzym, ist in der Plasmamembran über einen GPI-Anker eingebettet und baut Nucleosidtri-, -di-, und -monophosphate ab (Zimmermann, 2000). Im embryonalen Gehirn liegt



**Abbildung 1.4** Potenzielle Mechanismen des Nukleotidmetabolismus und der Aktivierung purinergener Rezeptoren am Beispiel des ATP. Freigesetztes ATP wird durch Ektonucleotidasen schrittweise zu Adenosin metabolisiert (Katabolismus). ATP ist ein Agonist von P2X- und P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>-, P2Y<sub>4</sub>- und P2Y<sub>11</sub>-Rezeptoren. UTP aktiviert ausschließlich P2Y<sub>2</sub>-, P2Y<sub>4</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren. ADP dient als Agonist für P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren; UDP für P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren. Adenosin aktiviert P1-Rezeptoren. Die auch auf der Zelloberfläche lokalisierten Enzyme „Nucleosiddiphosphatkinase“ und „Adenylatkinase“ katalysieren die Bildung von ATP (Anabolismus). Proteine der Zelloberfläche können von Ektoprotein-kinasen phosphoryliert und von Ektophosphoproteinphosphatasen (wie die TNAP) dephosphoryliert werden. Verändert nach Zimmermann, 2006.

die TNAP ubiquitär verteilt vor. Im Embryonalstadium E14 exprimieren nahezu alle Zellen des Endhirnbläschens TNAP. Während der weiteren embryonalen und postnatalen Entwicklung beschränkt sich die Expression von TNAP auf die ventrikuläre und subventrikuläre Zone und konzentriert sich schließlich auf die unterhalb des Ependyms gelegene, wenige Zellen dicke Schicht der SVZ. Dort wird die TNAP von allen Typen von Vorläuferzellen (B-, C-, A-Zellen) exprimiert (Langer et al., 2007). Da die TNAP die komplette Hydrolysekette vom Nucleosidtriphosphat bis hin zum entsprechenden Nucleosid katalysiert, liegt ihre Funktion womöglich in der Bereitstellung von P2Y- bzw. P1-Rezeptor (Adenosin)-Liganden. Darüber hinaus

kann dieses Enzym Proteine dephosphorylieren und könnte so zusätzlich als Ekto-phosphoproteinphosphatase wirken.

Extrazelluläre Hydrolyse kompliziert die Bestimmung der durch Nukleotide ausgelösten Effekte und kann durch Verwendung hydrolysestabiler Agonisten oder Ekto-enzym-inhibitoren umgangen werden. Einige P2Y-Rezeptorantagonisten wie Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2', 4'-disulphat (PPADS), Suramin, Reactive Blue 2 und DIDS sind Inhibitoren Nukleotid-hydrolysierender Enzyme und werden bei der Untersuchung von Nukleotid-induzierten Signalwegen eingesetzt.

### **1.3 RTKs und intrazelluläre Signalkaskaden**

Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) sind wichtige Bestandteile von Signaltransduktionswegen, die sich auf Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen auswirken. Die Vielzahl der RTK-Liganden und die Möglichkeit der Rezeptortransaktivierung führt zu einer großen Diversität der ausgelösten Signalkaskaden. Das am besten untersuchte Mitglied der RTK-Familie ist der EGF-Rezeptor und einer seiner Liganden, das EGF.

#### **1.3.1 EGF und der EGF-Rezeptor**

EGF wurde erstmals 1962 von Dr. Stanley Cohen in der Speicheldrüse der Maus entdeckt und isoliert (Cohen, 1962), wofür er 1968 den Nobelpreis für Medizin erhielt. Einige Jahre später wurde Urogastron, welches die Sekretion von Magensaft hemmt, aus dem menschlichen Urin isoliert und später als EGF identifiziert (Carpenter und Cohen, 1979, Yamada et al., 1997 und Gregory, 1975). Seine endgültige Bezeichnung „Epidermaler Wachstumsfaktor“ erhielt das Protein aufgrund seines proliferationsfördernden Effektes auf ekto- und mesodermale Zellen (Carpenter und

Cohen, 1979 und Yamada et al., 1987, 1997). Eine zunehmende Anzahl an Studien zeigt, dass EGF eine entscheidende Rolle bei den Prozessen der Neurogenese spielt.

EGF besteht aus 53 Aminosäuren und wird durch proteolytische Spaltung aus einer aus 1217 Aminosäuren aufgebauten membrangebundenen Vorstufe freigesetzt (Yamada et al., 1997). Das EGF-Vorläuferprotein und das reife EGF konkurrieren dabei um die Bindung am EGF-Rezeptor. Die Interaktion des EGF-Vorläuferproteins der einen Zelle mit dem EGF-Rezeptor der Nachbarzelle kann so biologische Effekte, wie Zellmigration, Zellwachstum und morphologische Veränderungen in streng begrenzten Regionen auslösen.

Weitere, dem EGF ähnlich strukturierte Wachstumsfaktoren, werden in die sogenannte „EGF-Familie“ gruppiert. Dazu zählen der transformierende Wachstumsfaktor  $\alpha$  ( $TGF\alpha$ ), Amphiregulin (AR), Epigen, der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF),  $\beta$ -Cellulin (BTC), Epiregulin und Neureguline (NRG).

Die Mitglieder der ErbB/HER-Familie (ErbB2-4/HER2-4) sind dem EGF-Rezeptor (auch ErbB1/HER1 genannt) strukturell sehr ähnlich (Yamada et al., 1997). EGF,  $TGF\alpha$ , AR und Epigen binden und aktivieren ausschließlich den EGF-Rezeptor. HB-EGF, BTC und Epiregulin stellen Liganden sowohl für den EGF-Rezeptor, als auch für den ErbB4/HER4-Rezeptor dar. ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4-Rezeptoren werden von den Neuregulinen 1-4 aktiviert, wobei ErbB3/HER3 keine eigene funktionelle Kinasedomäne besitzt. ErbB2/HER2-Rezeptoren binden nicht direkt an Liganden, sondern stellen Heterodimerisierungspartner für die anderen ErbB/HER-Rezeptor-Mitglieder dar. So bilden sich nach Bindung des Liganden Rezeptorhomo- bzw. -heterodimere. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors führt letztendlich zur Auslösung komplexer intrazellulärer Signalkaskaden, welche Zellen zur Proliferation, Differenzierung oder zum Überleben führen (Wong, 2003, Schlessinger, 2002 und Schlessinger und Lemmon, 2003).

### 1.3.2 EGF-induzierte intrazelluläre Signalkaskaden

Der EGF-Rezeptor ist ein 170 kDa schweres Membranprotein mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch Bindung des Liganden und Dimerisierung des Rezeptors (Carpenter, 1987 und Yarden, 2001). Der durch die Zusammenlagerung erwirkte enge Kontakt beider Kinasen führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität durch *trans*-Autophosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als hochaffine Bindestellen für zytoplasmatische sekundäre Signalmoleküle, welche über SH2- oder Phosphotyrosinkinasebindende (PTB)-Domänen verfügen.

Proteine, die über SH2-Domänen direkt an den aktivierten EGF-Rezeptor binden, sind die PLC $\gamma$ , Ras-GTPase-aktivierendes Protein (Ras-GAP), Grb2, Nck, Shc und SHP-2 (van der Geer et al., 1994). Die Aktivierung der PLC $\gamma$  erfolgt durch Phosphorylierung von Tyrosinresten. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des membranständigen Phospholipides PIP $_2$  in DAG und IP3 (Yamada et al., 1997 und Jorissen et al., 2003). DAG ist der Aktivator von PKCs, einer Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche in der Zellwachstumskontrolle und Tumorgenese involviert sind (Nishizuka, 1992). IP3 induziert die Freisetzung von Ca $^{2+}$  aus dem ER ins Zytosol und reguliert auf diese Weise Ca $^{2+}$ -abhängige Prozesse in der Zelle.

Grb2, Nck und Shc besitzen keine katalytische Domäne und fungieren als Adapterproteine und Vermittler zwischen Rezeptortyrosinkinasen und intrazellulären Signalmolekülen. Grb2 verbindet den aktivierten EGF-Rezeptor mit dem Ras/ERK-Signalweg (Yamada et al., 1997, Yarden und Sliwkowski, 2001, Schlessinger und Ullrich, 1992 und Pawson, 1995). Mit seinen zwei *Src-homology 3* (SH3)-Domänen bindet Grb2 an den Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos. Der Grb2/Sos-Komplex bindet an den aktivierten EGF-Rezeptor über die SH2-Domäne von Grb2 und rekrutiert Sos an die Plasmamembran, wo Ras aktiviert wird. Das aktivierte Ras induziert

eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen über die Serin/Threonin Kinase Raf auf die Kinase MEK und schließlich auf die Kinase ERK (Yamada et al., 1997 und Gotoh und Nishida, 1993). Während man als Kinasesubstrat von Raf nur MEK kennt und für MEK als einzige Substrate die ERK-Isoformen identifiziert wurden, kann ERK nach Translokation in den Zellkern eine ganze Reihe an Substraten phosphorylieren. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Myc und CREB, deren Aktivierung zu einer direkten Veränderung der zellulären Genexpression führt (Yamada et al., 1997).

Eine alternative Route zur Wachstumsfaktor-ausgelösten Aktivierung von Ras kann über Shc erfolgen. Durch Bindung an den EGF-Rezeptor über seine SH2-Domäne wird Shc durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert und bindet an Grb2, was zur Aktivierung des Ras-Signalweges führt (Yamada et al., 1997, Schlessinger, 1994 und van der Geer et al., 1994). Shc besitzt neben der SH2-Domäne auch eine PTB-Domäne über welche es an den EGF-Rezeptor bindet und intrazelluläre Signalwege vermittelt (Yamada et al., 1997, Yarden und Sliwkowski, 2001 und Jorissen et al., 2003).

Die PI3K ist ein Heterodimer bestehend aus einer 85 kDa schweren regulatorischen und einer 110 kDa schweren katalytischen Untereinheit. Erstere besitzt zwei SH2-Domänen, durch welche die PI3K an Phosphotyrosinreste des Zielproteins, wie SHP, bindet und aktiviert wird (Bredt, 1998, Yamada et al., 1997 und Jorissen et al., 2003). EGF stimuliert also die PI3K-Aktivität über Adapterproteine; im Vergleich hierzu binden andere Wachstumsfaktoren, wie der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor und die Tyrosinkinase A (TrkA) direkt an die PI3K. Die nun zur Plasmamembran rekrutierte PI3K wird aktiviert und katalysiert dort die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub>. An die entstandenen Substrate bindet die Protein-kinase Akt über Pleckstrin-homologe (PH)-Domänen. Über Bindung eines weiteren

PH-Domänen aufweisenden Signalmoleküles, die Phosphoinosid-abhängige Kinase 1 (PDK1), wird Akt phosphoryliert und aktiviert. Akt kommt in drei eng miteinander verwandten Isoformen vor (Akt1-3), wobei bisher keine Substrat-spezifischen Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen festgestellt werden konnten.

Die Stimulation des EGF-Rezeptors kann ein weiteres Protein, die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src, an den Rezeptor rekrutieren und aktivieren. Src kann dabei mit bereits prä-assozierten Signalmolekülen wie Jak2, STAT3 (Olayioye et al., 1999), Shc oder Komponenten des Zytoskeletts (Wilde et al., 1999) interagieren oder direkt an den EGF-Rezeptor binden und diesen an zwei weiteren Tyrosinresten (Tyr845 und Tyr1101) phosphorylieren, die nicht der Autophosphorylierung unterliegen (Biscardi et al., 1999). Die Phosphorylierung an Tyrosin 845 steigert dabei die Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors. Da wichtige Signalmoleküle, wie z. B. des MAP-Kinase-Signalweges, der Fokalen Adäsion, Komponenten der JNK-Signalwege und Adapterproteine mittelbar oder unmittelbar durch Src aktiviert werden (Brown und Cooper, 1996 und Courtneidge, 2003), nimmt Src eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Signaltransduktion ein.

### **1.3.3 Rezeptortransaktivierung**

Eines der komplexeren Phänomene der Signaltransduktion ist die Rezeptortransaktivierung; die Fähigkeit eines Rezeptors, andere Rezeptoren über Signalereignisse zu aktivieren. Die Transaktivierung verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren, insbesondere des EGF- und PDGF-Rezeptors durch GPCRs wurde in verschiedenen Zellsystemen gezeigt (Arthur et al., 2006a, Filardo, 2002, Jeanneteau und Chao, 2006, Kanno et al., 2003 und Mori et al., 2006).

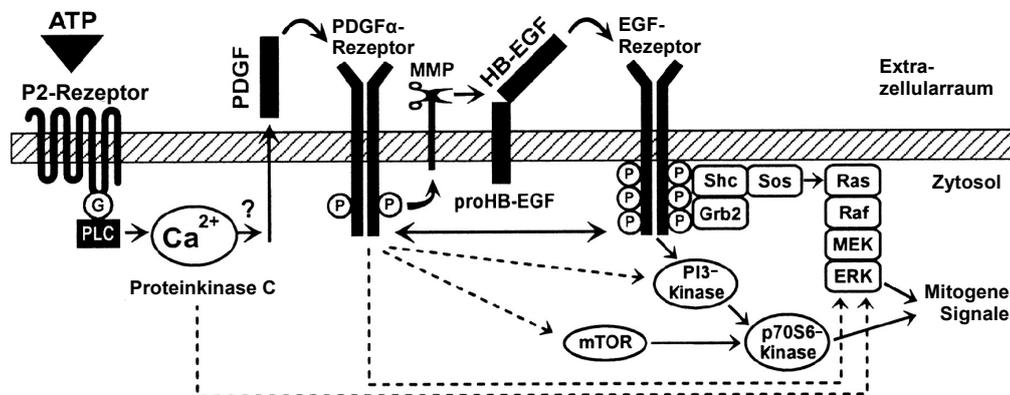
Die Rezeptortransaktivierung kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Ein Mechanismus ist die Aktivierung intrazellulärer Protein-Tyrosinkinasen wie Src und

PKC, welche dann Wachstumsfaktor-Rezeptoren phosphorylieren und aktivieren (Amos et al., 2005 und Roelle et al., 2003). Ein weiterer Mechanismus beinhaltet die Freisetzung membrangebundener Wachstumsfaktoren durch Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Mitglieder der *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM)-Familie (Kalmes et al., 2000, Mori et al., 2006 und Murasawa et al., 1998). Diese Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel pro-HB-EGF (Leserer et al., 2000) werden mittels Proteolyse zum reifen Molekül (HB-EGF) gespalten und können dann an den EGF-Rezeptor binden (Kumar et al., 2006). Dieser Prozess wird als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet.

Agonisten-aktivierte GPCRs können verschiedene MMPs (Fischer et al., 2006), wie MMP3 (Lee und Murphy, 2004), MMP2 und MMP9 (Le Gall et al., 2003 und Murasawa et al., 1998), sowie Mitglieder der ADAM-Metalloprotease-Familie, wie ADAM10, ADAM15 und ADAM17 (Gööz et al., 2006, Nebigil et al., 2000 und Prenzel et al., 1999) aktivieren. Die Transaktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt primär über Freisetzung von HB-EGF von der Membran (Leserer et al., 2000, Lucchesi et al., 2004 und Schäfer et al., 2004). Auch die Spaltung von pro-EGF zu EGF konnte gezeigt werden (Keely et al., 1998 und Nebigil et al., 2000).

Im Falle einer EGF-Rezeptortransaktivierung kann das GPCR-Signal durch Inhibition des EGF-Rezeptors mit Hilfe von EGF-Rezeptorkinaseinhibitoren (Hanawa et al., 2006 und Madarame et al., 2003), anti-EGF-Antikörpern (Gschwind et al., 2003 und Leserer et al., 2000) oder MMP-Inhibitoren (Kalmes et al., 2000 und Ota et al., 2003) abgemildert oder gehemmt werden (Fischer et al., 2006 und Kalmes et al., 2000).

Es konnte sowohl eine P2-Rezeptor-Agonisten-induzierte Reduktion (Langgut und Ogilvie, 1995) als auch eine Erhöhung (Soltoff, 1998) der Tyrosinkinase-Aktivität



**Abbildung 1.5** Vorgeschlagene Mechanismen der ATP-induzierten Transaktivierung des PDGF- und EGF-Rezeptors in retinalen Müllerzellen. Die Aktivierung des P2Y-Rezeptors durch ATP führt zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dadurch freigesetztes PDGF transaktiviert den PDGF $\alpha$ -Rezeptor und führt zur Aktivierung von Metalloproteasen, welche membrangebundenes proHB-EGF zu HB-EGF prozessieren. Das in den Extrazellulärraum entlassene HB-EGF führt zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Die aktivierten PDGF $\alpha$ - und EGF-Rezeptoren induzieren proliferative Prozesse in MAP-Kinase- und PI3K-abhängigen Signalwegen. Verändert nach Milenkovic et al., 2003.

des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. In retinalen Müllerzellen konnte gezeigt werden, dass die ATP-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalweges und die Stimulation der DNA-Synthese notwendigerweise eine Transaktivierung des PDGF- und EGF-Rezeptors voraussetzen (Milenkovic et al., 2003, Abbildung 1.5).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im adulten Säugerhirn findet Neurogenese in der SVZ der Seitenventrikel kontinuierlich statt. Gegenwärtig ist nur wenig verstanden, welche extrazellulären Signale die adulte Neurogenese steuern, wie die Zellproliferation reguliert wird und über welche Mechanismen die Differenzierung, die Wanderung und das Überleben der neu gebildeten Neuronen bestimmt werden. Studien unserer Arbeitsgruppe haben bereits nachgewiesen, dass extrazelluläre Nukleotide als Signalstoffe zur Regulation der adulten Neurogenese beitragen (Braun et al., 2003, Mishra et al., 2006 und Langer et al., 2007).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der molekularen Wirkungsweise extrazellulärer purinerger Signale bei der Kontrolle der adulten Neurogenese der Maus. Daher werden die molekularen Komponenten nukleotiderger Signalwege bei der Proliferation und deren Wirkung auf die Migration neuraler Stammzellen der SVZ adulter Mäuse *in vitro* charakterisiert.

Nach der Etablierung eines geeigneten Systems zur Kultivierung und Expansion adhärenter neuraler Stammzellen aus der SVZ adulter Mäuse werden die Zellen charakterisiert. RT-PCR-Analysen geben Aufschluss über die Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren, sowie der Nukleotid-hydrolysierenden Enzyme NTPDase und TNAP. Dosis- und zeitabhängige Studien zu Nukleotid- und EGF-induzierten Proteinphosphorylierungen ausgewählter Signalwegskomponenten geben weiterhin Hinweise auf die aktivierten Signalwege.

Die zur ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung führenden Signalwege werden durch Inhibitoren charakterisiert. Insbesondere wird eine mögliche P2Y-Rezeptor-vermittelte Transaktivierung des EGF-Rezeptors analysiert. Zur Verifizierung und Spezifizierung der bisherigen Untersuchungen wird die Aktivierung intrazellulärer Si-

gnalkaskaden in Stammzellkulturen von P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen bearbeitet. Diese Untersuchungen sollen darüber hinaus Hinweise auf mögliche Knockout-induzierte Veränderungen in den intrazellulären Signalkaskaden oder in der Expression funktioneller Rezeptoren liefern.

Die nach der Stimulation hergestellten Zellhomogenate werden dabei in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Antikörpern im quantitativen Westernblot auf die Aktivität ausgewählter Proteine hin untersucht werden.

Ein weiterer experimenteller Ansatz zielt schließlich auf die purinergen Mechanismen, die die Migration NSZ *in vitro* regulieren. Für die Analyse der Migrationsintensität werden NSZ-Kulturen in Boyden-Chemotaxis-Chambers etabliert. Zur Ausarbeitung der beteiligten purinergen Mechanismen, werden die Phosphorylierungen intrazellulärer Signalmoleküle mittels quantitativen Westernblots nachgewiesen. Parallel dazu werden die Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett analysiert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

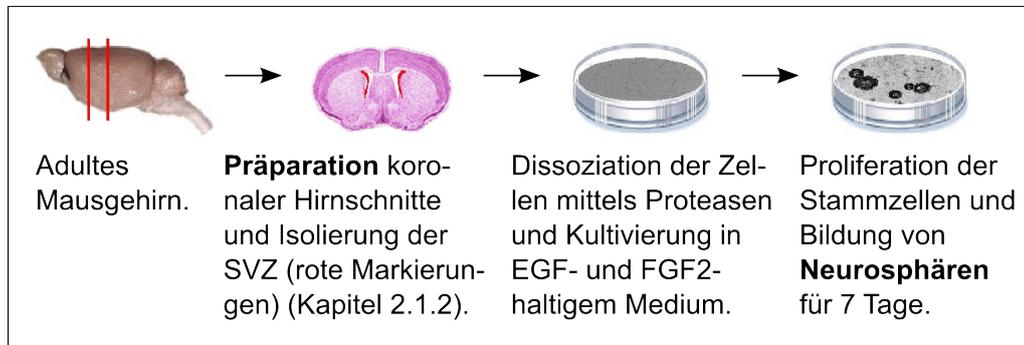
Die SVZ der Seitenventrikel der Maus beherbergt NSZ, die sich isolieren und in Kultur in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in Form von Neurosphären oder auf beschichteten Zellkulturoberflächen als adhärente Monolayer kultivieren und vermehren lassen. Die in dieser Arbeit verwendeten NSZ wurden aus den Seitenventrikeln adulter Mäuse isoliert und wuchsen innerhalb von sieben Tagen zu Neurosphären heran. Diese wurden dissoziiert und die NSZ wurden drei Tage als adhärente Monolayer kultiviert. Nach anschließender 24-stündiger Kultivierung der Zellen, entweder unter reduzierten Wachstumsfaktorkonzentrationen oder ohne Wachstumsfaktoren, wurden die Zellen in die Versuche eingesetzt.

Das Flussdiagramm in Abbildung 2.1 zeigt den methodischen und zeitlichen Ablauf der Präparation und Kultivierung adulter NSZ und deren Einsatz in Inhibitorstudien zur Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden und Migrationsanalysen. Darauf folgen die Auflistung und detaillierte Beschreibung der Methoden.

#### **2.1.1 Steriles Arbeiten**

Um beim Arbeiten mit Zellkulturen Kontaminationen mit anderen Organismen zu verhindern, werden alle Geräte und Lösungen durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und 1 bar Wasserdampfüberdruck oder per Hitzesterilisation für drei Stunden bei 180 °C sterilisiert oder bereits steril bezogen. Nicht autoklavierbare Lösungen werden mittels Nitrozellulosefiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$  sterilfiltriert. Gearbeitet wird unter Sterilwerkbänken. Alle Arbeitsflächen werden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Kulturmedien werden Antibiotika zugesetzt.

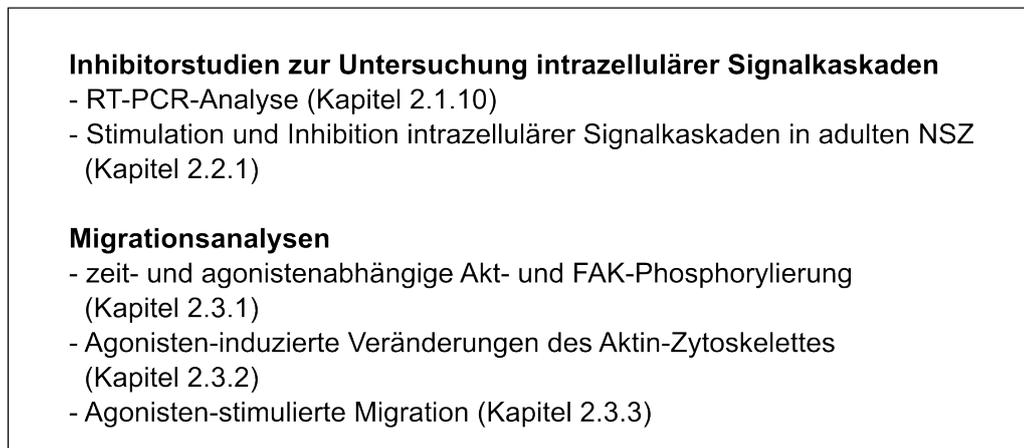
### Gewinnung



### Kultivierung



### Analyse



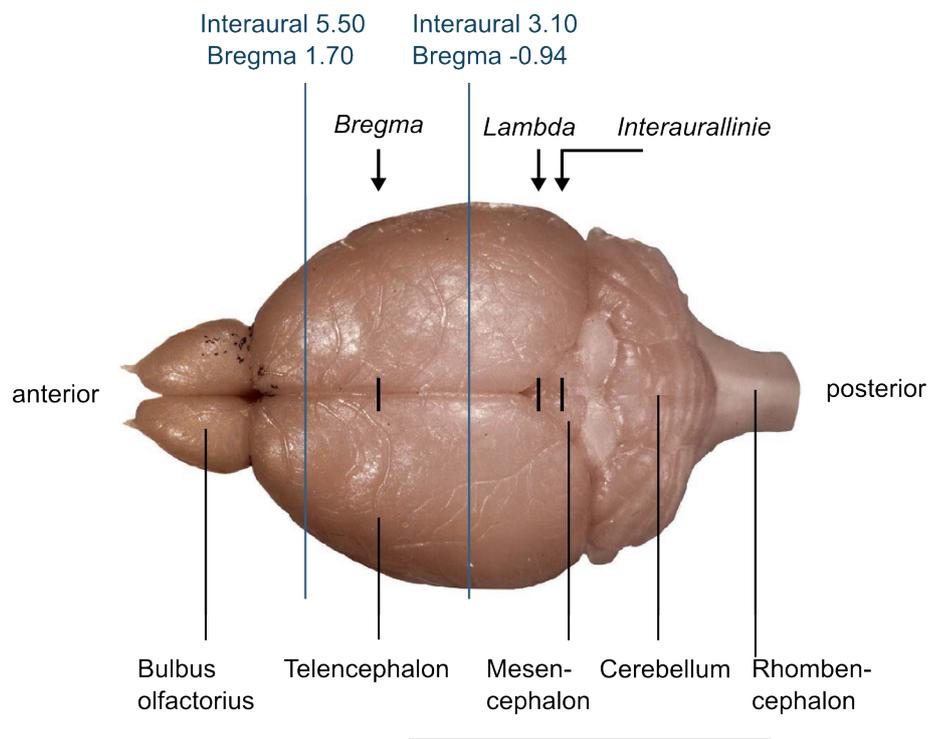
**Abbildung 2.1** Verlaufsschema zur Gewinnung, Kultivierung und Analyse adulter NSZ.

### 2.1.2 Präparation und Primärkultur adulter NSZ

Die im Folgenden angegebenen Volumina beziehen sich auf die Präparation einer Maus. NSZ werden aus adulten acht bis zwölf Wochen alten männlichen und weiblichen Tieren von Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- oder P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Linien des C57BL/6-Stammes (*Mus musculus*) gewonnen. Die Mäuse werden durch eine Überdosis Isofluran getötet, zur Desinfektion in 70%iges Ethanol getaucht und dekapitiert. Die Kopfhaut wird dorsal entlang der Sagittallinie durchtrennt und zur Seite geschoben. Die Öffnung des Schädels erfolgt durch einen Schnitt entlang der Sagittalnähte, so dass die Schädeldecke abgelöst werden kann. Das Gehirn wird entnommen und wenige Minuten in eiskaltem PBS gelagert. Mit Hilfe eines Gewebeschneiders werden 500  $\mu\text{m}$  dicke Hirnquerschnitte im Bereich der SVZ angefertigt, welche in eiskaltes PBS gelegt werden (Abbildung 2.2). Mit Hilfe eines Binokulars wird das Gewebe der SVZ der Seitenventrikel isoliert (Abbildung 2.3) und in eiskaltem PBS gesammelt. Es folgt die enzymatische Dissoziation des Gewebes in 1 ml Papain-Dissoziationslösung für 20 min bei 37°C. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in 1 ml Trypsin-Inhibitorlösung resuspendiert. Das Lösen des Zellverbandes wird durch mechanische Trituration unterstützt. Nach Zentrifugation (260  $g_{av}$ , 5 min) der Zellsuspension wird das Pellet in 1 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration (20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF2) resuspendiert. Die Zellen werden in unbeschichtete Kulturschalen (60/15 mm) überführt und in 6 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration für sieben Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte kultiviert. In dieser Zeit bilden sich in der Lösung schwebende Aggregate aus NSZ, so genannte Neurosphären.

### 2.1.3 Dissoziation von Neurosphären

Die sieben Tage alten Neurosphärenkulturen werden zentrifugiert (260  $g_{av}$ , 5 min) und zur enzymatischen Dissoziation in 1 ml Accutase II aufgenommen, für 30 min

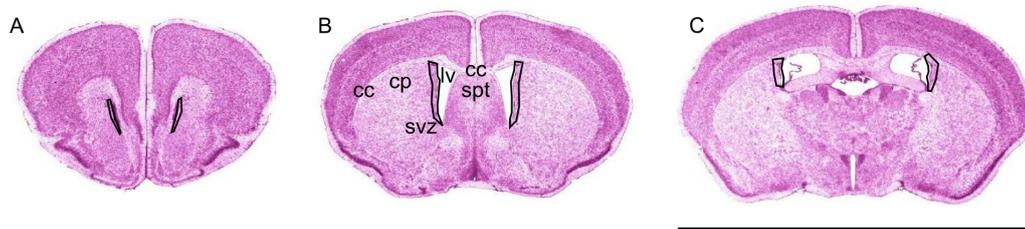


**Abbildung 2.2** Dorsalansicht des Mausgehirns. Eingezeichnet sind die Lage von Interaurallinie, Lambda und Bregma. Die dorsal sichtbaren anatomischen Regionen sind zur besseren Orientierung gekennzeichnet. Der Bereich des Gehirns, aus welchem Querschnitte angefertigt wurden, befindet sich zwischen den beiden blauen Markierungen. Der Balken entspricht 10 mm. Verändert nach *The mouse brain library*, 2005.

bei 37°C inkubiert und anschließend mit einer Pipette mechanisch trituriert. Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (260  $g_{av}$ , 5 min) und das Pellet wird in 1 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration resuspendiert. Es erfolgt die Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 2.1.4).

### 2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl dissoziierter Neurosphären erfolgt mit Hilfe eines Hämatocytometers nach Neubauer. Dazu wird die Zellsuspension 1:4 mit Trypanblau verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Der Azofarbstoff Trypan-



**Abbildung 2.3** Ansichten des Mausgehirns im Querschnitt. Die Schnitte (Nisselfärbung) zeigen die für die Präparation verwendeten Bereiche der Gehirns. A zeigt den am weitesten rostral gelegenen Schnitt (Interaural 5.50, Bregma 1.70), C gibt das Ende der kaudalen Region wieder (Interaural 3.10, Bregma -0.94), B liegt dazwischen (Interaural 4.18, Bregma 0.38). Der schwarz umrandete Bereich enthält die SVZ und wurde herauspräpariert. cc, corpus callosum; cp, caudate putamen; lv, Seitenventrikel; spt, Septum; svz, subventrikuläre Zone. Der Balken entspricht 10 mm. Verändert nach *The mouse brain library*, 2005.

blau kann auf Grund beschädigter Zellmembranen toter Zellen in deren Zytosol eindringen, während vitale Zellen das Trypanblau ausschließen und somit im Lichtmikroskop hell gegen den blauen Hintergrund erscheinen. Unter dem Lichtmikroskop werden die lebenden Zellen innerhalb von vier Großquadraten ausgezählt. Die Gesamtzahl ergibt sich aus der gemittelten Zellzahl pro Großquadrat, dem Verdünnungsfaktor (Faktor = 4) und dem Kammerfaktor (Faktor =  $10^{-4}$  ml).

### 2.1.5 Beschichten von Zellkulturoberflächen

Für alle adhärenenten NSZ-Kulturen werden die Zellkulturoberflächen zuerst mit Poly-L-Ornithin (0,5 mg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Danach wird dreimal mit sterilem MilliQ-Wasser gewaschen. Anschließend werden die Zellkulturoberflächen mit Fibronectin (10 ng/ml) für drei Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  beschichtet. Es folgt zweimaliges Waschen mit sterilem milliQ-Wasser. Die Platten können nun bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Nach dem Auftauen bei  $37^{\circ}\text{C}$  folgt einmaliges Waschen mit sterilem MilliQ-Wasser und die Aussaat der dissoziierten NSZ.

### **2.1.6 Kultivierung adhärenter Monolayer für Westernblot-Studien**

Für Stimulations- und Inhibitionsstudien werden je 30 000 Zellen in Poly-L-Ornithin/Fibronectin-beschichtete Wells (Kapitel 2.1.5) einer 24-Well-Platte in 1 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt für drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte. Etwa drei Stunden nach dem Ausplattieren sind die anhaftungsfähigen Zellen adhärent.

