

Aus der Anatomischen Anstalt  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

(Lehrstuhl III)

Vorstand: Prof. Dr. W. Lange

**Zelluläre und intrazelluläre Lokalisation des  
TrkC-Rezeptors für Neurotrophin-3 im Gehirn der Ratte:  
Immunhistochemische Mapping-Studie -  
Morphologie als Hinweis für eine Funktion  
in verschiedenartigen Neuronen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Barbara Johanna Rieder

aus

Landshut

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. J. Unger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Herms

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2006

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick über die Familie der Neurotrophine

## 1.2 Neurotrophinrezeptoren als transmembranständige Tyrosinkinasen

1.2.1 *Die Gruppe der trk-Neurotrophinrezeptoren und ihre jeweilige Interaktionsmöglichkeit zum Wachstumsfaktor*

1.2.2 *Molekulare Struktur des trkC-Rezeptors*

1.2.3 *Rezeptorbindung, Internalisation und retrograder Transport eines Liganden-Rezeptor-Komplexes*

1.2.4 *Funktionsweise des trkC-Rezeptors über den Signaltransduktionsmechanismus*

## 1.3 Vorkommen von NT-3 im Körper/ZNS im Vergleich mit anderen Wachstumsfaktoren der "NGF-Familie"

## 1.4 Neurotrophine als Einflussfaktoren in die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Neuronen bei Säugern und Mensch

1.4.1 *"Target-derived-synthesis" als Modell der embryonalen Entwicklung neuronaler Netzwerke*

1.4.2 *Neuronale und synaptische Plastizität als Mechanismus für Anpassungsvorgänge im erwachsenen Gehirn*

1.4.3 *Apoptose als programmierter Zelltod*

1.4.4 *Neurobiologische Modelle des Lernens und des Gedächtnisses unter Einbeziehung von Wachstumsfaktoren*

---

1.5 Wirkung von Neurotrophinen auf gliale Zellen

1.6 Problemstellung

## **2 Material und Methoden**

2.1 Material

2.1.1 *Verwendete Tiere*

2.1.2 *Verwendeter Antikörper*

2.1.3 *Verwendete Reagenzien*

2.2 Methoden

2.2.1 *Fixierung des Hirngewebes*

2.2.2 *Herstellung von Gefrierschnitten*

2.2.3 *Immunhistochemisches Verfahren der  
Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode*

2.2.3.1 Immunhistochemisches Vorgehen  
für die lichtmikroskopische Auswertung

2.2.3.2 Immunhistochemisches Vorgehen  
für die elektronenmikroskopische Auswertung

2.2.4 *Überprüfung der Spezifität des Antikörpers*

2.2.5 *Maßnahmen zur Qualitätssicherung*

## **3 Ergebnisse**

3.1 Lichtmikroskopische Verteilung des trkC-Rezeptors

3.1.1 *Vorkommen im Prosencephalon*

3.1.1.1 Telencephalon

3.1.1.2 Diencephalon

---

3.1.2 *Vorkommen im Mesencephalon*

3.1.3 *Vorkommen im Rhombencephalon*

3.1.3.1 Pons und Medulla oblongata

3.1.3.3 Cerebellum

3.2 Elektronenmikroskopische Lokalisation des trkC Rezeptors

## **4 Diskussion**

4.1 Zelluläre Verteilung von trkA und trkB im ZNS von Säugern im Vergleich zu trkC als möglicher Hinweis auf eine Co-Expression

4.2 Vergleich des zentralnervösen trkC-Verteilungsmusters mit den Ergebnissen anderer Autoren und in Bezug auf das Vorkommen von NT-3

4.3 Mögliche Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von trkC

4.4 Mögliche weitere bisher noch nicht nachgewiesene physiologische Funktionen von NT-3 am Nervensystem

4.5 Möglicher therapeutischer Einsatz von NT-3 in der Klinik

## **5 Zusammenfassung**

## **6 Literaturverzeichnis**

## **7 Anhang**

7.1 Verwendete Abkürzungen

7.2 Verwendete Skizzenvorlagen

## **8 Danksagung**

## **9 Curriculum Vitae**

---

### 1 Einleitung

#### 1.1 Überblick über die Familie der Neurotrophine

Neben klassischen neurochemischen Botenstoffen wie Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin, bzw. Aminosäuretransmitter wie beispielsweise GABA und Aspartat, unbekannteren Transmitterstoffen wie Stickstoffmonoxid (NO) und den Neuropeptiden und Hormonen am Beispiel des Hypothalamus-/Hypophysen Regelkreises, sind seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts Wachstumsfaktoren als neurotrope Faktoren bekannt.

Bei dem am längsten bekannten und damit mittlerweile am besten charakterisierten Vertreter dieser sogenannten Wachstumsfaktoren handelt es sich um den nerve growth factor (NGF). Seither wurden eine ganze Reihe dieser Faktoren isoliert. Neben dem schon erwähnten nerve growth factor, der hauptsächlich von peripheren Zelltypen wie Haut, Muskelgewebe und Schwann'schen Glia-Zellen im Zielgebiet von sensorischen oder vegetativen Innervationen gebildet wird (LEVI-MONTALCINI, 1987), gehören zu dieser Familie noch der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (BARDE et al., 1982; Leibrock et al., 1989), Neurotrophin-3 (NT-3) (ERNFORS et al., 1990a; HOHN et al., 1990; JONES und REICHHART, 1990; KAISHO et al., 1990; MAISONPIERRE et al., 1990b; ROSENTHAL et al., 1990) und Neurotrophin-4/5

(NT-4/5) (BERKEMEIER et al., 1991; HALBÖÖK et al., 1991; IP et al., 1992). Dabei wurde zunächst NT-4 aus dem *Xenopus*, einer Froschgattung, isoliert und erst danach NT-5 als das den Säugern entsprechende Homolog identifiziert (BRADSHAW et al., 1993). NT-4/5 kommt fast ausschließlich in unreifen Eizellen im Ovar vor und seine Rolle ist weitgehend unbekannt (NICHOLLS et al., 2002). Schließlich wurde 1994 noch Neurotrophin-6 (NT-6) als neues Mitglied der "NGF-Familie" in einem Teleost Fisch *Xiphophorus* beschrieben (GÖTZ et al., 1994). Es handelt sich dabei um ein Heparin-bindendes Glycoprotein (LI et al. 1997). Dieses Mitglied unterscheidet sich von den übrigen bekannten Neurotrophinen dadurch, dass es nicht als frei lösliches Protein in der produzierenden Zelle vorkommt. Heparin bewirkt eine Freisetzung von der Zelloberfläche und von extrazellulären Matrixmolekülen. GARTNER et al. konnten 2000 zeigen, dass NT-6 hauptsächlich in membranbegrenzten Zellkompartimenten lokalisiert ist, die teilweise an Mikrotubuli assoziiert sind, ähnlich dem Endoplasmatischen Reticulum. Als bisher letztes Mitglied dieser "NGF-Familie" wurde 1998 Neurotrophin-7 (NT-7) beschrieben. Es wurde von NILSSON et al. 1998 aus dem Zebrafisch *Danio rerio* isoliert und von LAI et al. 1998 aus dem Karpfen *Cyprinus carpio*. Die Aminosäuresquenz dieses Neurotrophins hat im Vergleich zu den anderen Neurotrophinen der "NGF-Familie" die größte Ähnlichkeit zu NT-6, was darauf hinweist, dass sich die zuletzt beschriebene Erweiterung der bisher bestehenden "NGF-Familie" um die Mitglieder NT-6 und NT-7 aus der Evolution des Teleost Fisches ergeben hat (NILSSON et al., 1998; DETHLEFFSEN, 2003). In Säugern konnte NT-6 und NT-7 bisher nicht gefunden werden, so

dass bei Säugern, einschließlich dem Menschen, bisher vier Neurotrophine als Mitglieder der "NGF-Familie" bekannt sind, die aus genetisch, d. h. strukturell eng verwandten Molekülen mit 13 bis 14 kDa Molekulargewicht bestehen (THOENEN, 1991). Diese werden zunächst als Präpropeptide synthetisiert und anschließend N-terminal zu Proteinen mit drei Disulfid-Brücken bearbeitet. Jedes Protein Monomer enthält eine verlängerte zentrale Achse bestehend aus einer antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einer hydrophoben Oberfläche, die an der Dimer-Bildung beteiligt ist (BRADSHAW et al, 1993; MOWLA et al., 2001).

Neben der "NGF-Familie" der Neurotrophine sind noch weitere Wachstumsfaktoren bekannt, wie Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Insulin-like growth faktor (IGF-1, IGF-2), Fibroblast growth factor (FGF-1, FGF-2), Platelet-derived growth factor (PDGF), Transforming growth factor (TGF-a, TGF-b) und Glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF). Die Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die an Membranrezeptoren binden. Ihre Wirkungsweise erfolgt über autokrine, parakrine oder endokrine Mechanismen (WEIMANN und KIES, 1991)

### 1.2 Neurotrophinrezeptoren als transmembranständige Tyrosinkinasen

#### 1.2.1 *Die Gruppe der trk-Neurotrophinrezeptoren und ihre jeweilige Interaktionsmöglichkeit zum Wachstumsfaktor*

Die oben erwähnte "NGF-Familie" der Neurotrophine bestehend aus NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7 binden alle an einen gemeinsamen nieder-affinen Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) ohne Tyrosin-Kinase-Domäne (JOHNSON et al., 1986; RADEKE et al. 1987, NILSSON et al. 1998). Es handelt sich bei diesem Rezeptor um ein Mitglied aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren. Die Rolle dieses Transmembranglycoproteins bezüglich der Signaltransduktion ist noch weitgehend unklar (BOTHWELL, 1991; CHAO, 1992). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass dieser Rezeptor durch Co-Expression mit der zweiten Gruppe der Neurotrophinrezeptoren eine wichtige Rolle spielt (BIBEL et al. 1999; DECHANT und BARDE, 2002). Daneben ist eine interessante Entdeckung, dass die eingangs erwähnten Neurotrophinorstufen selektiver an diesen Rezeptor binden und bei manchen physiologischen Wirkungen mehr Effekte erzielen als die Neurotrophine selbst (LEE et al., 2001b und BEATTI et al., 2002).

Die zweite Gruppe der Neurotrophinrezeptoren ist von dem oben beschriebenen Rezeptor p75<sup>NTR</sup> strukturell völlig unterschiedlich. Ihre Mitglieder werden alle von einer Gen-Familie mit Tyrosinkinaseaktivität (trk) codiert. Sie

wurden zunächst 1986 von Martin-Zanca als Onkoproteine und damit als Genprodukte der *trk*-Onkogene in menschlichen Colon-Carcinom-Zellen beschrieben (MARTIN-ZANCA et al., 1986 und 1989). Erst ab den 90er Jahren wurde die physiologische Rolle dieser Tyrosinkinaserzeptoren als Signalrezeptoren erkannt (KAPLAN et al. 1991a; KLEIN et al. 1991a und HEMPSTEAD et al. 1991). Zu der Gruppe der Neurotrophinrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität gehören *trkA* (MARTIN-ZANCA et al., 1989; MEAKIN et al., 1992a und b; BARKER et al., 1993 und HORIZOME et al., 1993), *trkB* (KLEIN et al. 1989; MIDDLEMAS et al., 1991; SOPPET et al., 1991) und *trkC* (LAMBALLE et al., 1991 und 1993; TSOULFAS et al., 1993; VALENZUELA et al. 1993). Dabei bindet NGF *in vitro* hochspezifisch an *trkA* (ROSS, 1991; RAFFIONI et al. 1993), NT-3 an *trkC* (LAMBALLE et al., 1991 und BARBACID, 1994 und 1995) und deutlich weniger effizient auch an *trkA* und *trkB* (KAPLAN et al. 1991a; LAMBALLE et al. 1991) während *trkB* mit BDNF (KLEIN et al., 1991b; SOPPET et al., 1991; SQUINTO et al. 1991 und BOTHWELL 1995), NT-4/5 (BERKEMEIER et al., 1991; KLEIN et al., 1992; IP et al., 1992) und in geringerem Maße auch mit NT-3 interagiert (KLEIN et al., 1989; SOPPET et al., 1991). Bei den beiden zuletzt beschriebenen Mitgliedern der "NGF-Familie", NT-6 und NT-7, die eine Art "Unterfamilie" darstellen, kann NT-7 nur *trkA* aktivieren, nicht jedoch *trkB* oder *trkC* (NILSSON et al., 1998; LAI et al., 1998 und CATANIA et al. 2003). Die Bindung von NT-7 an *trkA* ist jedoch deutlich weniger effizient als eine Interaktion zwischen NGF und *trkA* (NILSSON et al., 1998). Diese beiden Neurotrophine scheinen daher nur eine sehr geringe Rolle in Bezug auf eine *trk*-Rezeptor-Aktivierung zu spielen und wurden zudem bisher

## 1 EINLEITUNG

---

nicht in Säugern nachgewiesen, wie oben beschrieben. Abbildung 1 zeigt die spezifischen Interaktionen zwischen den Neurotrophinen und den jeweiligen Rezeptoren der trk-Familie.

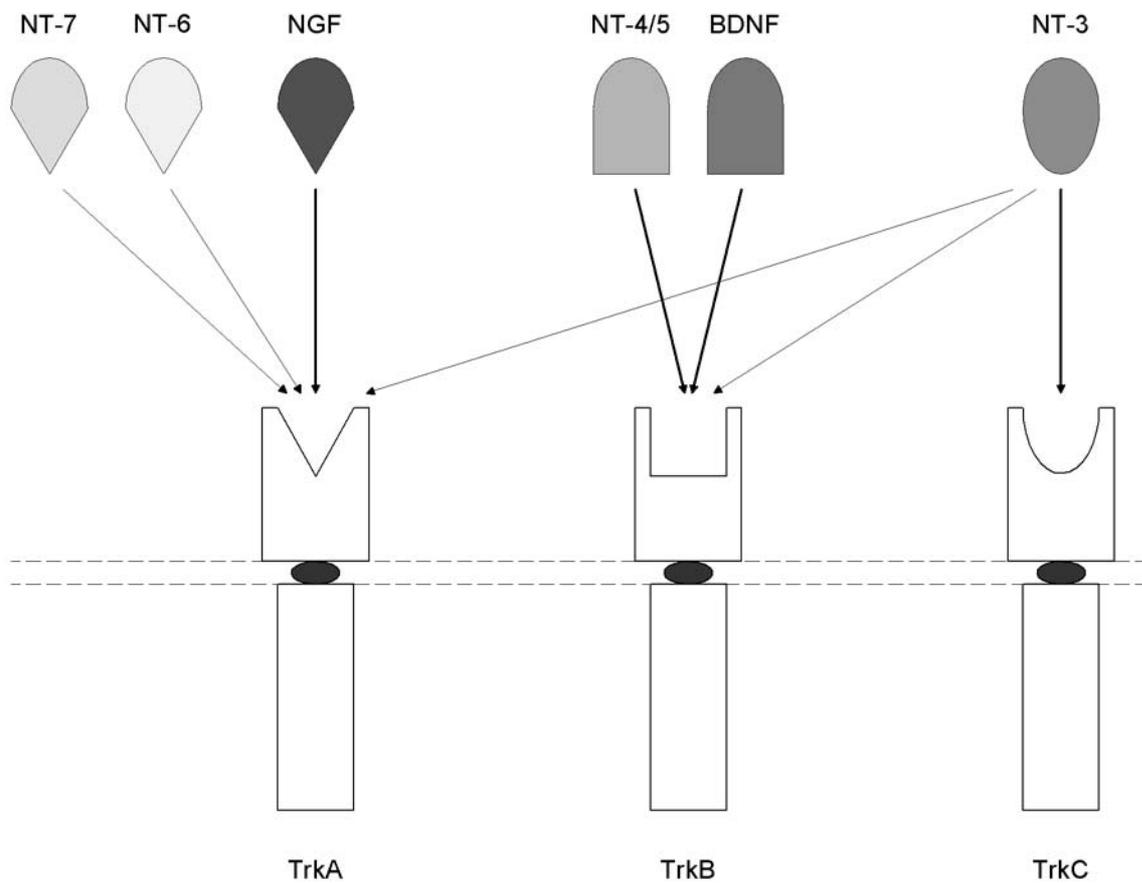


Abbildung 1: Ligand/Rezeptor Interaktion zwischen den Neurotrophinen der "NGF-Familie" und den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die dicken Pfeile symbolisieren die möglichen in vivo nachweisbaren Hauptinteraktionen zwischen Ligand und Rezeptor. Die dünnen Pfeile signalisieren Nebeninteraktionen, die z. T. nur in vitro oder mit hohen Konzentrationen möglich sind.

Wie eingangs schon erwähnt hat die Co-Expression von  $p75^{NTR}$  mit den *trk*-Rezeptoren einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit zu den Neurotrophinen als Liganden. So wird durch die Co-Expression von  $p75^{NTR}$  die Konformation von *trkA* so verändert, dass dieser für sich alleine ebenso nieder affine Rezeptor für NGF hoch affine Bindungsstellen hervorbringt. Dies bedeutet eine Verstärkung des NGF-Signales, wobei der genaue Mechanismus dazu noch unklar ist (ESPOSITO et al. 2001). VESA et al. konnte 2000 für *trkB* und BDNF bzw. NT-4/5 genau den umgekehrten Effekt mit  $p75^{NTR}$  nachweisen, auf *trkC* und NT-3 hatte dabei das Vorhandensein von  $p75^{NTR}$  keinen Einfluss.

Neurotrophinrezeptoren können schließlich auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Es gelang LEE und CHAO 2001a *trkA*-Rezeptoren von PC12-Zellen und *trkB*-Rezeptoren aus Hippocampus-Zellen durch Adenosin, einem G-Protein abhängigen Neuromodulator, zu aktivieren.

### *1.2.2 Molekulare Struktur des *trkC*-Rezeptors*

Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei den *trk*-Rezeptoren um klassische integrale Membranproteine mit Tyrosinkinaseaktivität. Alle diese Rezeptoren besitzen ein N-terminales Signal-Peptid (SP), gefolgt von der extrazellulären Domäne, welche die Möglichkeit der Interaktion mit dem jeweiligen Neurotrophin bietet. In diesem Abschnitt existieren zwei

unterschiedliche immunglobulinartige Domänen des C2-Typs (IgI und IgII) (SCHNEIDER et SCHWEIGER, 1991). Zwischen dem Abschnitt mit den immunglobulinartigen Domänen und dem Signalpeptid existiert eine Aminosäuresequenz aus drei hintereinander liegenden Abschnitten bestehend aus einer Leucin reichen Sequenz (LRM), wiederum beiderseits flankiert von unterschiedlichen Verbänden von Cystein-Clustern (CCI und CCII). Die in der C-terminalen Richtung anschließende einfache Transmembrandomäne (TM) besteht hauptsächlich aus einer hydrophoben Aminosäuresequenz. Am C-terminalen Ende schließlich folgt dann noch eine intrazelluläre Domäne mit der eigentlichen Protein-Kinase-Aktivität in Form einer Tyrosin-Kinase (TK) (BARBACID, 1994). COULIER konnte 1990 zeigen, dass entweder die Deletion eines extrazellulären Abschnittes bestehend aus 51 Aminosäuren einschließlich dem C-terminalen IgII oder der Austausch einer Aminosäure Cystein gegen ein Serin in diesem Abschnitt zu einer Aktivierung des trk-Rezeptors führt.

Dieser Grundaufbau ist allen bekannten trk-Molekülen gemeinsam. Speziell beim trkC-Rezeptor codiert der Gen-Lokus jedoch für zwei Klassen des Zelloberflächenrezeptors, einmal mit und einmal ohne Tyrosinkinaseaktivität. In der Klasse mit Tyrosinkinaseaktivität sind 4 Isoformen des trkC-Rezeptors bekannt (LAMBALLE et al., 1991 und 1993; TSOULFAS et al., 1993; VALENZUELA et al. 1993). Diese unterscheiden sich jeweils im C-terminalen Tyrosinkinase-Abschnitt vom zuerst identifizierten trkC-K1-Rezeptor. TrkC-K14 weist nach der Aminosäure in Position 711 14 zusätzliche Aminosäuren auf, 25 zusätzliche trkC-K25 und trkC-K39 eine zusätzliche Sequenz, bestehend aus

39 Aminosäuren. Dabei sind die zusätzlich vorhandenen 14 und 25 Aminosäuren des trkC-K14 und trkC-K25 unabhängig von anderen bekannten Sequenzen und scheinen auch keine strukturell informative Rolle zu spielen. Die 39 Aminosäuren lange zusätzliche Sequenz des trkC-K39 stellt eine Kombination der beiden anderen zusätzlichen Sequenzen des trkC-K14 und trkC-K25 dar, mit der gleichen funktionellen Bedeutung. Interessant ist jedoch, dass wohl nur trkC-K1 die Phospholipase-C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren kann, obwohl auch durch aktivierte trkC-K14 und -K25 Rezeptoren katalytische Effekte produziert oder inaktive Zellen zur DNA-Synthese aktiviert werden können (LAMBALLE et al. 1993; TSOULFAS et al. 1996). Die verschiedenen Subtypen des trkC-Rezeptors entstehen durch unterschiedliches Exon-Splicing. NT-3 bindet an alle diese katalytisch aktiven Rezeptoren mit der gleichen Affinität und Kinetik (LAMBALLE, 1993; TSOULFAS et al. 1993; VALENZUELA et al., 1993).

Die zweite Klasse der trkC-Rezeptoren hat den gleichen extrazellulären und transmembranösen Aufbau, unterscheidet sich aber in der intrazellulären Tyrosinkinase Domäne durch Fehlen der Kinase-Domäne (trkC<sup>TK-</sup>). Dabei sind die ersten 74 zytoplasmatischen Residuen noch identisch zum katalytisch aktiven Rezeptor. Ab der Sequenz 529 beginnen sich diese trkC<sup>TK-</sup>-Rezeptoren in Abhängigkeit von vier verschiedenen gesplittenen Exons von den Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität zu unterscheiden. Auch bei den trkC<sup>TK-</sup>-Rezeptoren wurden auf der Basis der unterschiedlichen Anzahl der zytoplasmatischen Residuen verschiedene Rezeptoren beschrieben, trkC<sup>TK-</sup> 158, trkC<sup>TK-</sup> 143,

## 1 EINLEITUNG

---

trkC<sup>TK-</sup> 113 und trkC<sup>TK-</sup> 108 (TSOULFAS et al., 1993; VALENZUELA et al. 1993). Ob diese nicht-katalytischen Rezeptoren in vivo exprimiert werden, ist nach wie vor nicht bekannt. Abbildung 2 zeigt schematisch den Grundaufbau eines trkC-Rezeptors mit und ohne Tyrosinkinaseaktivität.

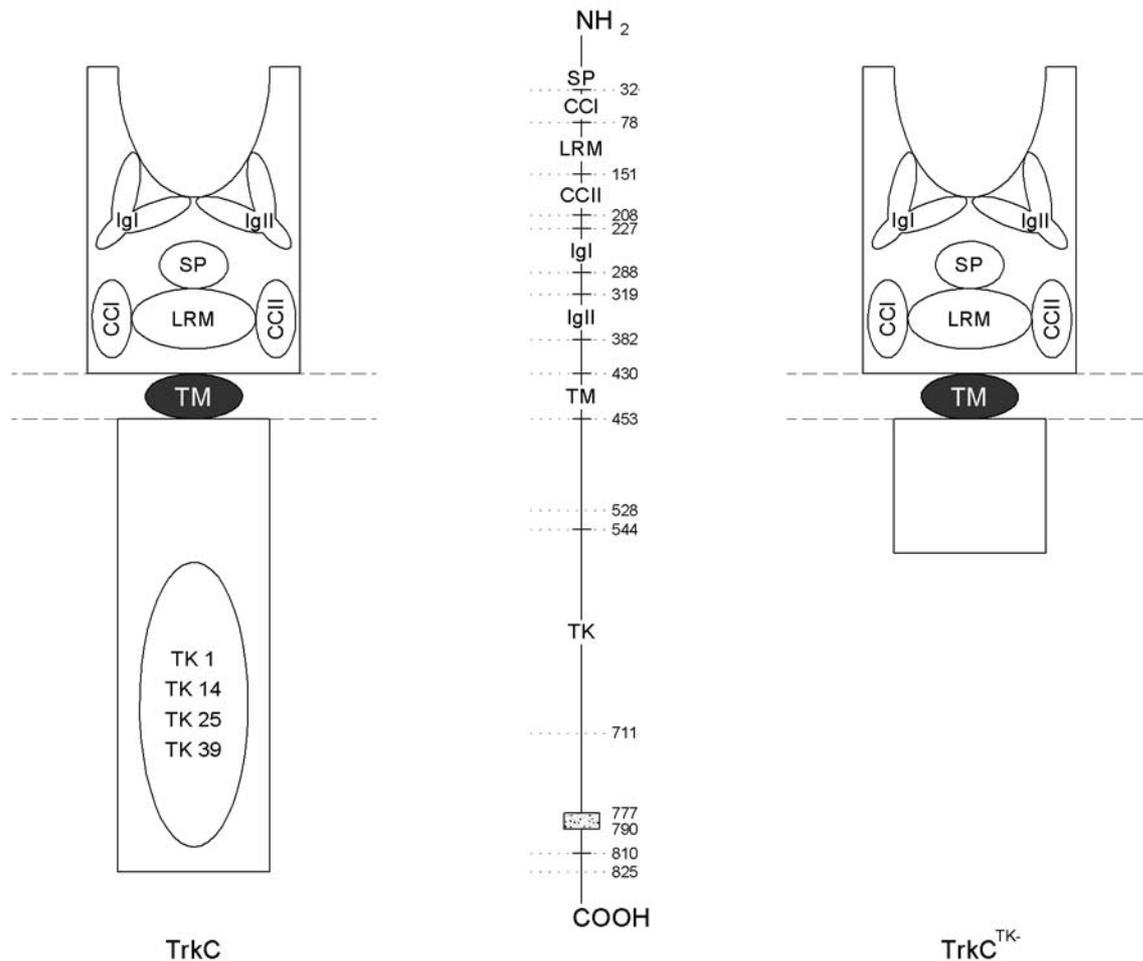


Abbildung 2: Schematischer Grundaufbau eines trkC-Rezeptors mit und ohne Tyrosinkinaseaktivität (TK). Weitere verwendete Abkürzungen und Erklärungen siehe Text. Daneben ist schematisch der innerhalb des Tyrosinkinaseabschnittes liegende Proteinabschnitt 777 bis 790 markiert, an den der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper c-trk (Ab-1) bindet (sh. 2.1.2)

### *1.2.3 Rezeptorbindung, Internalisation und retrograder Transport eines Liganden-Rezeptor-Komplexes*

Trk-Rezeptoren werden durch einen zweischrittigen Prozess aktiviert. Der erste Schritt besteht aus einer liganden-vermittelten Dimerisation des Rezeptormoleküles an der Zelloberfläche und der zweite Schritt in einer Autophosphorylierung der Tyrosinkinase-Residuen (KAPLAN et al., 1991b, JING et al., 1992; CHAO, 2003). Diese Tyrosin-Autophosphorylierung ist Voraussetzung für die katalytischen wie für die Signalaktivitäten der Trk-Rezeptoren. Dabei konnte schon früh für NT-3 die hauptsächliche Determinante für die Interaktion mit TrkC und die zur Bindung notwendige Konfiguration nachgewiesen werden (URFER et al., 1994). Effekte durch aktivierte Trk-Rezeptoren sind nicht nur topisch im Bereich der Synapsen, sondern zeigen auch weitreichende Wirkungen durch einen retrograden Transport des Liganden-Rezeptor-Komplexes vom axonalen Ende zum Zellkörper bzw. Zellkern (DiSTEFANO et al., 1992). Neuere Untersuchungen von 2001 zeigen, dass für diesen Transport eine direkte Zusammenarbeit mit Zytoskelettanteilen notwendig ist (YANO et al., 2001).

### 1.2.4 Funktionsweise des *trkC*-Rezeptors über den Signaltransduktionsmechanismus

Nach der Aktivierung eines *trk*-Rezeptors werden die daraus resultierenden Informationen über Signaltransduktionsmechanismen an das Zellinnere weitergeleitet. Dabei bewirkt zunächst die eingangs beschriebene Bindung von Neurotrophinen an die hoch-affinen Rezeptoren eine Autophosphorylierung dieser Rezeptoren an spezifischen Tyrosin-Residuen über die Aktivierung der Tyrosinkinase (CORDON-CARDO et al., 1991; KAPLAN et al., 1991a). Diese aktivierten Tyrosin-Residuen initiieren die Bindung und Phosphorylierung von Adapter-Molekülen (second-messenger) (KAPLAN und MILLER, 2000; CHAO, 2003). Die in diesem Zusammenhang am längsten bekannten beiden second messenger sind Shc, ein Src-homologes und SH2-haltiges Adapter-Molekül (PELICCI et al., 1992; OBERMEIER et al., 1993; SUEN et al., 1993 und STEPHENS et al., 1994) und Phospholipase-C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (OHMACHI et al., 1991; VETTER et al., 1991; WIDMER et al., 1993; KAPLAN und STEPHENS, 1994; SEGAL und GREENBERG, 1996). Die Tyrosin-Phosphorylierung der Adapter-Moleküle dient der Interaktion mit anderen Signalproteinen durch räumliche Zusammenführung innerhalb der Zellmembran. (SCHLESSINGER et ULLRICH, 1992; EGAN et WEINBERG, 1993). Im speziellen triggert die Phosphorylierung von Shc die Shc/Grb2/Sos-Interaktion, die Ras- und ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Aktivierung und schließlich eine Serie von Phosphorylierungen z. B. Raf, MEK und die mitogen-assoziierte

Proteinkinase (MAPK) (SCHANEN-KING et al., 1991; LOEB et al., 1992; SEGAL et GREENBERG, 1996). Die dabei erwähnte Ras-Aktivierung beispielsweise geschieht über ein Ras-GTPase aktivierendes Protein (GAP) (OBERMEIER et al., 1993). Die Signaltransduktionskaskade über Shc bewirkt einen Anstieg der Transkriptionseffekte (CHAO, 2003). Die zweite schon länger bekannte Signaltransduktionskaskade erfolgt über PLC- $\gamma$ . Dabei hydrolysiert die aktivierte PLC- $\gamma$  das membranständige Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>), das als hydrophiles Molekül von der Zellmembran abdiffundiert und an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert (SOLTHOFF et al., 1992; OHMICHI et al., 1992; OBERMEIER et al., 1993). Dies führt schließlich zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern und damit zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Wahrscheinlich geschieht dies über eine Serin- und Threonin-Kinase (BURGERING et COFFER, 1995). Durch PLC- $\gamma$  entsteht neben dem Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat durch Lipolyse aus Phospholipiden der Zellmembran Diacylglycerol (DAG). Dies verbleibt als hydrophobes Molekül in der Membran und aktiviert dort die Proteinkinase C (PKC).

Aus Abbildung 3 geht schematisch die beschriebene Transduktion extrazellulärer Signale von Neurotrophinen über die beiden im Zusammenhang mit Neurotrophinen am längsten bekannten Adaptermoleküle Shc und PLC- $\gamma$

## 1 EINLEITUNG

---

hervor, und die daraus folgenden Phosphorylierungskaskaden von zellulären Substratproteinen.

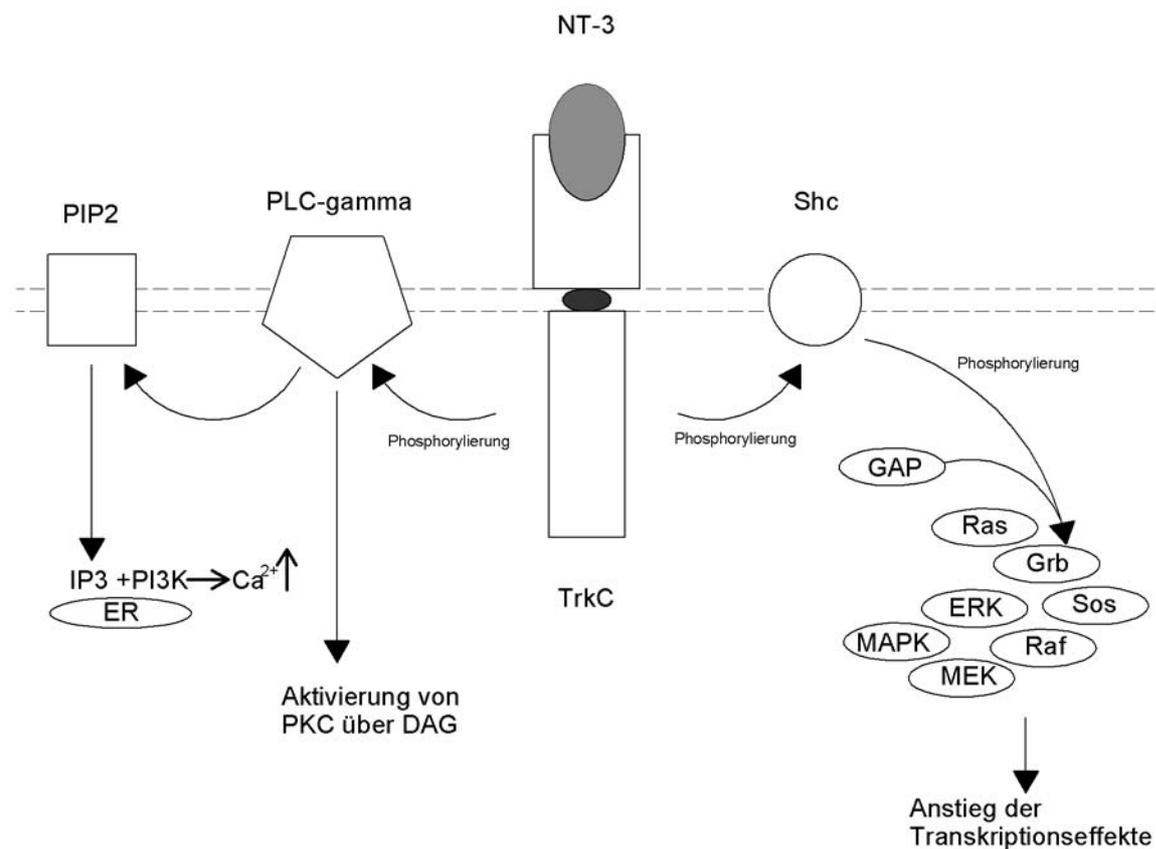


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transduktion extrazellulärer Signale durch Phosphorylierungskaskaden und den second-messenger Mechanismus nach einer Rezeptor-Liganden-Bindung eines Neurotrophins.

Ganz neue Untersuchungen ergaben, dass ein weiteres second-messenger Molekül mit der Bezeichnung SLAM-associated protein (SAP), ein Protein, das die homologe Src2-Domäne enthält, in vitro und vivo mit trkA, trkB und trkC

nach seiner Phosphorylierung interagiert. SAP reguliert gleichzeitig die Sekretion von Interferon-Gamma und unterdrückt bei Überexpression die NGF-abhängige Phosphorylierung des trkB-Rezeptors selbst und eine Bindung des phosphorylierten Rezeptors an weitere second-messenger im Sinne einer negativen Rückkoppelung (LO et al., 2005). Daneben wurde kürzlich noch eine weitere Tyrosinkinase beschrieben (ARMS/Kidis 220), die sich in ihrer Phosphorylierungskaskade von allen anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen unterscheidet und damit die Neurotrophinaktivität von der Aktivität anderer Wachstumsfaktoren differenziert (AREVALO et al. 2006). Dies alles zeigt die Komplexität auf und die dadurch unterschiedlichst möglichen und zum Teil konträren Wirkungen, die durch eine Liganden-Rezeptor-Interaktion zwischen trk-Rezeptoren und Neurotrophinen entstehen, und die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgedeckt sind.

### 1.3 Vorkommen von NT-3 im Körper/ZNS im Vergleich mit anderen Wachstumsfaktoren der "NGF-Familie"

Im Gegensatz zu NGF ist BDNF hauptsächlich, aber nicht ausschließlich im ZNS lokalisiert (HOFER et al., 1990; ERNFORS et al., 1990b; MAISONPIERRE et al., 1990a). Insgesamt ist im Gehirn von Säugern mRNA von BDNF selten, obwohl der Spiegel im Durchschnitt 20 bis 30mal höher ist als der von NGF (HOFER et al., 1990). Die Gehirnregion mit den höchsten Spiegeln von NGF- und BDNF-mRNA ist die Region des Hippocampus (CASTREN et al. 1995).

Bei NT-3 wird nun ähnlich dem NGF die Expression von mRNA nicht im ZNS dominiert. Große Mengen davon findet man auch im peripheren Gewebe wie Skelettmuskel, Leber und Darm (ERNFORS et al., 1990a und b; MAISONPIERRE et al., 1990a und b; HOHN et al., 1990; ROSENTHAL et al., 1990; KAISHO et al., 1990). Weder NGF noch BDNF findet man dort in ähnlich großen Mengen (BARDE, 1989; THOENEN et al., 1987). Am Beispiel von jungen adulten Ratten im Alter von einem Monat ist das Vorkommen von NT-3 im peripheren Gewebe sehr weit verbreitet, hauptsächlich in den viszeralen Zielzellen des Ganglion nodosum wie Herz, Lunge und Intestinum. So zeigt sich dort beispielsweise eine NT-3 Konzentration von 892 ng/g Nassgewebe im Pankreas, 133 ng/g in der Milz, 46 ng/g in der Nebenniere, 45 ng/g in der Leber, 40 ng/g in der Niere, 38 ng/g im Herz, 31 ng/g im Thymus und 21 ng/g im Diaphragma (KATOH-SEMBA et al., 1996).

Im ZNS ist NT-3 hauptsächlich im Hippocampus und Cerebellum zu finden (ERNFORS et al. 1990b; MAISONPIERRE et al., 1990a und HOHN et al., 1990). TOJO et al. konnte 1995 zeigen, dass NT-3 im postnatalen Cerebellum hauptsächlich in der Körnerzellschicht des Lobus posterior von Mäusen vorkommt und sich dort die Expression des Neurotrophins im Laufe des weiteren Lebens zurückbildet. Obwohl die Purkinjezellen Zielzellen für NT-3 darstellen und rekombinante Mäuse ohne NT-3 motorische Defizite wie Ataxie aufweisen, lassen sich histologisch bei diesen rekombinanten Mäusen keinerlei Abnormalitäten im Cerebellum nachweisen (TOJO et al., 1995).