Die dem Kulturmedium zugesetzten Wachstumsfaktoren EGF und FGF2 können die zu untersuchenden Signalkaskaden auslösen. Um eine Rezeptor-Resensibilisierung zu bewirken, werden den drei Tage alten NSZ für die folgenden 24 Stunden EGF und FGF2 entzogen. Dazu wird das Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration durch je 0,5 ml Kulturmedium ohne Wachstumsfaktoren ersetzt. Während dieser Phase teilen sich die Zellen nur minimal. Man erhält somit eine etwa 85%ig konfluente, adhärente Kultur, die zum Versuch eingesetzt wird.

### **2.1.7 Kultivierung adhärenter Monolayer für immunzytologische Untersuchungen und F-Aktin-Analysen**

Adulte NSZ werden zu je 15 000 Zellen auf Poly-L-Ornithin/Fibronectin-beschichtete Deckgläschen (Kapitel 2.1.5) in einer 24-Well-Platte in je 1 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt für drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte. Nach drei Tagen wird das Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration durch Kulturmedium ohne Wachstumsfaktoren ersetzt. Die Kultur wird nach weiteren 24 Stunden zum Versuch eingesetzt. Alternativ wird das Kulturmedium durch 1 ml Differenzierungsmedium ersetzt, um die Differenzierung der Zellen einzuleiten. Die Zellen werden nun für weitere acht Tage kultiviert und immunzytologisch analysiert.

### **2.1.8 Kultivierung adhärenter Monolayer für Boyden-Chamber-Assays**

Zur Untersuchung der Migration adulter NSZ mit Hilfe des Boyden-Chamber-Assays werden je 150 000 Zellen in Poly-L-Ornithin/Fibronectin-beschichtete Wells einer 6-Well-Platte (Kapitel 2.1.5) in 2,5 ml Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt für drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte. Nach drei Tagen wird das Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration durch Kulturmedium mit reduzierter Wachstumsfaktorkonzentration (5 ng/ml EGF, 2,5 ng/ml FGF2) ersetzt. Die Kultur wächst noch weitere 24 Stunden und wird dann zum Versuch eingesetzt.

### **2.1.9 Immunzytologie**

Zehn bzw. achtzehn Tage alte NSZ (zur Untersuchung der Proliferation bzw. Differenzierung) werden auf Deckgläschen kultiviert (siehe Kapitel 2.1.7). Zur Fixierung der Zellen wird das konditionierte Medium abgenommen und durch 0,5 ml Fixierlösung ersetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur und wird durch zweimaliges Waschen mit je 0,3 ml Waschpuffer für je 10 min abgeschlossen. Die Deckgläschen werden aus den 24-Wellen entnommen und mit 0,1 ml Waschpuffer für 10 min gewaschen. Es folgt die Permeabilisierung der Zell- und Kernmembranen durch Inkubation in 0,1 ml Permeabilisierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur. Die Gläschen werden dreimal mit 0,1 ml PBS für 5 min gewaschen. Es folgt die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in je 0,1 ml Blockingpuffer II für 30 min bei Raumtemperatur. Zur Markierung der NTPDase, von Nestin, GFAP, DCX, O4 und  $\beta$ -III-Tubulin werden die Deckgläschen mit 0,1 ml einer Lösung aus dem entsprechenden Antikörper (siehe unten) und DAPI (1  $\mu$ g/ml) (gelöst

in Blockingpuffer II), über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgt die Applikation des Zweitantikörpers (Tabelle 2.1, in Blockingpuffer II) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellen werden fünfmal mit 0,1 ml PBS gewaschen und mit Poly-Mount eingebettet.

Antikörper	Herkunft	Epitopbindestelle	Verdünnung
anti-NTPDase2	Kaninchen (polyklonal)	NTPDase2	1:500
anti-Nestin	Maus (monoklonal)	Nestin	1:100
anti-DCX	Ziege (polyklonal)	DCX	1:200
anti-GFAP	Maus (monoklonal)	GFAP	1:1000
anti-O4	Maus (monoklonal)	O4	1:300
anti- $\beta$ -III Tubulin (Tuj1)	Maus (monoklonal)	$\beta$ -III-Tubulin	1:500
anti-Maus-IgG (Cy3-gekoppelt)			1:400
anti-Kaninchen-IgG (Cy3-gekoppelt)			1:400
anti-Ziege-IgG (Cy3-gekoppelt)			1:400

**Tabelle 2.1** Herkunft, Epitopbindestelle und Verdünnung der in der Immunzytologie verwendeten Antikörper.

### 2.1.10 RT-PCR-Analyse

Die mRNA wird aus adhärennten NSZ vier Tage nach der Dissoziation primärer Neurosphären unter Verwendung des RNeasy Mini Kit und anschließendem Verdau der genomischen DNA mittels RNase-freier DNase I isoliert. Die cDNA wird unter Verwendung des Omniscript RT Kit in einer Kombination von oligo-dT-Primern (Tabelle 2.3) und Random-Hexamer-Oligonukleotiden synthetisiert. Mittels der Go-Taq Hot Start-Polymerase und einer 5-fach konzentrierten Enhancer-Lösung (Ralser

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der DNA-Polymerase (Hot-Start)	94°C	3 min	
Strangtrennung	94°C	45 s	} 15 x (-0,5°C pro Zyklus)
Primerbindung	63°C	45 s	
Strangsynthese	72°C	45 s	
Strangtrennung	94°C	45 s	} 27 x
Primerbindung	55°C	45 s	
Strangsynthese	72°C	45 s	
Strangsynthese	72°C	10 min	

**Tabelle 2.2** Amplifikationsbedingungen der eingesetzten Touch-Down-PCRs in adulten NSZ.

et al., 2006) wird eine Touch-Down-PCR durchgeführt. Die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Primer			
Gen-name	Vorwärts-Primer-Sequenz	Rückwärts-Primer-Sequenz	Amplikon (bp)
P2RX1	GAGAGTCGGGCCAGGACTTC	GCGAATCCCAAACACCTTGA	233
P2RX2	CCCCAAATTTACCATCC	GCACTCTGATTCAGACAAGTCC	263
P2RX3	GAAACCTCCTTCCTAACC	ATACCAGCACATCAAAGC	363
P2RX4	AATATCCTCCCCAACATTACC	CTGCCATCTCCTGAAAGC	133
P2RX5	TGGACAACAAACACACAATCC	TCACAGAAGAAAGCCCCAGC	223
P2RX6	TCTGGATTACAAGACGGAGAA	AGTTGGTTACCAGGAAGAACA	281
P2RX7	TCCATATGACAAGACAAGG	TTGTGAAAGGTACAAGAGC	201
P2RY1	TGCTATTGAGTGGTATGGAACAG	ACACGAGCAAAGTCACAGAAA	202
P2RY2	TCTTACCCTCTTGCCCTCCATC	CCCATTCTGCCTAAACTCC	205
P2RY4	GGCATTGTCAGACACCTTGTA	AAGGCACAAAGCAGACAGCAA	213
P2RY6	ATCAGCTTCCTGCCTTTCC	CTGTGAGCCTCTGTAAGAGATCG	214
P2RY12	TAACCATTGACCGCTACC	TTCGTGCCAAACTAGACC	212

P2RY13	CTGCCTTTCAAATCCTTTCC	TGCTGTCCTTACTCCTAAACTTCC	454
P2RY14	ACCACAGACCCTCCAAACC	TGCACACAAACACATTACC	268
GAPDH	AAGGGCATCTTGGGCTACACT	TCCAGGGTTTCTTACTCCTTG	209
Aplp	TGACCTTCTCTCCTCCATCC	GTGTGTGTGTGTGTCCTGTCC	205
Entpd2	CTGTGCTGACCTCGTCTCTG	GTCTGGTTGCAGGTGGTCTC	213

**Tabelle 2.3** Primer-Sequenzen und die Längen der erwarteten Amplifikationsprodukte zur Detektion von P2-Rezeptoren, TNAP und NTPDase2 mittels RT-PCR.

## 2.2 Inhibitorstudien zur Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden

Zur Ermittlung geeigneter Agonistenkonzentrationen und -applikationszeiten werden Zeit- und Dosis-Wirkungskurven erstellt. Die Analyse der Nukleotid- und EGF-induzierten intrazellulären Signalkaskaden erfolgt durch Einsatz von Inhibitoren, dargestellt in Tabelle 2.4.

### 2.2.1 Stimulation und Inhibition intrazellulärer Signalkaskaden in adulten NSZ

Mechanische Stimulation von NSZ führt zur Phosphorylierung der zu untersuchenden Proteine. Eine weitere Induktion der Phosphorylierung ist daher für die folgenden Stunden nicht möglich (Grimm, 2005 und Gampe, 2005). Deshalb wird mindestens zwei Stunden vor und während der Versuchsdurchführung auf stoßfreie Behandlung geachtet. Die Versuche werden in unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Stimulation kultivierter NSZ der SVZ werden 11 Tage alte adhärente NSZ verwendet. Zu Versuchsbeginn befinden sich die Zellen in je 0,5 ml Kulturmedium ohne Wachstumsfaktoren. Pro Well werden 0,1 ml Kulturmedium abgenommen, mit

Inhibitor/ Antagonist	Zielprotein	Konzentration	Applikationszeit
AG1478	EGF-Rezeptortyrosinkinasen	10 $\mu\text{M}$	30 min
Cangrelor (AR-C69931MX)	P2Y <sub>12</sub> - und P2Y <sub>13</sub> -Rezeptor (kompetitiver Antagonist)	50 $\mu\text{M}$	30 min
GF109203X	Serin-/Threonin-Proteinkinasen mit Ähnlichkeit zu Stauoponinen und alle PKC-Isoformen (Gesamt-PKC)	10 $\mu\text{M}$	30 min
GM6001 (Illomastat)	Matrixmetalloproteasen	2,5 $\mu\text{M}$	30 min
Gö6976	Ca <sup>2+</sup> -abhängige PKC-Isoformen, wie PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ (konventionelle PKCs)	10 $\mu\text{M}$	30 min
MRS2179	P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor (kompetitiver Antagonist)	50 $\mu\text{M}$	30 min
MRS2365	P2Y <sub>13</sub> -Rezeptor (kompetitiver Antagonist)	50 $\mu\text{M}$	30 min
U0126	MEK1/2	10 $\mu\text{M}$	30 min

**Tabelle 2.4** Name, Angriffspunkt, Konzentration und Applikationszeit der zur Analyse der intrazellulären Signalkaskaden verwendeten Inhibitoren und Antagonisten.

dem vorgelegten Agonisten gemischt, ins Well zurückgegeben und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Reaktion wird durch Entfernung des Überstandes und Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Lysis-/Probenpuffer beendet. Anschließend werden die Zellen für 1 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proben werden daraufhin in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine und deren Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen, werden die Proben für 5 min bei 95°C gekocht und sofort auf Eis abgekühlt. Proteinquartärstrukturen werden durch

die reduzierende Thiolverbindung DTT aufgelöst, indem Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen aufspalten werden. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Hemmung ausgewählter Proteine der durch ADP $\beta$ S und UTP aktivierbaren Signalwege soll Aufschluss über die tatsächlich aktivierten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren in den untersuchten Kulturbedingungen geben. Deshalb werden die NSZ vor der Stimulation mit ausgewählten Inhibitoren vorinkubiert. Dazu wird 0,1 ml Kulturmedium abgenommen, mit dem vorgelegten Inhibitor oder Carrier gemischt und zurück ins Well gegeben. Nach entsprechender Applikationszeit erfolgt die Stimulation der Zellen wie oben beschrieben. Die eingesetzten Konzentrationen und Applikationszeiten der Inhibitoren wurden der aktuellen Literatur entnommen (Tabelle 2.4, siehe auch Kapitel 2.4.4).

### **2.2.2 SDS-PAGE**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode der Molekularbiologie zur Trennung von Molekülen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient hier ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Dieses Polymer bewirkt, dass die Proteine bei ihrer Wanderung durch das Gel proportional zu ihrer molekularen Masse verlangsamt werden. Bisacrylamid dient als Quervernetzer von Acrylamid; zusammen bilden sie eine dreidimensionale Gelmatrix. Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet. N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator der Polymerisation indem es freie Sulfatradikale stabilisiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele findet sich in Tabelle 2.5. Da die Proteine in der SDS-PAGE

nur nach Größe und nicht nach Ladung aufgetrennt werden sollen, kommt zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Einsatz. Dieses anionische Detergens bindet sehr effizient an Proteine. Pro Gramm Protein binden ungefähr 1,4 g SDS – dieses entspricht etwa zwei Aminosäuren pro SDS-Molekül. Dies reicht aus, um die Polypeptidkette zu sättigen. SDS überdeckt die Eigenladung von Proteinen effektiv, so dass diese vernachlässigbar wird; das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein nun annähernd gleich. Der negativ geladene SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die SDS-Gele setzen sich wie unten dargestellt zusammen. Eine Proteinbestimmung der Proben wurde nicht durchgeführt. Stattdessen wurden jeweils gleiche Volumina (17,5  $\mu$ l) geladen und mittels densitometrischer Bestimmung des GAPDH-Gehaltes normiert (Kapitel 2.2.5). Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichen Tris-HCl-Puffersystem (Laemmli, 1970) bestehend aus einem weitporigem Sammelgel (5% Acrylamid) und einem engmaschigen Trenngel (10% Acrylamid), die sich weiterhin in Hinblick auf den pH-Wert und die Ionenstärke unterscheiden (Tabelle 2.5). Die Proben werden mittels Elektrophoresepuffer bei 10 mA im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie bei 25 mA im Trenngel aufgetrennt werden. Zur Bestimmung der molekularen Masse der aufgetrennten Proteine im Gel werden Proteinstandards verwendet.

### 2.2.3 Westernblot

Die auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Nitrozellulosemembranen und Whatman-Filterpapiere werden für 10 min in Transferpuffer eingeweicht. Daraufhin werden Gel, Membran und Filter folgendermaßen geschichtet: Whatman-Filterpapier (Anode), Nitrozellulosemembran, Gel, Whatman-Filterpapier (Kathode). Geblottet wird für 48 min nach folgender Formel: Stromstärke  $\hat{=}$  Fläche der Membran [ $\text{cm}^2$ ]  $\cdot$  1,6 mA im Semi-Dry-Verfahren. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, werden diese für 5 min mit TBS gewaschen, um Reste des Transferpuffers zu

<b>SDS-Gele</b>	<u>Sammelgel (5%)</u>	<u>Trenngel (10%)</u>
30% Acrylamid	0,366 ml	2,2 ml
1% Bisacrylamid	0,286 ml	0,88 ml
1 M Tris -HCl pH-Wert 8,7	–	2,53 ml
0,25 M Tris -HCl pH-Wert 6,8	1,1 ml	–
Aqua <sub>demin</sub>	0,429 ml	0,99 ml
20% SDS	11 $\mu$ l	33 $\mu$ l
TEMED	2,2 $\mu$ l	6,6 $\mu$ l
10% APS	11 $\mu$ l	33 $\mu$ l

**Tabelle 2.5** Zusammensetzung der in der SDS-PAGE verwendeten Sammel- und Trenngele.

entfernen. Es folgt eine Inkubation in Blockingpuffer I für eine Stunde mit anschließendem dreimaligen Waschen mit TBS/T für je 5 min. Auf einem Schüttler wird die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper (siehe unten), in Antikörperlösung) inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit TBS/T gewaschen. Mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (siehe unten, gelöst in Blockingpuffer I) wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und folgend dreimal für 5 min gewaschen. Für die Detektions-Reaktion werden gleiche Volumina von Lösung 1 und Lösung 2 der ECL-Lösung zugegeben und für 1 min unter Schütteln inkubiert. Die Membranen werden in Folie gelegt und anschließend zwischen 30 sec und 45 min zur Exposition auf einen photographischen Film gelegt und entwickelt.

## 2.2.4 Densitometrische Auswertung

Das Einscannen der belichteten Filme erfolgt über den Scanner ScanMaker4 und das Scanprogramm Silverfast. Die densitometrische Auswertung der Westernblots wurde mit Hilfe der KODAK 1D Image Analysis Software durchgeführt. Hierbei werden der

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Epitopbindestelle</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-phospho-ERK1/2	Maus (monoklonal)	endogenes, an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphoryliertes p44/p43 (ERK1/2)	1:1000
anti-phospho-CREB	Kaninchen (monoklonal)	endogenes, an Serin 133 phosphoryliertes CREB	1:1000
anti-phospho-Akt	Maus (monoklonal)	endogenes, an Serin 473 phosphoryliertes Akt	1:1000
anti-phospho-Src	Kaninchen (polyklonal)	endogenes, an Tyrosin 416 phosphoryliertes Src	1:1000
anti-GAPDH	Maus (monoklonal)	GAPDH	1:40000
anti-phospho-Raf	Kaninchen (monoklonal)	endogenes, an Serin 338 phosphoryliertes Raf	1:1000
anti-Raf	Kaninchen (monoklonal)	Raf	1:1000
anti-phospho-EGFR (Y845)	Maus (monoklonal)	endogenes, an Tyrosin 845 phosphorylierter EGFR	1:1000
anti-phospho-EGFR (Y1068)	Maus (monoklonal)	endogenes, an Tyrosin 1068 phosphorylierter EGFR	1:1000
anti-phospho-EGFR (Y1173)	Kaninchen (monoklonal)	endogenes, an Tyrosin 1173 phosphorylierter EGFR	1:1000
anti-EGFR	Kaninchen (monoklonal)	EGFR	1:1000
anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)			1:2000
anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)			1:2000

**Tabelle 2.6** Herkunft, Epitopbindestelle und Verdünnung der im Westernblot verwendeten Antikörper.

Schwärzungsgrad der jeweils kompletten Bänder über die Summe der Grauwerte aller Pixel abzüglich des Hintergrundes berechnet. Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgt mit dem Tabellenkalkulationsprogramm gnumeric.

### **2.2.5 Datenpräsentation**

Da eine Proteinbestimmung vor der Beladung der SDS-Gele nicht durchgeführt wurde, fungierte die GAPDH als Referenz. Dazu werden die Bänder von Phospho-ERK, -CREB, -Akt bzw. -Src in ein Verhältnis zum jeweiligen Band für die GAPDH derselben Probe gesetzt. Die zwei- oder dreifach durchgeführten Messungen pro Versuch werden durch Bildung der Mittelwerte dieser Verhältnisse zusammengefasst. Daraufhin werden diese Mittelwerte eines Versuches auf die entsprechenden Kontrollen normiert (bei Konzentrations- und Zeitreihen die unstimulierte Probe, bei Inhibitionsversuchen die stimulierte Probe); die Kontrolle steht dabei für 100% Phosphorylierung. Die Ermittlung des Mittelwertes mehrerer voneinander unabhängiger Versuche erfolgt über die Bildung der Summe der normierten Verhältnisse, dividiert durch die Anzahl der Versuche. Statistische Angaben werden mittels ANOVA (ungepaart) und dem Tukey-Kramer-Test erhoben. Die Varianz der Grundgesamtheit wird dabei als heteroskedastisch (Varianz ist inkonstant) angenommen. Als statistisch signifikant gelten Ergebnisse, die einen p-Wert kleiner oder gleich 0,05 aufwiesen.

## **2.3 Migrationsanalysen**

Zur Ausarbeitung der an der Migration von NSZ beteiligten Mechanismen, werden die Purin- und EGF-stimulierten Phosphorylierungen der intrazellulären Signalmoleküle Akt und FAK mittels quantitativen Westernblots nachgewiesen. Parallel dazu werden die Purin- und EGF-induzierten Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett

analysiert. Für die Untersuchung der Migrationsintensität werden NSZ-Kulturen in Boyden-Chemotaxis-Chambers etabliert.

### **2.3.1 Zeit- und agonistenabhängige Akt- und FAK-Phosphorylierung**

Zur Analyse der Migrationsprozesse adulter NSZ wurde die Nukleotid-induzierte zeitabhängige Phosphorylierung von Akt und FAK ermittelt. Des Weiteren wurden verschiedene Agonisten auf ihre Fähigkeit zur Akt- und FAK-Aktivierung hin untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Kapitel 2.2 beschrieben.

### **2.3.2 Agonisten-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes**

Die Stimulation zehn Tage alter NSZ erfolgt auf Deckgläschen in 24-Well (siehe Kapitel 2.1.7) in einem Volumen von 0,5 ml. Dazu werden 100  $\mu$ l konditioniertes Kulturmedium abgenommen, mit Stimulanz gemischt, und für 5 min zurück ins Well gegeben. Die Fixierung, Permeabilisierung und das Einbetten der Zellen erfolgt wie unter Kapitel 2.1.9 beschrieben. Die Markierung von filamentösem Aktin erfolgt durch Inkubation der Gläschen in 0,1 ml einer Lösung aus TRITC-gekoppeltem Phalloidin (2,5  $\mu$ g/ml) und DAPI (1  $\mu$ g/ml) (gelöst in Blockingpuffer II), über Nacht bei 4°C im Dunkeln.

Von den markierten Zellen werden mit Hilfe des Zeiss Axiophot-Mikroskops, der Zeiss AxioCam MRm CCD-Kamera und des Zeiss AxioVision-Analysesystems Aufnahmen gemacht. Zur quantitativen Auswertung der F-Aktin-Markierung werden Aufnahmen mit 40-facher Vergrößerung entlang des Deckgläschens angefertigt. Pro Experiment werden für die Kontrollen und die Agonisten-stimulierten Kulturen

identische Belichtungszeiten verwendet. Da nahezu alle nicht-stimulierten Zellen der Kontrollkulturen eine geringe F-Aktin-Markierung zeigen, wird die quantitative Analyse basierend auf der Pixelintensität oder -verteilung mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt. Von 20 zufällig ausgewählten Kontrollbildern eines Experimentes werden mittels ImageJ Schwellwerte definiert und der Mittelwert aller Schwellwerte wird zur Berechnung der Stimulation-induzierten Veränderung der F-Aktinmarkierung eingesetzt. Mit Hilfe dieser Daten wird die integrierte Intensität, als die Summe der Grauwerte der Pixel des Gesamtbildes, berechnet. Zusätzlich wird die F-Aktin-markierte Fläche des Gesamtbildes durch Summierung aller Pixel oberhalb des Schwellwertes ermittelt. Durch Auszählen der DAPI-gefärbten Zellkerne wird die integrierte Dichte und Fläche pro Zelle berechnet.

### **2.3.3 Agonisten-stimulierte Migration**

Die zu untersuchenden Substanzen werden in Kulturmedium mit reduzierter Wachstumsfaktorkonzentration gelöst. Je 29  $\mu\text{l}$  davon werden in die unteren Vertiefungen der Migrationskammer gefüllt. Ein beschichteter Polycarbonat-Filter mit 8  $\mu\text{m}$  Porengröße wird markiert und mit der rauhen, beschichteten Seite nach unten auf die Kammer gelegt. Die Beschichtung des Filters erfolgt mit einer Fibronectinlösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Migrationskammer wird nun zusammengesetzt und im Inkubator bei 37°C vorgewärmt. Die adhärenen Zellen aus sechs 6-Wells werden durch Trituration mit einer 1 ml-Eppendorfpipette gelöst. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 260  $g_{av}$  zentrifugiert und das Pellet wird in 1 ml Kulturmedium mit reduzierter Wachstumsfaktorkonzentration resuspendiert. Nun wird die Zellzahl bestimmt. Jede der oberen Vertiefungen der Migrationskammer wird mit 50 000 Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Kulturmedium mit reduzierter Wachstumsfaktorkonzentration beladen. Die nun vollständig gefüllte Kammer wird für 4,5 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Im Anschluss werden die Filter aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 5 min in Diffquick-Fixierlösung inkubiert. Zur anschließenden Cytoplasmafärbung wird der Filter für 5 min in Diffquick-Färbelösung I (rot) überführt. Die Kernfärbung erfolgt für 3 min in Diffquick-Färbelösung II (blau). Zum Schluss werden die Filter dreimal in MilliQ-Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die trockenen Filter werden markiert, halbiert und auf Objektträger gelegt. Die Ränder des Filters werden mit MilliQ-Wasser befeuchtet, so dass die Filterbereiche mit migrierten Zellen auf der Unterseite des Objektträgers markiert werden können. Nun werden die Zellen auf der Filteroberseite (nicht migrierte Zellen) mit einem MilliQ-Wasser-befeuchteten Wattestäbchen abgerieben. Der Filter wird erneut getrocknet. Im Anschluss wird der Filter mit Immersionsöl ausgestrichen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Klebeband befestigt. Das Auszählen der Zellen erfolgt am Lichtmikroskop im Hellfeld mit 40-facher Vergrößerung. Pro Bedingung werden fünf Gesichtsfelder ausgewertet. Die Agonisten-induzierte Migration wird auf Migration unstimulierter Zellen normalisiert.

## 2.4 Materialien

### 2.4.1 Versuchstiere

Zur Präparation von NSZ dienten acht bis zwölf Wochen alte Mäuse (*Mus musculus*) von Wildtyp-,  $P2Y_1^{-/-}$ - und  $P2Y_2^{-/-}$ -Linien des C57BL/6-Stammes. Wildtyp-Mäuse stammten aus Eigenzucht oder wurden von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäuse wurden von Dr. Christian Gachet (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Straßburg, Frankreich; Léon et al., 1999) erhalten.  $P2Y_2^{-/-}$ -Mäuse wurden von Dr. Beverly H. Koller (University

of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina; Homolya et al., 1999) bezogen und über mehr als sieben Generationen auf einen C57BL/6-Hintergrund gezüchtet.

## 2.4.2 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
$\beta$ -Glycerophosphat-Dinatrium	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
p-Nitrophenylphosphat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Accutase II	PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)
Aceton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid (Rotiphorese Gel A)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ADP $\beta$ S	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Antipain	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Aprotinin	Roche (Mannheim, Deutschland)
APS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
B27-Supplement	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
FGF2	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM/F12	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNase I	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DTT	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dual Color Protein Standard	BioRAD (München, Deutschland)
ECL	Amersham Biosciences (Dassel, Deutschland)
ECL Plus	Amersham Biosciences (Dassel, Deutschland)
EGF (rekombinant)	Tebu Bio (Offenbach, Deutschland)
EGTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCl (Salzsäure)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Leupeptin	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magic Mark - Western Standard	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumpyrophosphat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Nitrozellulose-Transfermembran	Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Deutschland)
Papain	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
PMSF	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
SDS	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TEMED	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Deutschland)

### 2.4.3 Puffer und Medien

Antikörperlösung	5% BSA 0,05% NaN <sub>3</sub> in TBS/T
Blockingpuffer I	5% Magermilchpulver in TBS/T
Blockingpuffer II	5% BSA 0,02% NaN <sub>3</sub> in PBS
Elektrophorese-Puffer	100 mM Tris 100 mM Glycin 70 mM SDS in Aqua <sub>demin</sub>
Enhancer-Lösung	2,7 M Betain 6,7 mM DTT 6,7% DMSO 55 µg/ml BSA
Fixierlösung	2% Paraformaldehyd 125 mM Tris 125 mM NaCl 5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (aktiviert) 50 mM NaF 50 mM Na <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) 125 mM β-Glycerophosphat 125 mM p-Nitrophenylphosphat 2,5 mM EGTA 5 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Antipain

	in PBS, pH-Wert 7,4 (HCl)
Kulturmedium ohne Wachstumsfaktoren	1 x B27-Supplement 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 10 $\mu$ g/ml Streptomycin in DMEM/F12, pH-Wert 7,2
Kulturmedium mit reduzierter Wachstumsfaktorkonzentration	1 x B27-Supplement 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 10 $\mu$ g/ml Streptomycin 5 ng/ml EGF 2,5 ng/ml FGF2 in DMEM/F12, pH-Wert 7,2
Kulturmedium mit voller Wachstumsfaktorkonzentration	1 x B27-Supplement 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 10 $\mu$ g/ml Streptomycin 20 ng/ml EGF 10 ng/ml FGF2 in DMEM/F12, pH-Wert 7,2
Differenzierungsmedium	1 x B27-Supplement 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 10 $\mu$ g/ml Streptomycin 1% BSA in DMEM/F12, pH-Wert 7,2
Lysispuffer	125 mM Tris 125 mM NaCl 5 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ (aktiviert) 50 mM NaF

	50 mM Na <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) 125 mM β-Glycerophosphat 125 mM p-Nitrophenylphosphat 2,5 mM EGTA 2,5% (v/v) Triton X-100 5 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Antipain in Aqua <sub>demin</sub> , pH-Wert 7,4 (HCl)
Papain-Dissoziationslösung	0,5 mg/ml Papain (14 U/mg) 0,1 mM EDTA in DMEM/F12
PBS	137 mM NaCl 3 mM KCl 13 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in A <sub>bidest</sub> , pH-Wert 7,4 (HCl)
Permeabilisierungspuffer	0,1% Triton X-100 in PBS
Probenpuffer	312,5 mM Tris 10% (w/v) SDS 50% Glycerol 0,05% Bromphenolblau 500 mM DTT in Aqua <sub>demin</sub> , pH-Wert 6,8
TBS	20 mM Tris 137 mM NaCl in Aqua <sub>demin</sub> , pH-Wert 7,6 (HCl)

TBS/T	20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1% Tween 20 in Aqua <sub>demin</sub> , pH-Wert 7,6 (HCl)
Transferpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 20% Methanol in Aqua <sub>demin</sub> , pH-Wert 8,3 (HCl)
Trypsin-Inhibitorlösung	0,7 mg/ml Trypsin-Inhibitor 1000 U/ml DNase I in DMEM/F12
Waschpuffer	125 mM Tris 125 mM NaCl 5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (aktiviert) 50 mM NaF 50 mM Na <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) 125 mM $\beta$ -Glycerophosphat 125 mM p-Nitrophenylphosphat 2,5 mM EGTA 5 mM PMSF 10 $\mu$ g/ml Aprotinin 10 $\mu$ g/ml Leupeptin 10 $\mu$ g/ml Antipain in PBS, pH-Wert 7,4 (HCl)

### 2.4.4 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Literatur
AG1478 <sup>1,3,5</sup>	Calbiochem (Schwalbach/Ts., Deutschland)	<sup>1</sup> Elia et al., 2005
GF109203X <sup>2,4,5</sup>	Calbiochem (Schwalbach/Ts., Deutschland)	<sup>2</sup> Gendron et al., 2003
Gö6976 <sup>2,4,5</sup>	Calbiochem (Schwalbach/Ts., Deutschland)	<sup>3</sup> Moll et al., 2002
U0126 <sup>2,3,5</sup>	Calbiochem (Schwalbach/Ts., Deutschland)	<sup>4</sup> Neary et al., 1999
Cangrelor (AR-C69931MX) <sup>6</sup>	AstraZeneca (Loughborough, UK)	<sup>5</sup> Weisman et al., 2001
GM6001 <sup>7,8</sup>	Chemicon (Hofheim, Deutschland)	<sup>6</sup> Marteau et al., 2004
MRS2179 <sup>9</sup>	Tocris Bioscience (Eching, Deutschland)	<sup>7</sup> Menon et al., 2005
MRS2395 <sup>10</sup>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	<sup>8</sup> Mercapide et al., 2003
		<sup>9</sup> Baurand et al., 2001
		<sup>10</sup> Jacobson et al., 2004

### 2.4.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Phospho-ERK1/2	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-CREB	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-Akt	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-Src	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-GAPDH	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-Raf	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Raf	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-EGFR (Y845)	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-EGFR (Y1068)	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-Phospho-EGFR (Y1173)	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)
anti-EGFR	Cell Signaling (Frankfurt a. M., Deutschland)

anti-NTPDase2	Dr. Jean Sevigny (Québec, Kanada)
anti-Nestin	Chemicon (Hofheim, Deutschland)
anti-DCX	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
anti-GFAP	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
anti-O4	Chemicon (Hofheim, Deutschland)
anti- $\beta$ -III-Tubulin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
anti-Maus-IgG-Cy3	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Kaninchen-IgG-Cy3	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Maus-IgG-HRP	Dako (Hamburg, Deutschland)
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

## 2.4.6 Zubehör

Produkt	Hersteller
Diffquick-Färbelösung	Medion Diagnostics AG (Düdingen, Schweiz)
ECL Hyperfilm	Amersham (Dassel, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Filtermembran Polycarbonat PVPF, 8.0 Micron, 25 x 80mm	GE Water & Process Technologies Pieper Filter GmbH (Bad Zwischenhahn, Deutschland)
Gewebekulturschalen 60/15 mm	Cellstar Greiner Labortechnik (Frickenhäusen, Deutschland)
Gewebekulturplatte 24-Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Migrationskammer (Multiwell Chemotaxis Kammer AP48)	Neuro Probe, Inc. (Gaithersburg, USA)
Mikroplatte 6-Well	Iwaki (Funabashi, Japan)
Nitrozellulose-Transfermembran	Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Heiland (Stuttgart, Deutschland)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Deutschland)

## 2.4.7 Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Binokular	Stemi SV6	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
Gewebeschneider	Mc Ilwain Tissue Chopper	Mickel Laboratory Engeneering coLTD (Surrey, UK)
Inkubator	Steri-Cult 200	Forma Scientific (St. Georgen, Deutschland)
Inkubator	Heraeus	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Mikroskop	Axiovert 200	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
Mikroskop	Leitz DM IL	Leica (Wezlar, Deutschland)
Proteintransfer	Trans-Blot SD Semi-dry	BioRAD (München, Deutsch- land)
	Transfer Cell	
Scanner	ScanMaker 4	Mikrotech (Taipei, Taiwan)
Schüttler	Köttermann	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Schüttler	WT12	Biometra (Göttingen, Deutsch- land)
Sterilbank	Hera safe	Heraus instruments (Hanau, Deutschland)
Sterilbank	BDK	Luft- und Raumfahrttechnik (Deutschland)
Vortexer	Vortex-2 Genie	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbäder		Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifuge	Laborzentrifuge Z360K	Hermle (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Laborzentrifuge ZK15	Sigma (Zerode am Harz, Deutschland)

## **2.4.8 Software**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Gnumeric 1.8.3	The Open Source Community, Earth, 2007
KODAK 1D Image Analysis Software	Eastman KODAK Company, Rochester, New York, 2000
Photoshop 11.0.1	Adobe Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA, 2009
Silverfast	LaserSoft Imaging, Kiel, Deutschland, 1995

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines adhärennten NSZ-Kultursystems *in vitro*

NSZ der SVZ können isoliert und *in vitro* kultiviert und expandiert werden. Hierfür stehen zwei Methoden zur Verfügung: Die Kultivierung als in der Lösung schwimmende Zellaggregate, so genannte Neurosphären (Reynolds und Weiss, 1992 und Reynolds et al., 1992), und die Kultivierung als adhärennte Monolayer in Gegenwart geeigneter adhärenter Substrate (Conti et al., 2005). Für beide Verfahren ist das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren unter Serum-freien Bedingungen unerlässlich.