Mit Enzym-Immuno-Assays kann NT-3 im Gehirn einer ein Monat alten Ratte nur im Bulbus olfactorius, Cerebellum, Septum und Hippocampus nachgewiesen werden. Mengenmäßig findet man dort eine Konzentration von 6.3 ng/g Nassgewicht im Hippocampus, 0.91 ng/g im Septum, im Cerebellum von 0.71 ng/g und 0.54 ng/g im Bulbus olfactorius (KATOH-SEMBA et al., 1996). ZHOU erbrachte mit seiner Arbeitsgruppe 1994 den immunhistochemischen Nachweis über das Vorkommen von NT-3 im ZNS der Ratte. Dabei konnte er zeigen, dass NT-3 sowohl in Gliazellen als auch in Neuronen zu finden ist. Die neuronale Verteilung von NT-3 differierte in seinen Untersuchungen zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die mRNA<sup>NT-3</sup> nachgewiesen haben; es wurde diskutiert, dass einige Zellen NT-3 für den Bedarfsfall akkumulieren, andere Zellen dagegen den Wachstumsfaktor selbst synthetisieren (ZHOU et al., 1994). Immunhistochemische Untersuchungen lassen auch die Vermutung zu, dass NT-3 in der Adenohypophyse von adulten

## 1 EINLEITUNG

---

Primaten vorkommt und dort möglicherweise ein neues Adenohypophysenhormonsystem darstellt (BORSON et al., 1994).

1.4 Neurotrophine als Einflussfaktoren in die Wachstums- und  
Differenzierungsvorgänge von Neuronen bei Säugern und Mensch

1.4.1 *"Target-derived-synthesis" als Modell der embryonalen Entwicklung  
neuronaler Netzwerke*

Voraussetzung für die Funktionalität von komplexen integrativen Prozessen zwischen Neuronen im Nervensystem ist die Regelmäßigkeit der Verbindungen, die die Nervenzellen untereinander und zu verschiedenen Geweben in der Peripherie bilden. Aus den Untersuchungen zur Entwicklung des Nervensystems von Säugern ergibt sich, dass nur wenige Verbindungen fest vorgegeben sind, was zu einem hohen Flexibilitätsgrad des Nervensystems führt, der für die Bildung, Aufrechterhaltung und Modifizierung synaptischer Verbindungen notwendig ist (NICHOLLS et al., 2002). Ein möglicher Mechanismus der Entstehung des komplexen neuronalen Netzwerkes ist die sogenannte "Neurotrophin-Hypothese". Diese besagt, dass über eine chemische Steuerung ein zielgerichtetes Wachstum von Axonen durch "target-derived-synthesis" und anschließend die Bildung und Stabilisierung von synaptischen Verschaltungen spezifischer Nervenzellpopulationen erfolgt. Dabei wird das selektive Überleben noch weitgehend ungerichtet ins Ziel einsprossender, miteinander konkurrierender Neurone oder Axone neben der

neuronalen Aktivität über das mengenmäßige Vorhandensein eines trophischen Faktors (Chemoattraktor) gesteuert und damit letztlich die Innervationsart und -dichte (OPPENHEIM, 1991; MAJDAN und MILLER, 1999).

Zu den am besten untersuchten Chemoattraktoren zählt NGF (MENESINICHEN et al., 1978). Dabei konnten DAVIES et al. 1990 zeigen, dass die Synthese von NGF erst nach Eintreffen der Axone an der Zielzelle beginnt. Die Axone exprimieren auch keine NGF-Rezeptoren, bevor sie ihr Zielgewebe erreichen. Der Nervenwachstumsfaktor scheint also vielmehr bei der Regulation der Verteilung der Axonausläufer innerhalb des Zielgewebes eine Rolle zu spielen (CAMPENOT, R. B., 1982). MILLER und KAPLAN konnten 2001b und 2002 zeigen, wie ein durch NGF stimulierter trk-Rezeptor neben den lokalen Wachstumseffekten an den Nervenendigungen auch retrograde Effekte an den Zellkörpern der Neuronen selbst macht, beispielsweise in Form von Genexpression. Die beachtlichen Strecken, die die Zellkörper oft von den Nervenendigungen entfernt liegen, überwinden die Neuronen offenbar durch einen retrograden Transport des aktivierten trk-Rezeptors selbst (DiSTEFANO et al., 1992 und YANO et al., 2001).

NT-3 nun wird wie NGF als "target-derived survival factor" oder Chemoattraktor betrachtet (LINDSAY, 1993). Tatsächlich wird NT-3 retrograd transportiert zu Regionen mit Neuronen, die auf NT-3 reagieren (DiSTEFANO et al., 1992). Diese These untermauert auch das Verteilungsmuster von mRNA für NT-3 und seinem Rezeptor (LINDSAY, 1993). Aber auch ein anterograder Transport von

## **1.4 NEUROTROPHINE ALS EINFLUSSFAKTOREN IN DIE WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE VON NEURONEN BEI SÄUGERN UND MENSCH**

---

NT-3, also ein axonal/dendritischer Transport und der direkte Einfluss von NT-3 auf die postsynaptische Zelle durch Aufnahme des Neurotransmitters dort, scheint eine Rolle in der Entwicklung des ZNS zu spielen. BARTHELD et al. konnte dies 1996 bei der Entwicklung des visuellen Kortex zeigen. In der gleichen anatomischen Region konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass NGF, BDNF und NT-4/5 die Entwicklung der okulären Dominanz-Säulen bei Ratten und Nagetieren modulieren (MAFFEI et al., 1992; CABELLI et al., 1995; RIDDLE et al., 1995; GALUSKE et al., 1996). Daneben haben verschiedene Neurotrophine unterschiedliche Effekte auf das Wachstum dendritischer Zellen im visuellen Cortex in Abhängigkeit der Schicht (layer-specific fashion) (McALLISTER et al., 1995, 1996 und 1997). Weitere Arbeitsgruppen konnten direkt nachweisen, dass NT-3 und der für NT-3 wichtigste Rezeptor trkC die Proliferation und das Überleben von neuronalen Vorläufern/Vorstufen und die kollaterale Verzweigung von Axonen in Zielzellen regulieren (FARINAS et al., 1994; SCHNELL et al., 1994, BIRREN et al., 1993; DiCICCO-BLOOM et al., 1993; KALCHEIM et al., 1992; HUANG und REICHARDT, 2001). Neue Untersuchungen beweisen, dass die Projektion der thalamo-kortikalen Axone während der Hirnentwicklung durch BDNF- und NT-3-abhängige Signalprozesse unterschiedlich reguliert wird in Abhängigkeit verschiedener zusätzlich notwendiger membranassoziierter Moleküle (sh. 1.2), die in kortikalen Zellen exprimiert werden (YAMAMOTO und HANAMURA, 2005). Einen indirekten Hinweis auf die Neurotrophinhypothese gibt die unterschiedliche Konzentration von NT-3 in verschiedenen

Entwicklungsabschnitten des ZNS. Dazu wurde von HALLBÖÖK 1993 gezeigt, dass die Konzentration von NT-3 in Hühner-Embryos am höchsten an Tag 4 und 5 ist und danach wieder abfällt (HALLBÖÖK, 1993).

### *1.4.2 Neuronale und synaptische Plastizität als Mechanismus für Anpassungsvorgänge im erwachsenen Gehirn*

Unter neuronaler und synaptischer Plastizität versteht man die Fähigkeit des Nervensystems von Säugern, lebenslang selektive und zielgerichtete Anpassungen gemäß den Erfordernissen durchzuführen, die mit Veränderungen der Morphologie, der Verschaltung und von molekularen Mechanismen einhergehen (SPITZER, 2000; MONTGOMERY, 2004). Dies tritt unter physiologischen Bedingungen unmittelbar vor und nach der Geburt mit zielgerichtetem axonalem Wachstum und Stabilisierung synaptischer Verschaltungen auf (sh. 1.4.1).

Bei Veränderungen im Zielgewebe (target) bzw. bei modifiziertem Input im erwachsenen Nervengewebe beobachtet man die Aussprossung (Sprouting) von Axonen und Dendriten, welches als Mechanismus im Rahmen der neuronalen und synaptischen Plastizität gilt. Unter natürlichen Stimuli kommt es physiologischerweise im adulten, differenzierten zentralen Nervensystem zum "Synapsen-turnover" und auf molekularer Ebene zu funktionellen

## 1.4 NEUROTROPHINE ALS EINFLUSSFAKTOREN IN DIE WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE VON NEURONEN BEI SÄUGERN UND MENSCH

---

Veränderungen zum Beispiel im Zytoskelett oder auf Ebene der Rezeptorexpression. Aber auch unter pathologischen Gegebenheiten spielen neuronale und synaptische Plastizität eine Rolle, beispielsweise durch Wachstum von neuronalen Fortsätzen und Anpassung der Synapsenexpression nach Läsion. Umgekehrt findet man eine verminderte Adaptationsfähigkeit bei neurodegenerativen Veränderungen (z. B. Verlust des Dendritenwachstums bei Alzheimer Krankheit) (ANDERTON et al., 1998; NICHOLLS et al., 2002).

Ähnlich der Entstehung neuronaler Netzwerke im embryonalen Gehirn spielen Neurotrophine eine entscheidende Rolle bei den aktivitätsabhängigen Modulationen im Rahmen der neuronalen Plastizität im adulten Gehirn (LO, 1995; THOENEN, 1995; BONHOEFFER, 1996; CELLERINO und MAFFEI, 1996; LU und FIGUROV, 1997; McALLISTER et al., 1999 und POO, 2001). Dabei nehmen die Neurotrophine bei den modulatorischen Aktivitäten sowohl prä- als auch postsynaptisch Einfluss. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass der präsynaptische Einfluss der Wachstumsfaktoren in der Steigerung der aktivitätsvermittelten Freisetzung von Neurotransmittern besteht (LOHOF et al., 1993; KNIPPER et al., 1994; LESSMANN et al., 1994; STOOP et POO, 1995 und 1996; BLÖCHL und SIRRENBURG, 1996; WANG et POO, 1997; XIE et al., 1997; GOTTSCHALK et al., 1998; LI, Y. X. et al, 1998). Postsynaptisch inhibiert BDNF die Wirkung über  $\gamma$ -Amino-Buttersäure-Rezeptoren ( $GABA_A$ ) (TANAKA et al., 1997). Daneben konnte von KAFITZ et al. (1999) gezeigt werden, dass Neurotrophine tetrodotoxin-resistente Natrium-Kanäle für Millisekunden

aktivieren. Dies bewirkt die Initiierung wiederholter Aktionspotentiale. MAMOUNAS et al. wiesen 2000 nach, dass durch BDNF das regenerative Aussprossen, aber nicht das Überleben von verletzten serotonergen Axonen im erwachsenen Gehirn der Ratte gefördert wird (MAMOUNAS et al., 2000).

Umgekehrt wird die Synthese von Wachstumsfaktoren durch die neuronale Aktivität reguliert (LINDHOLM et al., 1994; SHIEH et al., 1998; TAO et al., 1998). So steuert eine neuronale Aktivität gemeinsam mit den exzitatorischen Neurotransmittern Glutamat (Glu) und Acetylcholin (ACh) die Sekretion von Neurotrophinen aus Neuronen des Hippocampus (BLÖCHL und THOENEN, 1995 und 1996; CANOSSA et al., 1997; GRIESBECK et al. 1999). Glutamat benutzt dazu als Rezeptoren die Subtypen Ionotropic- $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolpropionic-Säure (AMPA) und metabotropic-glutamat-group I (mGluRI), nicht aber den Subtyp NMDA (BLÖCHL und THOENEN, 1995 und 1996).

Zusätzlich regulieren Neurotrophine auch ihre eigene Sekretion (CANOSSA et al., 1997; KRÜTTGEN et al. 1998). Diese Autoregulation kann über alle trk-Rezeptoren geschehen; in Neuronen des Hippocampus über trkB und trkC (Canossa et al., 1997) und in Phäochromozytomzellen PC12 der Ratte über TrkA (KRÜTTGEN et al., 1998). Über die genaue Signaltransduktionskaskade, welche zu einer NT-Sekretion führt, ist bisher wenig bekannt, jedoch scheint die Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  aus endogenen Speichern die gemeinsame Endstrecke zu sein, die schließlich zu einer regulierten NT-Sekretion führt (BLÖCHL und

## 1.4 NEUROTROPHINE ALS EINFLUSSFAKTOREN IN DIE WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE VON NEURONEN BEI SÄUGERN UND MENSCH

---

THOENEN, 1995 und 1996; GRIESBECK et al., 1999). MARCO CANOSSA konnte 2000 mit seiner Arbeitsgruppe zeigen, dass aktivierte trk- und mGluRI-Rezeptoren eine Aktivierung der Phospholipase-C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) zur Folge haben, was wiederum über Inositol-1,4,5-trisphosphat zur Mobilisierung intrazellulärer Calciumspeicher führt (CANOSSA et. al., 2000).

### 1.4.3 Apoptose als programmierter Zelltod

Ein auffälliges Merkmal der Entwicklung des Nervensystems besteht darin, dass viele Neuronen wieder absterben ohne jemals in ein neuronales Netzwerk eingebunden gewesen zu sein oder eine andere Funktion ausgeführt zu haben. Während der Periode der Synapsenbildung weisen alle Vertebraten-Nervensysteme eine Überproduktion von Neuronen mit konsekutivem Zelltod auf. Einige Neuronen, die absterben, haben unter Umständen gar keine Synapsen gebildet oder ein ungeeignetes Ziel innerviert. In solchen Fällen trägt der Zelltod zur Spezifität der Innervierung bei. Die meisten Zellen, die absterben, scheinen jedoch ihre korrekten Ziele erreicht und innerviert zu haben. Der Zelltod ist also primär ein Mechanismus, durch den die Größe des neuronalen Eingangs auf die Größe seines peripheren Ziels abgestimmt wird (NICHOLLS et al. 2002). Dabei besitzt jede neuronale Zellpopulation eine kritische Phase während der Entwicklung, in der ihr Überleben von der

Bereitstellung von Neurotrophinen abhängt. VAILLANT et al. konnten 1999 zeigen, dass das Überleben neuronaler Zellen synergistisch durch Zellaktivität in Form von intermittierender Depolarisation, und Bindung von Neurotrophinen reguliert wird. Beide Pfade münden in den oben bereits erwähnten Signaltransduktionsmechanismus von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). So unterstützt NT-3 das Überleben der viscerosensorischen Neuronen des Ganglion nodosum (HOHN et al., 1990; MAISONPIERRE et al., 1990b) sowie einer sensorischen Zellpopulation im Hinterhorn des Rückenmarkes (HORY-LEE et al., 1993) und in vitro das der Purkinjezellen im Kleinhirn (MOUNT et al., 1994). In vitro trägt NT-3 sogar zur Proliferation von Neuronen bei (KALCHHEIM et al., 1991). Im Gegensatz dazu konnten mehrere Arbeitsgruppen (ALOYZ et al., 1998 und BAMJI et al., 1998) zeigen, dass andere Mitglieder der "NGF-Familie" durch Bindung an den unspezifischen p75 Rezeptor an sympathischen Neuronen Apoptose signalisieren. LEE und Mitarbeiter deckten vor kurzem auf, dass die Neurotrophin-Vorläuferproteine und deren proteolytisch entstandene Produkte unterschiedliche pro- und antiapoptotische Zellantworten aktivieren. Dies zeigt nebenbei die Komplexität der Regulationsvorgänge auf, die durch Neurotrophine aktiviert werden (LEE et al. 2001b). MILLER und KAPLAN haben diese Zusammenhänge 2001a in einem Übersichtsartikel nochmals zusammengestellt.

*1.4.4 Neurobiologische Modelle des Lernens und des Gedächtnisses  
unter Einbeziehung von Wachstumsfaktoren*

Über das neuroanatomische, beziehungsweise biochemische Korrelat für Lernen und Gedächtnis ist bisher noch wenig bekannt. In der Lerntheorie unterscheidet man zwischen explizitem, das heißt ständig der bewussten Erinnerung zugänglich, und implizitem Gedächtnis, das heißt unbewusstes Erlernen von motorischen und wahrnehmungsbezogenen Fähigkeiten.

Implizite Gedächtnisinhalte scheinen durch Speichermechanismen innerhalb der sensomotorischen Systeme abgelegt zu werden und sind damit an verschiedenen Stellen im Nervensystem lokalisiert. Eine wichtige neuroanatomische Struktur dafür ist das Kleinhirn, das über die beiden Hauptprojektionsbahnen, den Moos- und Kletterfasern, seine Informationen erhält. Daneben ist auch der Mandelkernkomplex (Amygdala) für bestimmte implizite Gedächtnisinhalte wichtig. Dieser stellt ein anatomisches Bindeglied zwischen kognitivem implizitem Lernen und emotionalem Verhalten dar. Die Amygdala erhält zahlreiche sensorische Informationen aus dem Thalamus und den primären sensorischen Kortexfeldern. Dieser Informationsfluss scheint wichtig für das Erlernen verschiedener emotionaler Zustände wie Angst und Furcht, aber auch Appetit. Informationen des Mandelkernkomplexes werden dann zur bewussten Wahrnehmung und Bewertung dieser Emotionen an den limbischen Cortex (orbitofrontaler Cortex und Gyrus cinguli) weitergeleitet.

Gleichzeitig findet ein Zusammenspiel der Amygdala mit subcorticalen Strukturen wie Hypothalamus, Hirnstamm und dem autonomen Nervensystem statt, welches für unbewusste Reaktionen wie Hormonhaushalt oder Blutdruckregulation zuständig ist (FRICK et al, 1992; KLINKE und SILBERNAGL, 1994; SPITZER, 2000). Beispiele für die einfachen Formen des impliziten Lernens stellen Habituation, Sensitivierung und klassische Konditionierung dar. Dies geschieht auf zellulärer Ebene über Veränderung von Genexpression und der Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen. Direkte Zusammenhänge zwischen implizitem Gedächtnis und Wachstumsfaktoren konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Explizites Lernen und Gedächtnis werden mit der Hippocampusformation in Verbindung gebracht (KLINKE und SILBERNAGL, 1994). Diese ist im medialen Temporallappen lokalisiert und besteht aus zwei langen ineinandergreifenden C-förmigen Cortexstreifen, dem Hippocampus und dem Gyrus dentatus, neben dem benachbarten Subiculum, das hauptsächlich Assoziationen aus dem Hippocampus erhält (BENNINGHOFF, 1985; FRICK et al, 1992).

Lernen und Gedächtnis im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren ist schon lange Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Am längsten ist in der NGF-sensitiven cholinergen Neuronenpopulation im basalen Telencephalon, nämlich dem Nucleus basalis Meynert (B) und dem horizontalen diagonalen Band (HDB), der neuroanatomische Zusammenhang zwischen Lernen und Gedächtnis einerseits und Wachstumsfaktoren andererseits bekannt. Diese Neuronen innervieren mehrere Strukturen im ZNS, unter anderem den

## 1.4 NEUROTROPHINE ALS EINFLUSSFAKTOREN IN DIE WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE VON NEURONEN BEI SÄUGERN UND MENSCH

---

Hippocampus. Wenn die Axone dieser Neuronen in der adulten Ratte durchtrennt werden, sterben die Zellen ab. Nach einer NGF-Infusion ins ZNS überleben die Neuronen jedoch die Axotomie. Die Anzahl der cholinergen Zellen nimmt mit dem Alter ab, ebenso auch die Fähigkeit von Ratten sich in einem Labyrinth zurechtzufinden oder andere Aufgaben des räumlichen Gedächtnisses zu lernen (FISCHER et al., 1989). Wenn NGF jedoch in alte Ratten injiziert wird, steigt die cholinerge Aktivität der Zellen. Parallel dazu wird die Leistung von Ratten bei Aufgaben für das räumliche Gedächtnis erhöht (FISCHER et al., 1991). Die Rolle des Hippocampus für die räumlich visuelle Orientierung und das episodische Gedächtnis kennt man auch aus Untersuchungen von Patienten, deren mittlere Schläfenlappen beidseitig entfernt wurden, um die Symptome von Temporallappen-Epilepsie zu bessern. Bei denen beobachtet man einen besonders auffälligen und spezifischen Mangel der Fähigkeit, Inhalte des episodischen Gedächtnisses ins Langzeitgedächtnis umzusetzen (SQUIRE und ZOLA-MORGAN, 1991). Man nimmt an, dass zum einen langanhaltende Veränderungen der Synapsenstärken zwischen Neuronen im Hippocampus an der Konsolidierung des Gedächtnisses und an der Erinnerung beteiligt sind. Zum anderen stellt der Hippocampus selbst nur einen kurzzeitigen Speicher über Tage oder Wochen dar, der die erworbene Information an den Neocortex weitergibt. BLISS und LØMO identifizierten 1973 ein mögliches zelluläres Korrelat solcher langanhaltenden Veränderungen der synaptischen Effektivität (BLISS und LØMO, 1973). Sie zeigten, dass hochfrequente Stimulation von Eingängen in

den Hippocampus eine Zunahme der von den postsynaptischen Hippocampusneuronen abgeleiteten Amplitude der exzitatorischen synaptischen Potentiale bewirkte, die beim intakten Tier stundenlang anhielt, manchmal sogar über Tage und Wochen. Sie nannten diese verlängerte Bahnung Langzeitpotentierung (long-term potentiation, LTP). Dieses zelluläre Korrelat entspricht möglicherweise dem Lernen und Ablauf für Erinnerungsvorgänge bei Säugern und Menschen. ROBERTSON et al. konnte 1996 den komplexen biochemischen Pathway identifizieren, der im Hippocampus zur LTP führt (ROBERTSON et al., 1996). Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass LTP an vielen synaptischen Leitungsbahnen auftritt. Die LTP kann dazu unterschiedliche Reizmuster erfordern, verschieden schnell verschwinden und anderweitige Mechanismen involvieren (BROWN et al, 1990 und MADISON et al, 1991). In der Hippocampusformation sind drei große synaptische Schaltstellen bekannt, die alle LTP erzeugen können: zwischen Entorhinalcortex/Parahippocampus, als Hauptprojektionskerengebiet zum Hippocampus, und Gyrus dentatus über den sog. Tractus perforans, zwischen Gyrus dentatus und Neuronen der CA2-Region des Hippocampus über Moosfasern, und zwischen der CA2- und CA1-Region des Hippocampus über den sog. Schaffer-Kollateral/Kommissuraltrakt. Typischerweise wird an diesen Synapsen Glutamat als Transmitter ausgeschüttet, der über N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und non-NMDA-Rezeptoren seine Information an die betreffende Neuronenpopulation weitergibt. Neurotrophine spielen insgesamt eine entscheidende Rolle bezüglich der long-term Regulation der Synapsen-Reifung (LIOU et FU, 1997;

## 1.4 NEUROTROPHINE ALS EINFLUSSFAKTOREN IN DIE WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSVORGÄNGE VON NEURONEN BEI SÄUGERN UND MENSCH

---

LIOU et al., 1997; WANG et al., 1997). Im Speziellen konnte bisher gezeigt werden, dass BDNF notwendig für diese Langzeitpotentierung des Hippocampus ist (KORTE et al. 1995 und 1996; Patterson et al., 1996) Auch neuere Untersuchungen zeigen dies. XU et al. wiesen 2000 nach, dass BDNF durch trkB prä- und nicht postsynaptischen Einfluss auf die Modulation von LTP nimmt (XU et al., 2000).

### 1.5 Wirkung von Neurotrophinen auf gliale Zellen

Bald nach der Entdeckung der Wachstumsfaktoren zeigten sich Hinweise auf deren biologische Wirkung in bezug auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung neuronaler Systeme. Lange dachte man, dass dies die vorwiegende Funktion der Faktoren darstellt. Später erst kam der Aspekt hinzu, dass Wachstumsfaktoren über gliale Zellpopulationen die Regeneration des Nervensystems nach Entzündung oder Verletzung beeinflusst. So benötigen in vitro Oligodendrozyten von Ratten für das Überleben verschiedene Wachstumsfaktoren, darunter Neurotrophine und insbesondere NT-3. Außerdem kann NT-3 Mitosen bei Präkursorzellen von Oligodendrozyten induzieren. So konnten BARRES et al. 1993 in vitro zeigen, dass das Vorhandensein jeweils eines Wachstumsfaktors das Überleben nur kurzfristig steigert, die Kombination von Wachstumsfaktoren aus verschiedenen Gruppen Oligodendrozyten langfristig überleben lassen. Auch in vivo spielen Wachstumsfaktoren auf den Einfluss von Gliazellen eine Rolle. So konnten ALTHAUS et al. 1992 den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf adulte Oligodendrozyten zeigen. Sie verwendeten dazu Zellkulturen aus Oligodendrozyten, die sie von erwachsenen Schweinen isolierten. Die Oligodendrozyten beginnen vier bis fünf Tage nach der Isolierung mit der Regeneration ihrer Ausläufer und haben nach 14 Tagen ein Netzwerk von Fasern ausgebildet. Bei Anwesenheit von NGF über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde ein verstärktes Wachstum der Fasern beobachtet, bedingt

durch ein starkes Längenwachstum und eine Zunahme der Verzweigung. Daneben zeigte sich auch eine starke Vermehrung der Zellkultur. Sowohl Wachstum und Aussprossung der Myelinfasern, als auch die Zunahme der Oligodendrozyten konnte durch Anti-NGF verhindert werden. Auch in peripheren glialen Zellpopulationen wie Schwann'schen Zellen konnten BDNF und NT-3 nachgewiesen werden. Diese Wachstumsfaktoren beeinflussen dort die Myelinisierung des peripheren Nervensystems sowohl in vitro wie in vivo. So korrelierten die BDNF-Spiegel mit der Dicke der Myelininformation während der gesamten Proliferations- und Premyelinisierungsperiode, während die NT-3-Spiegel anfangs hoch waren und später niederreguliert wurden. Zugaben von exogenem BDNF verstärkten die Myelinisierung, während eine Hemmung die Ausbildung von reifem Myelin verhinderte. Interessanterweise verhielt sich NT-3 genau umgekehrt zu BDNF (CHAN et al. 2001).

### 1.6 Problemstellung

Einige Arbeitsgruppen haben bisher das Vorkommen von trkC-Rezeptoren über den Nachweis von mRNA bzw. Transkriptionsmolekülen oder mit immunhistochemischen Färbemethoden an einzelnen neuronalen Zellverbänden aufgezeigt oder schlossen über einen Funktionsausfall genetisch veränderter Säuger auf das Vorhandensein dieser Rezeptoren.

Diese Arbeit soll systematisch die Lokalisation der trkC-Rezeptoren durch den direkten Nachweis mittels immunhistochemischen Methoden im Gehirn von adulten Ratten erbringen. Dazu wurden sowohl Sagittal- als auch Frontalschnitte von Rattenhirnen, vom Bulbus olfactorius beginnend bis zur Medulla oblongata reichend, repräsentativ ausgewählt und daran der trkC-Rezeptor immunhistochemisch nach der Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Methode angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Anhand der Schnitte wurden anschließend Skizzen über die positiv gefärbten Areale in Anlehnung an einen neuroanatomischen Rattenhirnatlas von PAXINOS und WATSON von 1989 angefertigt. Neben der damit beurteilbaren zellulären Verteilung von trkC im Gehirn der Ratte soll eine elektronenmikroskopische Untersuchung dieser immunhistochemisch angefärbten Schnitte Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation von trkC bringen.

Eine zweite Intention dieser Arbeit ist der Versuch, über die zelluläre Verteilung und intrazelluläre Lokalisation der trkC-Rezeptoren weitere Hinweise über die physiologische Bedeutung und Funktionsweise von NT-3 zu bekommen, vor allem in bezug auf bisher noch lückenhaftes Wissen über Lernen und Gedächtnis. Zuletzt soll ein kurzer Ausblick auf einen möglicherweise zukünftigen therapeutischen Einsatz von Wachstumsfaktoren, insbesondere von NT-3, vor allem bei degenerativen Erkrankungen des ZNS und bei cerebral metastasierten Tumorerkrankungen diskutiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 *Verwendete Tiere*

Die für diese Arbeit erforderliche Genehmigung für Tierversuche gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes wurde von der Regierung von Oberbayern erteilt (Az: 211-2531-9/88 vom 19.07.1988 und Az:211-2531-19/92 vom 14.07.1992). Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Gehirnen von vier adulten Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 4 bis 6 Monaten beiderlei Geschlechtes durchgeführt.

#### 2.1.2 *Verwendeter Antikörper*

Die Rezeptoren für Neurotrophin-3 wurden immunhistochemisch mit dem Antikörper c-trk (Ab-1) der Firma Oncogene Science dargestellt. Es handelt sich dabei um einen hochgereinigten polyklonalen IgG-Antikörper aus Kaninchenserum, der spezifisch an die von MARTIN-ZANCA et al. beschriebene intrazelluläre C-terminale Domäne der Proteinsequenzen 777 bis 790 der TrkC Rezeptoren bindet (MARTIN-ZANCA et al., 1989). Die verwendete Konzentration richtete sich nach der Färbeintensität und wurde

durch Verdünnungsreihen ausgehend von der Ausgangskonzentration 100 µg IgG-Antikörper in 1.0 ml Natrium-Phosphat-Puffer so gewählt, dass ein unspezifischer Niederschlag möglichst vermieden wurde, und sich Zellen mit vorhandenen Rezeptoren dennoch eindeutig darstellen ließen. Zum Spezifitätsnachweis der gebildeten Färbungen wurde das p140/110 trk-Peptid c-trk (peptide-1) von Oncogene Science verwendet, woran der c-trk (Ab-1) Antikörper bindet. C-trk (peptide-1) wurde als Antikörper gegen eine Peptidstruktur am C-terminalen Ende des Rezeptors c-trk (Ab-1) entwickelt. Dabei handelt es sich um ein hochgereinigtes Peptid, dessen Aminosäuresequenz durch Analysen oder Sequenzierung verifiziert wurde (ONCOGENE SCIENCE, 1991 und 1996). Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Hersteller, die Eigenschaften und die verwendeten Konzentrationen bzw. Verdünnungen des spezifischen Antikörpers und des Proteins für den Spezifitätsnachweis.

### 2.1.3 *Verwendete Reagenzien*

Zur eigentlichen Immunreaktion waren weitere Antikörper nötig, die im folgenden kurz charakterisiert werden sollen.

Bei dem verwendeten Anti-Rabbit IgG der Firma Sigma Immuno Chemicals handelt es sich um ein Protein, das aus Ziegenserum durch Verwendung von gereinigtem Kaninchen-IgG als Immunogen gewonnen wurde. Hiervon präzipitiert 1.0 ml 1.5 mg Kaninchen IgG bei einer Konzentration von 53 mg/ml.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Die Verwendung erfolgte in einer Verdünnung 1:100 (vol:vol) (SIGMA, 1993).

Zusätzlich wurde Rabbit-PAP der Firma DAKO verwendet, ein Komplex aus Meerrettich-Peroxidase und aus Kaninchenserum gewonnenem Antikörper gegen Meerrettich-Peroxidase in der empfohlenen Verdünnung 1:100 (vol:vol).

Die darin enthaltene Peroxidase hat eine enzymatische Aktivität von 250 U/mg (DAKO, 1995).

Diese für die immunhistochemische Darstellung weiter nötigen Substanzen sind ebenfalls in Tabelle 1 mit ihrer Funktion, den Bezugsquellen, Eigenschaften und die für die Auswertung verwendeten Konzentrationen bzw. Verdünnungen zusammengefasst.

Substanz	Funktion	Hersteller	Immunglobulin	verwendete Konzentration /Verdünnung
c-trk (Ab-1)	1. Antikörper	Oncogene Science	polyklonal	1:50 bis 1:500 (LM) 1:50 (EM)
c-trk (peptide-1)	Spezifitätsnachweis	Oncogene Science	enfällt	10 µg
Anti-Rabbit-IgG	2. Antikörper	Sigma Immuno Chemicals	monoklonal	530 µg/ml bzw. 1:100
Rabbit-PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex	DAKO	monoklonal	1:100

Tabelle 1: Für die immunhistochemische Untersuchung verwendeter spezifischer Antikörper, zum Spezifitätsnachweis dieses Antikörpers verwendetes Protein und die dafür weiter benötigten Reagenzien mit den jeweiligen Funktionen, Bezugsquellen, Eigenschaften und angewandten Konzentrationen bzw. Verdünnungen

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 *Fixierung des Hirngewebes*

Das für die Arbeit verwendete Hirngewebe der Versuchstiere wurde perfusionsfixiert. Dazu wurden die Ratten zuerst mit Azaperon (Stresnil®) i. m. sediert und dann mit Pentobarbital (Nembutal®) i. p./i. v. (50 mg/kg KGW) eingeschläfert. Danach wurde der Thorax eröffnet, das Herz freipräpariert und mit Hilfe einer Knopfkanüle durch den linken Ventrikel zuerst das intracerebrale Gefäßsystem mit ca. einem Liter einer 0,9%igen NaCl- oder Ringer-Lösung zusammen mit 10.000 I. E. Heparin von Blut freigespült. Anschließend wurden über die gleiche Nadel ca. zwei Liter des Fixativums eingebracht. Dieses bestand bei den Tieren, deren Hirne für die lichtmikroskopische Untersuchung verwendet wurden aus Zamboni-Fixativ und einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung. Das Gewebe derjenigen Ratten, deren Gehirne später für die elektronen-mikroskopische Aufarbeitung verwendet wurden, wurde anstelle des Zamboni-Fixatives mit einer 0.2%igen Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Im Anschluß an die transkardiale Fixierung wurde den Versuchstieren das Gehirn entnommen und in den schon erwähnten Lösungen 48 Stunden nachfixiert.

### 2.2.2 *Herstellung von Gefrierschnitten*

Die histologischen Untersuchungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt. Für ihre Herstellung wurden die fixierten Rattenhirne fünfmal in 0.1 M Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden sie in eine Sukroslösung gelegt, wo sie zuerst in einer 10%igen und dann in einer 30%igen Lösung bis zu ihrem jeweiligen Absinken in diesen Medien verblieben. Damit sollte die spätere Bildung von Eiskristallen verhindert werden. Schließlich wurden auf einem Kryostat der Firma Leitz (Modell 1310 K) Frontal- und Sagittalschnitte in einer Dicke von 50 µm hergestellt. In einer Kryoprotektionslösung (300 g Sukrose mit 300 ml Äthylenglykol, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 ad 1000 ml) nach Watson et al. wurden diese Schnitte bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -18 Grad Celsius belassen (WATSON et al., 1986).

### 2.2.3 *Immunhistochemisches Verfahren der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode*

Die Ergebnisse in dieser Arbeit wurden mit der modifizierten Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Methode an Gefrierschnitten nach Sternberger erzielt (STERNBERGER, 1979). Immunhistochemische Verfahren sind in der Neurobiologie und vielen anderen Disziplinen heute weitverbreitete und routinemäßig angewandte Techniken (STERNBERGER, 1979). Aus diesem Grund wird an dieser Stelle nur das Grundprinzip der PAP-Methode

schematisch beschrieben. Dieses beruht darauf, dass das nachzuweisende Antigen mit Hilfe einer Aldehyd-Fixierung in dem Gewebsschnitt fixiert, und dieser Schnitt mit einem spezifischen Antikörper inkubiert wird, der sich an das Antigen bindet. Dieser sogenannte erste Antikörper wird mit drei nachfolgenden Schritten sichtbar gemacht. Im folgenden nächsten Schritt bindet ein zweiter Antikörper, ein Spezies-spezifisches Anti-Immunglobulin, an den ersten Antikörper. Im dritten Schritt wird durch eine weitere Inkubation ein Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex an den zweiten Antikörper gebunden. Und schließlich katalysiert die Peroxidase die Polymerisierung von Diaminobenzidin, was als letztes Reagenz dazugegeben wird. Das durch Polymerisierung gebildete unlösliche Polyaminobenzidin stellt das bräunliche Endprodukt dar und zeigt somit als Indikator indirekt das darzustellende Antigen.

### 2.2.3.1 Immunhistochemisches Vorgehen für die lichtmikroskopische Auswertung

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die hergestellten Gefrierschnitte (sh. 2.2.2) frei flottierend nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode immunhistochemisch gefärbt. Dazu waren der in 2.1.2 genannte Antikörper und die in 2.1.3 beschriebenen Reagenzien nötig, jeweils in der in Tabelle 1 angegebenen Verdünnung bzw. Konzentration. Die Auswahl der zu inkubierenden und entwickelnden Schnitte erfolgte so, daß entsprechend der Fragestellung bei den Frontalschnitten die Regionen vom Bulbus olfactorius bis

zur Medulla oblongata und den Sagittalschnitten die Regionen von medial nach lateral repräsentativ vertreten waren.

1. Schritt: Jeweils zwei bis vier Schnitte wurden zusammen aus der Kryoprotektionslösung in ein kleines Becherglas gegeben, dreimal 10 Minuten gründlich mit TRIS-Phosphat-Puffer gespült (14.8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 70 g NaCl, 50 g TRIS und 2 g Thiomersal ad 5000 ml Aqua dest., pH 7.8) zur Entfernung der Kryoprotektionslösung und danach 15 bis 20 Minuten zur Blockierung gewebeeigener endogener Peroxidasen in einer Lösung aus TRIS-Phosphat-Puffer, Methanol und 30%igem Wasserstoffperoxid (Perhydrol, Merck AG, Darmstadt) in einem Mischungsverhältnis 8:1:1 (vol:vol) inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder dreimal 10 Minuten gründlich mit TRIS-Phosphat-Puffer gespült und anschließend über Nacht bei vier Grad Celsius in einer Lösung aus TPS (LM) (200 ml TRIS-Phosphat-Puffer, 2 ml 1.0 % Normal Goat Serum und 600  $\mu\text{l}$  0.3 % Triton-X-100) und dem unter 2.1.2 beschriebenen Antikörper als sogenanntem ersten Antikörper inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 1).