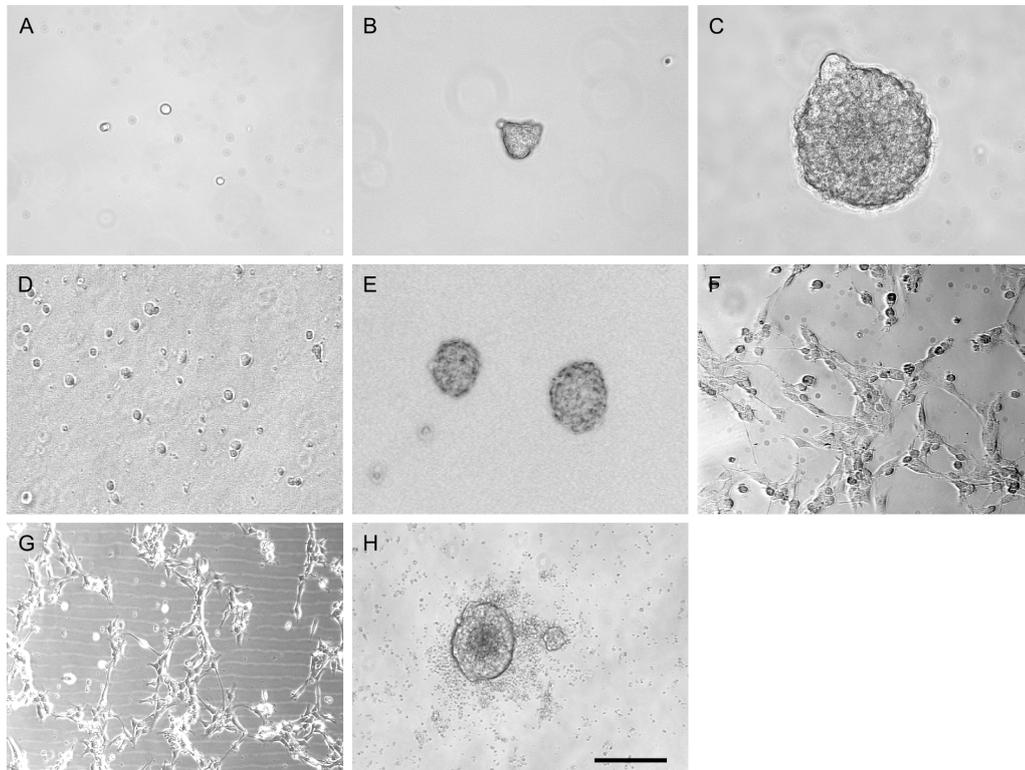
#### 3.1.1 Kultivierung adhärenter NSZ

Erste Erkenntnisse zur Nukleotid- und EGF-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden konnten bei Arbeiten mit Neurosphärenkulturen aus adulten NSZ gewonnen werden (Grimm, 2005). Hier wurden die Zellen aus der SVZ adulter Mäuse präpariert und sieben Tage als Neurosphären kultiviert. Diese wurden dissoziiert und weitere vier Tage zu sekundären Neurosphären herangezogen und schließlich mit P2Y- und EGF-Rezeptor-Agonisten oder Inhibitoren intrazellulärer Signalwegkomponenten stimuliert. So konnte die Nukleotid- und EGF-induzierte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden aufgedeckt werden. Wegen der fehlenden Adhäsivität der Neurosphären und der enormen Sensibilität des zu untersuchenden ERK1/2-Signalweges gegenüber geringster mechanischer Agitation gestalteten sich die damit verbundenen Medienwechsel als äußerst ungünstig. Jeglicher Wechsel des Mediums ging mit der Zentrifugation der Neurosphärenkultur einher, was zur Aktivierung

der zu untersuchenden Signalkaskaden führt (Grimm, 2005 und Gampe, 2005). Aus diesem Grund bestand der erste Schritt dieser Arbeit in der Etablierung adhärenter NSZ-Kulturen aus der SVZ adulter Mäuse *in vitro*, in der alle Medienwechsel ohne Zentrifugation durchgeführt werden können. In einem zweiten Schritt wurden diese Kulturen auf Eigenschaften von Stammzellen und die Fähigkeit zur Differenzierung in Glia- und Nervenzellen charakterisiert (Kapitel 3.1.2, Messemer, 2008).

In Vorversuchen wurde das Wachstumsverhalten adulter NSZ auf unterschiedlich beschichteten Kulturoberflächen bzw. Mediumzusätzen verglichen (Abbildung 3.1). In allen Ansätzen wurden die Zellen aus der SVZ adulter Mäuse präpariert (Tag 1) (A) und sieben Tage lang in unbeschichteten Zellkulturschalen als Neurosphären kultiviert (B, C). Im Anschluss wurden sie vereinzelt (Tag 8) (D) und auf PLO/Fibronectin- (F), PLO/Laminin- (G) oder PLO-beschichtete (H) oder unbeschichtete (E) 24-well-Platten ausgesät. In den folgenden vier Tagen wurden die Zellen mit dem Lichtmikroskop auf Adhärenz geprüft.

Bereits drei Stunden nach Aussäen der Zellen (Tag 8) adhäreren nahezu alle Zellen auf PLO/Fibronectin- und PLO/Laminin-beschichteten Oberflächen. Nach 24 Stunden (Tag 9) adhäreren in diesen Kulturen alle Zellen vollständig und bilden Monolayer. Zellen auf unbeschichteten und PLO-beschichteten Oberflächen zeigen zu diesem Zeitpunkt keine Adhärenz. Nach weiteren 24 Stunden (Tag 10) zeigt sich eine Zunahme der Zellzahl mit einer Verdichtung der adhärenen Monolayer bei PLO/Fibronectin- und PLO/Laminin-Beschichtung. Die Kulturen der anderen Bedingungen zeigen weiterhin keine Adhärenz und bilden aus wenigen Zellen bestehende Neurosphären. Eine Verdichtung der adhärenen Monolayer lässt sich auch am folgenden Tag (Tag 11) beobachten. Der Durchmesser der Neurosphären vergrößert sich. Neurosphären in PLO-beschichteten Wells adhäreren nun teilweise an der Unterlage und zeigen dort häufig eine Auswanderung von einzelnen Zellen aus



**Abbildung 3.1** Kultivierung adulter NSZ. Diese können als Neurosphären oder adhärenente Monolayer kultiviert werden. (A) zeigt in Kultur gebrachte Einzelzellen der SVZ. Daraus entwickeln sich in der Lösung schwimmende Zellaggregate (Neurosphären; (B) nach drei Tagen, (C) nach sieben Tagen). Die Zellen werden dissoziiert (D) und auf unbeschichtete (E), PLO/Fibronektin- (F), PLO/Laminin- (G) oder PLO-beschichtete (H) Zellkulturoberflächen ausgesät und für vier Tage kultiviert. Der Maßstab in (H) entspricht  $100\ \mu\text{m}$  und bezieht sich auf alle Abbildungen

dem Zellaggregat entlang der Zellkulturoberfläche. Neurosphären in unbeschichteten Wells weisen dieses Verhalten nicht auf.

Aufgrund der guten Adhärenz adulter NSZ auf PLO/Fibronektin-beschichteten Kulturoberflächen, wurden die NSZ-Kulturen der folgenden Experimente für sieben Tage in unbeschichteten Zellkulturschalen als Neurosphären herangezogen, dissoziiert und für weitere vier Tage auf PLO/Fibronektin-beschichteten Kulturoberflächen kultiviert.

### 3.1.2 Einfluss der Passagenanzahl auf die Proteinexpression adhärenter NSZ

NSZ, die aus dem Gehirn, zum Beispiel dem Striatum, isoliert wurden, lassen sich *in vitro* über mehrere Passagen hinweg kultivieren, ohne dass sie ihre Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung verlieren (Reynolds und Weiss, 1992). So ist es möglich, eine große Zahl an NSZ zu generieren, ohne die Zellen stets neu in aufwändigen Primärpräparationen isolieren zu müssen. Ob dies auch für NSZ aus der SVZ adulter Mäuse unter den gegebenen Kulturbedingungen zutrifft, wurde in mehrfach passagierten NSZ-Kulturen in einigen Vorversuchen untersucht. Analysiert wurde die Expression von Stammzellmarkern und die Fähigkeit zur Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone (Tabelle 3.1).

Pas- sage	Kultivierung	NTPD- ase2	Nestin	DCX	GFAP	O4	$\beta$ -III- Tubulin
1	7 +3+1	++	+++	-	+++	++	+
	7 +3+1+8	++	++	+++	+++	+++	+++
2	7+7 +3+1	++	++	-	++	+++	+
	7+7 +3+1+8	+	+	-	+	++	-
3	7+7+7+3+1	+++	++	+	++	++	-
	7+7+7+3+1+8	+++	++	-	++	+++	-

**Tabelle 3.1** Einfluss der Passagenanzahl kultivierter NSZ auf die Expression von Stammzell-, Astrozyten-, Oligodendrozyten- und Neuronenmarkern kultivierter adulter NSZ. Aus der SVZ isolierte NSZ werden für sieben Tage als Neurosphären kultiviert (rot), und ein- bis dreimal passagiert (linke Spalte). Daraufhin werden die Zellen für drei Tage als adhärenente Monolayer kultiviert (grün). Es folgt der Entzug der Wachstumsfaktoren für 24 Stunden (orange). Zur Analyse der Multipotenz der kultivierten NSZ wird die Differenzierung der Zellen über acht Tage eingeleitet (blau). Darauf folgt die immunzytochemische Analyse der Zellen für die NTPDase2, Nestin, DCX, GFAP, O4 und  $\beta$ -III-Tubulin. Färbung: -, keine; +, gering; ++, mäßig; +++, hoch.

Einmal passagierte adulte NSZ zeigen nach 11 Tagen in Kultur eine deutliche Expression der NTPDase2, eines Markers für Typ-B-Zellen der SVZ. Nestin, ein Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen der SVZ (Typ-B-, -C- und -A-Zellen), wird in hohem Maße exprimiert. Eine Färbung für DCX als Marker für die Typ-A-Zellen und junge Neurone kann nicht nachgewiesen werden. GFAP, welches sowohl von den Typ-B-Zellen, als auch von Astrozyten exprimiert wird, kann gezeigt werden. Der Oligodendrozytenmarker O4 zeigt nur eine mäßige und der Neuronenmarker  $\beta$ -III-Tubulin nur eine geringe Färbung.

Diese Kulturen weisen nach ihrer Differenzierung ein verändertes Expressionsprofil auf. NTPDase2 und Nestin werden nun mäßig exprimiert, wohingegen eine hohe DCX-Färbung beobachtet werden kann. GFAP bleibt weiterhin stark exprimiert und auch die Oligodendrozyten- und Neuronenmarkierung über O4 und  $\beta$ -III-Tubulin steigt stark an.

Zellen nach einmaligem Passagieren sind multipotent und können sich nach Entzug der Wachstumsfaktoren und Zugabe von 2% FBS in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone differenzieren. Die Resultate dieser Vorversuche wurden im Rahmen einer mitbetreuten Diplomarbeit in weiteren eingehenden Analysen umfassend untersucht und bestätigt (Messemer, 2008).

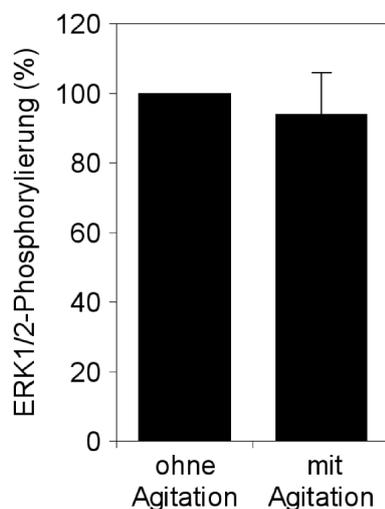
Mehrfach passagierte NSZ zeigen gegenüber einmal passagierten Kulturen wichtige Unterschiede. Im Wesentlichen ändert sich das Profil der NTPDase2-, Nestin-, GFAP- und O4-Expression in zwei- und dreifach passagierten, undifferenzierten und differenzierten Kulturen nicht. Jedoch zeigen sich in der Färbung für DCX und  $\beta$ -III-Tubulin relevante Unterschiede. Schon nach zweimaligem Passagieren der Zellen mit anschließender Differenzierung lassen sich beide Marker nicht mehr nachweisen.

Das mehrfache Passagieren von NSZ *in vitro* führt also zum Verlust der Expression für Marker junger und reifer Neurone in differenzierten NSZ-Kulturen. Die uneingeschränkte Multipotenz der NSZ, insbesondere die Differenzierung in Neurone lässt sich unter diesen Bedingungen nicht mehr bestätigen. Die folgenden Experimente wurden deshalb mit stets neu angelegten Primärkulturen durchgeführt, welche nur einmal passagiert wurden.

### **3.1.3 Auswirkungen mechanischer Agitation auf die ERK1/2-Phosphorylierung**

NSZ reagieren auf mechanische Agitation mit der Phosphorylierung von ERK1/2 und sind dann nur vermindert mit ADP $\beta$ S stimulierbar (Grimm, 2005 und Gampe, 2005). Die Zugabe von Substanzen zu adhärenen NSZ, wie sie in den folgenden Experimenten nötig ist, geht mit einer Umwälzung des Mediums und damit einer Agitation der Zellen einher. Um die Auswirkung der Substanzzugabe zu NSZ auf die Aktivierung von ERK1/2 zu untersuchen, wurden adhärenente NSZ mit konditioniertem Medium stimuliert, indem ein Fünftel des Kulturmediums entnommen und zurück ins Well pipettiert wurde (mit Agitation). Die Zellysate wurden anschließend dem quantitativen Westernblot unterworfen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (ohne Agitation).

Wie die Abbildung 3.2 zeigt, lässt sich zwischen beiden Versuchsgruppen kein Unterschied feststellen. Die Datenteihe „mit Agitation“ unterscheidet sich mit 94% nicht signifikant von der Kontrolle (ohne Agitation, 100%). Die NSZ können demzufolge mit Substanzen stimuliert werden, ohne dass der Vorgang der Substanzzugabe selbst Auswirkungen auf den Zustand der ERK1/2-Phosphorylierung der Zellen hat.



**Abbildung 3.2** Auswirkungen der Zugabe von konditioniertem Medium auf die ERK1/2-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden entweder sofort lysiert und in der SDS-PAGE aufgetragen (ohne Agitation) oder zuvor für 5 min mit konditioniertem Medium behandelt (mit Agitation). Der Nachweis von pERK1/2 erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Datenreihe „ohne Agitation“. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=5).

### 3.2 Nukleotid-, Nukleosid- und EGF-vermittelte Signalwege in adulten NSZ

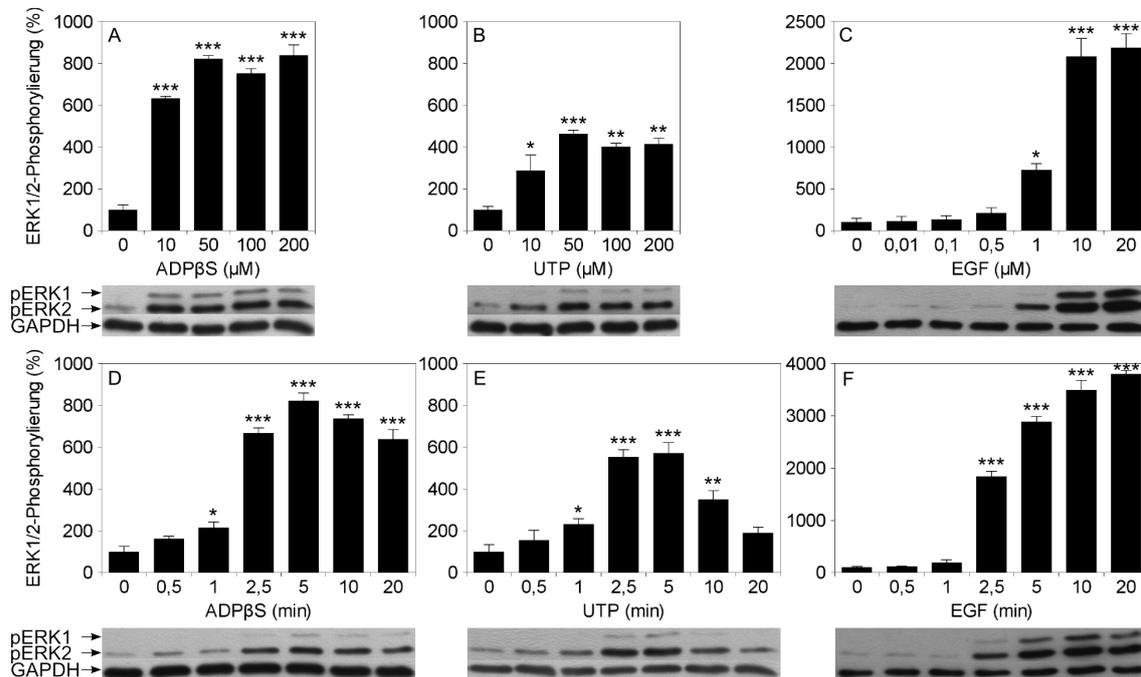
Zur Untersuchung der in NSZ induzierten Signalkaskaden werden dosis- und zeitabhängige Studien der Nukleotid- und EGF-induzierten Proteinphosphorylierungen ausgewählter Signalwegskomponenten durchgeführt. Weiterführend werden die zur ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung führenden Signalwege durch Inhibitoren charakterisiert. Zur Spezifizierung der bisherigen Untersuchungen wird die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in Stammzellkulturen von P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen analysiert.

### 3.2.1 Dosis- und zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung

In einem ersten Stimulationsversuch wurden adhärente adulte NSZ auf ihre Fähigkeit der ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierten ERK1/2-Aktivierung analysiert (Abbildung 3.3). Zur Untersuchung der dosisabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung wurden die Agonisten in den angegebenen Konzentrationen für 5 min (ADP $\beta$ S, EGF) bzw. 2,5 min (UTP) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) appliziert (A-C). Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert (D-F). Die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 im quantitativen Westernblot analysiert.

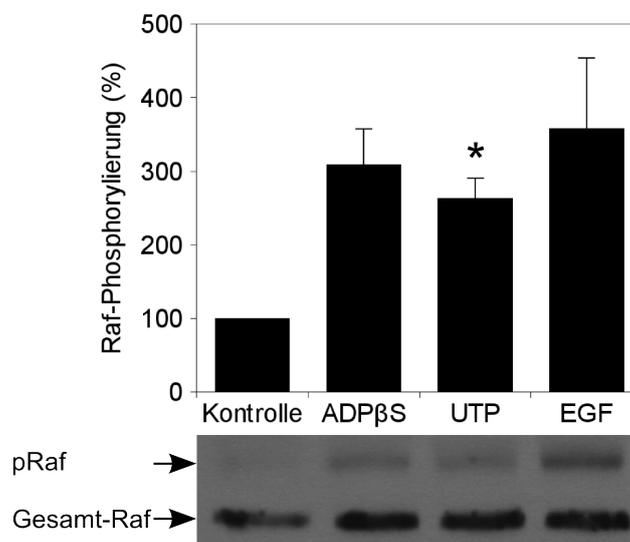
Die Daten zeigen, dass alle drei Agonisten eine zeit- und dosisabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren. Bei einer Applikationszeit von 5 bzw. 2,5 min zeigen sich maximale Antworten für ADP $\beta$ S (822%, A) bzw. UTP (463%, B) bei einer Konzentration ab 50  $\mu$ M. EGF löst nach 5 min Stimulation eine maximale ERK1/2-Phosphorylierung ab 10 ng/ml (2083%, C) aus.

Die ERK1/2-Phosphorylierung beginnt deutlich früher nach Stimulation mit den P2-Rezeptoragonisten ADP $\beta$ S und UTP im Vergleich zur Aktivierung des EGF-Rezeptors mit EGF. Beide Nukleotide (je 50  $\mu$ M) lösen eine rasche Phosphorylierung von ERK1/2 nach bereits 1 min aus (ADP $\beta$ S 215%, D, UTP 232%, E) und erreichen ein Maximum nach 5 min mit einer 8,2-fachen (ADP $\beta$ S) und 5,7-fachen (UTP) Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel, 100%). Daraufhin nimmt das Ausmaß der ERK1/2-Aktivierung im weiteren zeitlichen Verlauf stetig ab. Eine signifikante Aktivierung von ERK1/2 nach EGF-Stimulation (10 ng/ml) wurde erst nach 2,5 Minuten beobachtet (1842%, F). Das



**Abbildung 3.3** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte dosis- und zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung in adulten NSZ. Zur Analyse der Dosisabhängigkeit der Agonisten ADP $\beta$ S, UTP und EGF wurde diese in den angegebenen Konzentrationen für 5 min (ADP $\beta$ S, EGF) bzw. 2,5 min (UTP) appliziert (A-C). Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M) oder EGF (10 ng/ml) stimuliert (D-F). Der Nachweis von pERK1/2 erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3-6). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  relativ zur Kontrolle. Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pERK1/2 und GAPDH als Ladekontrolle.

Niveau der ERK1/2-Phosphorylierung steigt auch nach 10 und 20 min stetig an und löst dabei mit einer bis zu 38-fachen Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (100%) eine weitaus stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 aus, als es für ADP $\beta$ S und UTP beobachtet wurde.



**Abbildung 3.4** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte Raf-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für 5 min mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M) oder EGF (10 ng/ml) stimuliert. Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Der Nachweis von pRaf erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Raf. Gesamt-Raf diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$  relativ zur Kontrolle. Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pRaf und Gesamt-Raf als Ladekontrolle.

### 3.2.2 ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte Raf-Phosphorylierung

Der klassische Weg der ERK1/2-Aktivierung setzt die vorherige Phosphorylierung der Proteinkinase Raf voraus. Aus diesem Grund wurde die Nukleotid- und EGF-induzierte Aktivierung von Raf in adulten NSZ untersucht. Dazu wurden die Zellen für 5 min mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von phosphoryliertem Raf erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Raf.

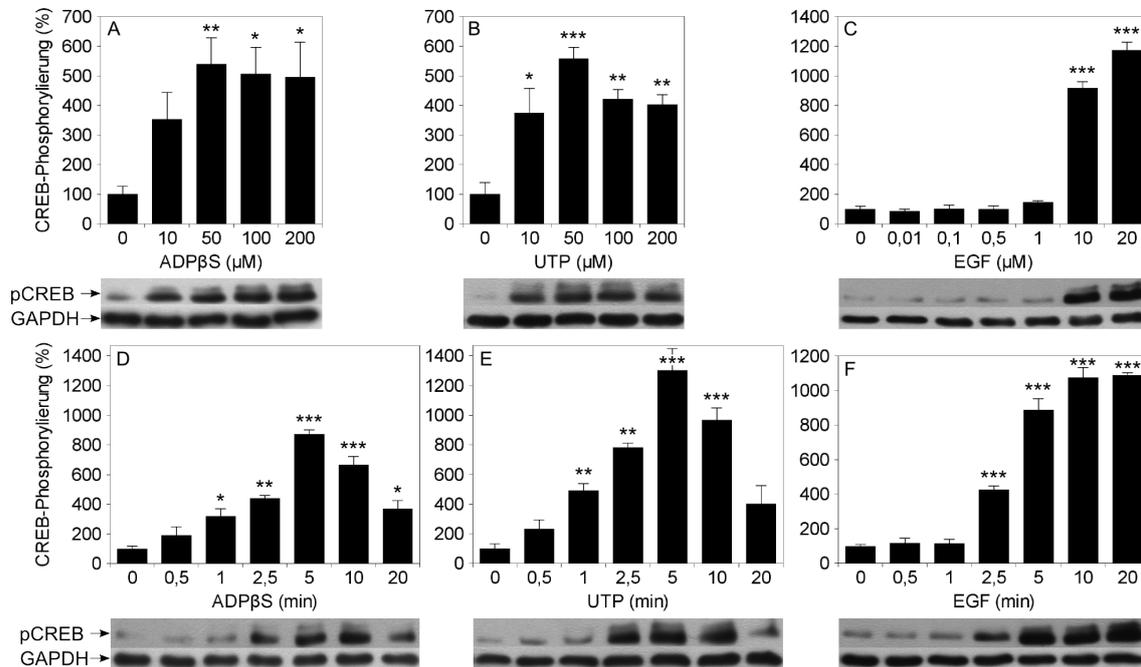
Die Ergebnisse zeigen, dass UTP die Phosphorylierung von Raf signifikant um das 2,6-fache im Vergleich zur Kontrolle (100%) erhöht (Abbildung 3.4). ADP $\beta$ S und EGF zeigen eine tendentielle Erhöhung der Raf-Phosphorylierung um das 3,1- bzw. 3,6-fache im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.2.3 Zeit- und dosisabhängige CREB-Phosphorylierung

Als ein weiteres mögliches Zielprotein der Nukleotid- und EGF-stimulierten Signalkaskaden in adulten NSZ wurde der Transkriptionsfaktor CREB analysiert (Abbildung 3.5). Zur Untersuchung der dosisabhängigen CREB-Phosphorylierung wurden ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF in den angegebenen Konzentrationen für 5 min (ADP $\beta$ S, EGF) bzw. 2,5 min (UTP) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) appliziert (A-C). Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert (D-F). Anschließend wurden die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten im quantitativen Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes CREB analysiert.

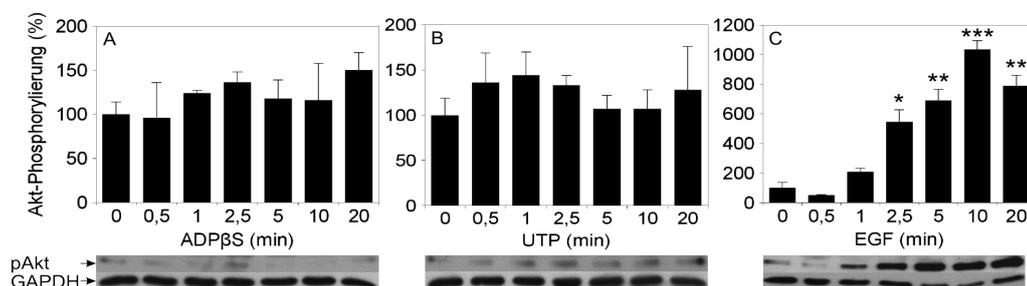
Die ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte Phosphorylierung von CREB zeigt ähnliche zeit- und dosisabhängige Verläufe wie die Nukleotid- und EGF-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 3.3). Beide Nukleotide induzieren nach einer Stimulation von 5 min (ADP $\beta$ S, EGF) bzw. 2,5 min (UTP) ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M (ADP $\beta$ S 540%, A, UTP 558%, B) und EGF ab 10 ng/ml (917%, C) eine maximale CREB-Phosphorylierung.

ADP $\beta$ S- und UTP (je 50  $\mu$ M) lösen schon nach 1 min eine signifikante CREB-Phosphorylierung aus (ADP $\beta$ S 319%, D, UTP 492%, E), mit einem Maximum



**Abbildung 3.5** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte dosis- und zeitabhängige CREB-Phosphorylierung in adulten NSZ. Zur Analyse der Dosisabhängigkeit der Agonisten ADP $\beta$ S, UTP und EGF wurden diese in den angegebenen Konzentrationen für 5 min (ADP $\beta$ S, EGF) bzw. 2,5 min (UTP) appliziert (A-C). Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M) oder EGF (10 ng/ml) stimuliert (D-F). Der Nachweis von pCREB erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3-5). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  relativ zur Kontrolle. Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pCREB und GAPDH als Ladekontrolle.

bei 5 min mit 872% (ADP $\beta$ S) bzw. 1303% (UTP). Daraufhin nimmt das Ausmaß der CREB-Phosphorylierung stetig ab. Die EGF-vermittelte (10 ng/ml) CREB-Aktivierung ist im Vergleich dazu verzögert und erst nach 2,5 min signifikant (427%). Auch nach 10 und 20 min steigt das Niveau der CREB-Phosphorylierung weiter



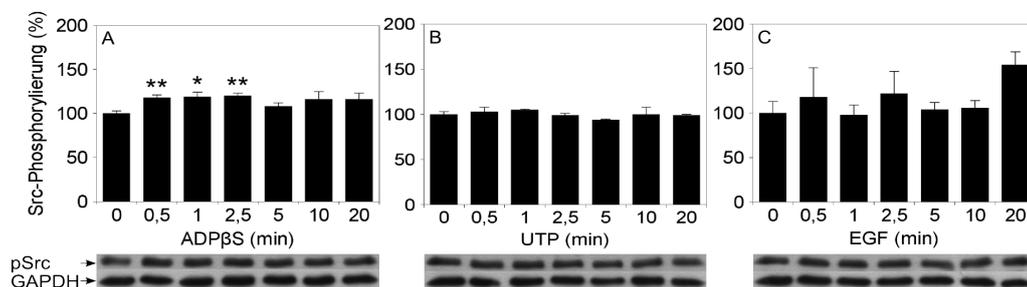
**Abbildung 3.6** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte zeitabhängige Akt-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) (A), UTP (50  $\mu$ M) (B) oder EGF (10 ng/ml) (C) stimuliert. Der Nachweis von pAkt erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle. Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pAkt und GAPDH als Ladekontrolle.

an und erreicht mit maximal 1090% einen deutlich schwächeren Effekt, als es für ERK1/2 gezeigt wurde.

### 3.2.4 Zeitabhängige Akt-Phosphorylierung

Als ein weiteres Mitglied der möglicherweise von Nukleotiden- und EGF-stimulierbaren Ziele wurde die Proteinkinase Akt untersucht (Abbildung 3.6). Dafür wurden NSZ für die angegebenen Zeitpunkte mit ADP $\beta$ S (A), UTP (B) (je 50  $\mu$ M), EGF (C, 10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten wurden dann im quantitativen Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes Akt analysiert.

Die Experimente ergaben, dass ADP $\beta$ S (A)- und UTP (B) (je 50  $\mu$ M) bei den gewählten Zeitpunkten nicht in der Lage sind, eine signifikante Akt-Phosphorylierung auszulösen. Im Vergleich dazu kann EGF (10 ng/ml, C) nach 2,5 min mit 544%



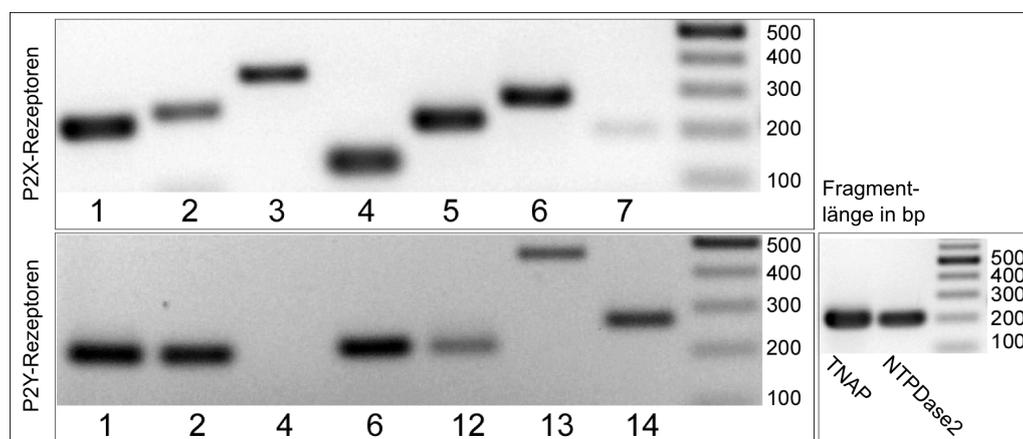
**Abbildung 3.7** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte zeitabhängige Src-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) (A), UTP (50  $\mu$ M) (B) oder EGF (10 ng/ml) (C) stimuliert. Der Nachweis von pSrc erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  relativ zur Kontrolle. Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pSrc und GAPDH als Ladekontrolle.

eine signifikante Akt-Phosphorylierung induzieren, welche bei 10 min mit 1033% ihr Maximum erreicht. Nach 20 min schwächt sich das Signal ab, bleibt aber weiterhin signifikant verschieden zur Kontrolle.

### 3.2.5 Zeitabhängige Src-Phosphorylierung

Als ein fünftes mögliches Zielprotein aktivierter P2Y- und EGF-Rezeptoren wurde die Tyrosinkinase Src analysiert (Abbildung 3.7). Adhärenzte NSZ wurden dafür mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert (A-C). Daraufhin wurden die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten im quantitativen Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes Src untersucht.

Die Daten demonstrieren, dass UTP (50  $\mu$ M, B) und EGF (10 ng/ml, C) bei den gewählten Zeitpunkten nicht in der Lage sind, eine signifikante Src-Phosphorylierung



**Abbildung 3.8** mRNA-Nachweis von P2X- und P2Y-Rezeptoren, TNAP und NTPDase2 in kultivierten adulten NSZ. Die mRNA adulter NSZ wurde extrahiert und in der RT-PCR mit Primern gegen alle P2X- und P2Y-Rezeptoren, die TNAP (Aplp) und NTPDase2 (Entpd2) untersucht. GAPDH (nicht gezeigt) fungierte als Kontrolle. Die Primersequenzen und -längen der erwarteten Amplifikationsprodukte finden sich in Tabelle 2.3.

auszulösen. Im Vergleich dazu induziert ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M, A) zwischen 0,5 und 2,5 min eine schwache, signifikante 1,2-fache Erhöhung des Signals.

### 3.2.6 Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren

In früheren Studien konnte unsere Arbeitsgruppe die Expression der durch ADP $\beta$ S und UTP stimulierten P2Y-Rezeptoren, sowie der NTPDase2 und TNAP in Neurosphären aus der SVZ adulter Mäuse identifizieren (Mishra et al., 2006 und Langer et al., 2007). Zur Bestimmung des P2-Rezeptor-Repertoires in adhärennten NSZ, wurden RT-PCRs mit Primern gegen alle P2X- und P2Y-Rezeptoren, die TNAP (Aplp) und NTPDase2 (Entpd2) durchgeführt (Abbildung 3.8). In Tabelle 2.3 sind die Primersequenzen und -längen der erwarteten Amplifikationsprodukte aufgelistet.

Es zeigen sich starke Banden für P2Y<sub>1</sub>- (ADP, ATP), P2Y<sub>2</sub>- (UTP, ATP) und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor- (UDP) mRNA und schwächere Banden für P2Y<sub>12</sub>- (ADP), P2Y<sub>13</sub>- (ADP)

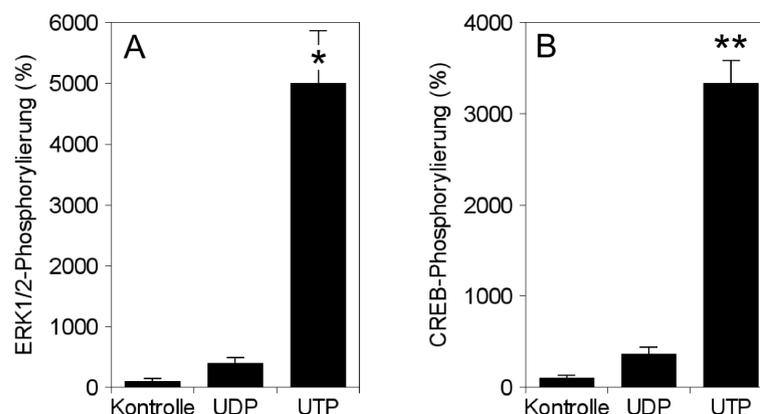
und P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor- (UDP-Glukose) mRNA. P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. Starke Signale konnten für P2X<sub>1</sub>- bis P2X<sub>6</sub>-Rezeptor- (alle ATP) mRNA gezeigt werden. Für P2X<sub>7</sub>-Rezeptor- (ATP) mRNA wurde ein leichtes Signal beobachtet. Außerdem konnte mRNA, welche für die NTPDase2 und TNAP kodiert, nachgewiesen werden.

### 3.2.7 UDP-induzierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung

Die Verfügbarkeit von exogen zugegebenen Nukleotiden kann durch in der Plasmamembran befindliche Nukleotid-spaltende Enzyme reguliert werden. Die dabei entstehenden Hydrolyseprodukte können ihrerseits als Signalstoff dienen. NSZ der SVZ exprimieren die NTPDase2 und die TNAP (Braun et al., 2003, Mishra et al., 2006 und Langer et al., 2007, Kapitel 3.2.6), welche UTP zu UDP hydrolysieren können. Das entstandene UDP kann nun als Ligand des P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors dienen und möglicherweise zur Aktivierung von ERK1/2 und CREB führen. Die Wirkung des zugegebenen UTPs könnte sich somit nicht ausschließlich über Aktivierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors entfalten, sondern auch über Stimulierung von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren.

Um die Beteiligung des P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors zu untersuchen, wurden die Zellen für 5 min mit UDP (50  $\mu$ M) und zum Vergleich mit UTP (50  $\mu$ M) stimuliert. Die ausgelösten zellulären Antworten wurden dann im quantitativen Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 und CREB untersucht.

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede der ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (100%). Im Gegensatz dazu wird nach 5-minütiger Stimulation mit UTP (50  $\mu$ M) eine deutliche, signifikante Erhöhung der ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung auf das 50- bzw. 33-fache ausgelöst (Abbildung 3.9).

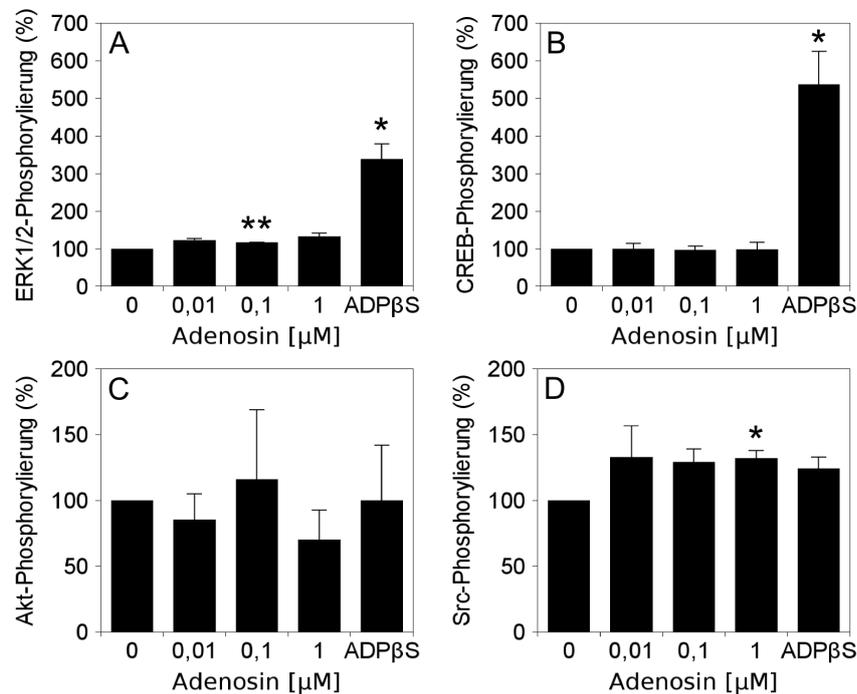


**Abbildung 3.9** UDP- und UTP-induzierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für 5 min mit UDP oder UTP (je 50  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Der Nachweis von pERK1/2 (A) und pCREB (B) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 und CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p<0,05$  und \*\* $p<0,01$  relativ zur Kontrolle.

### 3.2.8 Adenosin-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung

Adenosin, als ein mögliches Abbauprodukt von ATP und in geringerem Maße auch des langsam hydrolysierbaren ADP $\beta$ S, wurde als ein weiteres mögliches Zielprotein in der Nukleotid- und EGF-stimulierbaren Signalkaskaden in adulten NSZ in die Signalweganalysen einbezogen (Abbildung 3.5).

Zur Untersuchung der ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in Abhängigkeit der dosisabhängigen Adenosin-Applikation wurden die Zellen für 5 min mit Adenosin in den angegebenen Konzentrationen, mit ADP $\beta$ S (50  $\mu\text{M}$ ) oder mit



**Abbildung 3.10** Adenosin-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für die angegebenen Konzentrationen 5 min mit Adenosin oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3-4). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  relativ zur Kontrolle.

Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert (Abbildung 3.10). Die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten wurden im quantitativen Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2, CREB, Akt und Src analysiert.

Die Daten lassen bei einer Applikation von 0,1  $\mu$ M Adenosin eine sehr schwache (1,2-fache), jedoch signifikante Phosphorylierung von ERK1/2 erkennen (A). ADP $\beta$ S ist

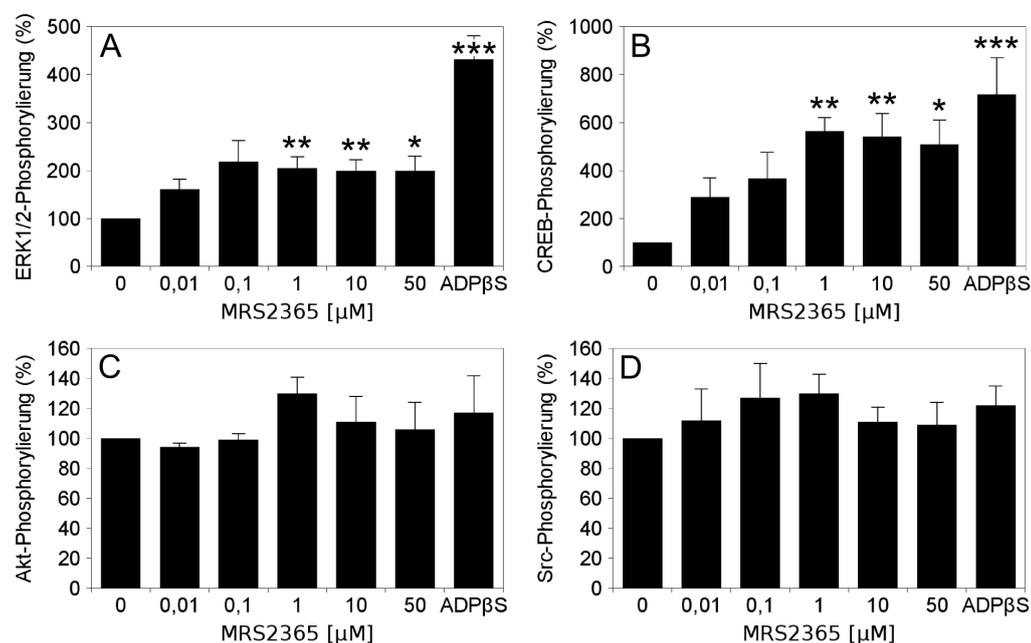
in der Lage, eine deutlich stärkere ERK1/2-Aktivierung auszulösen (3,4-fach). Adenosin kann in den angegebenen Konzentrationen im Vergleich mit ADP $\beta$ S (5,4-fach) keine CREB-Phosphorylierung auslösen (B). Akt wird weder durch Adenosin, noch durch ADP $\beta$ S aktiviert (C). Adenosin löst bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine schwache, signifikante (1,3-fache) Src-Phosphorylierung aus (D). Bei den anderen verwendeten Konzentrationen kann Src weder durch Adenosin, noch durch ADP $\beta$ S aktiviert werden.

### 3.2.9 MRS2365-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung

ADP $\beta$ S aktiviert P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren. Um zu ermitteln, welche Rezeptorsubtypen an der ADP $\beta$ S-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 und CREB in adulten NSZ beteiligt sind, wurde der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifische Agonist MRS2365 (Bourdon et al., 2006) eingesetzt.

Zur Untersuchung der P2Y<sub>1</sub>-stimulierten dosisabhängigen ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung wurde MRS2365 für 5 min in den angegebenen Konzentrationen, ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) appliziert (Abbildung 3.11). Im quantitativen Westernblot wurden dann die durch die Agonisten ausgelösten zellulären Antworten mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2, CREB, Akt und Src analysiert.

Es lässt sich eine MRS2365-induzierte dosisabhängige ERK1/2-Phosphorylierung beobachten (A). Das Maximum der ERK1/2-Aktivierung wird bei 1  $\mu$ M MRS2365 mit 205% erreicht und wird bis 50  $\mu$ M beibehalten. ADP $\beta$ S löst mit 432% im Vergleich zu MRS2365 eine mehr als doppelt so hohe ERK1/2-Phosphorylierung. Die MRS2365- und ADP $\beta$ S-induzierte CREB-Phosphorylierung zeigt einen ähnlichen Verlauf (B). Die MRS2365-induzierte CREB-Aktivierung erreicht bei 1  $\mu$ M mit 564%



**Abbildung 3.11** MRS2365-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für die angegebenen Konzentrationen 5 min mit dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten MRS2365 oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=2-8). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle.

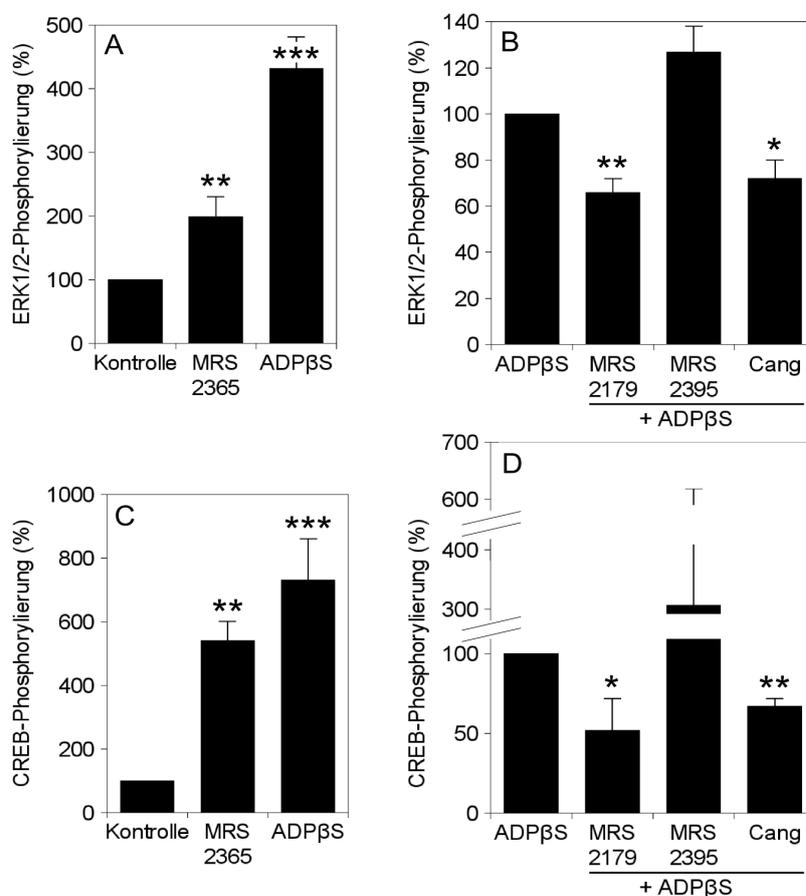
ihr Maximum, welches sich bei 10- und 50  $\mu$ M nur minimal abschwächt. ADP $\beta$ S löst mit 716% eine etwa 1,3-fach stärkere Antwort aus. Akt (C) und Src (D) lassen sich weder durch MRS2365 noch durch ADP $\beta$ S in den angegebenen Konzentrationen aktivieren.

### 3.2.10 ADP $\beta$ S-vermittelte Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren

Um zu ermitteln, ob neben dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor noch weitere Rezeptorsubtypen, wie die P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren, in der ADP $\beta$ S-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 und CREB beteiligt sind, wurden der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifische Agonist MRS2365, der P2Y<sub>1</sub>-spezifische Antagonist MRS2179, der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-spezifische Antagonist MRS2395 und der P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor-spezifische Antagonist Cangrelor (AR-C69931MX) eingesetzt (Abbildung 3.12).

Die Zellen wurden zur vergleichenden Analyse für 5 min mit MRS2365, ADP $\beta$ S (je 50  $\mu$ M) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert (A, C). Nach Vorinkubation von MRS2179 (100  $\mu$ M, 15 min), MRS2395 (100  $\mu$ M, 30 min) oder Cangrelor (Cang, 100  $\mu$ M, 30 min) erfolgte die 5-minütige Applikation mit ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) (B, D). Der Nachweis von pERK1/2 (A, B) und pCREB (C, D) wurde im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 bzw. CREB geführt.

Die Daten zeigen eine MRS2365-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und CREB (A, B) mit einer Erhöhung der Signale um das 2- bzw. 5,4-fache im Vergleich zur Kontrolle (100%). Dies entspricht 30% bzw. 70% der Aktivierung der mit 50  $\mu$ M ADP $\beta$ S-ausgelösten ERK1/2- (432%) bzw. CREB-(730%) Phosphorylierung. Der kompetitive P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifische Antagonist MRS2179 inhibiert die ADP $\beta$ S-ausgelöste ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung teilweise (C, D). Die ADP $\beta$ S-induzierte ERK1/2- bzw. CREB Phosphorylierung (je 100%) wird dabei nach Vorinkubation mit MRS2179 auf 66% bzw. 52% reduziert. Der P2Y<sub>12</sub>-spezifische Antagonist MRS2395 ergibt keinen Effekt auf die ADP $\beta$ S-ausgelöste ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung (C, D). Im Gegensatz dazu löst der P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-spezifische



**Abbildung 3.12** Stimulation der ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten MRS2365 und Inhibierung durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179, den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2395 und den P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor-Antagonisten Cangrelor in adulten NSZ. Die Zellen wurden zur vergleichenden Analyse 5 min mit MRS2365 und ADPβS (je 50 μM) stimuliert (A,C). Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Nach Vorinkubation von MRS2179 (100 μM, 15 min), MRS2395 (100 μM, 30 min) oder Cangrelor (Cang, 100 μM, 30 min) erfolgte die 5-minütige Applikation mit ADPβS (50 μM) (B, D). Der Nachweis von pERK1/2 (A, B) und pCREB (C, D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 bzw. CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=3-11). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle.

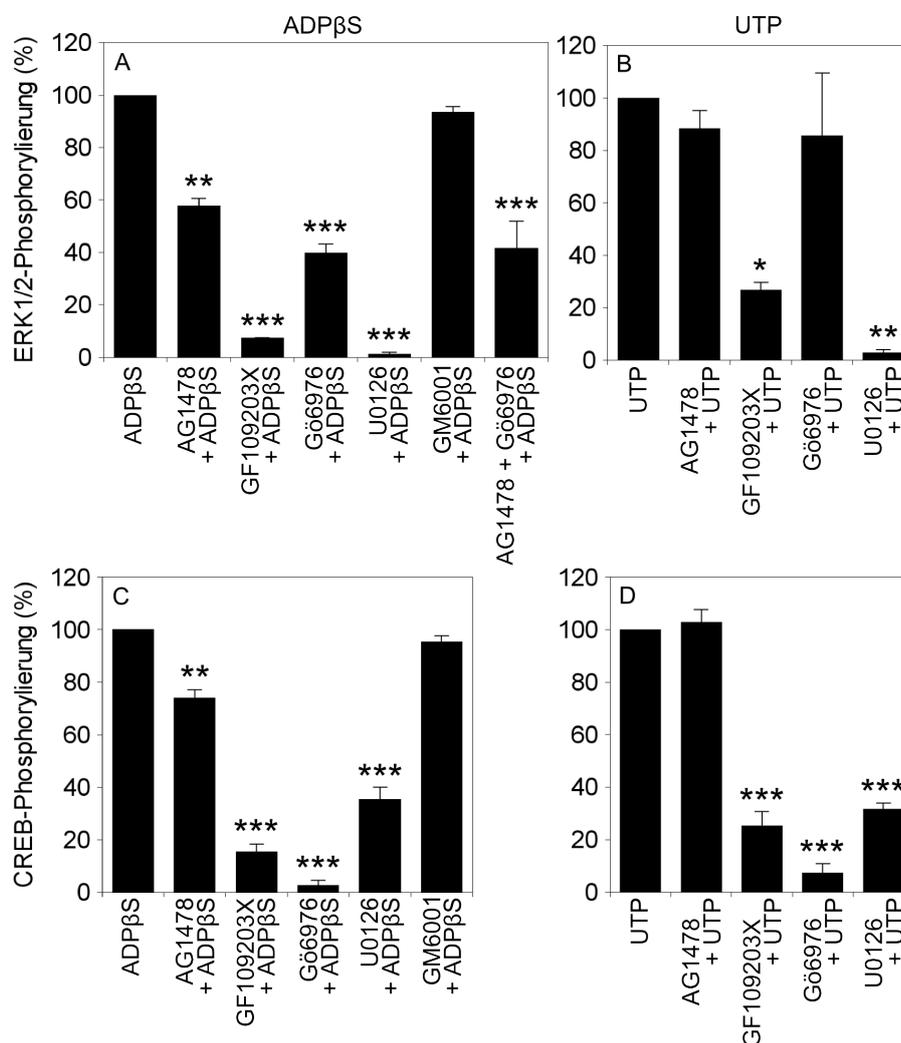
kompetitive Antagonist Cangrelor eine signifikante Reduktion der ADP $\beta$ S-induzierten ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung aus (C, D). Das Phosphorylierungsniveau für ERK1/2 bzw. CREB fiel dabei in beiden Fällen um rund 30% (72% bzw. 67%) im Vergleich zum nicht inhibierten ADP $\beta$ S-Signal (100%).

### 3.2.11 ADP $\beta$ S- und UTP-vermittelte Signalwege zur ERK1/2-Aktivierung

Die Datenreihen der ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierten dosis- und zeitabhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 und CREB (Kapitel 3.2.3 und 3.2.1) zeigen, dass sowohl beide Nukleotide, als auch EGF gleiche intrazelluläre Proteine aktivieren können. Dies wirft die Frage nach der Art und Zusammensetzung der beteiligten intrazellulären Signalwege auf. Diese können parallel aktiviert werden oder sich teilweise überlappen. Eine Möglichkeit für überlappende Signalwege wäre die Bindung des Nukleotids an seinen Rezeptor und eine dadurch ausgelöste Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Zur Analyse der ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-ausgelösten intrazellulären Signalwege, die schließlich zur ERK1/2-Aktivierung führen, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt (Abbildung 3.13).

NSZ wurden mit den Inhibitoren bzw. Vehikel für 30-60 min vorinkubiert (Inhibitorkonzentrationen und -inkubationszeiten siehe Tabelle 2.4) und anschließend für 5 min mit ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) (A,C), UTP (50  $\mu$ M) (B,D) bzw. Vehikel in Gegenwart der Inhibitoren stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2.

Um die Möglichkeit einer in die ADP $\beta$ S-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung involvierten Transaktivierung des EGF-Rezeptors zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Einsatz des Inhibitors AG1478 gehemmt (A).



**Abbildung 3.13** Inhibition der ADPβS- und UTP-induzierten ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung. Die Inhibitoren bzw. Vehikel wurden für 30-60 min appliziert (Inhibitorkonzentrationen und -inkubationszeiten siehe Tabelle 2.4). Es folgte die Zugabe von ADPβS (50 μM) (A,C), UTP (50 μM) (B,D) bzw. Vehikel für 5 min in Gegenwart der Inhibitoren. Der Nachweis von pERK1/2 (A,B) und pCREB (C,D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 bzw. CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=3-4). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle.

Dies führt zu einer Reduktion der ADP $\beta$ S-ausgelösten ERK1/2-Aktivierung um 42%. GF109203X, ein nicht selektiver Inhibitor aller Serin/Threonin-Kinaseformen mit Ähnlichkeit zu Stauroporinen und Isoformen der Proteinkinase C (Gesamt-PKCs) (Mackay und Twelves, 2007), inhibiert die ADP $\beta$ S-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung nahezu komplett (auf 7%). Im Gegensatz dazu reduziert der Inhibitor Gö6976, welcher  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen konventioneller PKCs (Ca<sup>2+</sup>-abhängige PKC-Isoformen, kurz cPKCs) inhibiert, die ERK1/2-Phosphorylierung nur um 60%. Inhibierung der stromaufwärts-gelegenen MAP/ERK-Kinase MEK durch den Inhibitor U0126 hebt die ERK1/2-Phosphorylierung auf (1%). Frühere Studien an anderen Zellsystemen zeigen eine P2Y-Rezeptor-vermittelte Transaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren über Metalloproteasen (Camden et al., 2005 und Yin et al., 2007). Aus diesem Grund wurde der Metalloprotease-Inhibitor GM6001 eingesetzt. Es zeigte sich dabei keine signifikante Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung (93%). Im Vergleich zur Gö6976-Applikation allein, ergibt die Koapplikation von AG1478 und Gö6976 keine zusätzliche Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung (42%). Dies lässt vermuten, dass sich die ADP $\beta$ S-ausgelöste Aktivierung von cPKCs stromabwärts der EGF-Rezeptor-Aktivierung befindet.

Interessanterweise unterscheiden sich die durch ADP $\beta$ S und UTP ausgelösten Signalwege zur ERK1/2-Aktivierung. Inhibierung des EGF-Rezeptors mit AG1478 zeigt keinen signifikanten Effekt auf die UTP-ausgelöste ERK1/2-Aktivierung (88%, B). Während GF109203X die ERK1/2-Phosphorylierung um 73% reduziert, zeigt der cPKC-Inhibitor Gö6976 keinen Effekt auf die durch UTP-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung (86%). Ebenso wie die ADP $\beta$ S-ausgelöste ERK1/2-Phosphorylierung, kann auch die UTP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Hemmung von MEK mittels U0126 komplett inhibiert werden (3%).

Diese Daten zeigen, dass die ADP $\beta$ S- und UTP-ausgelösten Signalwege zur ERK1/2-Phosphorylierung in der Aktivierung von MEK konvergieren, sich aber in den zwischengeschalteten Signalkaskaden unterscheiden. Unterschiede ergeben sich hierbei in der Involvierung des EGF-Rezeptors in der ADP $\beta$ S- aber nicht in der UTP-vermittelten ERK1/2-Aktivierung. Des Weiteren spielen cPKCs eine Rolle in der ADP $\beta$ S-, nicht aber in der UTP-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2.

### **3.2.12 ADP $\beta$ S- und UTP-vermittelte Signalwege zur CREB-Aktivierung**

Ähnlich wie für die ERK1/2-Aktivierung durchgeführt, wurden in einem weiteren Versuchsansatz die ADP $\beta$ S- und UTP-induzierten stimulierten Signalwege zur CREB-Phosphorylierung analysiert. Der Ablauf der Experimente entspricht dem in Kapitel 3.2.11 beschriebenen Verfahren. Allein der Nachweis von pCREB erfolgte dabei im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes CREB.

Wie im Folgenden beschrieben, zeigen die durch ADP $\beta$ S- und UTP-induzierten Signalkaskaden, die zur Phosphorylierung von CREB führen, Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede im Vergleich zur ERK1/2-Aktivierung.

Ebenso wie für die ERK1/2-Aktivierung nachgewiesen, wird die ADP $\beta$ S-induzierte CREB-Phosphorylierung durch Applikation des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 signifikant reduziert (auf 74%, Abbildung 3.13, C). Die Anwendung des Gesamt-PKC-Inhibitors GF109203X hemmt die ADP $\beta$ S-ausgelöste CREB-Phosphorylierung nahezu vollständig (auf 15%), so wie es auch für die ERK1/2-Aktivierung zutrifft. Unterschiede ergeben sich bei der vollständigen Hemmung der ADP $\beta$ S-ausgelösten CREB-Aktivierung bei Einsatz des cPKC-Inhibitors Gö6976 (3%). Die Applikation des MEK-Inhibitors U0126 induziert eine nur teilweise, etwa 65%ige Involvierung der MAP/ERK-Kinase an der ADP $\beta$ S-induzierten CREB-Phosphorylierung.

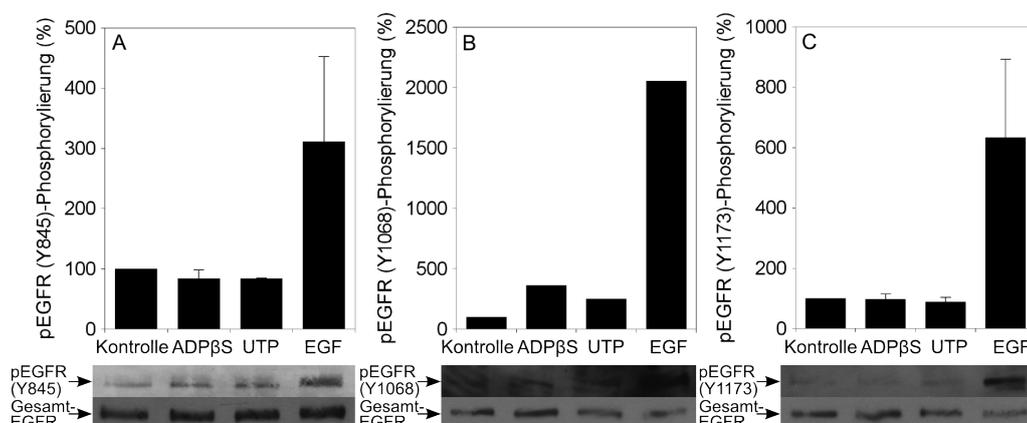
Wie schon für die ERK1/2-Phosphorylierung gezeigt, kann auch auf die CREB-Aktivierung beim Einsatz des Metalloprotease-Inhibitors GM6001 kein Effekt erzielt werden (95%).

Im Gegensatz zur ADP $\beta$ S-induzierten CREB-Phosphorylierung kann die UTP-stimulierte CREB-Aktivierung durch Hemmung des EGF-Rezeptors mittels AG1478 nicht beeinflusst werden (103%, D). Gemeinsamkeiten zeigen sich in der nahezu vollständigen Reduktion des CREB-Phosphorylierungsniveaus nach Einsatz der PKC-Inhibitoren GF109230X (25%) und Gö6976 (7%). Identisch zur ADP $\beta$ S-Stimulation ergibt sich auch für UTP eine nur partielle Hemmung der CREB-Phosphorylierung durch den MEK-Inhibitor U0126 (32%).

Die Daten weisen, mit Ausnahme einer möglichen EGF-Rezeptor-Transaktivierung durch ADP $\beta$ S, große Ähnlichkeiten mit den ADP $\beta$ S- und UTP-ausgelösten Signalwegen zur CREB-Phosphorylierung auf. Im Gegensatz dazu ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den P2Y-Rezeptor-ausgelösten Signalwegen, die zur ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung führen. So scheinen cPKCs bei den ADP $\beta$ S- und insbesondere bei den UTP-ausgelösten CREB phosphorylierenden Signalkaskaden stärker involviert zu sein als bei der Aktivierung von ERK1/2. Zudem ist die Phosphorylierung von CREB nur teilweise von einer Aktivierung der MAP/ERK-Kinase abhängig.