2. Schritt: Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte nach wiederum dreimalig 10minütigem Spülen mit TRIS-Phosphat-Puffer bei Zimmertemperatur eine Stunde mit dem unter 2.1.3 näher bezeichneten zweiten Antikörper inkubiert, der auch dabei mit TPS (LM), wie in Tabelle 1 aufgeführt, verdünnt wurde.

3. Schritt: Anschließend wurden die Gefrierschnitte eine Stunde mit dem Peroxidase-Anit-Peroxidase-Komplex bei Raumtemperatur angesetzt, nachdem sie nach dem gleichen Verfahren, wie unter den vorausgegangenen

Arbeitsschritten erwähnt, sorgfältig mit TRIS-Phosphat-Puffer von dem überschüssigen zweiten Antikörper gereinigt waren.

4. Schritt: Zur Indikatorreaktion wurden 10 mg lösliches Diaminobenzidin in 15 ml TRIS-Phosphat-Puffer und 12 µl Wasserstoffperoxid (30%) gelöst. Anfang und Ende (nach 5 bis 10 Minuten) dieser Reaktion war wiederum das dreimal 10minütige Spülen in TRIS-Phosphat-Puffer.

Die Gefrierschnitte wurden anschließend auf mit 1%iger Gelatine überzogene Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Kerne dieser Schnitte noch mit Hämalaun dargestellt und das Zytoplasma diskret mit Toluidinblau oder 0.1%igem Naphtolgrün (= Alizarinviridin) gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, durch Xylol gereinigt und mit einem Deckglas mit Permount (Fisher) eingedeckt.

Alle gefertigten histologischen Schnitte wurden am Lichtmikroskop sorgfältig nach positiv gefärbten Regionen bzw. Kerngebieten untersucht und schließlich repräsentative sagittale Schnitte mit Hilfe eines Zeichentubus skizziert und darin die Ergebnisse schematisch festgehalten.

### 2.2.3.2 Immunhistochemisches Vorgehen für die elektronenmikroskopische Auswertung

Für die Fragestellung nach der intrazellulären Lokalisation des trkC-Rezeptors als hochaffiner Rezeptor für Neurotrophin-3 wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Auch dafür waren die in Tabelle 1 aufgeführten Antikörper in der dort angegebenen Verdünnung nötig. In diesem Fall wurden frontale Gefrierschnitte (sh. 2.2.2) aus dem Bereich des basalen Vorderhirns, des Mandelkernkomplexes und des magnozellulären Hypothalamus als aus der Lichtmikroskopie bekannte positive Kerngebiete verwendet. Die Darstellung des Rezeptors wurde ebenfalls nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode immunhistochemisch durchgeführt, so dass hier nur noch die Variationen zum oben ausführlich beschriebenen lichtmikroskopischen Verfahren geschildert werden sollen.

1. Schritt: Für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Schnitte wurden vor der Blockade der gewebeeigenen Peroxidasen auch die Aldehyd-Gruppen des Glutaraldehyds durch die 10minütige Inkubation mit einer Natriumborhydridlösung (0.5 g NaBH<sub>4</sub> 98%ig in 50 ml TRIS-Puffer) blockiert. Unmittelbar vor der Inkubation der Schnitte mit dem ersten Antikörper erfolgte zusätzlich noch die 30 bis 60minütige Reaktion mit einer Lösung aus 182.5 µg L-Lysine in 0.5 ml 1.0 % Normal Goat Serum und 9.5 ml Tris-Puffer (30.5 g Tris und 42.5 g NaCl ad 5000 ml Aqua dest., pH 7.6). Nach diesen Arbeitsgängen wurden die Schnitte jeweils dreimal 10minütig in TRIS-Puffer analog zum lichtmikroskopischen Verfahren gespült. Die Verdünnung des ersten

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Antikörpers nach den in Tabelle 1 genannten Werten erfolgte dann mit TPS (EM), das im Gegensatz zum TPS (LM) ohne 0.3%iges Triton-X-100 angesetzt wurde.

2. bis 4. Schritt: Zur Verdünnung des zweiten Antikörpers und des Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplexes wurde wie beim ersten Antikörper TPS (EM) verwendet. Als Spüllösung bei diesen Arbeitsschritten diene anstelle des TRIS-Posphat-Puffers auch hier der TRIS-Puffer. Ansonsten war die Durchführung von Schritt 2 bis 4 identisch mit der Färbemethode für die Lichtmikroskopie.

Aus den entwickelten Schnitten wurden anschließend die lichtmikroskopisch identifizierten positiv gefärbten Regionen ausgestanzt, diese fünfmal 10 Minuten in 0.1 M Phosphatpuffer (13.79 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 17,79 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad 1000 ml Aqua dest., pH 7.4) gespült und schließlich bis zum nächsten Morgen in 0.01 M Phosphatpuffer liegen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Osmiumfixierung mit 60minütiger Inkubation in 1%igem Osmiumtetroxid, anschließend die Entwässerung in einer aufsteigenden Reihe unvergällten Alkohols und über Nacht bzw. am letzten Tag dieses Ansatzes die Einbettung in Epon. Das gehärtete Gewebe wurde in Semidünnschnitte zur lichtmikroskopischen Orientierung und in Ultradünnschnitte mit 0.5  $\mu\text{m}$  zur elektronenmikroskopischen Auswertung geschnitten. Als Elektronenmikroskop diene ein Philips CM-10 Gerät.

### 2.2.4 *Überprüfung der Spezifität des Antikörpers*

Die Spezifität der positiv gefärbten Regionen als tatsächlich dem Neurotrophin-3-Rezeptor entsprechende Lokalisationen wurde getestet, indem der Antikörper c-trk (Ab-1) vor Anwendung als sogenannter erster Antikörper am Schnitt mit dem unter 2.1.2 näher beschriebenen Peptid c-trk (peptide-1) inkubiert wurde. Dabei wurde für das Peptid eine Verdünnung gewählt, die im Vergleich zum Antikörper einen Überschuss darstellte (siehe Tabelle 1). Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, daß die Reaktion bei Prä-Inkubation mit dem Peptid, gegen welches der Antikörper gerichtet ist, verhindert wurde (sh. Abb. 9).

### 2.2.5 *Maßnahmen zur Qualitätssicherung*

Sowohl für den licht- als auch den elektronenmikroskopischen Ansatz wurden stets Gefrierschnitte von verschiedenen Tieren für eine Inkubation ausgewählt, um methodische Unregelmäßigkeiten zu verhindern und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Außerdem wurden für die Verifizierbarkeit der immunhistochemisch gefärbten Regionen bei jedem Ansatz Schnitte ohne Verwendung des sogenannten ersten Antikörpers mitinkubiert und entwickelt. Dabei zeigte sich, dass bei entsprechend ausgewählter Verdünnung des Antikörpers c-trk (Ab-1), nur Schnitte unter Verwendung des ersten Antikörpers positive Ergebnisse zeigten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Repräsentative Schnitte wurden in Übersichts- und Detailaufnahmen photographiert und dokumentiert. Die in den Photoillustrationen im Abschnitt 3 Ergebnisse gezeigten Befunde sind jeweils repräsentativ für alle untersuchten Tiere.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lichtmikroskopische Verteilung des trkC-Rezeptors

Wie aus Abbildung 2 und Abschnitt 2.1.2 hervorgeht wurde das trkC-Rezeptorprotein an den intrazellulären Proteinsequenzen 777 bis 790 mit einem IgG der Firma Oncogene Science markiert. Die Immunfärbung nach der PAP-Methode wurde anschließend qualitativ an ausgewählten Sagittalschnitten eines erwachsenen Rattenhirnes analysiert. In der Übersicht war die Immunreaktion in verschiedenen Regionen innerhalb des gesamten Gehirns verteilt. In der lichtmikroskopischen Vergrößerung war die Färbung nur intrazellulär. Es färbte sich ausschließlich graue Substanz an, in der weißen Substanz lies sich an keinem Anschnitt ein Vorkommen nachweisen. Innerhalb der grauen Substanz waren ausschließlich in Neuronen Immunkomplexe nachweisbar. Die Färbeintensität war in den verschiedenen positiv angefärbten Zellkomplexen unterschiedlich. Durch die Kernfärbung mit Hämalaun und Gegenfärbung mit Toluidinblau bzw. Naphtolgrün konnten auch schwach jedoch spezifisch gefärbte Nervenzellen identifiziert werden (sh. 2.2). Die topographische Verteilung von trkC wird in den Skizzen 1 bis 4 in Anlehnung an den Atlas von PAXINOS und WATSON von 1986 dargestellt. Die gepunkteten Areale entsprechen dabei den immunhistochemisch angefärbten Kerngebieten. Im Anhang finden sich die verwendeten Skizzenvorlagen aus dem erwähnten

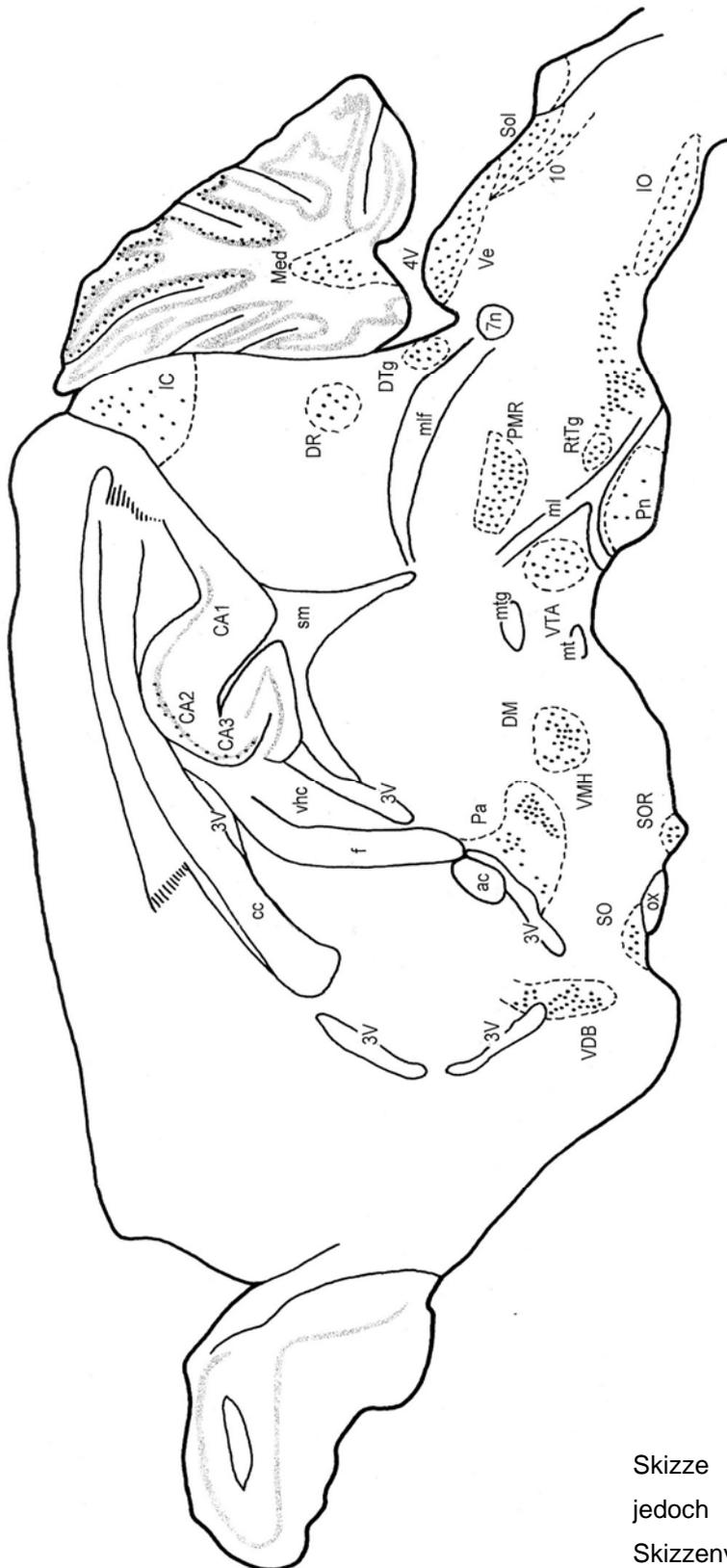
### 3 ERGEBNISSE

---

Atlas neben einer Auflistung der in den Skizzen und im Text verwendeten Abkürzungen der anatomischen Strukturen. Die Verteilung des trkC-Rezeptors im Vergleich zum bekannten Vorkommen von trkA und trkB ist in Tabelle 2 im Abschnitt 4.1 aufgeführt.



Skizze 1: Schematische Darstellung aller mittels Immunhistochemie mit lichtmikroskopischer Auswertung erkennbarer positiver Neuronenkomplexe für trkC (gepunktete Areale) in Anlehnung an Skizzenvorlage 77 (Pros- und Mesencephalon) und 78 (occipitale Hirnanteile) von PAXINOS und WATSON. Die in den Skizzen verwendeten Abkürzungen sind im Text genannt und neben den genannten Skizzenvorlagen im Anhang dargestellt.



Skizze 2: Analog zu Skizze 1, jedoch in Anlehnung an Skizzenvorlage 78 von PAXINOS und WATSON

### 3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE VERTEILUNG DES TRKC-REZEPTORS



Skizze 3: Analog zu Skizze 1, jedoch in Anlehnung an Skizzenvorlage 79 (Pros- und Mesencephalon) und 80 (occipitale Hirnanteile) von PAXINOS und WATSON



Skizze 4: Analog zu Skizze 1, jedoch in Anlehnung an Skizzenvorlage 81 (occipitale Hirnanteile) und 82 (Pros- und Mesencephalon) von PAXINOS und WATSON

#### 3.1.1 Vorkommen im Prosencephalon

##### 3.1.1.1 Telencephalon

Im Telencephalon findet sich eine deutliche Immunreaktion sowohl in phylogenetisch alten Arealen des Hirnmantels, als auch in Kernkomplexen des basalen Vorderhirnes. Es zeigen sich trkC-positive Regionen in der Hippokampusformation, hier im Speziellen in den Abschnitten CA1 bis CA3 (CA1 - CA3) des Hippocampus. Man kann lichtmikroskopisch erkennen, dass es sich bei der für trkC-positiven Zellpopulation um die Pyramidenzellen handelt, und damit um den Ursprung der efferenten Fasern aus dem Hippocampus. In den Kernkomplexen des basalen Vorderhirnes zeigen sich positive Immunreaktionen im vertikalen diagonalen Band (VDB), im Bereich des horizontalen diagonalen Bandes (HDB) und in sehr vereinzelt septalen Kernen (Se). Auch im Nucleus basalis Meynert (B) lässt sich eine Immunreaktion für trkC nachweisen. Neben diesen anatomisch eindeutig zuordenbaren Regionen sind im Endhirn noch einzelne verstreute großzellige Neurone mit positiver Immunreaktion für trkC unterhalb des Balkens erkennbar. Erwähnenswert ist in dieser Hirnregion, dass im Bereich der Hirnrinde nur Zellen des limbischen Systems trkC enthalten, die Endhirnrinde im engeren Sinn also keine Immunreaktion für trkC zeigt. Damit ist trkC nur an funktionellen Strukturen nachweisbar, die nicht der willkürlichen Steuerung unterliegen, sondern, wie das limbische System, der Regulierung unbewusster vitaler Reaktionen und Verhaltensweisen oder der Integration angeborener und

### 3 ERGEBNISSE

---

erlernter Verhaltensmuster dienen. Daneben sei ausdrücklich erwähnt, dass auch im Bulbus olfactorius keinerlei immunpositiver Niederschlag für trkC nachweisbar ist, obwohl das Riechhirn bekanntermaßen eng mit dem limbischen System assoziiert ist und sich in vielen Kerngebieten dieses funktionellen Systems trkC nachweisen lässt. Abbildung 4 enthält lichtmikroskopische Photographien aus den positiven Kernkomplexen des basalen Vorderhirnes.

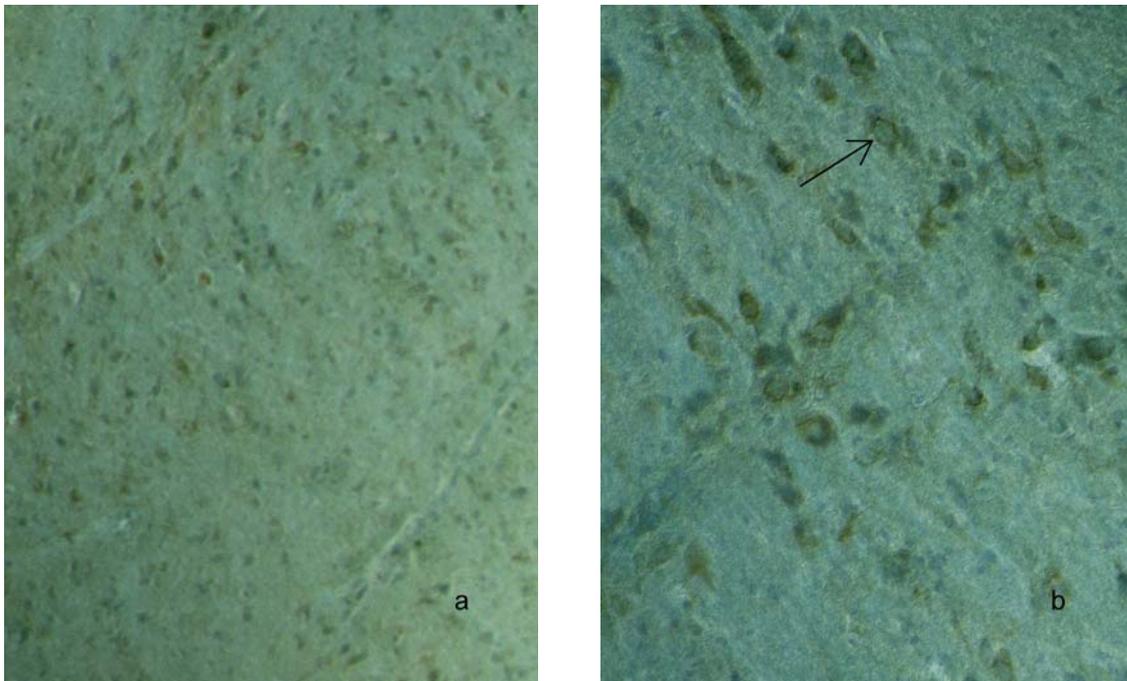


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung positiver Zellpopulationen aus dem Telencephalon. Bild a VDB, Vergrößerung 100fach, Bild b VDB, Vergrößerung 200fach. Der Pfeil markiert einen immunhistochemischen Niederschlag.

#### 3.1.1.2 Diencephalon

Im Diencephalon ist ein Kerngebiet des Thalamus positiv für trkC, nämlich der Nucleus anterodorsalis thalami (AD). Dieser gehört anatomisch zum sogenannten vorderen Territorium des Thalamus und erhält afferente Fasern über den Fasciculus mamillothalamicus (Vicq d'Azyrsches Bündel) aus dem Corpus mamillare. Daneben stellt er als Teil des limbischen Systems eine wichtige Schaltstelle zur Hippokampusformation dar.