### **3.2.13 ADP $\beta$ S-vermittelte Transaktivierung des EGF-Rezeptors**

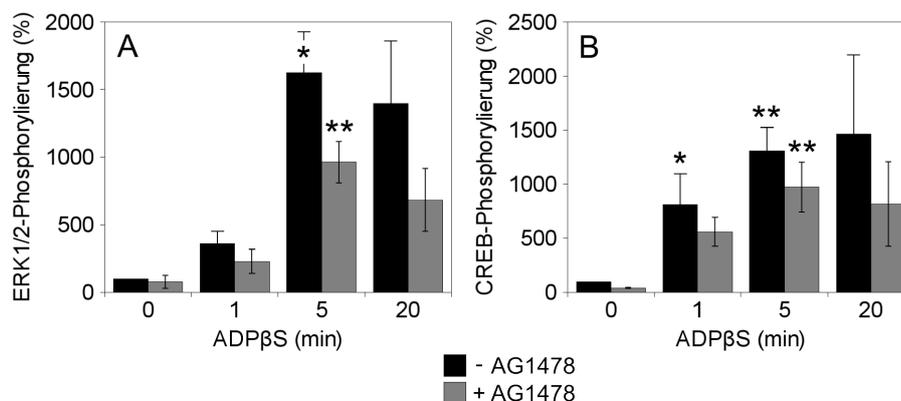
Die Reduktion der ADP $\beta$ S-induzierten Erk1/2- und CREB-Phosphorylierung durch den EGF-Rezeptor-Inhibitor AG1478 liefert einen indirekten Beweis für eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung. Aus diesem Grund wurde diese Möglichkeit in einigen



**Abbildung 3.14** ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-induzierte EGFR-Phosphorylierung in adulten NSZ. Die Zellen wurden für 5 min mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M) oder EGF (10 ng/ml) stimuliert. Für die Kontrolle wurde Vehikel (MilliQ-Wasser) verwendet. Der Nachweis von pEGFR erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen an den Tyrosinen Y845 (A), Y1068 (B) und Y1173 (C)-phosphorylierten EGFR. Gesamt-EGFR diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=1-3).

Vorversuchen durch Analyse der direkten EGF-Rezeptorphosphorylierung mittels quantitativer Westernblots weiter untersucht (Abbildung 3.14). Es kamen Antikörper gegen verschiedene Phosphorylierungsstellen des EGF-Rezeptors (Y845 (A), Y1068 (B) und Y1173 (C)) zum Einsatz.

In diesen Vorversuchen konnte in keiner der durchgeführten Versuchsreihen ein signifikanter Anstieg der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung nach ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-Applikation nachgewiesen werden. Dennoch zeigt sich insbesondere bei der Stimulation mit EGF mit einer 3,1- (Y845), 20,5- (Y1068) und 6,3-fachen (Y1173) Steigerung der Phosphorylierung gegenüber der Kontrolle (100%) eine deutliche Tendenz zur Phosphorylierung aller drei untersuchten EGFR-Phosphorylierungsstellen.



**Abbildung 3.15** Hemmung der ADP $\beta$ S-induzierten zeitabhängigen ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung mit dem EGFR-Inhibitor AG1478. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor AG1478 (10  $\mu$ M) oder Vehikel (DMSO) für 30 min vorinkubiert. Es folgte die Zugabe von ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) bzw. Vehikel (MilliQ-Wasser) für die angegebenen Zeiten. Der Nachweis von pERK1/2 (A) und pCREB (B) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 bzw. CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=4-7). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05 und \*\*p<0,01 relativ zur Kontrolle.

In weiteren Experimenten wurde die zeitabhängige Induktion der ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung durch ADP $\beta$ S in Anwesenheit des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 untersucht (Abbildung 3.15). Die Zellen wurden mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 (10  $\mu$ M) oder Vehikel (DMSO) vorinkubiert (30 min) und anschließend für die angegebenen Zeiten mit ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Die daraus resultierende Aktivierung von ERK1/2 (A) und CREB (B) wurde im quantitativen Westernblot nachgewiesen.

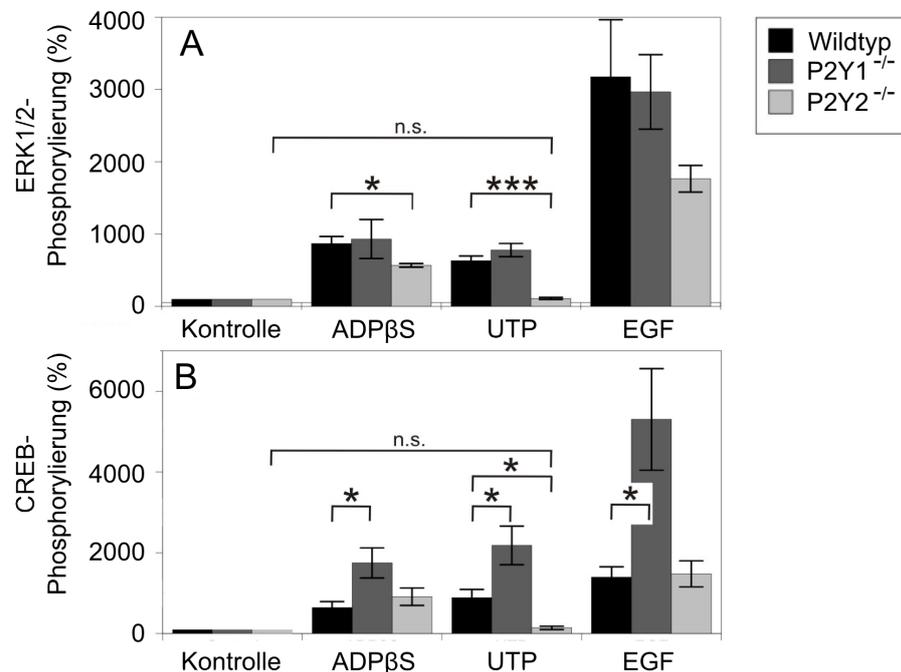
ADP $\beta$ S (ohne AG1478) löst eine zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung mit einem Maximum bei 5 min (16,3-fach) aus, welches sich nach 20 min tendenziell abschwächt. Dieser Verlauf lässt sich durch Vorinkubation mit AG1478 tendenziell um jeweils 50% senken (bei 1 min um 50%, 5 min um 43% und 20 min um 55%). Auch

CREB lässt sich durch ADP $\beta$ S in einem zeitabhängigen Verlauf aktivieren. Nach 5 min lässt sich eine Erhöhung der CREB-Phosphorylierung um das 13-fache beobachten. Auch dieser Verlauf lässt sich durch Vorinkubation mit AG11478 tendenziell senken, wenn auch in geringerem Maße im Vergleich zur ERK1/2-Aktivierung (bei 1 min um 35%, 5 min um 28% und 20 min um 47%).

### **3.2.14 ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen**

Um die Beteiligung der P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren weiter zu untersuchen, wurden vergleichende Analysen mit kultivierten NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen durchgeführt (Abbildung 3.16). Die Zellen wurden für 5 min mit ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2, CREB (Abbildung 3.16, A, B), pAkt und pSrc (Abbildung 3.17, A, B) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src.

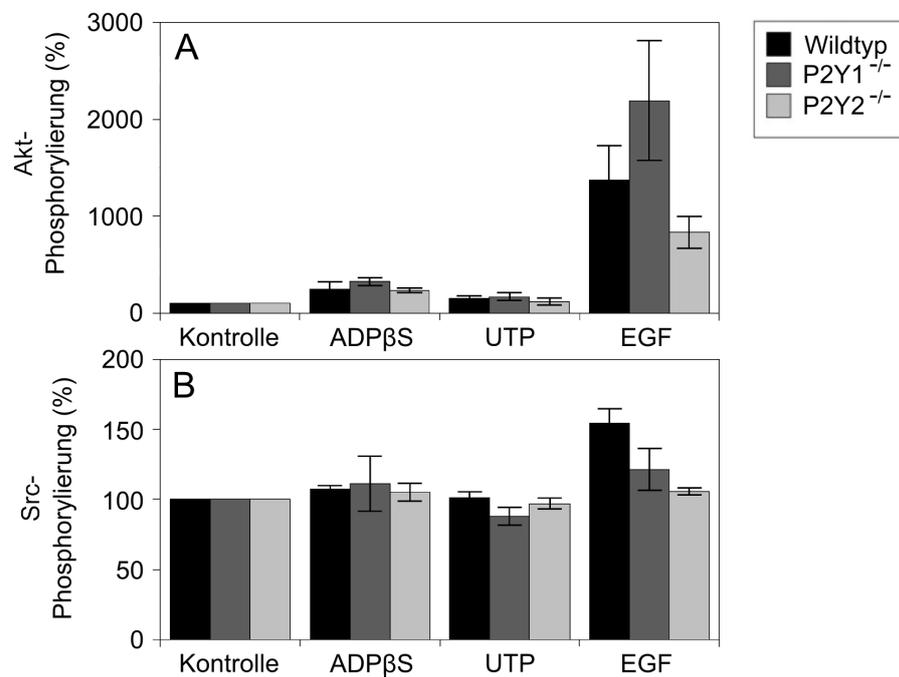
Der Knockout des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors hebt die UTP-stimulierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung vollständig auf und zeigt dabei keinen Einfluss auf die ADP $\beta$ S-induzierte CREB-Phosphorylierung (A, B). Die ADP $\beta$ S-stimulierte ERK1/2-Phosphorylierung reduziert sich jedoch um 35%. Sie blieb in P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen unbeeinflusst. Auch die UTP-stimulierte ERK1/2-Phosphorylierung blieb unverändert. Überraschenderweise zeigt sich in den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen eine verstärkte ADP $\beta$ S- und UTP-stimulierte CREB-Phosphorylierung um einen Faktor von 2,9 (ADP $\beta$ S) und 2,4 (UTP) im Vergleich zum Wildtyp. Auch die EGF-induzierte CREB-Phosphorylierung erhöht sich deutlich, wohingegen die ERK1/2-Aktivierung nicht signifikant beeinflusst wird.



**Abbildung 3.16** ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung in P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Experimente wurden mit kultivierten NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min mit ADPβS, UTP (je 50 μM), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A) und pCREB (B) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktivierte ERK1/2 und CREB. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=4-14). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle.

Die ADPβS-, UTP- und EGF-induzierte Akt- und Src-Phosphorylierung zeigt in P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp.

Die Daten unterstützen die Annahme, dass neben P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auch funktionelle P2Y<sub>12</sub>-/P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren in kultivierten NSZ vorhanden sind und zeigen, dass



**Abbildung 3.17** Akt- und Src-Phosphorylierung in P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Experimente wurden mit kultivierten NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min mit ADPβS, UTP (je 50 μM), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pAkt (A) und pSrc (B) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=4-14). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05 relativ zur Kontrolle.

der Knockout von P2Y<sub>1</sub>- oder P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren zu einem veränderten Antwortverhalten auf Gabe von ADPβS, UTP und EGF führt.

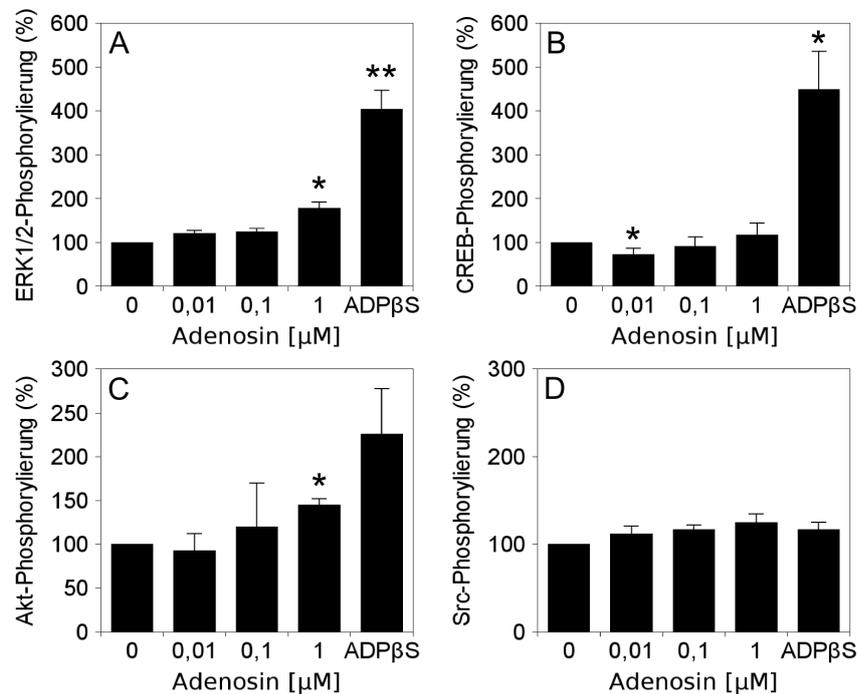
### 3.2.15 Adenosin-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Neben Untersuchungen der Wirkung von Adenosin auf NSZ aus Wildtyp-Mäusen wurde in weiteren Experimenten die Wirkung von Adenosin auf NSZ von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen analysiert. Dazu wurden NSZ aus der SVZ adulter P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Mäuse für 5 min mit den angegebenen Konzentrationen Adenosin vergleichend mit der Applikation von ADP $\beta$ S (50  $\mu$ M) stimuliert (Abbildung 3.18). Die durch Adenosin und ADP $\beta$ S-ausgelösten zellulären Antworten wurden daraufhin mit Hilfe von Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2, CREB, Akt und Src im quantitativen Westernblot analysiert.

Die Daten zeigen, dass Adenosin ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine 1,8-fache Phosphorylierung von ERK1/2 auslöst (A). ADP $\beta$ S kann mit einer 4-fachen Erhöhung des phospho-ERK1/2-Ausmaßes ein deutlich stärkeres Signal auslösen. Adenosin kann des Weiteren in den angegebenen Konzentrationen im Vergleich mit ADP $\beta$ S (449%) keine erhöhte CREB-Phosphorylierung auslösen (B). Dennoch zeigt sich bei 0,01  $\mu$ M ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (73%). Adenosin ist in der Lage bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine signifikante Akt-Phosphorylierung auszulösen (145%, C). Src wird weder von Adenosin, noch von ADP $\beta$ S aktiviert (D).

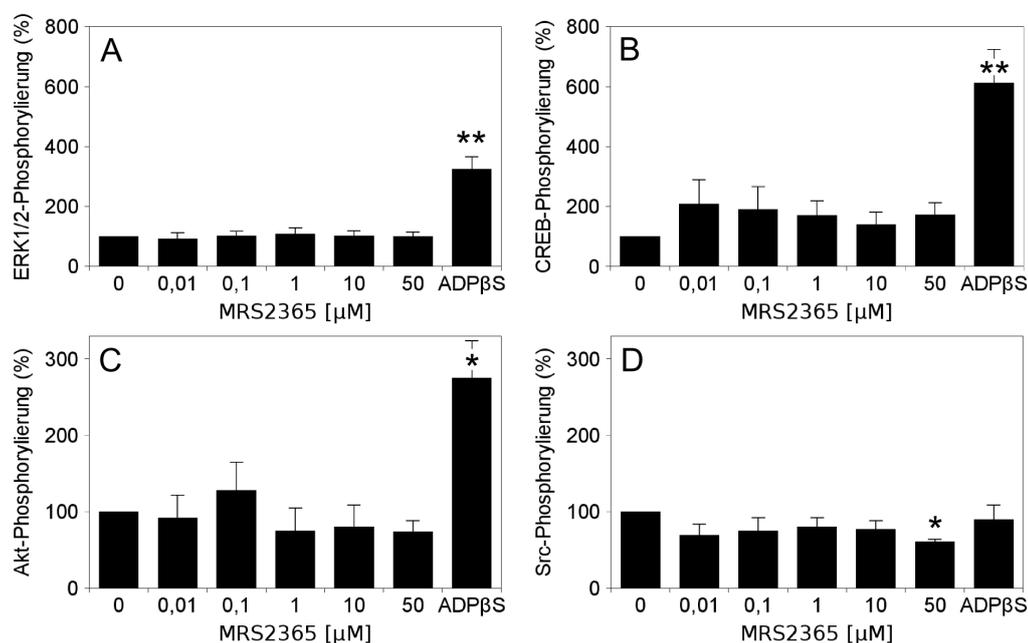
### 3.2.16 MRS2365-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in NSZ aus P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Da MRS2365 in NSZ aus Wildtyp-Mäusen die Phosphorylierung von ERK1/2, CREB, Akt und Src induzieren kann, wurde in weiteren Experimenten die Wirkung des Agonisten in NSZ aus P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen untersucht (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.18** Adenosin-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen. Adulte NSZ aus  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen wurden für die angegebenen Konzentrationen für 5 min mit Adenosin oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=4). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  relativ zur Kontrolle.

NSZ aus adulten  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen wurden dazu für die angegebenen Konzentrationen für 5 min mit dem  $P2Y_1$ -Rezeptor-Agonisten MRS2365 oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src.



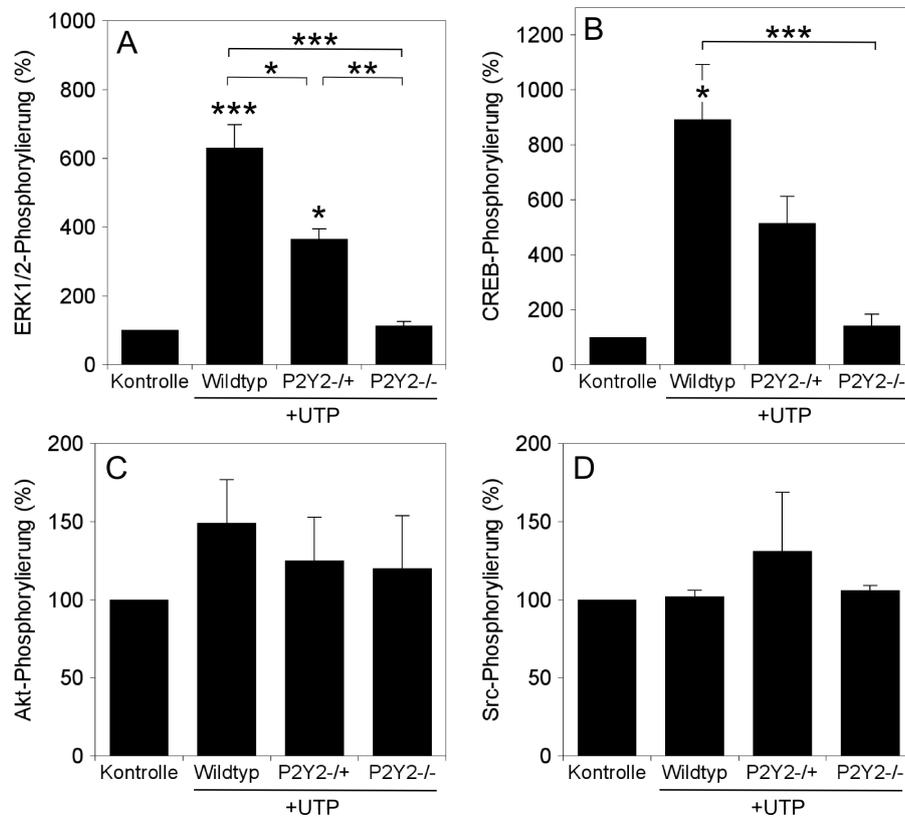
**Abbildung 3.19** MRS2365-induzierte dosisabhängige ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen. NSZ aus adulten  $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen wurden für die angegebenen Konzentrationen für 5 min mit dem  $P2Y_1$ -Rezeptor-Agonisten MRS2365 oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-6$ ). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p<0,05$  und \*\* $p<0,01$  relativ zur Kontrolle.

Wie zu erwarten, lässt sich in der  $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout-Maus mit dem  $P2Y_1$ -Agonisten MRS2365 für ERK1/2, CREB und Akt keine Phosphorylierung auslösen (Abbildung 3.19 A-C). Im Gegensatz dazu lässt sich eine signifikante ADP $\beta$ S-induzierte Aktivierung dieser drei Proteine beobachten. Die MRS2365-stimulierte Aktivierung von Src zeigt bei 50  $\mu$ M einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, unterscheidet sich aber bei den anderen verwendeten Konzentrationen nicht von der Kontrolle (D).

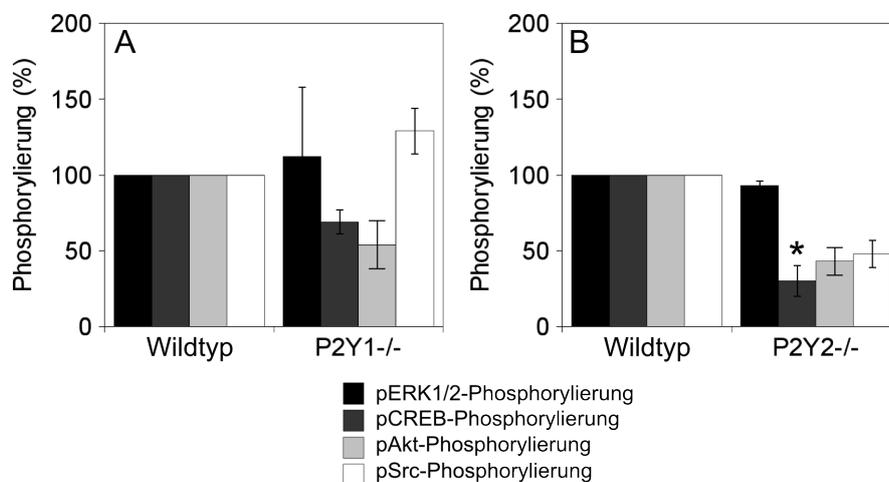
### 3.2.17 UTP-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in homo- und heterozygoten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor- Knockout-Mäusen

In einer vergleichenden Analyse wurde die UTP-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Aktivierung in NSZ aus adulten Wildtyp-, P2Y<sub>2</sub>-heterozygoten (P2Y<sub>2</sub><sup>-/+</sup>) und -homozygoten (P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>)-Mäusen untersucht (Abbildung 3.20). Die Zellen wurden dazu für 5 min mit UTP (50 μM) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt(C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src.

Sowohl in Wildtyp-, als auch in P2Y<sub>2</sub>-heterozygoten NSZ kann mit UTP eine signifikante ERK1/2-Phosphorylierung induziert werden (631% bzw. 366%, A). In P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-NSZ lässt sich ERK1/2 mit UTP nicht aktivieren (112%). Dabei entspricht das UTP-ausgelöste Signal in P2Y<sub>2</sub>-heterozygoten NSZ 50% des Signals in Wildtyp-NSZ. In diesen lässt sich zudem eine signifikante UTP-induzierte CREB-Aktivierung (891%, B) induzieren. In P2Y<sub>2</sub>-heterozygoten Mäusen ist dies tendenziell auch der Fall (515%). In P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-NSZ unterscheidet sich das UTP-induzierte Signal nicht von der Kontrolle (142%). Auch hier zeigt sich ein tendenzieller Unterschied des UTP Signal in P2Y<sub>2</sub>-heterozygoten- und Wildtyp-Mäusen um 53%. Die Daten zeigen, dass der heterozygote Knockout des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors zu einer reduzierten UTP-induzierten ERK1/2- und CREB-Antwort führt, die im homozygoten Knockout des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors komplett aufgehoben werden kann. Wildtyp-, P2Y<sub>2</sub>-hetero- und -homozygote Knockout-NSZ zeigen in Bezug auf die UTP-induzierte Akt- und Src-Phosphorylierung keine Unterschiede.



**Abbildung 3.20** UTP-induzierte ERK1/2-, CREB-, Akt- und Src-Phosphorylierung in P2Y<sub>2</sub><sup>-/+</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Experimente wurden mit kultivierten NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>2</sub><sup>-/+</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min mit UTP (50  $\mu$ M) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pERK1/2 (A), pCREB (B), pAkt (C) und pSrc (D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (n=3-7). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle. Die Werte überlappen sich mit den Daten der Abbildung 3.16 und 3.17.



**Abbildung 3.21** ERK-, CREB-, Akt- und Src-Grundphosphorylierung in P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Experimente wurden zur vergleichenden Analyse mit kultivierten NSZ aus Wildtyp- (A, B), P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> (A)- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> (B)-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und in der SDS-PAGE aufgetragen. Der Nachweis von pERK1/2, pCREB, pAkt und pSrc erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=2-3). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05 relativ zur Kontrolle.

### 3.2.18 ERK-, CREB-, Akt- und Src-Grundphosphorylierung in P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen.

Zur vergleichenden Analyse wurden NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>- und P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen in Bezug auf die Grundphosphorylierung von ERK1/2, CREB, Akt und Src hin untersucht (Abbildung 3.21). Die Zellen wurden lysiert und Analysen durch qualitative Westernblots mit Antikörpern gegen aktiviertes ERK1/2, CREB, Akt und Src unterworfen.

NSZ von P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen keine vom Wildtyp abweichende ERK1/2- und Src-Phosphorylierung (112% bzw. 129%, A). Die Grundphosphorylierung von CREB

und Akt ist tendenziell reduziert (69% bzw. 54%). Die ERK1/2-Grundphosphorylierung in  $P2Y_2^{-/-}$ -Mäusen unterscheidet sich ebenfalls nicht vom Wildtyp (93%, B). Die CREB-Aktivierung in diesen Zellen dagegen ist signifikant (30%) und die Akt- (43%) und Src-Phosphorylierung (48%) sind tendenziell vermindert.

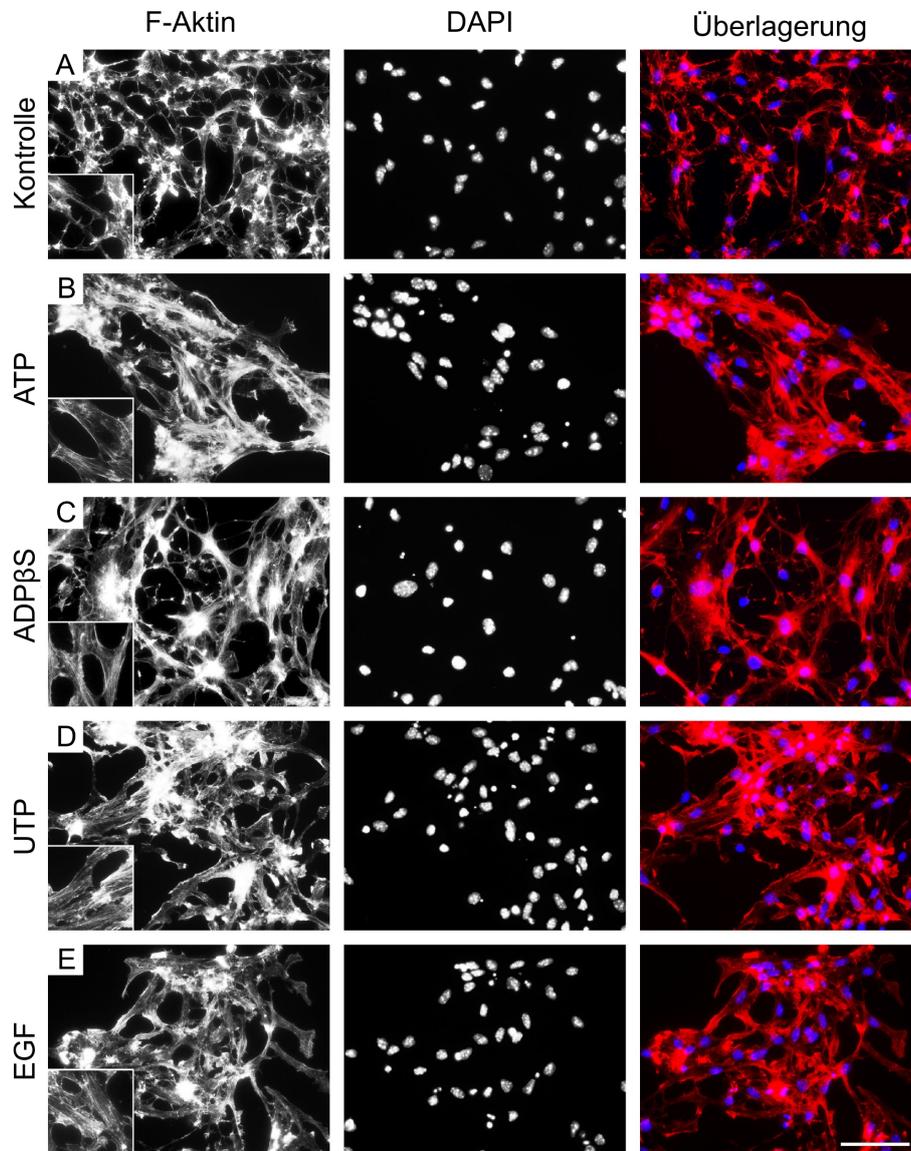
### 3.3 Nukleotid- und EGF-vermittelte Migrationsprozesse in adulten NSZ

Die folgenden Experimente dienen zur Untersuchung der purinergen Mechanismen, die die Migration von NSZ *in vitro* regulieren. Es erfolgt die Analyse der Nukleotid- und EGF-induzierten Veränderungen des Aktinzytoskelettes. Parallel dazu werden zeitabhängige Studien der Nukleotid-induzierten Akt- und FAK-Phosphorylierung mittels quantitativen Westernblots untersucht. Weitere Agonisten werden auf ihre Fähigkeit zur Akt- und FAK-Aktivierung hin untersucht. Für die Analyse der Migrationsintensität werden NSZ-Kulturen in Boyden-Chemotaxis-Chambers etabliert.

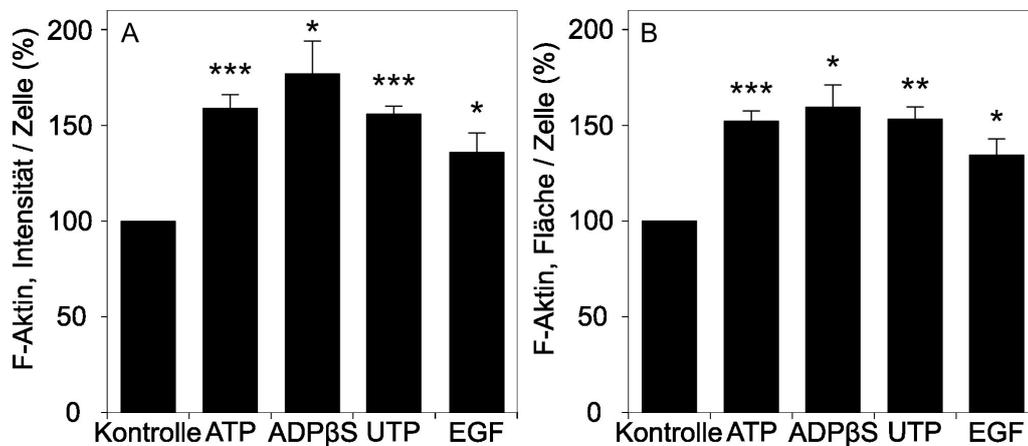
#### 3.3.1 Agonisten-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes

Adulte NSZ wurden 5 min mit ATP, ADP $\beta$ S, UTP (je 50  $\mu$ M) und EGF (10 ng/ml) stimuliert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes zu induzieren (Abbildung 3.22). Dazu wird filamentöses Aktin (F-Aktin) durch Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, spezifisch gebunden und durch den daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff TRITC mittels direkter Immunfluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Alle vier Agonisten lösen dabei ähnliche, signifikante Veränderungen der Zellstruktur aus. Unstimulierte Zellen (Kontrolle, A) zeigen eine spindelförmige Zellform,



**Abbildung 3.22** Agonisten-induzierte Veränderungen der TRITC-Phalloidin-Fluoreszenz in kultivierten adulten NSZ. Die Visualisierung des F-Aktins wurde in adhärennten NSZ von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor für 5 min mit ATP (B), ADP $\beta$ S (C), UTP (D) (je 50  $\mu$ M), EGF (E) (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle, A) stimuliert. Die Abbildung zeigt die TRITC-Phalloidin-Färbung (linke Spalte), DAPI-Färbung (mittlere Spalte) und deren Überlagerung (rechte Spalte). Der Maßstab in (E) entspricht 50  $\mu$ m und bezieht sich auf alle Abbildungen. Die Vergrößerungen zeigen Details der entsprechenden TRITC-Phalloidin-Fluoreszenz.



**Abbildung 3.23** Quantifizierung der TRITC-Phalloidin-Fluoreszenz. (A) zeigt die integrierte Pixelintensität des Fluoreszenzsignals, (B) die F-Aktin-gefärbte Fläche. Beide Werte wurden auf die Anzahl der DAPI-positiven Zellkerne der jeweils gleichen Aufnahme relativiert. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. ( $n=4-10$ ). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  relativ zur Kontrolle.

mit vielen Wachstumskegeln und Filopodien. Stimulierte Zellen (B-E) erscheinen ausgebreiteter und zeigen eine hellere TRITC-Phalloidin-Fluoreszenz. Die Zunahme der Aktinpolymerisation führt zur Bildung von Stressfasern und erhöhter kortikaler Fluoreszenz.

Die Daten zeigen, dass Nukleotide und EGF Kurzzeitveränderungen des Aktinzytoskelettes in adulten NSZ auslösen können. Um diese Vorgänge quantitativ belegen zu können, wurden sowohl die Intensität des Fluoreszenzsignals, als auch die F-Aktin-markierte Fläche pro Zelle (DAPI) bestimmt (Abbildung 3.23).

Es zeigt sich, dass alle Agonisten einen vergleichbaren signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität (bis 1,7-fach, A) und Fluoreszenzfläche (Ausdehnung der Zelle, bis 1,6-fach), B) induzieren.

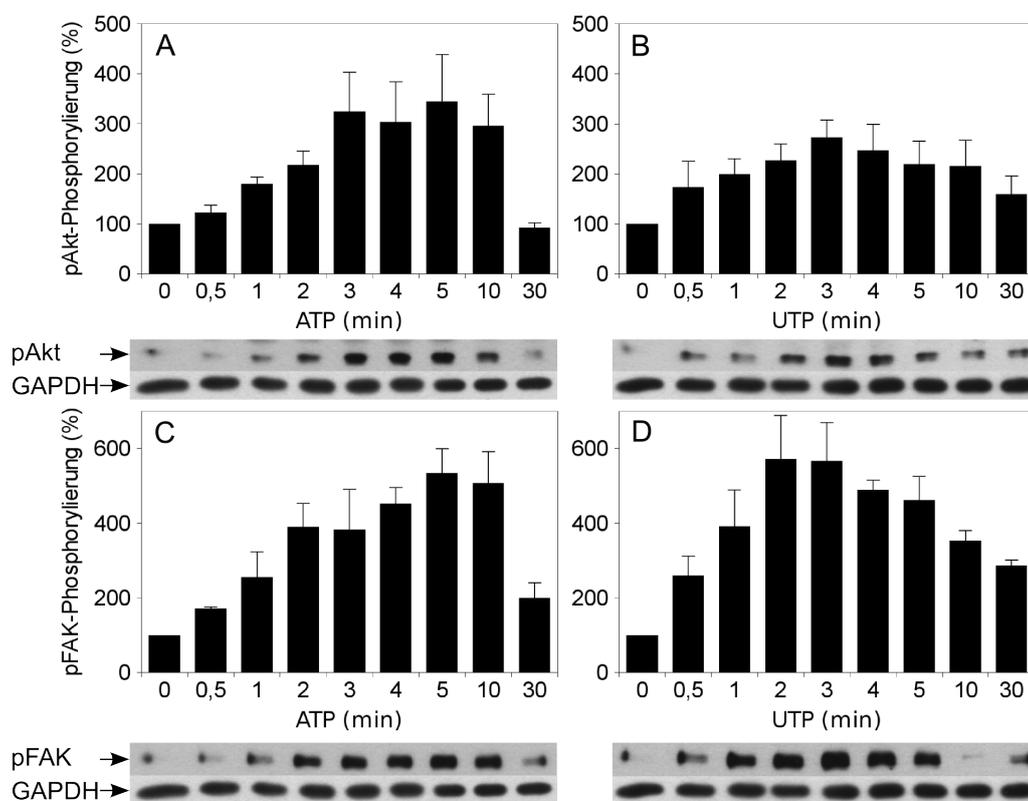
### 3.3.2 Zeitabhängige Akt- und FAK-Phosphorylierung

Diese ersten Daten lassen vermuten, dass Nukleotide und EGF intrazellulär Signalwege auslösen können, die zu Veränderungen des Aktinzytoskelettes führen. Zur Identifizierung daran beteiligter intrazellulärer Signalmoleküle wurden Vorversuche zur zeitabhängigen Phosphorylierung von Akt und FAK nach Stimulation mit ATP, UTP (je 50  $\mu\text{M}$ ) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) durchgeführt. Der Nachweis von pAkt (A, B) und pFAK (C, D) erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt und FAK (Abbildung 3.24).

Diese Vorversuche zeigen eine mögliche zeitabhängige Aktivierung von Akt und FAK durch beide Agonisten. Die Nukleotid-vermittelte Akt-Phosphorylierung fällt dabei etwas schwächer aus (etwa 3-fach), als die Aktivierung von FAK (etwa 5-fach). Zudem erscheint das ATP-induzierte Maximum der zeitabhängigen Akt- und FAK-Phosphorylierung tendenziell später (nach 3 bis 10 min), als das UTP-vermittelte (nach 2 bis 3 min).

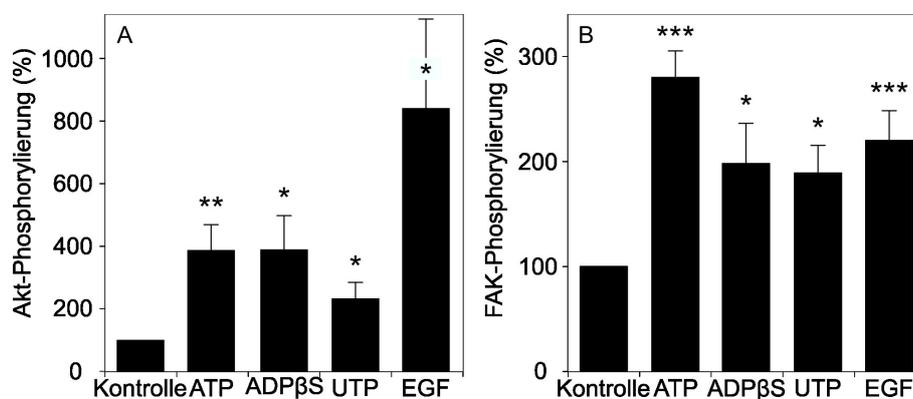
### 3.3.3 Agonisten-abhängige Akt- und FAK-Aktivierung

In vergleichenden Experimenten wurden Nukleotide und EGF auf ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Akt- und FAK-Phosphorylierung hin untersucht (Abbildung 3.25). Entsprechend der Resultate aus Kapitel 3.3.2 wurde die Applikationszeit aller Agonisten auf 3 min angepasst. Adhärente NSZ wurden für 3 min mit ATP, ADP/ $\beta\text{S}$ , UTP (je 50  $\mu\text{M}$ ), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (MilliQ-Wasser, Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pAkt und pFAK erfolgte im quantitativen Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt und FAK.



**Abbildung 3.24** ATP- und UTP-induzierte zeitabhängige Akt- und FAK-Phosphorylierung in kultivierten adulten NSZ. Adhärenzte NSZ wurden für die angegebenen Zeiten mit ATP oder UTP (je  $50 \mu\text{M}$ ) oder Vehikel (MilliQ-Wasser) stimuliert. Der Nachweis von pAkt und pFAK erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt und FAK. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. ( $n=2$ ). Unterhalb jedes Graphen befinden sich repräsentative Westernblots für pAkt, pFAK und GAPDH als Ladekontrolle.

Alle Agonisten lösen eine signifikante Erhöhung der Akt-Phosphorylierung in adulten NSZ aus (A). Die Stärke des ausgelösten Signals beträgt in aufsteigender Reihenfolge: UTP 233%, ATP 388%, ADP $\beta$ S 390% und EGF 843%. Zudem sind alle Agonisten in der Lage FAK signifikant zu phosphorylieren (B). Hier ergibt sich eine andere Verteilung der Agonisten-induzierten Intensität des Signals (in aufsteigender Reihenfolge): UTP 189%, ADP $\beta$ S 198%, EGF 220% und ATP 280%.

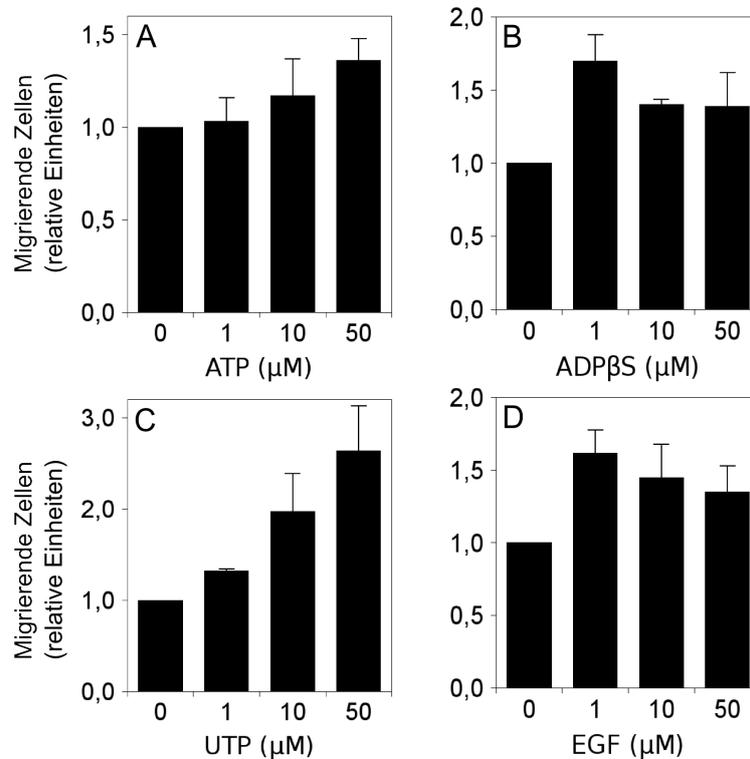


**Abbildung 3.25** Agonisten-induzierte Phosphorylierung von Akt und FAK. Adhärenente NSZ wurden für 3 min mit ATP, ADPβS, UTP (je 50 μM), EGF (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle) stimuliert. Der Nachweis von pAkt und pFAK erfolgte im Westernblot durch phosphospezifische Antikörper gegen aktiviertes Akt und FAK. GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=6-14). Signifikanztests erfolgten mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test (ungepaart) mit \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001 relativ zur Kontrolle.

### 3.3.4 Agonisten-stimulierte Migration

Da Nukleotide und EGF Änderungen des Aktin-Zytoskelettes und damit assoziierte Signalwege in adulten NSZ induzieren können, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob diese Agonisten die Migration NSZ stimulieren können (Abbildung 3.26). Die Experimente wurden in Mikrochemotaxiskammern durchgeführt; die NSZ befinden sich in der oberen Kammer und sind durch einen perforierten Polycarbonatfilter von der unteren Kammer, welche die zu untersuchenden Agonisten enthält, getrennt. Vorversuche haben gezeigt, dass NSZ in Wachstumsfaktor-freiem Medium nicht wandern. Deshalb wurde Wachstumsfaktor-reduziertes Kulturmedium (EGF 5 ng/ml, FGF2 2,5 ng/ml) zur Aufnahme der Zellen und Lösung der Agonisten verwendet.

Die Vorversuche lassen vermuten, dass alle Agonisten die NSZ-Migration konzentrationsabhängig stimulieren können. ATP und UTP tendieren dazu, die Migration von



**Abbildung 3.26** Agonisten-induzierte Zellmigration. Adulte NSZ migrierten in 48-Well-Boyden-Chemotaxiskammern für 4,5 Stunden in Anwesenheit von ATP (A), ADPβS (B), UTP (C) (je 50 μM), EGF (D) (10 ng/ml) oder Vehikel (Kontrolle). Die Darstellung der Werte erfolgt als prozentualer Anteil der Kontrolle. Aufgetragen ist der Mittelwert ± S.E.M. (n=2).

NSZ mit steigender Konzentration zu erhöhen und erreichen mit einer 1,4- (ATP, A) bzw. 2,6-fachen (UTP, C) Migrationssteigerung ein Maximum bei einer eingesetzten Konzentration von 50 μM. ADPβS und EGF lösen bei einer Konzentration von 1 μM eine 1,7- (ADPβS, B) bzw. 1,6-fach gesteigerte Migration gegenüber der Kontrolle aus. Mit steigender Konzentration vermindert sich die Migrationsintensität wieder. Der durch diese Untersuchungen eröffnete experimentelle Ansatz wurde anschließend im Rahmen einer mitbetreuten Diplomarbeit eingehender untersucht (Ullsperger, 2009).

## 4 Diskussion

Die adulte Neurogenese wird durch eine Vielzahl von Signalen gesteuert und moduliert, und verschiedene Mitspieler aktivieren, verstärken oder hemmen die damit verbundenen intrazellulären Prozesse (Abrous et al., 2005). Um die adulte Neurogenese zu verstehen, ist es deshalb unumgänglich, Einblick in die ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde die Kultivierung adulter adhärenter NSZ etabliert und die Eigenschaften der Kulturen wurden in Bezug auf Stammzellcharakter und Multipotenz charakterisiert. Die Arbeit zeigt, dass Nukleotide und EGF gleiche intrazelluläre Zielproteine über verschiedenartige Signalwege in kultivierten NSZ aus der SVZ adulter Mäuse aktivieren und das Potenzial besitzen, über synergistisches Zusammenspiel Einfluss auf die adulte Neurogenese zu nehmen. Dabei zeigen NSZ aus P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen ein verändertes Antwortverhalten. In einem weiteren Ansatz wurde nachgewiesen, dass Nukleotide und EGF die Migration und Umordnung des Aktinzytoskelettes adulter NSZ induzieren.

### 4.1 Kultivierung und Charakterisierung adhärenter adulter NSZ *in vitro*

#### Beschichtung von Zellkulturoberflächen

In dieser Arbeit wurde die Kultivierung, Expansion und Differenzierung adulter NSZ *in vitro* als adhärenente Monolayer etabliert. Die Fähigkeit der Zellen zur Adhärenz hängt dabei maßgeblich von der Beschichtung der Zellkulturoberflächen mit geeigneten Substraten ab. Studien an verschiedenen Zellsystemen belegen, dass die

extrazelluläre Matrix unzählige Zellfunktionen, wie die Mitose, Apoptose, Migration, Signalweiterleitung ins Zellinnere und die Transkription reguliert (Howe et al., 1998, De Arcangelis und Georges-Labouesse, 2000 und Bökel und Brown, 2002).

Auch die Proliferation, Migration und Differenzierung neuraler Stammzellen in Nagnern wird durch die extrazelluläre Matrix beeinflusst. Laminin und Fibronectin stellen extrazelluläre Matrixkomponenten für  $\beta$ 1-Integrine dar, welche auf der Oberfläche von NSZ der SVZ in Mäusen und Ratten exprimiert werden. Die nach Liganandenbindung aktivierten Integrine fördern dabei über die Aktivierung des MAPK-Signalweges die Proliferation dieser Zellen *in vitro* (Campos et al., 2004). Laminin und Fibronectin stimulieren die Migration neuraler Vorläuferzellen durch den RMS *in vivo* (Murase und Horwitz, 2002) und neuraler Vorläuferzellen aus dem Cerebellum von Mäusen *in vitro* (Kearns et al., 2003). Untersuchungen zur Funktion extrazellulärer Matrixproteine an adulten neuralen Stamm- und Vorläuferzellen zeigen, dass deren neurale Differenzierung durch die Präsenz von Fibronectin induziert wird (Cooke et al., 2009).

Es wurde nachgewiesen, dass Astrozyten Laminin-beschichtete gegenüber Poly-L-Ornithin-beschichteten Oberflächen bevorzugen. Ein noch besseres Zellwachstum ließ sich dabei mit einer Doppelbeschichtung aus Poly-L-Ornithin und Laminin erreichen (Fröjdö et al., 2002). Auch die in dieser Arbeit angelegten Kulturen adulter NSZ zeigten keine adäquate Adhärenz auf unbeschichteten oder mit Poly-L-Ornithin allein beschichteten Kulturoberflächen. Doppelbeschichtung mit Poly-L-Ornithin und Fibronectin bzw. Laminin zeigt dagegen gute Ergebnisse, so dass sich adhärenente Monolayer ausbilden konnten.

## **Einfluss der Passagenanzahl auf die Differenzierung von NSZ**

NSZ wurden aus der SVZ adulter Mäuse isoliert und in Kultur als Neurosphären herangezogen. Diese wurden anschließend ein-, bis dreimal dissoziiert und als adhärenente Monolayer kultiviert (Passagen 1 bis 3) und in undifferenzierter und differenzierter Form auf Stammzellcharakter und die Fähigkeit zur Multipotenz analysiert.

Undifferenzierte Kulturen zeigen in jeder der drei Passagen Merkmale von Stamm- und Vorläuferzellen (Nestin-, GFAP-positiv). In den Kulturen finden sich zudem auch Astrozyten (GFAP-positiv) und Oligodendrozyten (O4-positiv). Junge und reife Neurone (DCX- und  $\beta$ -III-Tubulin-positiv) lassen sich nicht oder nur vereinzelt nachweisen.

In differenzierten Kulturen aller drei Passagen finden sich Astrozyten (GFAP-positiv), Oligodendrozyten (O4-positiv) aber auch weiterhin Stamm- bzw. Vorläuferzellen (Nestin-positiv). Kulturen der ersten Passage besitzen die Fähigkeit, sich in Neurone (DCX- und  $\beta$ -III-Tubulin-positiv) zu differenzieren. Dieses Merkmal verliert sich jedoch in den folgenden Passagen. Da sich die Fähigkeit zur Multipotenz mehrfach passagierter adulter NSZ nicht bestätigen lässt, wurden für die Versuche stets NSZ der ersten Passage eingesetzt.

Im Zuge dessen wurden die Resultate dieser Vorversuche an einmal passagierten Kulturen im Rahmen einer mitbetreuten Diplomarbeit in weiteren eingehenden Analysen umfassend untersucht (Messemer, 2008). Die Arbeit beschreibt fast 98,8% der Zellen in einer undifferenzierten Kultur als Nestin-positiv. Eine differenzierte Kultur setzt sich aus 51,5% Astrozyten (GFAP-positiv), 29,6% Neuronen ( $\beta$ -III-Tubulin-positiv) und 0,3% Oligodendrozyten (O4-positiv) zusammen. 20% der Zellen wurden

von keinem der verwendeten zelltypspezifischen Antikörper markiert. Diese Resultate charakterisieren adulte NSZ der ersten Passage als Kulturen mit Stammzellcharakter und der Fähigkeit zur Multipotenz – zur Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone.

Im Vergleich zu anderen Studien finden sich zum Teil abweichende Befunde. Auf der einen Seite zeigen Studien, dass Neurosphären der SVZ adulter CD-1-Mäuse in Langzeitkulturen bis zu 21 Passagen kultiviert werden können ohne dabei ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone zu verlieren (Gritti et al., 1999). Auch in einer weiteren Studie behalten *in vitro* kultivierte Zellen des RMS über fünf Passagen ihre Fähigkeit zur Multipotenz bei (Gritti et al., 2002). Auf der anderen Seite untersuchten Wissenschaftler das Differenzierungspotenzial mehrfach passagierter humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) durch Induktion der Osteogenese und Adipogenese. Schon nach der dritten Passage findet hier eine signifikante Reduktion des Differenzierungspotenzials der Zellen statt, das sich in den folgenden Passagen in bestimmten Aspekten komplett verliert (Siddappa et al., 2007).

Die hier im Vorversuch durchgeführten Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial adulter NSZ-Kulturen nach mehrmaligem Passagieren müssten durch weitere Experimente ergänzt werden, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Dennoch zeigt sich hier ein allgemeines Problem beim Vergleich verschiedener Studien: Trotz vieler Gemeinsamkeiten gibt es auch eine große Anzahl von Unterschieden in den verwendeten Protokollen zur Kultivierung von Stammzellen, welche vermutlich das untersuchte System beeinflussen, was den Vergleich der Experimente erschwert.

So nutzen einige Studien EGF als primäres Mitogen, andere verwenden FGF2 mit oder ohne EGF. Die verwendeten Spezies, wie Maus oder Ratte, unterscheiden sich

in ihrer Expression von Proteinen und oftmals wird nicht auf Unterschiede zwischen verschiedenen Tierstämmen geachtet. Die Vorgehensweise bei der Kultivierung von Stammzellen unterscheidet sich zudem bezüglich der isolierten Hirnregion, der Präparationsmethode, des Alters des Spendertieres, der ausgesäten Zelldichte, der Form der Kultivierung – als frei schwebende Neurosphären oder adhärente Monolayer – und des Substrats zur Beschichtung von Zellkulturoberflächen. In einigen Fällen sind die Zelllinien mit Onkogenen wie dem *simian virus 40 large T antigen* (Noble, 1999) oder v-myc (Hoshimaru et al., 1996) zur Ermöglichung fortlaufender Proliferation infiziert oder transfiziert. Diese onkogenetisch unsterblichen Zellen sind jedoch genetisch verändert und weitere Mutationen ändern womöglich die Transkription von Genen.

## 4.2 Adulte NSZ exprimieren Ektonukleotidasen und P2-Rezeptoren

In früheren Studien konnte unsere Arbeitsgruppe die Expression der durch ADP $\beta$ S und UTP stimulierten P2Y-Rezeptoren, sowie der NTPDase2 und TNAP in kultivierten Neurosphären aus der SVZ adulter Mäuse identifizieren (Mishra et al., 2006 und Langer et al., 2007). Mit Hilfe der RT-PCR wurde in dieser Arbeit das P2-Rezeptor-Repertoire und das Vorkommen Nukleotid-hydrolysierender Ektoenzyme in kultivierten adhärenen NSZ bestimmt. RT-PCR-Daten allein lassen keine Aussage über die Synthese und funktionelle Relevanz der entsprechenden Proteine zu, so dass diese Daten durch pharmakologische Experimente ergänzt werden. Der direkte Nachweis von P2-Rezeptoren mittels Westernblot-Analysen lässt sich aufgrund fehlender geeigneter Antikörper nicht führen.

In Korrelation mit früheren Befunden an Neurosphären (Mishra et al., 2006) konnte auch in adhärenen Kulturen P2Y<sub>1</sub>-mRNA detektiert werden. Zusätzlich konnte

mRNA für den P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden. Alle drei Rezeptoren sind durch ADP/βS, der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor spezifisch durch MRS2365 aktivierbar. In Stimulations- und Inhibitionsanalysen konnte die Präsenz und Funktionalität der P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren dargelegt werden. Die Involvierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors an den ADP/βS-induzierten Signalkaskaden zur ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung konnte durch Inhibitionsanalysen ausgeschlossen werden und lässt eine Funktion für andersartige zelluläre Aufgaben vermuten.

Wie auch für Neurosphären gezeigt (Mishra et al., 2006), lassen sich in der RT-PCR starke Banden für P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren nachweisen. Der P2Y<sub>6</sub> kann durch UDP und mit etwa 100-fach geringerer Affinität auch durch UTP aktiviert werden (von Kügelgen, 2006). UDP ist ein spezifischer Agonist für den P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor, welcher sowohl in Neurosphären keinen Effekt auf die Proliferation (Mishra et al., 2006), als auch in adhärennten NSZ keinen Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und CREB zeigt, obwohl P2Y<sub>6</sub>-mRNA nachgewiesen wurde. UTP, ein Agonist des P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors, vermittelt seine Wirkung demzufolge ausschließlich über den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor. Die vollständige Aufhebung der UTP-ausgelösten ERK1/2- und CREB-Aktivierung in NSZ aus P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen unterstützen diese Annahme.

P2Y<sub>4</sub>-mRNA konnte weder in Neurosphären (Mishra et al., 2006), noch in adhärennten Kulturen detektiert werden. mRNA für den P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor konnte in adhärennten Kulturen nachgewiesen werden, jedoch wurde die Rolle dieses Rezeptors an der Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden nicht betrachtet. Bei der Stimulation des P2Y<sub>14</sub>-Rezeptors in Neurosphären konnte in früheren Untersuchungen kein Einfluss auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beobachtet werden (Mishra et al., 2006).

Nicht nur das Vorkommen von P2Y-Rezeptoren wurde analysiert, auch der Nachweis für alle bekannten P2X-Rezeptoren wurde mittels RT-PCR geführt. Es zeigten sich starke Signale für P2X<sub>1</sub>- bis P2X<sub>6</sub>- und ein leichtes Signal für P2X<sub>7</sub>-Rezeptor-mRNA. Die Rolle von P2X-Rezeptoren in adhärennten NSZ wurde nicht untersucht. In Neurosphären konnte früher nach Aktivierung von P2X<sub>1</sub>-, P2X<sub>3</sub>- und P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren kein Effekt auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nachgewiesen werden (Mishra et al., 2006).

Die Verfügbarkeit von exogen zugegebenen Nukleotiden kann durch in der Plasmamembran befindliche Nukleotid-spaltende Enzyme reguliert werden. NSZ der SVZ *in vivo* und kultivierte Neurosphären exprimieren die NTPDase2 und die TNAP (Braun et al., 2003, Mishra et al., 2006 und Langer et al., 2007). Auch in adhärennten NSZ lässt sich NTPDase2- und TNAP-mRNA nachweisen. Die TNAP wird von den Stamm- und Vorläuferzellen der SVZ (Typ-B-, -C- und -A-Zellen) exprimiert, wohingegen die NTPDase ausschließlich auf Typ-C-Zellen zu finden ist und spezifisch die Stammzellen der SVZ markiert (Langer et al., 2007). Dies deutet auf eine Rolle purinerges Signalwege bei der Regulation der Neurogenese hin. Ektonukleotidasen kontrollieren die Verfügbarkeit purinerges Rezeptor-Liganden (Zimmermann, 2006). Die dabei entstehenden Hydrolyseprodukte können ihrerseits als Signalstoff dienen und P1- (Adenosin) und P2-Rezeptoren aktivieren. TNAP-Knockout-Mäuse zeigen keine Abnormalitäten in der Gehirnentwicklung, weisen jedoch zwei Wochen nach Geburt schwerwiegende Krämpfe (Waymire et al., 1995), eine gestörte Knochenmineralisierung und dünnere Nervenwurzeln im lumbalen Rückenmark auf (Narisawa et al., 1997 und Fedde et al., 1999). Neuere Studien belegen die entscheidende Rolle der NTPDase2 (und des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors) bei der Entstehung eines kompletten Organs – der Augenentwicklung in *Xenopus*-Larven (Massé et al., 2007).

### 4.3 P2-Rezeptor-Agonisten und EGF zeigen Unterschiede in der Aktivierung von Zielproteinen

In dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass die P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren über ADP $\beta$ S und der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor über UTP eine schnelle und transiente Aktivierung von ERK1/2 und CREB induzieren. EGF aktiviert ebenfalls ERK1/2 und CREB, jedoch mit einem anderen zeitlichen Verlauf. Die Phosphorylierung startet verzögert und wird gefolgt von einer verlängerten Aktivierung.

Dies lässt vermuten, dass der Koaktivierung beider Signalwege *in situ* eine bedeutende Rolle zukommt: Nukleotide als schnelle aber transiente Effektoren und EGF als ein verzögert einsetzender aber lang anhaltender Effektor. Die Mechanismen des Abfallens der Nukleotid-Antwort wurden nicht untersucht. Eine Agonisten-induzierte Desensitivierung verbunden mit einer Rezeptor-Internalisierung wurde bereits gezeigt (Hoffmann et al., 2008 und Sanabria et al., 2008).

Unterschiede ergeben sich auch in der Nukleotid- und EGF-induzierten Aktivierung der Proteinkinase Akt. Während die P2Y<sub>1</sub>-/P2Y<sub>12</sub>-/P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren über ADP $\beta$ S und der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor über UTP (Abbildung 3.6) keine Akt-Phosphorylierung induzieren können, zeigt sich eine signifikante Aktivierung von Akt nach Stimulation des EGF-Rezeptors mit EGF. An dieser Stelle soll auf die Abbildungen 3.6 und 3.24 hingewiesen werden. Hier wurde die UTP-induzierte Akt-Phosphorylierung in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen mit unterschiedlichen Zeitintervallen untersucht. Abbildung 3.6 zeigt mit drei und Abbildung 3.24 mit zwei Vorversuchen keinen signifikanten, aber tendentiellen schnellen Anstieg der Akt-Phosphorylierung mit maximaler Erhöhung zwischen einer und drei Minuten. Zudem zeigt auch ATP in zwei Vorversuchen eine tendentielle Erhöhung des Akt-Niveaus ähnlich wie für UTP beobachtet.

In Astrozyten und anderen Zellsystemen wurde bereits eine P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-induzierte Akt-Phosphorylierung nachgewiesen (Wang et al., 2005b, Chorna et al., 2004 und Huwiler et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit nicht gezeigte Experimente untersuchen die Beteiligung des PI3K/Akt-Signalweges durch Verwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 in adulten NSZ. Dabei wird die ADP $\beta$ S-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch den PI3K-Inhibitor LY294002 (100  $\mu$ M, für 60 min vorinkubiert) signifikant reduziert (um 35%). Eine gleichzeitige Hemmung der PI3K und des EGF-Rezeptors ergibt dabei keine zusätzliche Reduktion des Signals und lässt die Beteiligung beider Proteine innerhalb eines Signalweges vermuten. Im Gegensatz dazu zeigt LY294002 keinen Effekt auf die ADP $\beta$ S-induzierte CREB-Phosphorylierung. Die Präsenz von LY294002 hat zudem keinen Einfluss auf die UTP-induzierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung (alle Daten n=3).

Diese Daten scheinen auf die Beteiligung der PI3K hinzuweisen, doch muss hier der umstrittene Einsatz des Inhibitors als spezifischem PI3K-Hemmer betont werden. In mehrere Studien wurden unspezifische Effekte von LY294002 nachgewiesen. In glatten Muskelzellen von Rindern und Menschen zeigt LY29400 im Gegensatz zum PI3K-Inhibitor Wortmannin unspezifische Effekte auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Regulation (Ethier und Madison, 2002). Zudem wurde gezeigt, dass LY294002 unspezifisch und mit gleicher Potenz die Caseinkinase II (CKII) inhibiert (Davies et al., 2000). Weitere Experimente sind nötig, um die Daten dieser Arbeit zu konkretisieren und Aufschluss darüber zu gewinnen, ob neben EGF auch Nukleotide in der Lage sind Akt/PI3K in adulten NSZ zu aktivieren.

#### 4.4 Nukleotide und EGF aktivieren gleiche Zielproteine über unterschiedliche Signalwege

Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF agieren über Rezeptor-Tyrosinkinase und ermöglichen die Proliferation neuraler Vorläuferzellen *in vivo* und *in vitro*, sowohl in Neurosphären-, wie auch in adhärennten Kulturen (Temple, 2001). Da unsere Arbeitsgruppe gezeigt hat, dass die Nukleotide ADP $\beta$ S und UTP einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ausstoß induzieren und die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation kultivierter adulter NSZ steigern können (Mishra et al., 2006), wurden hier die durch ADP $\beta$ S und UTP induzierten intrazellulären Signalwege mit Blick auf eine mögliche Interaktion mit den dem EGF-Rezeptor-nachgeschalteten Signalkaskaden untersucht.

Abhängig vom jeweiligen P2Y-Rezeptor-Subtyp aktivieren Nukleotide wie ATP, ADP, UTP und UDP eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden. Dazu zählen die Aktivierung der PLC mit einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die Aktivierung oder Inhibierung der Adenylylzyklase, Beeinflussung von Ionenkanälen, Aktivierung von Mitogen-aktivierten MAP-Kinase-Signalwegen und Induktion früher Genantworten (Erb et al., 2006 und Majumder et al., 2007). Hierbei variieren die Signalwege und die daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen nicht nur innerhalb der verschiedenen P2Y-Rezeptor-Subtypen, sondern auch innerhalb verschiedener Zellkontexte (Fam et al., 2003, 2005, Baker et al., 2006 und Kudirka et al., 2007).

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren über ADP $\beta$ S, der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor über UTP und der EGF-Rezeptor über EGF die Aktivierung von ERK1/2 und CREB induzieren. In Vorversuchen wurde eine mögliche Phosphorylierung von Raf sowohl nach Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-/P2Y<sub>12</sub>-/P2Y<sub>13</sub>-, P2Y<sub>2</sub>-

und EGF-Rezeptoren beobachtet. Die der ERK1/2-Phosphorylierung vorangegangene Aktivierung von Raf entspricht dem klassischen Weg des MAPK-Signalweges. Dieser Zusammenhang wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Die Daten zeigen aber auch, dass sich die Aktivierung der intrazellulären Signalwege bezüglich der Aktivierung von ERK1/2 und CREB und ebenso hinsichtlich der Agonisten ADP $\beta$ S und UTP unterscheiden. Die ADP $\beta$ S- und UTP-induzierte ERK1/2-Aktivierung verläuft vollständig über eine Aktivierung von MEK. CREB wird auch über MEK aktiviert, jedoch scheint ein weiterer, MEK-unabhängiger Signalweg vorhanden zu sein, der zur CREB-Phosphorylierung führt. Die ADP $\beta$ S- und UTP-induzierte CREB-Aktivierung ist zudem vollständig abhängig von der Aktivierung von cPKCs. Auch bei der ERK1/2-Phosphorylierung spielen PKCs eine entscheidende Rolle, wobei cPKCs dabei ausschließlich nach ADP $\beta$ S-, nicht jedoch nach UTP-Stimulation aktiviert werden.