Dagegen sind im Hypothalamus einige Kerngebiete positiv für trkC. So kann trkC in den hinteren mamillären Hypothalamuskernen, der Regio hypothalamica posterior (Hp), nachgewiesen werden. Diese besteht aus den Nuclei corporis mamillaris und dem Nucleus hypothalamicus posterior. Diese Kerne stehen mit ihren Faserbündeln, dem Fasciculus mamillotegmentalis (mtg), mit der Formatio reticularis des Tegmentum und mit den vegetativen Kernen von Mittelhirn, Rautenhirn und Rückenmark in Verbindung. Von dieser Region werden lebenswichtige viszeromotorische Funktionen im Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme, Ausscheidung und Fortpflanzung gesteuert.

Im Gegensatz zu den hinteren hypothalamischen Kernen gehen von den mittleren und vorderen Hypothalamuskernen hormonelle Efferenzen aus. TrkC kann in den mittleren Hypothalamuskernen, der Regio hypothalamica intermedia, im Nucleus hypothalamica dorsomedialis (DM), dem Nucleus hypothalamica ventromedialis (VMH) und Nucleus arcuatus (Arc) gezeigt werden. Diese Kerngebiete werden zu den Nuclei tuberales zusammengefasst, die Transmittersubstanzen bilden und die Freisetzung von Steuerhormonen aus

der Adenohypophyse kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Versuch unternommen, die Adenohypophyse selbst auf das Vorkommen von trkC zu untersuchen. Dies misslang jedoch aus methodischen Gründen.

Im Bereich der vorderen Hypothalamuskern, der Regio hypothalamica anterior unterscheidet man magnozellige (supraoptische) Kerne und kleinzellige (präoptische) Kerne. TrkC kann dort nur in den großzelligen Kernen, nämlich dem Nucleus paraventricularis (Pa) und dem Nucleus supraopticus (SO und SOR) nachgewiesen werden. Vom Nucleus paraventricularis aus streuen einzelne positive Zellen bis in den dorsalen Hypothalamus. In der kleinzelligen präoptische Kerngruppe zeigt sich auffälligerweise kein Färbeverhalten für trkC. Die großzelligen supraoptischen Kerne sezernieren die Effektorhormone Vasopressin und Oxytocin, die über die Neurohypophyse, also den Hypophysenhinterlappen, zum Blutkreislauf gelangen und dort ihre bekannten physiologischen Wirkungen ausführen. Abbildung 5 belegt lichtmikroskopisch das Vorkommen von trkC im Diencephalon.

### 3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE VERTEILUNG DES TRKC-REZEPTORS

---

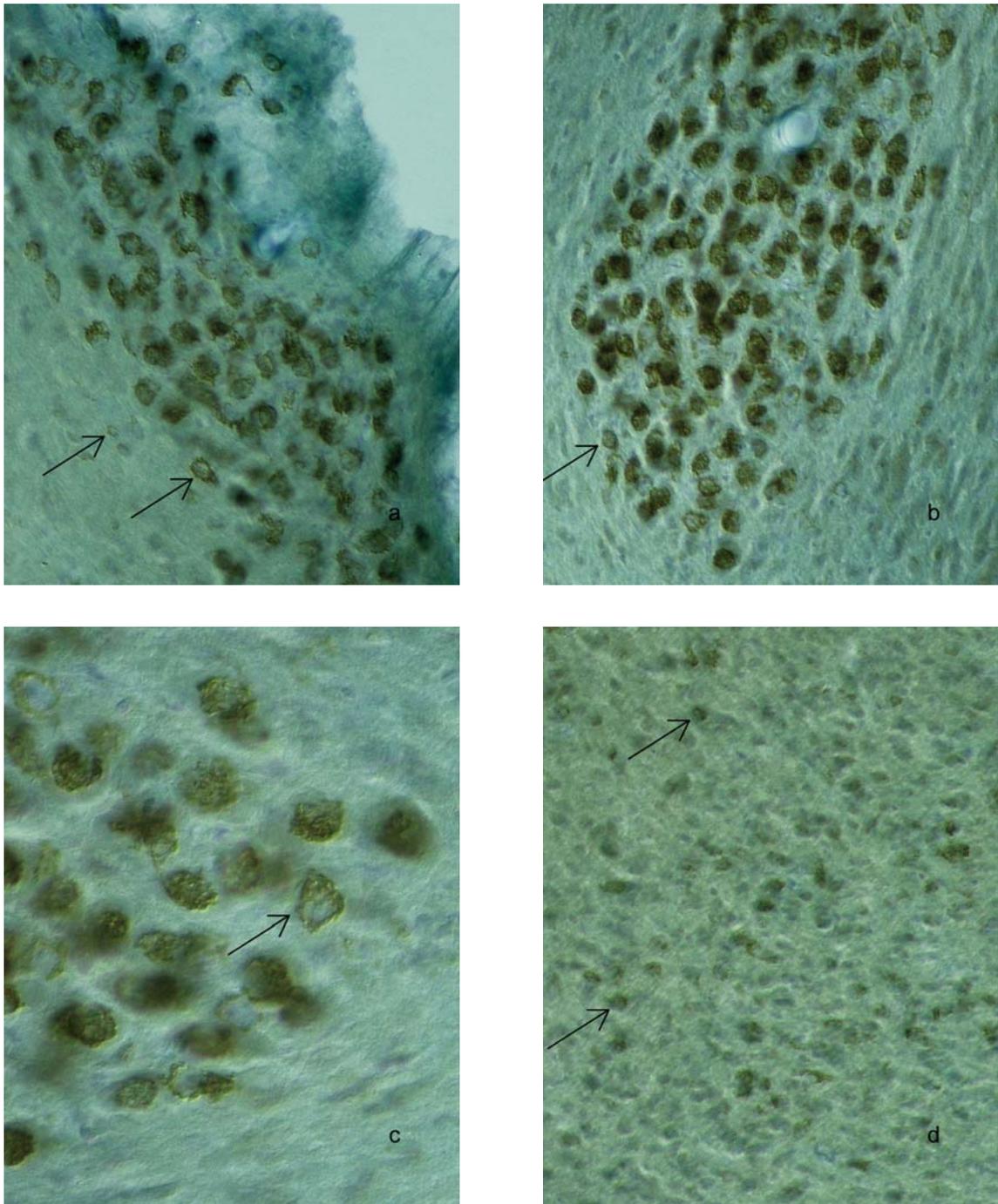


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung positiver Zellpopulationen aus dem Diencephalon. Bild a SO und SOR, Vergrößerung 200fach, Bild b Pa, Vergrößerung 200fach, Bild c Pa, Vergrößerung 400fach, Bild d Arc, Vergrößerung 200fach. Die Pfeile markieren jeweils immunohistochemische Niederschläge.

#### 3.1.2 Vorkommen im Mesencephalon

Nach occipital dem Prosencephalon angrenzend, folgt das Mesencephalon. Auch hier ist trkC immunhistochemisch nachweisbar. So lassen sich im Tectum im Nucleus colliculi inferioris (IC) einzelne Zellen diskret positiv für trkC nachweisen. Dieser Kern hat als Teil der Hörbahn mit dem Corpus geniculatum mediale Verbindung.

Das Tegmentum mesencephalicum stellt phylogenetisch die Verlängerung der grauen Substanz des Rhombencephalons bzw. der Medulla oblongata nach rostral dar. Hier finden sich die Kerngebiete der Hirnnerven III und IV und die Formatio reticularis mit ihrer grauen Substanz, dem Nucleus ruber und dem Nucleus interpeduncularis. Daneben finden sich im Tegmentum noch Kerngebiete, die nicht unmittelbar zur Formatio reticularis gehören, sondern zum vegetativen Nervensystem im weitesten Sinne, wie beispielsweise der Nucleus tegmentalis dorsalis (GUDDEN). In dieser anatomischen Region ist trkC immunhistochemisch nachweisbar im Nucleus nervi oculomotorius (3) und dort insbesondere im kleinzelligen akzessorischen vegetativen Kern (Edinger-Westphal), diskret aber auch in den großzelligen Anteilen des motorischen Hauptkernes. Auch in der Formatio reticularis, im Nucleus ruber (R) lässt sich trkC nachweisen. Dieser bildet eine zentrale Schaltstelle zwischen dem Kleinhirn und den Basalganglien bzw. dem Zwischenhirn, womit er eine Schlüsselstellung im extra-pyramidalen System einnimmt. Eng benachbart zum Nucleus ruber, funktionell jedoch dem vegetativen System im weitesten Sinn zuzurechnen, ist der Nucleus tegmentalis dorsalis (GUDDEN) (DTg). Auch hier

zeigt sich im immunhistochemischen Nachweis trkC. Ein weiteres Teiglied des extra-pyramidalen Systems, nämlich die Substantia nigra, findet sich im Mesencephalon. Hier ist trkC sowohl in der Pars compacta (SNC) wie in der Pars reticulata (SNR) immunhistochemisch nachweisbar. Die Substantia nigra hat Verbindungen zum Großhirn und dem Striatum. Schließlich gelingt noch der Nachweis von trkC in der Area ventralis tegmenti (TSAI) (VTA), die wie die Substantia nigra über dopaminerge Neuronen verfügt und funktionell dem meso-kortiko-limbischen System zuzurechnen ist. Abbildung 6 zeigt Beispiele aus den genannten trkC-positiven Regionen im Mesencephalon.

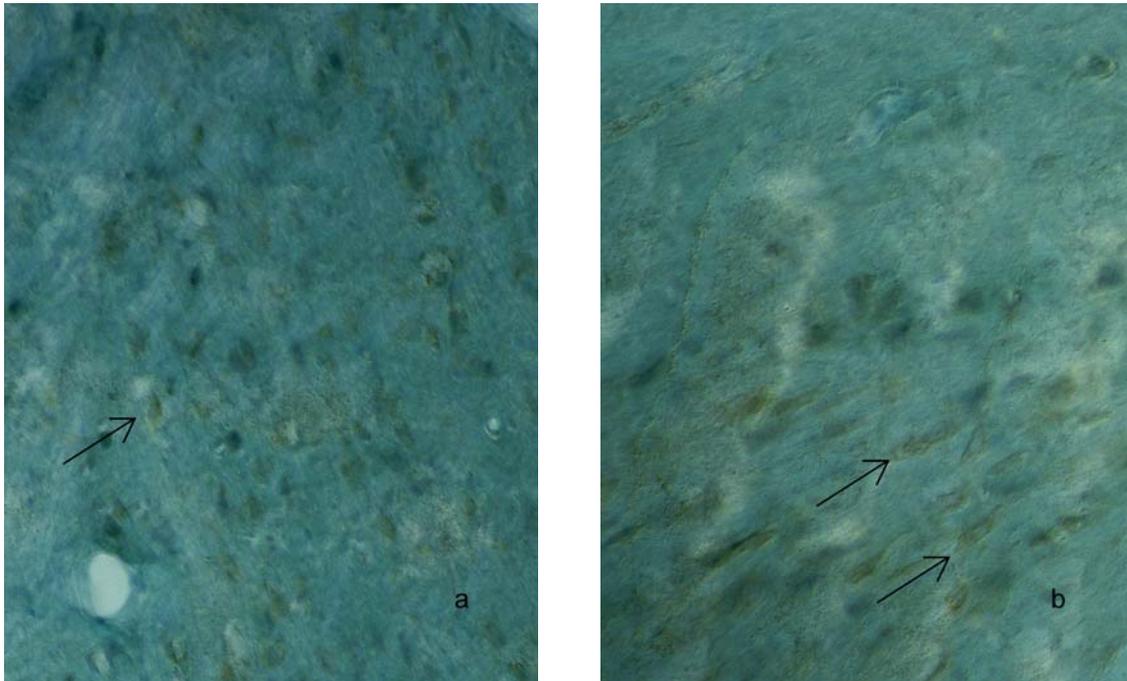


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Darstellung positiver Zellpopulationen aus dem Mesencephalon. Bild a VTA, Vergrößerung 200fach, Bild b Substantia nigra, Vergrößerung 200fach. Die Pfeile markieren je immunhistochemische Niederschläge.

#### 3.1.3 Vorkommen im Rhombencephalon

Das Rhombencephalon besteht aus der Pons und wird gefolgt von der Medulla oblongata, die kaudalwärts das Mesencephalon fortsetzt und willkürlich das Rückenmark unmittelbar oberhalb der Austrittsstelle des ersten Spinalnervenpaares abgrenzt. Daneben wird auch das Cerebellum zum Rhombencephalon gerechnet.

#### 3.1.3.1 Pons und Medulla oblongata

Die Pons wiederum wird anatomisch funktionell in einen ventralen und einen dorsalen Teil gegliedert. Der ventrale Teil enthält den Nucleus pontis (Pn), der dorsale Teil wird funktionell dem Tegmentum des Rhombencephalon zugeordnet. Der Nucleus pontis besteht aus vielen einzelnen verstreuten Kerngebieten, die das zweite Neuron der Großhirn-Brückenbahn (Tractus corticopontocerebellaris) darstellen. Das erste Neuron dieser Bahn entspringt in der Rinde des Frontalhirnes, des Okzipitalhirnes, sowie des Parietal- und des Temporalhirnes. Mit dieser Bahn werden die Tätigkeit von Hirnrinde und Cerebellum koordiniert. In den pontinen Kernen (Pn) lässt sich trkC deutlich nachweisen. Wie oben beschrieben enthält sowohl verlängertes Mark als auch der dorsale Teil der Brücke das Tegmentum des Rautenhirnes mit den Ursprungs- und Endkernen der Hirnnerven V bis XII. TrkC kann im Nucleus motorius nervi trigemini (Mo5), als motorischer Ursprungskern des fünften Hirnnerven, im Nucleus facialis (7), als motorischer Ursprungskern des siebten Hirnnerven, im Nucleus tractus solitarii (Sol), als sensorischer Endkern des Nervus intermedius des siebten und neunten Hirnnerven, im Vestibularkomplex (Ve), als sensorischer Endkern des achten Hirnnerven, im Nucleus dorsalis nervi vagi (10) als parasympatischer Kern des zehnten Hirnnerven und im Nucleus ambiguus (Amb) als motorischer Ursprungskern des neunten, zehnten und elften Hirnnerven gezeigt werden. Wie im Mesencephalon gehören zum Tegmentum des Rhombencephalons auch zahlreich verstreute Perikaryen, die nur an wenigen Stellen zu umschriebenen Kernen zusammengeschlossen sind

und von weißer Substanz durchzogen werden, nämlich die *Formatio reticularis*. TrkC kann lichtmikroskopisch deutlich im größten Kern der *Formatio reticularis*, dem *Nucleus olivaris inferior* (IO) mit seinem Nebenkern, dem *Nucleus olivaris accessorius* (LSO) gezeigt werden. Diese erhalten Afferenzen aus dem Rückenmark und senden Efferenzen zum Kleinhirn, und sind an Präzisionsbewegungen der Hand (IO) und an groben Massenbewegungen des Rumpfes (LSO) beteiligt. Auch kleinere Kerne der *Formatio reticularis* der Pons und der *Medulla oblongata*, wie der *Nucleus reticulotegmentalis pontis* (RtTg), der *Nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (PPTg), der *Nucleus reticularis* (Rt), der *Nucleus raphes dorsalis* (DR) und der *Nucleus raphes paramedianus* (PMR) sind positiv für trkC. Diese Kerne sind Interneurone zwischen Afferenzen und Efferenzen verschiedenartiger phylogenetisch alter und lebenswichtiger Systeme wie Atem- und Kreislaufzentrum oder Atem- und Kreislaufreflex. Die Raphekerne benutzen dazu als Neurotransmitter hauptsächlich Serotonin. Daneben finden sich im Rautenhirn noch die Kerngebiete der allgemeinen Somatosensibilität in Form der Hinterstrangkern- und dem sensiblen Trigeminskern-Gebiet. Im sensiblen Trigeminskern-Gebiet lässt sich immunhistochemisch kein trkC nachweisen. Im *Nucleus cuneatus externus* (Ecu) jedoch findet sich trkC. In diesem Kern endet das erste Neuron der Leitungsbahnen des Druck- und Tastsinnes sowie der Tiefensensibilität. Von hier aus wird die Erregung über die mediale Schleife des zweiten Neurons zum Thalamus geleitet, und schließlich zum dritten Neuron der hinteren Zentralwindung der Großhirnrinde. Schließlich finden sich im Rhombencephalon noch Kerngebiete, die vorwiegend noradrenerge Neurone

### 3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE VERTEILUNG DES TRKC-REZEPTORS

---

besitzen und funktionell dem limbischen System zugeordnet werden können. So lassen sich auch im Locus coeruleus (LC) und dem Nucleus subcoeruleus (SubC) trkC-Rezeptoren zeigen. Erwähnenswert ist, dass sich in Zellen der Area postrema, einem sogenannten zirkumventrikulären Organ, kein Immunkomplex nachweisen lässt. Abbildung 7 zeigt exemplarisch einige Kerngebiete mit positiver Immunreaktion für trkC aus Pons und Medulla oblongata.

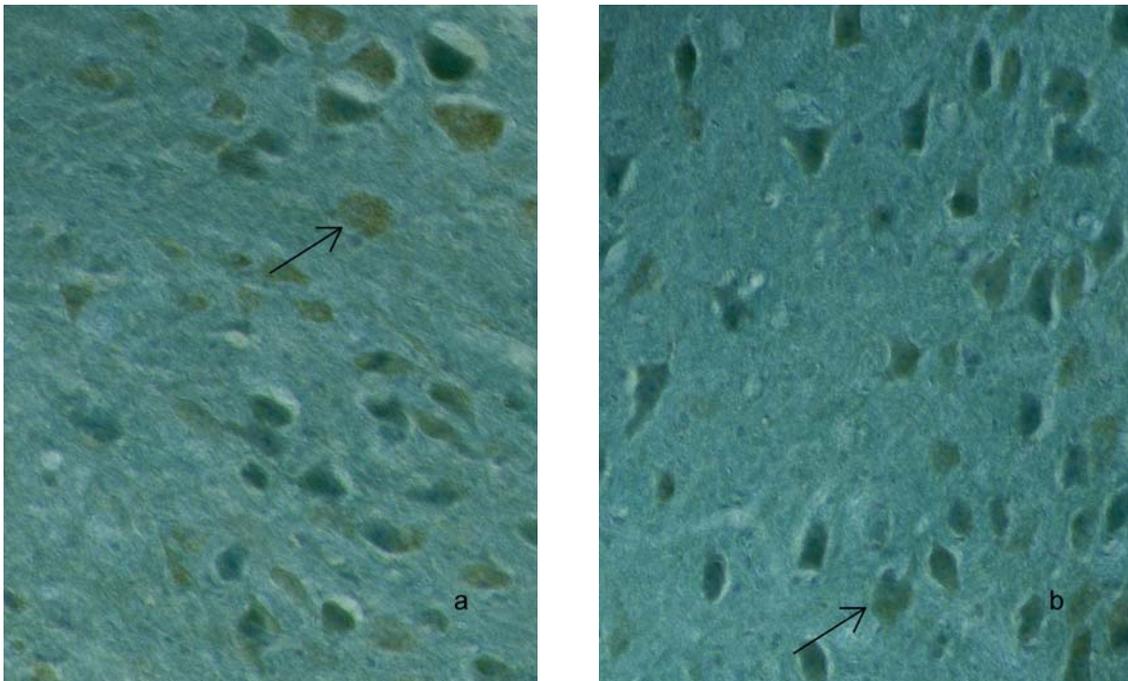


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung positiver Zellpopulationen aus Pons und Medulla oblongata. Bild a DR, Vergrößerung 200fach, Bild b Sol, Vergrößerung 200fach. Die Pfeile markieren je immunhistochemische Niederschläge.