#### **4.5 Nukleotide besitzen das Potenzial zur Transaktivierung des EGFR**

Die Reduktion der ADP $\beta$ S-induzierten ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung nach Hemmung der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung deutet auf eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors hin. Nach Applikation von ADP $\beta$ S konnte im Westernblot keine Erhöhung der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung beobachtet werden. Die ADP $\beta$ S-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung entspricht, wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich, nur rund einem Drittel der EGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung. So besteht die Möglichkeit, dass die geringe Beteiligung von ADP $\beta$ S an der EGF-Rezeptor-Transaktivierung über quantitative Westernblots nicht detektiert werden kann. Obwohl ein nicht-spezifischer Effekt des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 nicht ausgeschlossen werden kann, ist doch darauf hinzuweisen, dass die Applikation des Inhi-

bitors keinen Effekt auf die UTP-induzierte ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung zeigt.

Es lässt sich vermuten, dass das Ausmaß der Nukleotidrezeptor-vermittelten Transaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren zwischen verschiedenen Zelltypen und Spezies variiert. So wurde gezeigt, dass der UTP-aktivierte rekombinante menschliche P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren, einschließlich des EGF-Rezeptors, zu transaktivieren vermag. Damit verbunden ist die Aktivierung von Src über Prolin-reiche SH3-Domänen-Bindemotive am C-Terminus des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors (Liu et al., 2004). Es bleibt allerdings unklar, ob das Konsensusmotiv der C-terminalen Domäne KPPTEPTPSP (aa 321-330) des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors der Maus funktional ist. Ebenso möglich wäre eine Src-unabhängige EGFR-Transaktivierung. Andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie G<sub>q</sub>-gekoppelte Bradykinin-Rezeptoren, induzieren unter Beteiligung von EGFR und PKCs in Src- und PI3K $\gamma$ -unabhängigen Signalwegen die Aktivierung von MAP-Kinasen in COS7-Zellen (Adomeit et al., 1999). Eine P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-induzierte Transaktivierung des EGF-Rezeptors wurde bei tumorösen HeLa Zellen und epithelialen FRT-Zellen gezeigt (Buvinic et al., 2007).

Die Mechanismen der ADP $\beta$ S-vermittelten EGF-Rezeptor-Transaktivierung in adulten NSZ bedürfen der weiteren Klärung. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zeitreihen zur Src-Phosphorylierung nach Stimulation mit Nukleotiden und EGF lassen eine Src-unabhängige, möglicherweise PI3K/Akt-abhängige EGFR-Transaktivierung vermuten. Die Inhibierung von Metalloproteasen beeinflusste weder die Phosphorylierung von ERK1/2, noch von CREB. Eine Freisetzung von Wachstumsfaktorenvorläufern scheint also nicht stattzufinden (Wong und Guillaud, 2004 und Ohtsu et al., 2006).

#### 4.6 Das Antwortverhalten in adulten NSZ ist bei P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen verändert

Während die ERK1/2- und CREB-Aktivierung nach Zugabe von UTP zu NSZ von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen komplett aufgehoben wird, zeigt sich in P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockouts ein anderes und überraschendes Antwortverhalten. Die Aktivierung von CREB wird nicht nur durch ADP $\beta$ S-, sondern auch durch UTP und EGF erhöht. Adenosin ist zudem in der Lage, die ERK1/2- und Akt-Phosphorylierung zu steigern. Die ADP $\beta$ S- und Adenosin-induzierte Erhöhung der CREB-Phosphorylierung lässt eine Hochregulation von P2Y<sub>11</sub>-, P2Y<sub>13</sub>- und Adenosin-Rezeptoren vermuten. Zudem sind in der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout-Maus womöglich kompensatorische Mechanismen aktiv, die Cluster von Proteinen, wie P1-, P2- und EGF-Rezeptoren, beeinflussen. Für Knockout-induzierte Veränderungen im Transkriptom gibt es Literaturbeispiele. Neuronale Vorläuferzellen aus dem Striatum embryonaler Connexin43-Knockout-Mäuse zeigen eine erniedrigte Expression von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren (Scemes et al., 2003). Weitere Untersuchungen legen dar, dass die Gene für P2-Rezeptoren und GAP-Junction-Proteine in kortikalen Astrozyten als funktionelle Einheit exprimiert werden (Iacobas et al., 2007). Das Regulom in Gehirn, Herz und kultivierten Astrozyten von Connexin43-Knockout-Mäusen unterscheidet sich von dem von Wildtyp-Mäusen in über 10% (Spray und Iacobas, 2007). Interessanterweise führen Connexin43-Knockout und Connexin-siRNA-Knockdown zu ähnlichen Veränderungen im Transkriptom (von Astrozyten) (Iacobas et al., 2008).

## 4.7 Die Migration adulter NSZ ist Akt- und FAK-abhängig

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass schon die kurze Exposition von Nukleotiden und EGF auf NSZ zu signifikanten Veränderungen des Aktinzytoskelettes und einem migratorischen Zellphänotyp führen. Alle hier verwendeten Nukleotide und EGF induzieren die Phosphorylierung von Akt und FAK.

Die nicht-Rezeptor-Proteintyrosinkinase FAK ist ein Schlüsselement bei Integrin-vermittelten Prozessen der Zellmigration (Sieg et al., 1999). Die stabile Überexpression von FAK in CHO-Zellen führt zu einer erhöhten Zellmigration (Cary et al., 1996, 1998). Der Einsatz von FAK-Mutanten zeigt einen engen Zusammenhang zwischen der Expression von FAK und der damit erhöhten Invasivität menschlicher Tumore (Owens et al., 1995). So vermittelt FAK als stromabwärts gelegenes Zielprotein der Serin/Threonin-spezifischen Kinase Akt die Migration und Invasivität menschlicher Krebszellen des Enddarms (Turecková et al., 2009).

In einer Reihe von Zellsystemen beeinflusst die Aktivität von Akt die Zellmotilität und -migration, die damit verbundene Organisation des Aktin-Zytoskelettes, die zelluläre Interaktion mit der extrazellulären Matrix, die Expression von Motilitätsgenen und die Festlegung der Zellpolarität (Qian et al., 2004 und Stambolic und Woodgett, 2006). So wurde die PI3K/Akt-induzierte Umordnung des Aktinzytoskelettes einhergehend mit einer erhöhten Zellmigration in Fibroblastenzellen aus Hühnchenembryonen demonstriert. Oft ist die Aktivität von Akt in aktivierten Krebszellen des Menschen, wie z. B. bei Eierstockkrebs oder Lungenkrebs, erhöht und fördert die Invasivität dieser Zellen (Woodhouse et al., 1997, Testa und Bellacosa, 2001, Bellacosa et al., 1995 und Brognard et al., 2001).

## 4.8 Mechanismen der Nukleotid- und EGF-induzierten Zellmigration

Die Nukleotid-induzierte Erhöhung der Zellmigration und Chemotaxis wurde für verschiedene Zellsysteme, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten, Astrozyten und Mikroglia beschrieben (Klepeis et al., 2004, Chorna et al., 2007 und Taboubi et al., 2007). In Endothelzellen der Nabelschnurvenen von Neugeborenen (HUVEC) erhöhen ATP und UTP die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, induzieren die Phosphorylierung von FAK und Paxilin und lösen Umordnungen des Zytoskelettes und die Zellmigration aus (Kaczmarek et al., 2005). In kultivierten Mikrogliazellen löst die Nukleotid-induzierte Aktivierung des  $\text{P2Y}_{12}$ -Rezeptors die Phosphorylierung von Akt und Chemotaxis aus (Irino et al., 2008). Zudem ist der  $\text{P2X}_4$ -Rezeptor involviert (Ohsawa et al., 2007 und Horvath und DeLeo, 2009). In kultivierten Astrozyten induzieren ATP und UTP die Zellmigration über den an  $\alpha_v$ -Integrine gekoppelten  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptor, was zur Aktivierung der PI3K/Akt und ERK1/2 führt (Bagchi et al., 2005 und Wang et al., 2005b). Interessanterweise führt die Aktivierung des  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptors nicht in allen Zelltypen zu gleichen zellulären Antworten. In menschlichen Keratinozyten aktivieren ATP und UTP den  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptor und lösen so eine Herunterregulation der PI3K/Akt und ERK1/2 und eine Inhibierung der Zellmigration aus (Taboubi et al., 2007).

Die Rolle von EGF bei der Stimulation der Zellmigration konnte durch eine erhöhte Invasivität von Tumorzellen bei Überexpression des EGFR *in vivo* und einer gesteigerten Zellmigration an Zelllinien *in vitro* nachgewiesen werden (Fontanini et al., 1995, Turner et al., 1996, McCawley et al., 1997, Verbeek et al., 1998 und Jorissen et al., 2003). Es ist außerdem bekannt, dass EGF die Aktinpolymerisation und die Ausbildung von Lamellipodien induziert (Segall et al., 1996, Wells et al., 1999, Nogami et al., 2003 und Kurokawa et al., 2004).

## 4.9 Migration von Vorläuferzellen

Bisher ist nur wenig über die Regulation der Migration neuraler Vorläuferzellen bekannt. Die Überexpression des EGF-Rezeptors in neuralen Vorläuferzellen erhöht deren Migration *in situ* (Aguirre et al., 2005). Chemoattraktiv wirkende Signale spielen bei der gerichteten Migration von Neuroblasten aus der SVZ hin zum OB eine entscheidende Rolle (Liu und Rao, 2003). So steuern Substanzen der Zerebrospinalflüssigkeit, insbesondere das Chemorepellent Slit2 die Migration von Neuroblasten *in situ* (Sawamoto et al., 2006). Auch das Morphogen Sonic Hedgehog wirkt chemoattraktiv auf die Migration von neuralen Vorläuferzellen zum OB (Angot et al., 2008). BDNF induziert eine CREB-, PI3K- und Akt-abhängige Migration kultivierter Neuroblasten (Chiaramello et al., 2007). Inhibierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors erhöht, und tonische Aktivierung des GLU<sub>K5</sub>-Kainat-Rezeptors vermindert die Migration von Neuroblasten in Gewebeschnitten der SVZ (Platel et al., 2008). In embryonalen Connexin43-Null-Neurosphären wurde eine P2Y<sub>1</sub>-abhängige Zellmigration beobachtet (Scemes et al., 2003). Und auch in akuten Hirnschnitten wurde gezeigt, dass der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor essenziell ist für eine ungehinderte Migration neuraler Vorläuferzellen von der embryonalen ventrikularen Zone zur SVZ (Liu et al., 2008).

Die Daten dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass Nukleotide und EGF Zellmigration in adulten NSZ auslösen können. Sie zeigen zudem, dass die Zellmigration zusätzlich zum P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor, auch über P2Y<sub>1</sub>-/P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren stimuliert werden kann.

## 4.10 Funktionale Relevanz

ATP und FGF aktivieren die Zellproliferation synergistisch in kultivierten Astrozyten (Neary et al., 1994). In neuronalen Vorläuferzellen aktiviert ATP die MAPK ERK1/2 (Neary et al., 1999). Die Aktivierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors führt in Astrozytomazellen zur Phosphorylierung von CREB und zu einer damit verbundenen Hochregulation von Genen anti-apoptotischer und neurotropher Proteine (Chorna et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>- bzw. P2Y<sub>13</sub>-Rezeptors zur Aktivierung von ERK1/2 und CREB in adulten neuronalen Vorläuferzellen führt. Aktiviertes ERK1/2 ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus (Meloche und Pouysségur, 2007), insbesondere in adulten NSZ der Maus (Kalluri et al., 2007). Die Phosphorylierung von CREB führt zur Transkription zahlreicher Zielproteine (Impey et al., 2004). So unterstützt aktiviertes CREB die Differenzierung und das Überleben neu gebildeter Neurone im OB (Giachino et al., 2005). Innerhalb der SVZ wird der EGF-Rezeptor überwiegend von den Typ-C-Zellen exprimiert (Doetsch et al., 2002).

Über die Lokalisation der P2-Rezeptoren lässt sich aufgrund fehlender geeigneter Antikörper keine Aussage treffen. Ein Nukleotid-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom kann zur Freisetzung von ATP führen (Pryazhnikov und Khiroug, 2008). Das so freigesetzte ATP könnte nun über P2X-Rezeptoren wirken und so zusätzliche Signalwege aktivieren. Die Daten zeigen, dass die parallele Aktivierung von EGF-, P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren das Potenzial für eine synergistische Steuerung der Proliferation, des Wachstums und Überlebens von NSZ besitzt. Dabei interagieren die Nukleotid-induzierten Signalkaskaden mit abwärts gelegenen Signalmolekülen, wie den über den EGF-Rezeptor induzierten Signalwegen.

Extrazelluläre Nukleotide unterliegen der Hydrolyse durch Ektonukleotidasen (Abbraccio et al., 2009) und können so vermutlich nicht über lange Distanzen als Signalmoleküle während der Zellmigration fungieren. Es wird angenommen, dass sie auf auto- und parakrine Weise wirken (Joslin et al., 2007). Nukleotide und EGF besitzen die Fähigkeit, Veränderungen im Zytoskelett NSZ auszulösen und deren Zellmotilität zu erhöhen. Die hohe Nukleotidaseaktivität der die wandernden Neuroblasten umgebenden Typ-B-Zellen, die extrazelluläres ATP und UTP hydrolysieren kann (Braun et al., 2003), könnte die Zellmobilität erniedrigen, wenn diese während der Migration in dieses Grenzgebiet einwandern. Da die Nukleotid- und EGF-induzierten intrazellulären Signalwege zahlreiche intrazelluläre Signalmoleküle gemeinsam haben, könnte die lokale Migration durch parallel agierende Signalmoleküle und Signalkaskaden beeinflusst werden. Abhängig vom umgebenden zellulären Aktivierungsprofil könnten diese unabhängig oder bei simultaner Aktivierung gemeinsam wirken und können so synergistisch unterschwellige in überschwellige Aktivitäten verwandeln.

## 4.11 Ausblick

Das Streben nach dem Verständnis der intrazellulären Prozesse, die die adulte Neurogenese steuern und deren Relevanz für die Hirnfunktionen des Menschen, weckte in den letzten Jahren das Interesse der grundlagenorientierten und klinischen Neurowissenschaft. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Steuerung der endogenen Zellproliferation stellen möglicherweise Ansätze für Reparaturmechanismen bei akuten und chronischen Erkrankungen des Nervengewebes dar. Erkenntnisse zur Steuerung intra- und extrazellulär aktivierter Signalkaskaden unter *in vitro*- und *in situ*-Bedingungen in verschiedenen Modellsystemen könnten sich für die Erarbeitung therapeutischer Ansätze am Menschen als nutzbar erweisen.

Für das Verständnis des Wechselspiels der verschiedenen Nukleotidrezeptor-Subtypen untereinander und mit Rezeptoren anderer Rezeptorfamilien, insbesondere der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, bedarf es deren exakter immunzytologischer Lokalisierung auf den verschiedenen Zelltypen der adulten SVZ. Zukünftige Studien erfordern eingehende funktionelle Analysen definierter zellulärer Signalkaskaden innerhalb der SVZ. Intrazelluläre Signalwege agieren miteinander in gekoppelten Netzwerken, die aufgrund ihrer Komplexität nur schwierig zu definieren sind. Daraus ergeben sich meist verschiedene Funktionen einzelner Proteine, welche je nach Zellkontext verstärkt, gehemmt oder kompensiert werden können, was die Validierung der Funktion isolierter Proteine erschwert. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren, das gezielte Ausschalten von Genen und die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen P2-Rezeptoren und intrazelluläre Zielproteine *in vitro* und *in situ* werden bei weiteren Signalwegsanalysen unerlässlich sein.

## 5 Zusammenfassung

Im adulten Säugerhirn findet Neurogenese in der SVZ der Seitenventrikel kontinuierlich statt. Eine Vielzahl von Signalsystemen steuert in komplexer Weise zelluläre Antworten und reguliert die Proliferation, Differenzierung und Wanderung NSZ. Gegenwärtig ist nur wenig über die zugrundeliegenden Signalwege bekannt. Zunehmend gibt es Hinweise darauf, dass Nukleotide an diesen Prozessen beteiligt sind. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Nukleotide ADP $\beta$ S und UTP in kultivierten NSZ der adulten SVZ einen schnellen Kalziumeinstrom induzieren und die Wachstumsfaktor-vermittelte NSZ-Proliferation steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System zur Kultivierung adhärenter adulter NSZ etabliert. Die Untersuchungen zeigen, dass adulte NSZ eine Vielzahl an P2Y- und P2X-Rezeptoren, sowie die Nukleotid-hydrolysierenden Enzyme NTPDase2 und TNAP exprimieren. Untersuchungen der ADP $\beta$ S-, UTP- und EGF-vermittelten Signalwege zeigen, dass alle drei Agonisten eine ERK1/2- und CREB-Phosphorylierung induzieren, wobei sich die zeitlichen Charakteristika zwischen den Nukleotiden und EGF unterscheiden. Inhibierungsexperimente geben Einblicke in die dabei aktivierten Signalkaskaden und weisen auf eine ADP $\beta$ S-induzierte Transaktivierung des EGF-Rezeptors hin. Während UTP über den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor wirkt, übt ADP $\beta$ S seine Funktion über den P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor aus.

Die Daten implizieren zudem, dass Nukleotide und EGF gleiche Zielproteine über verschiedene Signalwege induzieren und dass sie das Potenzial besitzen, bei der Kontrolle der Zellproliferation in der adulten Neurogenese synergistisch zu agieren. Vergleichende Analysen mit kultivierten NSZ aus Wildtyp-, P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Mäusen belegen ein verändertes Antwortverhalten in Gegenwart von ADP $\beta$ S, UTP und EGF und lassen kompensatorische Mechanismen vermuten.

Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren zudem, dass ATP, ADP $\beta$ S, UTP und EGF die Migration von NSZ induzieren. Parallel dazu konnten Veränderungen des Aktinzytoskelletes, wie die Zunahme an F-Aktin, die Bildung von Stressfasern und eine Veränderung der Zellmorphologie gezeigt werden. Diese Prozesse gehen mit einer Aktivierung der Proteinkinasen Akt und FAK einher. Die Daten weisen darauf hin, dass Nukleotide und EGF für die Zytoarchitektur der SVZ und die Wanderung von Neuroblasten zum OB eine wichtige Rollen spielen könnten.

## A Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A. und Weisman, G. A. (2006a). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.*, 58:281–341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. und Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.*, 32:19–29.
- Abrous, D. N., Koehl, M. und Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.*, 85:523–569.
- Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R. und Liebmann, C. (1999). Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cell. Biol.*, 19:5289–5297.
- Aguirre, A., Rizvi, T. A., Ratner, N. und Gallo, V. (2005). Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. *J. Neurosci.*, 25:11092–11106.
- Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. und Feramisco, J. R. (1994). Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 14:4398–4407.
- Alvarez-Buylla, A. und Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.*, 22:629–634.
- Amos, S., Martin, P. M., Polar, G. A., Parsons, S. J. und Hussaini, I. M. (2005). Phorbol 12-myristate 13-acetate induces epidermal growth factor receptor transactivation via protein kinase Cdelta/c-Src pathways in glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 280:7729–7738.
- Anderson, K. A. und Means, A. R. (2002). Defective signaling in a subpopulation of CD4(+) T cells in the absence of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Mol. Cell. Biol.*, 22:23–29.
- Angers, S., Salahpour, A. und Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42:409–435.
- Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Gadeau, A. P., Ruat, M. und Traiffort, E. (2008). Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells*, 26:2311–2320.

- Arthur, D. B., Akassoglou, K. und Insel, P. A. (2006a). P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 347:678–682.
- Ayuso-Sacido, A., Roy, N. S., Schwartz, T. H., Greenfield, J. P. und Boockvar, J. A. (2008). Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery*, 62:223–229.
- Bading, H. und Greenberg, M. E. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*, 253:912–914.
- Bagchi, S., Liao, Z., Gonzalez, F. A., Chorna, N. E., Seye, C. I., Weisman, G. A. und Erb, L. (2005). The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alpha v integrins to activate Go and induce cell migration. *J. Biol. Chem.*, 280:39050–39057.
- Baker, O. J., Camden, J. M., Ratchford, A. M., Seye, C. I., Erb, L. und Weisman, G. A. (2006). Differential coupling of the P2Y1 receptor to Galpha14 and Galphaq/11 proteins during the development of the rat salivary gland. *Arch. Oral Biol.*, 51:359–370.
- Basak, O. und Taylor, V. (2009). Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66:1057–1072.
- Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A. und Moyse, E. (2005). In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience*, 130:75–90.
- Baurand, A., Raboisson, P., Freund, M., Léon, C., Cazenave, J. P., Bourguignon, J. J. und Gachet, C. (2001). Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 412:213–221.
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W. und Cheng, J. Q. et al. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 64:280–285.
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J. und LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 23:10411–10418.
- Bender, R. A., Lauterborn, J. C., Gall, C. M., Cariaga, W. und Baram, T. Z. (2001). Enhanced CREB phosphorylation in immature dentate gyrus granule cells precedes neurotrophin expression and indicates a specific role of CREB in granule cell differentiation. *Eur. J. Neurosci.*, 13:679–686.
- Bernier, P. J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M. und Parent, A. (2002). Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11464–11469.
- Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1:11–21.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J. und Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.*, 291:17–20.

- Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H. und Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.*, 274:8335–8343.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A. und Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, 286:1358–1362.
- Bourdon, D. M., Mahanty, S. K., Jacobson, K. A., Boyer, J. L. und Harden, T. K. (2006). (N)-methanocarba-2MeSADP (MRS2365) is a subtype-specific agonist that induces rapid desensitization of the P2Y1 receptor of human platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 4:861–868.
- Braun, N., Sévigny, J., Mishra, S. K., Robson, S. C., Barth, S. W., Gerstberger, R., Hammer, K. und Zimmermann, H. (2003). Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 17:1355–1364.
- Bredt, D. S. (1998). Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell*, 94:691–694.
- Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y. und Dennis, P. A. (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.*, 61:3986–3997.
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. und Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 467:1–10.
- Brown, M. T. und Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta*, 1287:121–149.
- Burnstock, G. (2009). Purinergic signalling: past, present and future. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42:3–8.
- Buvinic, S., Bravo-Zehnder, M., Boyer, J. L., Huidobro-Toro, J. P. und González, A. (2007). Nucleotide P2Y1 receptor regulates EGF receptor mitogenic signaling and expression in epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 120:4289–4301.
- Bähler, M. (2009). Signaling pathways controlling the dynamic organization of the actin cytoskeleton. *Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Münster*.
- Bédard, A., Lévesque, M., Bernier, P. J. und Parent, A. (2002). The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Eur. J. Neurosci.*, 16:1917–1924.
- Böhm, M., Moellmann, G., Cheng, E., Alvarez-Franco, M., Wagner, S., Sassone-Corsi, P. und Halaban, R. (1995). Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ.*, 6:291–302.

- Bökel, C. und Brown, N. H. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev. Cell*, 3:311–321.
- Camden, J. M., Schrader, A. M., Camden, R. E., González, F. A., Erb, L., Seye, C. I. und Weisman, G. A. (2005). P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J. Biol. Chem.*, 280:18696–18702.
- Campos, L. S., Leone, D. P., Relvas, J. B., Brakebusch, C., Fässler, R., Suter, U. und French Constant, C. (2004). Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development*, 131:3433–3444.
- Capela, A. und Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*, 35:865–875.
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A. und Lledo, P. M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, 6:507–518.
- Carrier, M. F., Wiesner, S., Le Clainche, C. und Pantaloni, D. (2003). Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro. *C. R. Biol.*, 326:161–170.
- Carlén, M., Cassidy, R. M., Brismar, H., Smith, G. A., Enquist, L. W. und Frisé, J. (2002). Functional integration of adult-born neurons. *Curr. Biol.*, 12:606–608.
- Carpenter, G. (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:881–914.
- Carpenter, G. und Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:193–216.
- Cary, L. A., Chang, J. F. und Guan, J. L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J. Cell. Sci.*, 109 ( Pt 7):1787–1794.
- Cary, L. A., Han, D. C., Polte, T. R., Hanks, S. K. und Guan, J. L. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell Biol.*, 140:211–221.
- Cerda, S. R., Mustafi, R., Little, H., Cohen, G., Khare, S., Moore, C., Majumder, P. und Bissonnette, M. (2006). Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene*, 25:3123–3138.
- Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S. und Moysé, E. (2006). Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience*, 138:5–16.
- Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G. und Cremer, H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.*, 20:1446–1457.

- Chen, H. C. und Guan, J. L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:10148–10152.
- Chiaramello, S., Dalmasso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A. und De Marchis, S. (2007). BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.*, 26:1780–1790.
- Chorna, N. E., Chevres, M., Santos-Berrios, C., Orellano, E. A., Erb, L. und González, F. A. (2007). P2Y2 receptors induced cell surface redistribution of alpha(v) integrin is required for activation of ERK 1/2 in U937 cells. *J. Cell. Physiol.*, 211:410–422.
- Chorna, N. E., Santiago-Pérez, L. I., Erb, L., Seye, C. I., Neary, J. T., Sun, G. Y., Weisman, G. A. und González, F. A. (2004). P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J. Neurochem.*, 91:119–132.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237:1555–1562.
- Conti, L., Pollard, S. M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q. L., Cattaneo, E. und Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol.*, 3:e283.
- Cooke, M. J., Zahir, T., Phillips, S. R., Shah, D. S., Athey, D., Lakey, J. H., Shoichet, M. S. und Przyborski, S. A. (2009). Neural differentiation regulated by biomimetic surfaces presenting motifs of extracellular matrix proteins. *J Biomed Mater Res A*.
- Corotto, F. S., Henegar, J. A. und Maruniak, J. A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 149:111–114.
- Courtneidge, S. A. (2003). Isolation of novel Src substrates. *Biochem. Soc. Trans.*, 31:25–28.
- Craig, C. G., Tropepe, V., Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Weiss, S. und van der Kooy, D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J. Neurosci.*, 16:2649–2658.
- Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R. und Kandel, E. R. (1991). cAMP response element-binding protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:5061–5065.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. und Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, 351:95–105.

- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J. und Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.*, 20:4563–4572.
- Dayar, A. G., Cleaver, K. M., Abouantoun, T. und Cameron, H. A. (2005). New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J. Cell Biol.*, 168:415–427.
- De Arcangelis, A. und Georges-Labouesse, E. (2000). Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.*, 16:389–395.
- De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A. und Sassone-Corsi, P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:12202–12207.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M. und Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.*, 17:4426–4441.
- Di Mari, J. F., Mifflin, R. C. und Powell, D. W. (2005). The role of protein kinase C in gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 128:2131–2146.
- Ding, Z., Kim, S., Dorsam, R. T., Jin, J. und Kunapuli, S. P. (2003). Inactivation of the human P2Y<sub>12</sub> receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*, 101:3908–3914.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13:543–550.
- Doetsch, F. und Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:14895–14900.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, 17:5046–5061.
- Doetsch, F. und Hen, R. (2005). Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15:121–128.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36:1021–1034.
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M. und Greenberg, M. E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 294:333–339.
- Du, K. und Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.*, 273:32377–32379.
- Ehninger, D. und Kempermann, G. (2008). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 331:243–250.

- Elia, M. G., Muscella, A., Romano, S., Greco, S., Di Jeso, B., Verri, T., Storelli, C. und Marsigliante, S. (2005). Effects of extracellular nucleotides in the thyroid: P2Y2 receptor-mediated ERK1/2 activation and c-Fos induction in PC Cl3 cells. *Cell. Signal.*, 17:739–749.
- Eliceiri, B. P., Puente, X. S., Hood, J. D., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., Huang, X. Z., Sheppard, D. und Cheresch, D. A. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.*, 157:149–160.
- Emsley, J. G. und Hagg, T. (2003). alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp. Neurol.*, 183:273–285.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. und Weisman, G. A. (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.*, 452:552–562.
- Ethier, M. F. und Madison, J. M. (2002). LY294002, but not wortmannin, increases intracellular calcium and inhibits calcium transients in bovine and human airway smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 32:31–38.
- Evans, J. H., Murray, D., Leslie, C. C. und Falke, J. J. (2006). Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca<sup>2+</sup> and PIP2 recognition by its C2 domain. *Mol. Biol. Cell*, 17:56–66.
- Fam, S. R., Gallagher, C. J., Kalia, L. V. und Salter, M. W. (2003). Differential frequency dependence of P2Y1- and P2Y2- mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes. *J. Neurosci.*, 23:4437–4444.
- Fam, S. R., Paquet, M., Castleberry, A. M., Oller, H., Lee, C. J., Traynelis, S. F., Smith, Y., Yun, C. C. und Hall, R. A. (2005). P2Y1 receptor signaling is controlled by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:8042–8047.
- Farin, A., Liu, C. Y., Elder, J. B., Langmoen, I. A. und Apuzzo, M. L. (2009a). The biological restoration of central nervous system architecture and function: part 1-foundations and historical landmarks in contemporary stem cell biology. *Neurosurgery*, 64:15–39.
- Farin, A., Liu, C. Y., Langmoen, I. A. und Apuzzo, M. L. (2009b). The biological restoration of central nervous system architecture and function: part 2-emergence of the realization of adult neurogenesis. *Neurosurgery*, 64:581–560.
- Fedde, K. N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S. P., Ryan, L. M., Weinstein, R. S., Waymire, K., Narisawa, S., Millán, J. L., MacGregor, G. R. und Whyte, M. P. (1999). Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.*, 14:2015–2026.
- Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 80:231–238.

- Fischer, O. M., Hart, S. und Ullrich, A. (2006). Dissecting the epidermal growth factor receptor signal transactivation pathway. *Methods Mol. Biol.*, 327:85–97.
- Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, H., Angeletti, C. A., Pingitore, R., Pepe, S., Basolo, F. und Bevilacqua, G. (1995). Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *Eur. J. Cancer*, 31A:178–183.
- Fowler, C. D., Johnson, F. und Wang, Z. (2005). Estrogen regulation of cell proliferation and distribution of estrogen receptor-alpha in the brains of adult female prairie and meadow voles. *J. Comp. Neurol.*, 489:166–179.
- Fowler, C. D., Liu, Y., Ouimet, C. und Wang, Z. (2002). The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J. Neurobiol.*, 51:115–128.
- Fowler, C. D., Liu, Y. und Wang, Z. (2008). Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev*, 57:342–351.
- Franchini, K. G., Torsoni, A. S., Soares, P. H. und Saad, M. J. (2000). Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.*, 87:558–565.
- Fröjdö, E. M., Westerlund, J. und Isomaa, B. (2002). Culturing and characterization of astrocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, 133:17–28.
- Fuchs, E., Tumber, T. und Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116:769–778.
- Fujioka, T., Fujioka, A. und Duman, R. S. (2004). Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J. Neurosci.*, 24:319–328.
- Gampe, K. K. (2005). Analyse intrazellulärer Signalkaskaden in Neurosphären nach Aktivierung des P2Y2-Nukleotidrezeptors. *Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.
- Gendron, F. P., Neary, J. T., Theiss, P. M., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A. und Weisman, G. A. (2003). Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 284:C571–581.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. und Mansuy, I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418:970–975.
- Giachino, C., De Marchis, S., Giampietro, C., Parlato, R., Perroteau, I., Schütz, G., Fasolo, A. und Peretto, P. (2005). cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 25:10105–10118.
- Gilbertson, R. J. und Rich, J. N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer*, 7:733–736.

- Gotoh, Y. und Nishida, E. (1993). MAP kinase kinase/MAP kinase cascade. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 38:1625–1628.
- Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S. und Gross, C. G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286:548–552.
- Gould, E., Vail, N., Wagers, M. und Gross, C. G. (2001). Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:10910–10917.
- Gregory, H. (1975). Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, 257:325–327.
- Grimm, I. (2005). P2Y1-Rezeptor-induzierte intrazelluläre Signalmechanismen in kultivierten Neurosphären. *Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.
- Griner, E. M. und Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7:281–294.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., Galli, R., Verdugo, J. M., Herrera, D. G. und Vescovi, A. L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J. Neurosci.*, 22:437–445.
- Gritti, A., Frölichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R. und Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J. Neurosci.*, 19:3287–3297.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. und Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.*, 22:2411–2421.
- Gööz, M., Gööz, P., Luttrell, L. M. und Raymond, J. R. (2006). 5-HT<sub>2A</sub> receptor induces ERK phosphorylation and proliferation through ADAM-17 tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) activation and heparin-bound epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) shedding in mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, 281:21004–21012.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S. und Montminy, M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell*, 70:105–113.
- Hamm, H. E. und Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8:189–196.
- Hanawa, M., Suzuki, S., Dobashi, Y., Yamane, T., Kono, K., Enomoto, N. und Ooi, A. (2006). EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int. J. Cancer*, 118:1173–1180.