#### 3.1.3.3 Cerebellum

Schließlich wird noch das Cerebellum dem Rhombencephalon zugeordnet. Auch hier konnten Immunkomplexe des trkC-Rezeptors sichtbar gemacht werden. Im Kleinhirn findet sich graue Substanz sowohl in der Rinde als auch in Form von subcortical gelegenen Kleinhirnkernen. In der Kleinhirnrinde waren die Purkinjezellen des Pontocerebellums stark positiv anfärbbar für trkC, an Kleinhirnkernen der Nucleus cerebellaris medialis (Med) und der Nucleus cerebellaris interpositus (Int). Die Axone der Purkinjezellen bilden im Kleinhirn das einzig inhibitorisch wirkende Ausgangssystem. Dies ist fast ausschließlich auf die Kleinhirnerne gerichtete. Die Kleinhirnerne erhalten daneben exzitatorische Erregungen über die Moos- und Kletterfasern. Der inhibitorisch vermittelte Ausgang der Purkinjezellen erhält Einfluss aus den exzitatorischen Erregungen der Moos- und Kletterfasern und aus den inhibitorischen Einflüssen über die Interneurone der Rinde, die Korb-, Stern- und Golgi-Zellen. Dabei sind die Moosfasern Axone der vestibulo-, spino-, und pontozerebellaren Bahnen, die Kletterfasern Axone des kontralateralen unteren Olivenkernes. Erwähnenswert ist, dass sich nicht in allen Purkinjezellen gleichermaßen positive Immunkomplexe anfärben lassen, sondern nur in der Rinde des sogenannten Pontocerebellums (Neocerebellums) trkC in den Purkinjezellen nachweisbar ist. Dies ist die Kleinhirnregion, die embryologisch erst spät im Zusammenhang mit der Motorik des Endhirns entsteht (ROHEN, 1994). Hier münden vor allem die zuletzt erwähnten Afferenzen aus dem unteren Olivenkern. Daneben enden die Efferenzen der Purkinjezellen dieser Region in

### 3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE VERTEILUNG DES TRKC-REZEPTORS

---

der intermediären Kerngruppe der Kleinhirnkerne, also dem Nucleus interpositus (Int). Abbildung 8 zeigt photographisch Regionen aus dem Kleinhirn, in denen trkC immunhistochemisch nachweisbar ist.

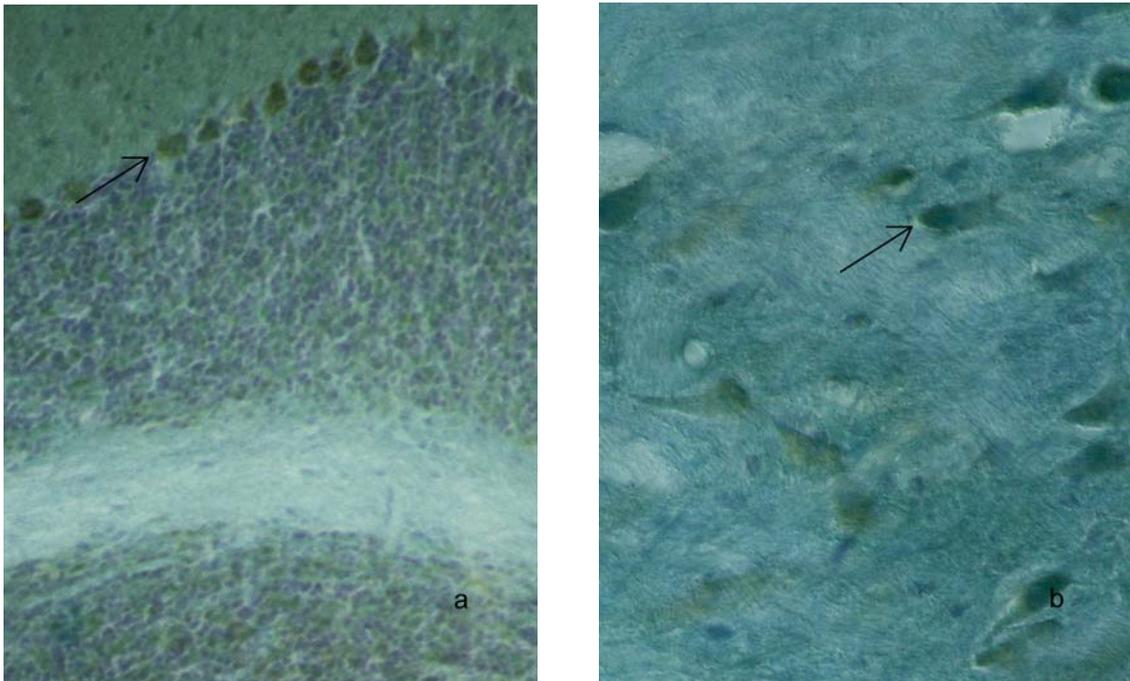


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Darstellung positiver Zellpopulationen aus dem Kleinhirn. Bild a Purkinjezellen, Vergrößerung 200fach, Bild b Med, Vergrößerung 400fach. Die Pfeile markieren je immunhistochemische Niederschläge.

#### 3.2 Elektronenmikroskopische Lokalisation des trkC Rezeptors

Die lichtmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse über die Lokalisation des trkC-Rezeptors wurden elektronenmikroskopisch noch genauer analysiert. Dazu wurden frontale Gefrierschnitte (sh. 2.2.2) aus dem Bereich des basalen Vorderhirns, des Mandelkernkomplexes und des magnozellulären Hypothalamus verwendet, als aus der Lichtmikroskopie bekannte trkC enthaltende Kerngebiete. Es bestätigt sich dabei identisch zur lichtmikroskopischen Auswertung, dass der Färbeniederschlag als Äquivalent des trkC-Rezeptors ausschließlich intrazellulär zu finden ist. Die sichtbar gemachten Proteinkomplexe sind bei genauer Analyse ausschließlich im Zytoplasma und hier fast immer in Zellkernnähe, niemals jedoch im Zellkern selbst oder in anderen Zellorganellen wie Mitochondrien zu finden. Sie zeigen sich meist clusterartig in Form von sekretorischen Granula zusammengelagert, jedoch auch frei im Zytoplasma vorkommendes Reaktionsprodukt ist sichtbar. Dies war in allen oben erwähnten elektronenmikroskopisch ausgewerteten Kernregionen gleich. Abbildung 9 zeigt in Bild a bis c eine positive Immunreaktion im basalen Vorderhirn, und zwar trkC enthaltende Neurone des Nucleus basalis Meynert (B). In Bild d ist die gleiche Zellpopulation zu sehen, wo zum Spezifitätsnachweis des verwendeten Antikörpers dieser vor dem Ansatz mit dem jeweiligen Hirnschnitt noch mit dem Peptid c-trk (peptide-1) inkubiert wurde (sh. 2.2.4). Hier kann keine Immunreaktion sichtbar gemacht werden.

### 3.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE LOKALISATION DES TRKC REZEPTORS

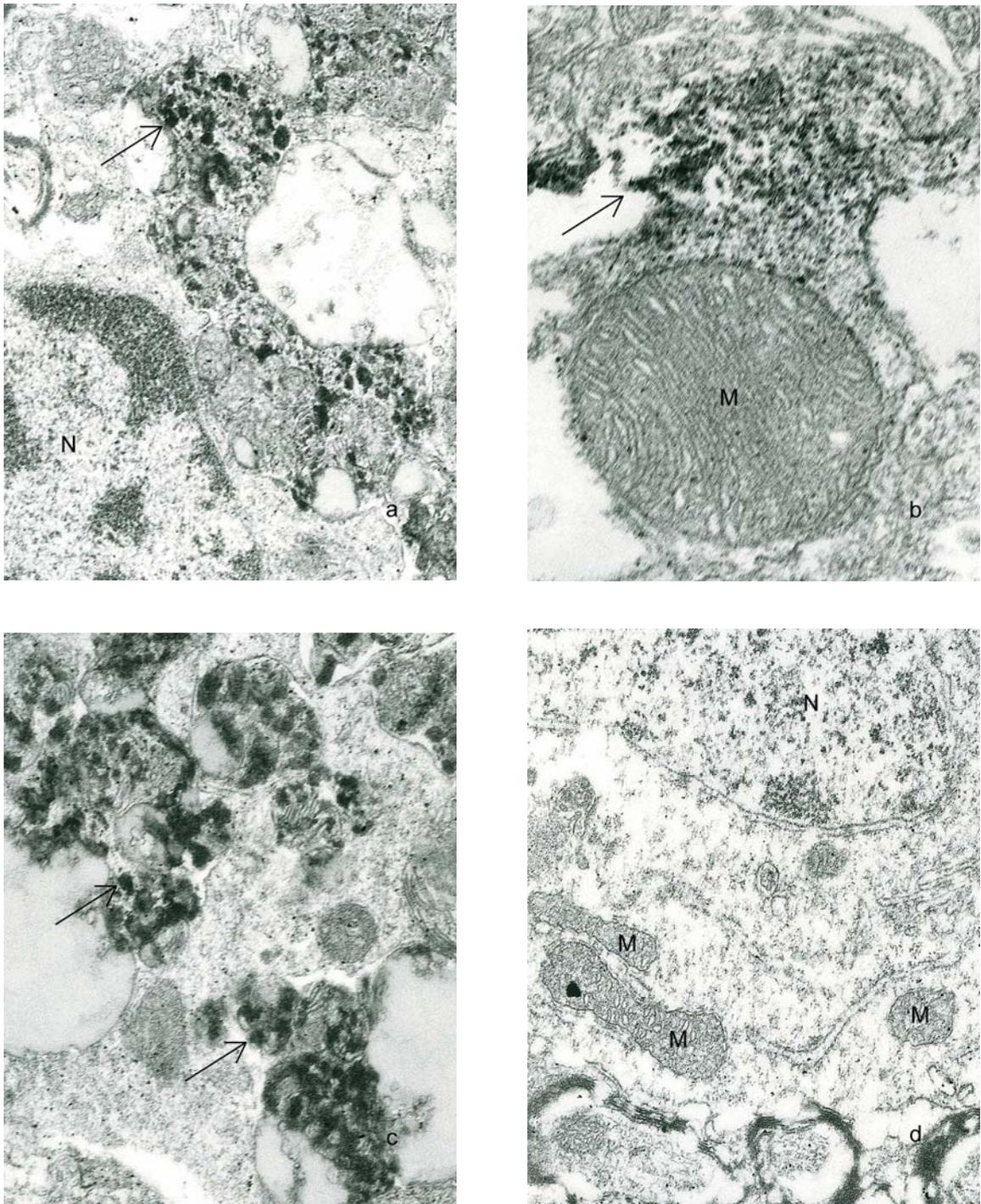


Abbildung 9: Bild a bis c elektronenmikroskopische Schnitte aus B. Positive Immunkomplexe (Pfeile) sind intrazellulär und in clusterartigen sekretorischen Granula in Zellkernnähe zu sehen. Bild d fehlende Immunreaktion in B im Spezifitätsnachweis des verwendeten Antikörpers. Mitochondrium (M), Nucleus (N). Vergrößerung 15.500fach und 28.500fach.

### 4 Diskussion

#### 4.1 Zelluläre Verteilung von trkA und trkB im ZNS von Säugern im Vergleich zu trkC als möglicher Hinweis auf eine Co-Expression

Eingangs wurde erwähnt, dass die Co-Expression von p75NTR mit trkA und trkB von funktioneller Bedeutung bezüglich der Affinität der jeweiligen Liganden an diese Rezeptoren ist bzw. über Tod oder Überleben der jeweiligen Zelle entscheidet. Aus diesen Ergebnissen stellt sich nun weiter die Frage, ob auch eine evtl. Co-Expression von trkC mit trkA oder trkB eine funktionelle Bedeutung hat. Aus diesem Grunde soll hier kurz ein Vergleich zwischen dem von anderen Autoren beschriebenen Vorkommen von trkA und trkB mit den Ergebnissen dieser Arbeit über das Vorkommen von trkC in bezug auf evtl. Co-Expression mit trkC gezogen werden.

So wurde Rezeptorprotein des trkA-Rezeptors durch STEININGER et al. bereits 1993 in cholinergen Neuronen, sowohl des basalen Vorderhirnes, als auch des Neostriatums immunhistochemisch nachgewiesen (STEININGER et al., 1993). KORDOWER et al. fanden zusätzlich noch Immunreaktivität im Nucleus caudatus und putamen (KORDOWER et al., 1994). Später wurde durch histochemische in situ Hybridisierung und Immunzytochemie systematisch die Verteilung von trkA aufgezeigt (HOLTZMANN et al., 1995). Dabei zeigte sich ein Vorkommen von trkA zusätzlich zu den schon bekannten cholinergen

#### 4.1 ZELLULÄRE VERTEILUNG VON TRKA UND TRKB IM ZNS VON SÄUGERN IM VERGLEICH ZU TRKC ALS MÖGLICHER HINWEIS AUF EINE CO-EXPRESSION

---

Zentren des basalen Vorderhirnes in nicht cholinergen Neuronen, nämlich im Nucleus paraventricularis (Pa) des Hypothalamus, im Nucleus interpeduncularis (rostraler und intermedialer Abschnitt), in verstreuten Neuronen der venterolateralen und paramedianen Medulla oblongata, im Nucleus hyperglossus und der Area postrema.

TrkB ist in neuronalen Dendriten sowohl im Hippocampus als auch im Cortex lokalisiert (FRYER et al., 1996, Yan et al., 1997), wo eine Subpopulation dieser Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (WU et al., 1996, LIN et al., 1998). Durch in situ Hybridisierung von mRNA des trkB-Rezeptors zeigten ALTAR et al. 1994 ein Vorkommen von trkB im Vorderhirn in weit verbreiteten Neuronenpopulationen, aber auch in nicht neuronalen Zellen im ZNS wie Astrozyten, Ependymzellen und Arachnoidalzellen. So fand sich trkB mRNA im olfactorischen System wie Bulbus olfactorius, in fast allen Schichten des Neocortex (Ausnahme Schicht I), weit verbreitet in den Basalganglien, der Hippocampusformation, im Mandelkernkomplex, in fast allen Kernen des Thalamus und Hypothalamus, der Substantia nigra, in den Neuronen der Nuclei Colliculi inferioris und superioris, in der Area ventralis tegmenti und dem zentralen Grau.

In einigen Zellregionen ist somit ein gemeinsames Vorkommen von trkA bzw. trkB und trkC nachweisbar, wie dies in Tabelle 2 gezeigt wird. Dabei soll explizit nochmals auf die unterschiedlichen Nachweismethoden für die jeweiligen

## 4 DISKUSSION

---

Rezeptoren hingewiesen werden. Ob eine Co-Expression der verschiedenen hoch-affinen Rezeptoren eine funktionelle Bedeutung hat, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht.

<b>Positiv nachgewiesene Zellpopulationen</b>	<b>trkA</b>	<b>trkB</b>	<b>trkC</b>
<b>Telencephalon</b>			
Rhinencephalon		mRNA	
Neocortex		mRNA	IR
Hippokampusformation		mRNA	IR
Basale Vorderhirnkerne	mRNA/IR	mRNA	IR
Mandelkernkomplex		mRNA	
Basalganglien	mRNA/IR	mRNA	
<b>Diencephalon</b>			
Thalamuskern		mRNA	IR
Hypothalamus	mRNA/IR	mRNA	IR
<b>Mesencephalon</b>			
Tectum/Nucleus colliculi inferiores (IC)		mRNA	IR
Nucleus interpeduncularis	mRNA/IR		
Verschiedene Hirnnervenkerne	mRNA/IR		IR
Nucleus ruber			IR
Substantia nigra		mRNA	IR
Area ventralis tegmenti (TSAI)		mRNA	IR
<b>Rhombencephalon</b>			
Pontine Kerne (Pn)			IR
Tegmentum pontis			IR
Formatio reticularis			IR
Kerngebiete der ventrolateralen und paramedianen Medulla oblongata	mRNA/IR		

#### 4.1 ZELLULÄRE VERTEILUNG VON TRKA UND TRKB IM ZNS VON SÄUGERN IM VERGLEICH ZU TRKC ALS MÖGLICHER HINWEIS AUF EINE CO-EXPRESSION

---

Hinterstrangkern/Nucleus cuneatus			IR
Locus coeruleus			IR
Area postrema	mRNA/IR		
Purkinje-Zellen			IR
Kleinhirnkerne			IR

Tabelle 2: Vergleich Vorkommen trkC (eigene Ergebnisse) mit trkA und trkB (Ergebnisse anderer Autoren im Text erwähnt) zur Darstellung möglicher Co-Expressionen der verschiedenen Neurotrophinrezeptoren. Die Nachweismethoden der jeweiligen Rezeptoren wurden folgendermaßen abgekürzt: Immunhistochemie (IR), in situ Hybridisierung von mRNA des Rezeptors (mRNA).

### 4.2 Vergleich des zentralvenösen trkC-Verteilungsmusters mit den Ergebnissen anderer Autoren und in Bezug auf das Vorkommen von NT-3

Einige Arbeitsgruppen schließen über den Funktionsausfall verschiedener genetisch veränderter Säugetiere auf die Lokalisation von NT-3 sensiblen Neuronen, andere über den Nachweis von m-RNA für trkC auf Vorhandensein von trkC selbst. Wenige Arbeitsgruppen haben bisher über den direkten Nachweis von trkC-Protein mittels Immunhistochemie das Vorkommen von trkC dargestellt, und dann jeweils nur in ausgewählten Hirnarealen. Den systematischen Nachweis der Verteilung von trkC im ZNS von Säugern vom Bulbus olfactorius bis in die Medulla oblongata mittels Immunhistochemie hat bisher noch keine Arbeitsgruppe erbracht.