- Haynes, M. P., Li, L., Sinha, D., Russell, K. S., Hisamoto, K., Baron, R., Collinge, M., Sessa, W. C. und Bender, J. R. (2003). Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J. Biol. Chem.*, 278:2118–2123.
- Heine, P., Braun, N., Heilbronn, A. und Zimmermann, H. (1999). Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.*, 262:102–107.
- Ho, N., Liauw, J. A., Blaeser, F., Wei, F. und Hanissian, S. et al. (2000). Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice. *J. Neurosci.*, 20:6459–6472.
- Hoffmann, C., Moro, S., Nicholas, R. A., Harden, T. K. und Jacobson, K. A. (1999). The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y<sub>1</sub> receptor in surface expression and activation processes. *J. Biol. Chem.*, 274:14639–14647.
- Hoffmann, C., Ziegler, N., Reiner, S., Krasel, C. und Lohse, M. J. (2008). Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 283:30933–30941.
- Homolya, L., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., Koller, B. H. und Boucher, R. C. (1999). Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y<sub>2</sub> receptor (-/-) mice. *J. Biol. Chem.*, 274:26454–26460.
- Horvath, R. J. und DeLeo, J. A. (2009). Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X<sub>4</sub> receptor signaling. *J. Neurosci.*, 29:998–1005.
- Hoshimaru, M., Ray, J., Sah, D. W. und Gage, F. H. (1996). Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:1518–1523.
- Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K. und Juliano, R. L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:220–231.
- Hsieh, J. und Gage, F. H. (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14:461–469.
- Hu, H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23:703–711.
- Hu, H. (2000). Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J. Neurosci. Res.*, 61:480–492.
- Hu, H. und Rutishauser, U. (1996). A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron*, 16:933–940.
- Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. und Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron*, 16:735–743.

- Huang, L., DeVries, G. J. und Bittman, E. L. (1998). Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J. Neurobiol.*, 36:410–420.
- Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M. und Nishizuka, Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.*, 6:477–480.
- Huwiler, A., Rölz, W., Dorsch, S., Ren, S. und Pfeilschifter, J. (2002). Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 136:520–529.
- Iacobas, D. A., Iacobas, S., Urban-Maldonado, M., Scemes, E. und Spray, D. C. (2008). Similar transcriptomic alterations in Cx43 knockdown and knockout astrocytes. *Cell Commun. Adhes.*, 15:195–206.
- Iacobas, D. A., Suadicani, S. O., Iacobas, S., Chrisman, C., Cohen, M. A., Spray, D. C. und Scemes, E. (2007). Gap junction and purinergic P2 receptor proteins as a functional unit: insights from transcriptomics. *J. Membr. Biol.*, 217:83–91.
- Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., Boss, J. M., McWeeney, S., Dunn, J. J., Mandel, G. und Goodman, R. H. (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119:1041–1054.
- Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S. und Ohsawa, K. (2008). Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.*, 86:1511–1519.
- Jacobson, K. A., Costanzi, S., Ohno, M., Joshi, B. V., Besada, P., Xu, B. und Tchilibon, S. (2004). Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Curr Top Med Chem*, 4:805–819.
- Jarvis, M. F. und Khakh, B. S. (2009). ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 56:208–215.
- Jeanneteau, F. und Chao, M. V. (2006). Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands. *Novartis Found. Symp.*, 276:181–189.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. und Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11946–11950.
- Johnson, G. L. und Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298:1911–1912.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. und Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.*, 284:31–53.
- Joslin, E. J., Opresko, L. K., Wells, A., Wiley, H. S. und Lauffenburger, D. A. (2007). EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signaling from autocrine stimulation. *J. Cell. Sci.*, 120:3688–3699.

- Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., Blusztajn, J. K., Trinkaus-Randall, V., Weisman, G. A. und Robson, S. C. (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb. Haemost.*, 93:735–742.
- Kahl, C. R. und Means, A. R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr. Rev.*, 24:719–736.
- Kalluri, H. S., Vemuganti, R. und Dempsey, R. J. (2007). Mechanism of insulin-like growth factor I-mediated proliferation of adult neural progenitor cells: role of Akt. *Eur. J. Neurosci.*, 25:1041–1048.
- Kalmes, A., Vesti, B. R., Daum, G., Abraham, J. A. und Clowes, A. W. (2000). Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ. Res.*, 87:92–98.
- Kang, H., Sun, L. D., Atkins, C. M., Soderling, T. R., Wilson, M. A. und Tonegawa, S. (2001). An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell*, 106:771–783.
- Kanno, H., Horikawa, Y., Hodges, R. R., Zoukhri, D., Shatos, M. A., Rios, J. D. und Dartt, D. A. (2003). Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 284:C988–998.
- Kato, T., Yokouchi, K., Fukushima, N., Kawagishi, K., Li, Z. und Moriizumi, T. (2001). Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. *Neurosci. Lett.*, 307:17–20.
- Kearns, S. M., Laywell, E. D., Kukekov, V. K. und Steindler, D. A. (2003). Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exp. Neurol.*, 182:240–244.
- Keely, S. J., Uribe, J. M. und Barrett, K. E. (1998). Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T84 cells. Implications for carbachol-stimulated chloride secretion. *J. Biol. Chem.*, 273:27111–27117.
- Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C. R. und Zimmermann, H. (1997). An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology*, 36:1189–1200.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. und Kronenberg, G. (2004a). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.*, 27:447–452.
- Kempermann, G., Wiskott, L. und Gage, F. H. (2004b). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14:186–191.

- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Séguéla, P., Voigt, M. und Humphrey, P. P. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.*, 53:107–118.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C. und Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121:1109–1121.
- Klepeis, V. E., Weinger, I., Kaczmarek, E. und Trinkaus-Randall, V. (2004). P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J. Cell. Biochem.*, 93:1115–1133.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B. C. und Gleeson, J. G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.*, 9:779–786.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. und Flier, J. S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, 310:679–683.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K. und Clapham, D. E. (1995). G beta gamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH. *J. Biol. Chem.*, 270:29059–29062.
- Kudirka, J. C., Panupinthu, N., Tesseyman, M. A., Dixon, S. J. und Bernier, S. M. (2007). P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins. *J. Cell. Physiol.*, 213:54–64.
- Kumar, R. N., Ha, J. H., Radhakrishnan, R. und Dhanasekaran, D. N. (2006). Transactivation of platelet-derived growth factor receptor alpha by the GTPase-deficient activated mutant of Galpha12. *Mol. Cell. Biol.*, 26:50–62.
- Kurokawa, K., Itoh, R. E., Yoshizaki, H., Nakamura, Y. O. und Matsuda, M. (2004). Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell*, 15:1003–1010.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Langer, D., Ikehara, Y., Takebayashi, H., Hawkes, R. und Zimmermann, H. (2007). The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience*, 150:863–879.
- Langgut, W. und Ogilvie, A. (1995). Silencing of the epidermal growth factor receptor in the absence of the ligand requires phospholipase C activity. *FEBS Lett.*, 372:173–176.
- Le Gall, S. M., Auger, R., Dreux, C. und Mauduit, P. (2003). Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J. Biol. Chem.*, 278:45255–45268.

- Lee, M. H. und Murphy, G. (2004). Matrix metalloproteinases at a glance. *J. Cell. Sci.*, 117:4015–4016.
- Leserer, M., Gschwind, A. und Ullrich, A. (2000). Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life*, 49:405–409.
- Li, H. und Weinstein, I. B. (2006). Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 66:11399–11408.
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., García-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28:713–726.
- Lin, J. H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A. und Nedergaard, M. (2007). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.*, 302:356–366.
- Liu, G. und Rao, Y. (2003). Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 23:6651–6659.
- Liu, J., Liao, Z., Camden, J., Griffin, K. D., Garrad, R. C., Santiago-Pérez, L. I., González, F. A., Seye, C. I., Weisman, G. A. und Erb, L. (2004). Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*, 279:8212–8218.
- Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O. und Bordey, A. (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia*, 54:394–410.
- Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Haydar, T. F. und Rakic, P. (2008). The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:11802–11807.
- Livneh, E. und Fishman, D. D. (1997). Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J. Biochem.*, 248:1–9.
- Lledo, P. M., Alonso, M. und Grubb, M. S. (2006). Neural stem cells and the regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7:179–193.
- Lois, C. und Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264:1145–1148.
- Lois, C., García-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271:978–981.
- Lonze, B. E. und Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35:605–623.
- Lonze, B. E., Riccio, A., Cohen, S. und Ginty, D. D. (2002). Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, 34:371–385.

- Louissaint, A., Rao, S., Leventhal, C. und Goldman, S. A. (2002). Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 34:945–960.
- Lucchesi, P. A., Sabri, A., Belmadani, S. und Matrougui, K. (2004). Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation*, 110:3587–3593.
- Luo, H. R., Hattori, H., Hossain, M. A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E. und Snyder, S. H. (2003). Akt as a mediator of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:11712–11717.
- Léon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J. Clin. Invest.*, 104:1731–1737.
- Mackay, H. J. und Twelves, C. J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet?. *Nat. Rev. Cancer*, 7:554–562.
- Madarame, J., Higashiyama, S., Kiyota, H., Madachi, A., Toki, F., Shimomura, T., Tani, N., Oishi, Y. und Matsuura, N. (2003). Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate*, 57:187–195.
- Majumder, P., Trujillo, C. A., Lopes, C. G., Resende, R. R., Gomes, K. N., Yuahasi, K. K., Britto, L. R. und Ulrich, H. (2007). New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal.*, 3:317–331.
- Markakis, E. A. und Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.*, 406:449–460.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80:179–185.
- Marteau, F., Communi, D., Boeynaems, J. M. und Suarez Gonzalez, N. (2004). Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 76:796–803.
- Massé, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N. und Jones, E. A. (2007). Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature*, 449:1058–1062.
- Mattiesen, W. R., Tauber, S. C., Gerber, J., Bunkowski, S., Brück, W. und Nau, R. (2009). Increased neurogenesis after hypoxic-ischemic encephalopathy in humans is age related. *Acta Neuropathol.*, 117:525–534.

- McCawley, L. J., O'Brien, P. und Hudson, L. G. (1997). Overexpression of the epidermal growth factor receptor contributes to enhanced ligand-mediated motility in keratinocyte cell lines. *Endocrinology*, 138:121–127.
- Meloche, S. und Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26:3227–3239.
- Menon, B., Singh, M. und Singh, K. (2005). Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 289:C168–176.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Castresana, J. S. und Klein-Szanto, A. J. (2003). Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 106:676–682.
- Messemer, N. (2008). Immunzytologische Charakterisierung adulter adhärenter neuraler Vorläuferzellen. *Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.*
- Milenkovic, I., Weick, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A. und Bringmann, A. (2003). P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44:1211–1220.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3:265–278.
- Mishra, S. K., Braun, N., Shukla, V., Füllgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H. W., Gachet, C., Ikehara, Y., Sévigny, J., Robson, S. C. und Zimmermann, H. (2006). Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development*, 133:675–684.
- Moll, V., Weick, M., Milenkovic, I., Kodal, H., Reichenbach, A. und Bringmann, A. (2002). P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43:766–773.
- Moore, C. A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A. und Milligan, R. A. (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell*, 14:833–839.
- Mori, K., Kitayama, J., Shida, D., Yamashita, H., Watanabe, T. und Nagawa, H. (2006). Lysophosphatidic acid-induced effects in human colon carcinoma DLD1 cells are partially dependent on transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Surg. Res.*, 132:56–61.
- Murasawa, S., Mori, Y., Nozawa, Y., Gotoh, N. und Shibuya, M. et al. (1998). Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ. Res.*, 82:1338–1348.

- Murase, S. und Horwitz, A. F. (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.*, 22:3568–3579.
- Murphy, L. O., MacKeigan, J. P. und Blenis, J. (2004). A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol. Cell. Biol.*, 24:144–153.
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C. und Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.*, 4:556–564.
- Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Chen, J., Fujioka, T., Malberg, J., Tsuji, S. und Duman, R. S. (2002a). Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J. Neurosci.*, 22:9868–9876.
- Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y. J., Nestler, E. J. und Duman, R. S. (2002b). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J. Neurosci.*, 22:3673–3682.
- Narisawa, S., Fröhlander, N. und Millán, J. L. (1997). Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev. Dyn.*, 208:432–446.
- Neary, J. T., Kang, Y., Bu, Y., Yu, E., Akong, K. und Peters, C. M. (1999). Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J. Neurosci.*, 19:4211–4220.
- Neary, J. T., Whittemore, S. R., Zhu, Q. und Norenberg, M. D. (1994). Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP. *J. Neurochem.*, 63:490–494.
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M. und Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:9508–9513.
- Nichols, M., Weih, F., Schmid, W., DeVack, C., Kowenz-Leutz, E., Luckow, B., Boshart, M. und Schütz, G. (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J.*, 11:3337–3346.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258:607–614.
- Noble, M. (1999). Production and growth of conditionally immortal cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Methods Mol. Biol.*, 97:139–158.

- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. und Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409:714–720.
- Nogami, M., Yamazaki, M., Watanabe, H., Okabayashi, Y., Kido, Y., Kasuga, M., Sasaki, T., Maehama, T. und Kanaho, Y. (2003). Requirement of autophosphorylated tyrosine 992 of EGF receptor and its docking protein phospholipase C gamma 1 for membrane ruffle formation. *FEBS Lett.*, 536:71–76.
- North, R. A. und Barnard, E. A. (1997). Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7:346–357.
- Ocbina, P. J., Dizon, M. L., Shin, L. und Szele, F. G. (2006). Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol. Cell. Neurosci.*, 33:126–135.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. und Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55:604–616.
- Ohtsu, H., Dempsey, P. J. und Eguchi, S. (2006). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 291:1–10.
- Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. und Hynes, N. E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 274:17209–17218.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. und Rutishauser, U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron*, 13:595–609.
- Ota, I., Zoukhri, D., Hodges, R. R., Rios, J. D., Tepavcevic, V., Raddassi, I., Chen, L. L. und Dartt, D. A. (2003). Alpha 1-adrenergic and cholinergic agonists activate MAPK by separate mechanisms to inhibit secretion in lacrimal gland. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 284:C168–178.
- Owen-Lynch, P. J., Draper, C. E., Mashayekhi, F., Bannister, C. M. und Miyan, J. A. (2003). Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain*, 126:623–631.
- Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T. und Cance, W. G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, 55:2752–2755.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. und Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 425:479–494.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. und Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292:1502–1506.
- Parekh, A. B. und Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 85:757–810.

- Parker, P. J. und Murray-Rust, J. (2004). PKC at a glance. *J. Cell. Sci.*, 117:131–132.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373:573–580.
- Pekcec, A., Löscher, W. und Potschka, H. (2006). Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuroreport*, 17:571–574.
- Peng, J., Xie, L., Jin, K., Greenberg, D. A. und Andersen, J. K. (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 153:664–670.
- Platel, J. C., Heintz, T., Young, S., Gordon, V. und Bordey, A. (2008). Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. *J. Physiol. (Lond.)*, 586:3783–3793.
- Poser, S. und Storm, D. R. (2001). Role of Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 19:387–394.
- Pouysségur, J. und Lenormand, P. (2003). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur. J. Biochem.*, 270:3291–3299.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. und Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402:884–888.
- Pryazhnikov, E. und Khiroug, L. (2008). Sub-micromolar increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia*, 56:38–49.
- Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zeng, J. Z., Shi, X., Lynn, D. C. und Jiang, B. H. (2004). PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286:C153–C163.
- Ralser, M., Querfurth, R., Warnatz, H. J., Lehrach, H., Yaspo, M. L. und Krobitsch, S. (2006). An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 347:747–751.
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J. und Fariñas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat. Neurosci.*, 9:331–339.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. und Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 12:4565–4574.
- Reynolds, B. A. und Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255:1707–1710.
- Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:281–312.

- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A. und Ginty, D. D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, 286:2358–2361.
- Riquelme, P. A., Drapeau, E. und Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 363:123–137.
- Robson, S. C., Sévigny, J. und Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.*, 2:409–430.
- Roelle, S., Grosse, R., Aigner, A., Krell, H. W., Czubayko, F. und Gudermann, T. (2003). Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*, 278:47307–47318.
- Rozengurt, E. (1998). Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J. Cell. Physiol.*, 177:507–517.
- Sanabria, P., Ross, E., Ramirez, E., Colon, K., Hernandez, M., Maldonado, H. M., Silva, W. I., Jimenez-Rivera, C. A. und Gonzalez, F. A. (2008). P2Y2 receptor desensitization on single endothelial cells. *Endothelium*, 15:43–51.
- Sasaki, A. T., Chun, C., Takeda, K. und Firtel, R. A. (2004). Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *J. Cell Biol.*, 167:505–518.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. A. und Yamada, M. et al. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311:629–632.
- Scemes, E., Duval, N. und Meda, P. (2003). Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J. Neurosci.*, 23:11444–11452.
- Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4:25–30.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110:669–672.
- Schlessinger, J. und Lemmon, M. A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE*, 2003:RE12.
- Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, 9:383–391.
- Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A. und Ullrich, A. (2004). Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.*, 279:47929–47938.

- Segall, J. E., Tyrech, S., Boselli, L., Masseling, S., Helft, J., Chan, A., Jones, J. und Condeelis, J. (1996). EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism. *Clin. Exp. Metastasis*, 14:61–72.
- Seger, R. und Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9:726–735.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S. M., Goderie, S. K., Roy-sam, B. und Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, 3:289–300.
- Sheng, M., Thompson, M. A. und Greenberg, M. E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252:1427–1430.
- Siddappa, R., Licht, R., van Blitterswijk, C. und de Boer, J. (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J. Orthop. Res.*, 25:1029–1041.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R. und Schlaepfer, D. D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell. Sci.*, 112 ( Pt 16):2677–2691.
- Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Hsieh, N., Jiang, X. und Rozengurt, E. (2004). Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 279:16883–16893.
- Soltoff, S. P. (1998). Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or [Ca2+]i elevation can substitute for receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 273:23110–23117.
- Spray, D. C. und Iacobas, D. A. (2007). Organizational principles of the connexin-related brain transcriptome. *J. Membr. Biol.*, 218:39–47.
- Stambolic, V. und Woodgett, J. R. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol.*, 16:461–466.
- Sweatt, J. D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.*, 76:1–10.
- Taboubi, S., Milanini, J., Delamarre, E., Parat, F., Garrouste, F., Pommier, G., Takasaki, J., Hubaud, J. C., Kovacic, H. und Lehmann, M. (2007). G alpha(q/11)-coupled P2Y2 nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *FASEB J.*, 21:4047–4058.
- Tan, S. L. und Parker, P. J. (2003). Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem. J.*, 376:545–552.

- Tang, W. J. und Gilman, A. G. (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*, 254:1500–1503.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev*, 53:198–214.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414:112–117.
- Testa, J. R. und Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:10983–10985.
- Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G. und Besmer, P. (1998). Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J.*, 17:6250–6262.
- Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., Lim, D. A. und Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb. Cortex*, 13:580–587.
- Turecková, J., Vojtechová, M., Krausová, M., Sloncová, E. und Korínek, V. (2009). Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. *Transl Oncol*, 2:281–290.
- Turner, T., Chen, P., Goodly, L. J. und Wells, A. (1996). EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 14:409–418.
- Ullsperger, S. N. (2009). Wirkung von Nukleotiden auf die Migration von adulten neuronalen Stammzellen. *Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.*
- van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10:251–337.
- Verbeek, B. S., Adriaansen-Slot, S. S., Vroom, T. M., Beckers, T. und Rijksen, G. (1998). Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.*, 425:145–150.
- von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.*, 110:415–432.
- Wadzinski, B. E., Wheat, W. H., Jaspers, S., Peruski, L. F., Lickteig, R. L., Johnson, G. L. und Klemm, D. J. (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol. Cell. Biol.*, 13:2822–2834.
- Walton, M., Woodgate, A. M., Muravlev, A., Xu, R., During, M. J. und Dragunow, M. (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J. Neurochem.*, 73:1836–1842.
- Wang, L. P., Kempermann, G. und Kettenmann, H. (2005a). A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol. Cell. Neurosci.*, 29:181–189.

- Wang, M., Kong, Q., Gonzalez, F. A., Sun, G., Erb, L., Seye, C. und Weisman, G. A. (2005b). P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration. *J. Neurochem.*, 95:630–640.
- Waymire, K. G., Mahuren, J. D., Jaje, J. M., Guilarte, T. R., Coburn, S. P. und MacGregor, G. R. (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat. Genet.*, 11:45–51.
- Wei, F., Qiu, C. S., Liauw, J., Robinson, D. A., Ho, N., Chatila, T. und Zhuo, M. (2002). Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat. Neurosci.*, 5:573–579.
- Weisman, G. A., Griffin, K., Santiago-Pérez, L. I., Liu, J., Krugh, B., Flores, R. V., Chorna, N. E., Santos-Berriós, C., Vivas-Mejía, P. E., Garrad, R. C. und González F. A. Erb, L. (2001). P2Y2 receptors regulate multiple signal transduction pathways in monocytic cells. *Drug. Dev. Res.*, 53:186–192.
- Wells, A., Ware, M. F., Allen, F. D. und Lauffenburger, D. A. (1999). Shaping up for shipping out: PLCgamma signaling of morphology changes in EGF-stimulated fibroblast migration. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 44:227–233.
- West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., Takasu, M. A., Tao, X. und Greenberg, M. E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:11024–11031.
- Wickman, K. D. und Clapham, D. E. (1995). G-protein regulation of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5:278–285.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M. F. und Pantaloni, D. (2003). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J. Cell Biol.*, 160:387–398.
- Wiggin, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P. und Arthur, J. S. (2002). MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 22:2871–2881.
- Wilde, A., Beattie, E. C., Lem, L., Riethof, D. A., Liu, S. H., Mobley, W. C., Soriano, P. und Brodsky, F. M. (1999). EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell*, 96:677–687.
- Wong, R. W. (2003). Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60:113–118.
- Wong, R. W. und Guillaud, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15:147–156.
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F. und Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80:1529–1537.

- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y. und Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, 400:331–336.
- Xing, J., Ginty, D. D. und Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273:959–963.
- Xing, J., Kornhauser, J. M., Xia, Z., Thiele, E. A. und Greenberg, M. E. (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, 18:1946–1955.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M. und Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.*, 192:251–264.
- Yamada, M., Ikeuchi, T. und Hatanaka, H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog. Neurobiol.*, 51:19–37.
- Yamada, M., Onodera, M., Mizuno, Y. und Mochizuki, H. (2004). Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice. *Neuroscience*, 124:173–181.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer*, 37 Suppl 4:3–8.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:127–137.
- Yin, J., Xu, K., Zhang, J., Kumar, A. und Yu, F. S. (2007). Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 120:815–825.
- Yu, W., Murray, N. R., Weems, C., Chen, L., Guo, H., Ethridge, R., Ceci, J. D., Evers, B. M., Thompson, E. A. und Fields, A. P. (2003). Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C beta II-mediated colon carcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, 278:11167–11174.
- Zhao, C., Deng, W. und Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132:645–660.
- Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J. und Janson, A. M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:7925–7930.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 362:299–309.
- Zimmermann, H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Arch.*, 452:573–588.

## B Abkürzungsverzeichnis

A	A	Ampère
	ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
	ADP	Adenosindiphosphat
	ADP $\beta$ S	Adenosin-5'-[ $\beta$ -thio]-diphosphat
	AMP	Adenosinmonophosphat
	ANOVA	univariate Varianzanalyse
	Ap4A	Diadenosin 5', 5'''-P1,P4-Tetraphosphat
	Aplp	Alkalische Phosphatase
	APS	Amoniumpersulfat
	Aqua <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
	Aqua <sub>demin</sub>	demineralisiertes Wasser
	AR	Amphiregulin
	ATF1	aktivierender Transkriptionsfaktor 1
	ATP	Adenosintriphosphat
	ATP $\gamma$ S	Adenosin-5'-O-[3 thio-triphosphat]
B	bp	Basenpaar
	BMP	Knochen-morphogenetisches Protein
	BrdU	Bromodesoxyuridin
	BSA	Rinderserumalbumin
	BTC	$\beta$ -Cellulin
C	CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
	cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
	Cang	Cangrelor
	CBP	CREB-Bindeprotein
	cc	Corpus callosum
	cDNA	komplementäre DNA
	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
	cp	Caudate putamen
	CRE	<i>cAMP-Response-Element</i>
	CREB	CRE-Bindeprotein
	CREM	CRE-Modulator
D	DA	Datenanalyse

	DAG	Diaglycerin
	DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
	DCX	<i>doublecortin</i>
	DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DNase I	neutrale Desoxyribonuklease
	DTT	Dithiothreitol
E	ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
	EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
	Entpd2	Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 2
	ER	endoplasmatisches Retikulum
	ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
F	F-Aktin	filamentöses Aktin
	FAK	Fokale Adhäsionskinase
	FCS	Fötale Kälberserum
	FGF2	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G	g	Gramm
	G-Aktin	globuläres Aktin
	$g_{av}$	durchschnittliche Zentrifugalbeschleunigung
	GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
	GAP	GTPase-aktivierendes Protein
	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
	GD	Gyrus dentatus
	GFAP	saures gliales Faserprotein
	GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
	GPCR	G-Protein-gekoppeltes Protein
	Grb2	Wachstumsfaktor-gebundenes Protein 2
H	H <sub>2</sub> O	Wasser
	HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor

	HCl	Chlorwasserstoff
	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
	hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
	HRP	Meerrettich-Peroxidase
I	IDP	Inosindiphosphat
	Ig	Immunglobulin
	IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
	ITP	Inosintri-phosphat
K	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	l	Liter
	LexA/SSEA-1	<i>stage specific embryonic antigen-1</i>
	lv	Seitenventrikel
M	m	Meter
	M	Molar
	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
	2-MeSADP	2-Methylthio-ADP
	2-MeSATP	2-Methylthio-ATP
	MilliQ	Reinstwasser
	min	Minute
	mg	Milligramm
	ml	Milliliter
	MMP	Matrixmetalloprotease
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
	μg	Mikrogramm
	μl	Mikroliter
N	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
	Na <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Tetranatriumdiphosphat
	NaCl	Natriumchlorid
	NaF	Natriumfluorid
	NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
	NeuN	Neuronen-spezifisches Kernprotein
	ng	Nanogramm

	NRG	Neuregulin
	NSZ	Neurale Stammzelle
	NTPDase	Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
O	OB	Bulbus olfactorius
P	p	phosphoryliert
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
	PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase
	PEDF	<i>pigment epithelium-derived factor</i>
	PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
	PI(3,4,5)P	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
	PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
	PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
	PKC	Proteinkinase C
	PLC	Phospholipase
	PLO	Poly-L-Ornithin
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2', 4'-disulphat
	PSA-NCAM	polysialylierte Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls
	PTB	Phosphotyrosinkinase-bindende Domäne
R	Ras-GAP	Ras-GTPase-aktivierendes Protein
	reduz.	reduziert
	RMS	rostraler Migrationsstrom
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNAi	RNA-Interferenz
	RNase	Ribonuklease
	RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	s	Sekunde
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SGZ	subgranuläre Zone

	SH2	<i>Src-homology 2</i>
	SH3	<i>Src-homology 3</i>
	spt	Septum
	svz, SVZ	Subventrikuläre Zone
T	T	Tween-20
	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
	TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
	TGF $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
	TNAP	gewebeunspezifische Form der alkalischen Phosphatase
	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
	TrkA	Tyrosinkinase A
	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
	Tween-20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
U	U	<i>unit</i>
	UDP	Uridin-5'-Diphosphat
	UTP	Uridin-5'-Triphosphat
V	v/v	Volumen pro Volumen
	VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	WB	Westernblot
	WF	Wachstumsfaktor
	w/v	Gewicht pro Volumen

## C Danksagung

Meine Dankbarkeit gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Herbert Zimmermann für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und seine uneingeschränkte fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Herrn Professor Dr. Walter Volknandt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herzlich danken möchte ich auch allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Neurochemie für die angenehme Zusammenarbeit. Meinen besonderen Dank richte ich an Herrn Peter Brendel für die Unterstützung in der Zellkultur und bei der Erstellung der unzähligen Westernblots. Klaus Hammer danke ich sehr für die Unterstützung in immunzytochemischen Experimenten. Matthias Stanke möchte ich für die Durchführung der RT-PCRs danken.

Christian Gachet vom Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale möchte ich mich an dieser Stelle für die Bereitstellung des Inhibitors Cangrelor bedanken. Melanie Meister und Professor Dr. Ritva Tikkanen aus dem Institut für Biochemie II der Universitätsklinik Frankfurt danke ich sehr für die Durchführung der kniffligen EGFR-Detektion. Für die Einführung in die Migrationsanalysen mit Hilfe von Boyden-Chemotaxis-Chambers danke ich ganz herzlich Dr. Angelika Rappert aus dem Institut der Anatomie I der Universitätsklinik Frankfurt.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten. Herzlich danken möchte ich meiner Familie, die mich während meiner Ausbildung unterstützt und begleitet hat. Mein ganz besonderer Dank gilt Adam Duck. Ihm danke ich für seine liebevolle Unterstützung und seine fortwährende Motivation.

## D Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

Name: Ivette Grimm  
Geburtsdatum: 15. Juli 1980  
Geburtsort: Chemnitz  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

---

- 11/2005 – 2009 Promotionsstudium der Biowissenschaften am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main;  
Dissertation: „Analyse von molekularen Interaktionen nach Stimulierung von Nukleotidrezeptoren während der neuronalen Entwicklung“ (unter Anleitung von Prof. Herbert Zimmermann)
- 11/2005 – 2009 Wissenschaftliche Angestellte im Forschungsprojekt „Adulte Neurogenese in Säugern: Die Rolle von Nukleotiden und Ektonukleotidasen“ am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main; gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
- 09/2008 Co-Organisatorin des IZNF-Workshops „Gewinnung und Charakterisierung adulter neuraler Stammzellen der subventrikulären Zone“ an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main
- seit 11/2006 Mitglied im Interdisziplinären Zentrum für Neurowissenschaften Frankfurt (IZNF) an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

- 02/2006 – 09/2006 Mitglied im Graduiertenkolleg „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen und Funktionen“ an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main
- 10/1999 – 09/2005 Diplomstudiengang der Biowissenschaften am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main; Abschluß: Diplom mit Note: sehr gut;  
Diplomarbeit: „P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-induzierte intrazelluläre Signalmechanismen in kultivierten Neurosphären“ (unter Anleitung von Prof. Herbert Zimmermann)
- 09/1992 – 07/1999 Werner-Heisenberg-Gymnasium in Chemnitz; Abschluß: Abitur

### **Sprachkenntnisse**

---

Englisch  
Französisch  
Latein  
Japanisch

Frankfurt am Main, den 11. Januar 2010

## E Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Grimm I., Ullsperger S.N. und Zimmermann H. (2009). *Nucleotides and EGF induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells*. Acta Physiol, accepted for publication.

Grimm I., Messemer N., Stanke M., Gachet C. und Zimmermann H. (2009). *Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells*. J Cell Sci., Jul 15;122(Pt 14):2524-33.

### Übersichten

Zimmermann H., Mishra K.S., Shukla V., Langer D., Gampe K., Grimm I., Delic J. und Braun N. (2007). *Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact*. An. R. Acad. Nac. Farm.,73: 537-566.

### Kurzmitteilungen

Zimmermann, H., Grimm, I., Langer, D., Messemer, N., Gampe, B., Albuquerque, B., Leib, C., Ritter, M. und Stanke, M. (2008). *Purinergic signaling in subventricular zone neurogenesis*. Abstr. Society for Neuroscience Meet., Washington D.C.

Grimm I., Messemer N., Stanke M. und Zimmermann H. (2008). *Purinergic signaling in adult neural stem cells*. Purinergic Signalling 4 (Suppl 1), S.79.

Zimmermann H., Grimm I., Messemer N., Gampe K. und Stanke M. (2008). *Purinergic regulation of adult neural stem cells: new perspectives for repair*. Purinergic Signalling 4 (Suppl 1), S.45.

Zimmermann H., Langer, D., Mishra, S.K., Shukla, V., Braun, N., Gampe, K., Grimm, Y., Delic, J., Schomerus, C., Korf, H.-W., Kettenmann, H., Sévigny, J. und Robson, S.C. (2007). *Nucleotide signaling in adult neurogenesis*. J. Neurochem. 102 (Suppl. 1), S.5.

Grimm, I., Gampe, K. und Zimmermann, H. (2006). *Nucleotide-mediated intracellular signaling cascades in adult neural stem cells*. FENS Abstr., Vol. 3, A015.10