Bezüglich des Vorkommens von trkC konnte MERLIO et al. schon 1992 zeigen, dass in den noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus aus der Familie der trk-Rezeptoren nur trkC exprimiert wird. Das Vorkommen des Rezeptors in dieser Region deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit. ALTAR et al. bewiesen 1994 durch in situ Hybridisierung von trkC mRNA und den Nachweis der hoch affinen Bindung zwischen Rezeptor und Ligand über den Nachweis von markiertem NT-3 das Vorkommen von trkC im Neocortex, Neostriatum, vorderen Kernen des Thalamus, Hypothalamus und anderen Regionen des Mittelhirnes. So wurde hier im Bulbus olfactorius in

## 4.2 VERGLEICH DES ZENTRALNERVÖSEN TRKC-VERTEILUNGSMUSTERS MIT DEN ERGEBNISSEN ANDERER AUTOREN UND IN BEZUG AUF DAS VORKOMMEN VON NT-3

---

verschiedenen Schichten, im Neocortex in allen sechs Schichten, in den verschiedenen Bestandteilen der Basalganglien beziehungsweise der basalen Vorderhirnkerne wie beispielsweise Septum, diagonales Band, Striatum, Putamen, Nucleus accumbens, Nucleus subthalamicus etc., in der Hippocampusformation wie Gyrus dentatus, Ammonshorn, Subiculum, Induseum griseum, Enterochinalcortex, in der Amygdala, in verschiedenen Zellen des ventralen Thalamus, in verschiedenen Zellen des Hypothalamus, der Substantia nigra trkC beziehungsweise Bindung von markiertem NT-3 nachgewiesen. Diese Arbeitsgruppe differenziert zusätzlich noch zwischen dem Vorkommen extrazellulärer Domänen des Rezeptors (Liganden-Bindungs-Abschnitt) und intrazellulären Domänen (Tyrosinkinase-Region), das allerdings identisch war. In der vorliegenden Arbeit wird trkC durch immunhistochemische Nachweismethoden in deutlich weniger Kerngebieten nachgewiesen, insbesondere sind Neocortex und Striatum frei von trkC, und auch weniger Kerngebiete des Thalamus sind als trkC enthaltende Regionen nachweisbar. Möglicherweise ist dies durch die Methodik bedingt. So ist mRNA durch in situ Hybridisierung schon in kleinsten Konzentrationen nachweisbar. Andererseits beweist das Vorkommen von mRNA des trkC-Rezeptors nicht das Vorkommen des Rezeptor selbst. Die Spezifität ist durch den immunhistochemischen Nachweis also deutlich höher. Daneben differieren die Ergebnisse der genannten Arbeitsgruppe auch in sich schon zwischen den beiden angewandten Methoden, was dadurch begründet wird, dass der Rezeptor zwar vorhanden sei, eine Bindung daran jedoch nicht unbedingt stattfindet. Teilweise

#### 4 DISKUSSION

---

war auch nur eine Bindung des markierten NT-3 ohne trkC mRNA zu finden. ALTAR et al. fanden daneben 1994 in nicht neuronalen Zellen kein Vorkommen von trkC mit Ausnahme von zerebralen Arterien und Arteriolen. Auch dieser Aspekt deckt sich nur teilweise mit meinen Untersuchungen, wo trkC durch immunhistochemische Untersuchungen in neurothelialen Zellen der Arachnoidea bzw. der Meningen nachzuweisen ist, wobei sich natürlich kapilläre Strukturen durch Schichten mit neurothelialen Zellverbänden ziehen.

ZHOU führte mit seiner Arbeitsgruppe immunhistochemische Färbungen von NT-3 im adulten Rattenhirn durch. Glial fand sich NT-3 vor allem im Corpus callosum, in der Substantia nigra, den Fimbrien des Hippocampus, in der subependymalen Region der Ventrikel und im Kleinhirn. Neuronal war NT-3 nachzuweisen im Vorderhirn in den Pyramidenzellen der fünften Schicht des Cortex, in Subpopulationen des Septums (Se), des Diagonalen Bandes (DB), im olfactorischen Cortex und der Amygdala. Im Hippocampus waren Pyramidenzellen in den Regionen CA1, CA2 und laterale Regionen von CA3 neben Körnerzellen des dorsalen Gyrus dentatus in unterschiedlichen Intensitäten immunhistochemisch anfärbbar. Daneben war NT-3 noch in mesencephalischen Neuronen im Nucleus trigeminus und in Motoneuronen im Hirnstamm nachweisbar. Auch in Purkinjezellen des Kleinhirnes und in Zellen der Kleinhirnkerne fand sich NT-3 (ZHOU et al., 1994). Im Vergleich zu meinen Ergebnissen zeigt sich, dass NT-3 häufig in den gleichen neuronalen Zellpopulationen wie sein hochaffiner Rezeptor nachweisbar ist. Die überwiegende Identität zwischen dem Vorkommen des trkC-Rezeptors aus

## 4.2 VERGLEICH DES ZENTRALNERVÖSEN TRKC-VERTEILUNGSMUSTERS MIT DEN ERGEBNISSEN ANDERER AUTOREN UND IN BEZUG AUF DAS VORKOMMEN VON NT-3

---

meinen Untersuchungen und dem Vorkommen von NT-3 bestätigt zum einen nochmals indirekt den retrograden Rezeptor-Liganden-Transportmechanismus nach der Aktivierung des Neurotrophinrezeptors und eine physiologische Funktion der Neurotrophine auch in adulten Neuronen. Bezüglich des Nachweises von NT-3 in Gliazellen zeigt sich ein wesentlicher Unterschied zu meinen Ergebnissen, wo sich in glialen Zellen kein trkC nachweisen lies. Diese differenten Ergebnisse bleiben unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Neurotrophine die Gliazellen nur als Wege zu ihren eigentlichen Zielzellen benutzen oder aber, dass möglicherweise noch andere Rezeptoren mit Neurotrophin-3 interagieren können. Dies scheint auch im Hinblick auf bekannte physiologische Wirkungen der Neurotrophine auf Gliazellen wahrscheinlich.

### 4.3 Mögliche Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von trkC

Bereits 2001 konnte YANO et al. zeigen, dass sich trkA intrazellulär vor allem an Zytoskelettanteilen im Bereich von Dynein anhäuft, was die Folgerung nahe legt, dass diese Struktur für den retrograden Transport des trkA-Liganden-Komplexes notwendig ist (YANO et al., 2001). Dies wiederum lässt vermuten, dass dabei Parallelen zum trkC-Liganden-Komplex vorhanden sind. Das Vorkommen eines retrograden trkC-Liganden-Komplexes wurde bisher noch nicht nachgewiesen, wobei die elektronenmikroskopischen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit diese These unterstützen. So ist trkC intrazellulär fast ausschließlich in Vesikeln ganz nahe dem Zellkern gefunden worden. Entlang der Axone gelang dabei jedoch kein Nachweis. Unklar bleibt auch, ob die intrazelluläre Lokalisation nicht stark abhängig ist vom Grad der zellulären Aktivität des jeweiligen Neurons bzw. dem gerade notwendigen Anpassungs- bzw. Plastizitätsprozess. So ist während der Entwicklung im Hirnstamm im Nucleus colliculi inferioris (IC) elektronenmikroskopisch trkC intrazellulär nicht in clusterartigen Vesikeln zu finden, sondern im präsynaptischen Neuron im Zytoplasma am Endoplasmatischen Reticulum und postsynaptisch an der Zellmembran (HAFIDI et al., 1996).

#### 4.4 Mögliche weitere bisher noch nicht nachgewiesene physiologische Funktionen von NT-3 am Nervensystem

Wie unter 1.4 bereits beschrieben, beeinflussen Neurotrophine physiologisch ein breites Spektrum von Synapsen, sowohl während der Entwicklung als auch im ausgereiften Nervensystem. Dabei interagieren Neurotrophine mit Neuronen, um über eine trophische Stimulation das Wachstum und die Differenzierung zu beeinflussen und sind grundsätzlich notwendig für ein langfristiges Überleben der Neurone durch Unterdrückung des programmierten Zelltodes (RAFFIONI et al., 1993; SNIDER, 1994; LEE et al., 2001b). Es wurde bereits erwähnt, dass bisher kein direkter Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Funktionalität des impliziten Gedächtnisses erbracht werden konnte. Der positive Nachweis von *trkC* in der Hippocampusformation (CA1 - CA3), in basalen Vorderhirnkernen, wie dem Nucleus basalis Meynert (B), in den Purkinjezellen der Kleinhirnrinde und im unteren Olivenkern im adulten Hirn der Ratte lässt jedoch die Vermutung aufkommen, dass das Vorhandensein von NT-3 durchaus Einfluss nimmt auf das Erlernen impliziter motorischer Fertigkeiten, wie beispielsweise Aufbringung der nötigen Kraft für einen bestimmten Bewegungsablauf.

Daneben ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht näher untersucht, ob NT-3 nicht eine mögliche autokrine oder parakrine Funktion in der Hippocampusformation einnimmt. Diese These stützt sich auf die

#### 4 DISKUSSION

---

Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass im Cornu ammonis in den Feldern CA1 bis CA3 trkC nachweisbar ist. Der Nachweis von NT-3-Protein gelang anderen Autoren in den Feldern CA2 bis CA4. MRNA für NT-3 findet sich jedoch nur im Feld CA2 und sehr medial im Feld CA1 (KATOH-SEMBA et al., 1996). Weiterhin wurde früher schon der Transport von markiertem NT-3 innerhalb des Hippocampus beschrieben (DISTEFANO et al., 1992). Ein Proteintransport in die Felder CA3 und CA4 aus anderen Hippocampusregionen scheint daher durchaus wahrscheinlich. Diese Behauptung einer neuen para- bzw. autokrinen Drüsenfunktion des Hippocampus konnte jedoch bisher noch nicht weiter bestätigt werden.

### 4.5 Möglicher therapeutischer Einsatz von NT-3 in der Klinik

Die Alzheimer Krankheit ist eine progressiv fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des ZNS. Sie ist gekennzeichnet durch den Verlust des Gedächtnisses und kognitiver Funktionen. Dabei ist zu Beginn der Erkrankung vor allem das Merken neuerer Fakten betroffen, später auch das Altgedächtnis und schließlich sogar das Erkennen der eigenen Person. Bei der großen Häufigkeit von zwei bis vier Prozent der Menschen über 60 Jahren und einer Verdoppelung der relativen Häufigkeit alle fünf Jahre nach dem 60. Lebensjahr (CUMMINGS, 1993), ist diese Erkrankung nach wie vor von großer sozioökonomischer Bedeutung. Pathophysiologisch findet man bei Morbus Alzheimer generalisiert im ZNS, vorwiegend jedoch im Hippocampus, der Amygdala und Neocortex, eine Häufung von unlöslichen Aggregaten modifizierter Proteinversionen, bestehend aus normalerweise mit dem Cytoskelett assoziierten helicalen Filamenten. Ähnlich lokalisiert kommt es daneben zur Bildung und Ablagerung von senilen Plaques, die eine mit unlöslichen Fibrillen gefüllte Kernregion enthalten. Dies entspricht unvollständig abgebauten Amyloid-Proteinen, umgeben von dystrophierten Neuriten. Des weiteren beobachtet man einen lokalisierten Zelluntergang in verschiedenen Gebieten des ZNS. Davon betroffen sind beispielsweise sowohl der cholinerge Nucleus basalis Meynert, als auch die noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus. Erfolglos blieben bis zum jetzigen Zeitpunkt medikamentöse Therapieversuche, die darauf abzielten, die Funktion der cholinergen Neuronen

zu verstärken. Im Gegensatz zum Nucleus basalis Meynert, wo neben trkC auch trkA und trkB nachweisbar ist (MERLIO et al., 1992), findet sich an den Neuronen des Locus coeruleus aus der Familie der trk-Rezeptoren nur trkC (sh. Tabelle 2 aus Abschnitt 4.1). Zudem konnten ARENAS und PERSSON 1994 zeigen, dass in vivo NT-3 die Degeneration erwachsener Neuronen im Bereich des Locus coeruleus schützt, was möglicherweise weiterhin einen neuen therapeutischen Ansatz bei neurodegenerativen Erkrankungen und hier insbesondere bei Morbus Alzheimer offen hält.

Ein neuerer möglicher therapeutischer Aspekt ergibt sich aus dem noch nicht lange nachgewiesenen Einfluss von NT-3 auf eine cerebrale Metastasierung von malignen Tumoren. Für eine Metastasierung werden von Tumorzellen bestimmte Fähigkeiten vorausgesetzt, die in einer festgesetzten Abfolge aufeinander treffen müssen (FIDLER, 2003). Studien haben gezeigt, dass für die Entstehung von cerebralen Metastasen zunächst die Tumorzelle an einem Mikrogefäß des Gehirns anhaften, danach die Blut-Hirn-Schranke überwinden und schließlich ein Wachstum in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren möglich sein muss (NICOLSON et al. 1996; YANO et al., 2000). Bei malignen Tumoren ist neben mehreren anderen Faktoren das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren Voraussetzung für deren Proliferation und Metastasierung. Zum einen ist die Proliferation, der Invasionsvorgang und das Überleben der Tumorzelle von der autokrinen Wirkung der Wachstumsfaktoren abhängig, zum anderen bewirken Wachstumsfaktoren parakrin die notwendige Angiogenese. (NICOLSON et al. 1996; YANO et al. 2000). Melanomzellen gehören zu der

Tumorzellart mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine cerebrale Metastasierung, was wohl am gemeinsamen ektodermalen Ursprung von Neuronen und Melanomzellen liegt. MARCHETTI et al. konnten 2003 zeigen, dass bioptisch gewonnene maligne Melanomzellen aus cerebralen Metastasen neben p75<sup>NTR</sup> auch trkC aufweisen, nicht jedoch trkA (MARCHETTI et al., 2003). Außerdem konnten in den Zellen ansteigende Mengen von NT-3 und NGF nachgewiesen werden. Dies könnte zukünftig bedeuten, dass eine wirksame Antagonisierung des NT-3 Wirkmechanismus ein möglicher therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Hirnmetastasen bei malignem Melanom darstellt.

Schon länger bekannt ist, dass die Neurotrophinrezeptoren p75, trkB und trkC in jungen adulten Ratten im Ganglion vestibulare nachweisbar sind. Die zugehörigen Neurotrophine BDNF und NT-3 finden sich in den Sinneszellen des Vestibularorganes (PIRVOLA et al., 1994). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von ZHANG et al. konnte 2005 zeigen, dass Trk-Rezeptoren und deren zugehörige Neurotrophine im Vestibularkomplex junger adulter Ratten während horizontaler Kopfbewegungen zur Verarbeitung der eingehenden gravitationsabhängigen Informationen beitragen. Eine Dysfunktion dieser Informationen führt klinisch unter anderem zu Schwindel. Diese Zusammenhänge lassen für die Zukunft die Vermutung aufkommen, dass durch Neurotrophine ein neuartiger Ansatz zur Schwindeltherapie entstehen könnte.

### 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die systematische Verteilung des trkC-Rezeptors für Nerotrophin-3 im ZNS der adulten Ratte vom Bulbus olfactorius bis zur Medulla oblongata untersucht. Dafür wurden Gefrierschnitte aus dem Gehirn mehrerer adulter Ratten angefertigt, davon repräsentative Schnitte ausgewählt und diese anschließend immunhistochemisch mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Oncogene Science markiert, der gegen trkC gerichtet ist. Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden daraufhin sorgfältig nach positiven Immunkomplexen untersucht. Durch weitere Färbemethoden, welche die Zellkerne und das Zytoplasma von Zellen jeder Art abgrenzen lassen, wurde das Vorkommen beobachteter Immunkomplexe bekannten anatomischen Regionen im Gehirn zugeordnet. Hierzu wurde ein Schnittatlas von PAXINOS und WATSON von 1986 verwendet. Über diese Ergebnisse wurden dann mit Hilfe eines Zeichentubus eigene Skizzen angefertigt. Daneben wurden die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass trkC ausschließlich in grauer Substanz jedoch in verschiedenen Kerngebieten im gesamten Gehirn vorkommt. Im einzelnen lässt sich trkC im Telencephalon im Hippokampus (CA1 - 3) und in Kernkomplexen des basalen Vorderhirnes, wie dem Nucleus basalis Meynert (B), dem vertikalen und horizontalen diagonalen Band (VDB und HDB) und in septalen Kernen (Se) nachweisen. Im Diencephalon findet man trkC im Nucleus anterodorsalis thalami (AD) und in verschiedenen Kernen des Hypothalamus,

wie den Nuclei corporis mamillaris, dem Nucleus hypothalamicus posterior (Hp), dem Nucleus hypothalamica dorsomedialis und ventromedialis (DM und VMH), dem Nucleus arcuatus (Arc), dem Nucleus paraventricularis (Pa) und dem Nucleus supraopticus (SO und SOR). Auch im Mesencephalon zeigt sich trkC, hier insbesondere im Nucleus colliculi inferioris (IC), im Nucleus nervi oculomotorius (3), im Nucleus ruber (R), im Nucleus tegmentalis dorsalis (GUDDEN) (DTg), der Substantia nigra (SNC und SNR) und Area ventralis tegmenti (TSAI) (VTA). Im Rhombencephalon ist trkC nachweisbar in den Pontinen Kernen (Pn), im Nucleus motorius nervi trigemini (Mo5), im Nucleus facialis (7), im Nucleus tractus solitarii (Sol), im Vestibularkomplex (Ve), im Nucleus dorsalis nervi vagi (10), im Nucleus ambiguus (Amb), in den Nuclei olivaris inferior und accessorius (IO und LSO), in kleineren Kernen der Formatio reticularis, im Nucleus cuneatus externus (Ecu), im Locus coeruleus und subcoeruleus (LC und SubC), in den Purkinjezellen des Pontocerebellums und in den Kleinhirnkernen Nucleus cerebellaris medialis und interpositus (Med und Int).

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von trkC im Gehirn von adulten Ratten untersucht. Dazu erfolgte eine elektronenmikroskopische Auswertung der aus der Lichtmikroskopie als trkC enthaltende bekannten Zellen. Auch diese Kerngebiete wurden zum genannten Zweck mit dem polyklonalen Antikörper der Firma Oncogene Science inkubiert, anschließend eingebettet und schließlich Dünnschnitte davon angefertigt. Von diesen Dünnschnitten erfolgte abschließend mit dem Elektronenmikroskop die

sorgfältige Auswertung und eine photographische Dokumentation. Hierbei bestätigten sich zum einen die Ergebnisse der Lichtmikroskopie hinsichtlich des ausschließlichen Vorkommens von trkC in grauer Substanz neben dem ausschließlichen Vorkommen von trkC im Cytosol. Zum anderen wurden die lichtmikroskopischen Ergebnisse um die Erkenntnis erweitert, dass trkC außerhalb von Zellorganellen häufig in Clustern angeordnet und meist in Zellkernnähe zu finden ist.

So konnte in dieser Arbeit eine systematische Darstellung des Vorkommens von trkC im Gehirn der Ratte erfolgen, die die bekannten Funktionen von NT-3 auf die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Neuronen der Säuger durch die Zuordnung zu Zellkomplexen mit bekannten Funktionen genauer verstehen lässt. Daneben lassen sich durch die systematische Darstellung des Vorkommens von trkC in Zellstrukturen im ZNS mit bekannten Funktionen auch weitere mögliche physiologische und therapeutische Möglichkeiten durch NT-3 mutmaßen, die jedoch noch Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

- ALOYZ, R. S., BAMJI, S. X., POZNIAK, C. D., TOMA, J. G., ATWAL, J., KAPLAN, D. R., MILLER, F. D. (1998) *p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors*. J. Cell Biol. 143:1691-1703
- ALTAR, C. A., SIUCIAK, J. A., WRIGHT, P., IP, N. Y., LINDSAY, R. M. und WIEGAND, S. J. (1994) *In Situ Hybridization of trkB and trkC Receptor mRNA in Rat Forebrain and Association with High-affinity Binding of [<sup>125</sup>I]NT-4/5 and [<sup>125</sup>I]NT-3*. Europ. J. Neurosci. 6:1389-1405
- ALTHAUS, H. H., KLÖPPNER, S., SCHMIDT-SCHULTZ, T. und SCHWARTZ, P. (1992) *Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain*. Neurosci Lett 135:219-223
- ANDERTON, B. H., CALLAHAN, L., COLEMAN, P., DAVIES, P., FLOOD, D., JICHA, G. A., OHM, T., WEAVER, C. (1998) *Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes*. Prog. Neurobiol. 55(6):595-609
- ARENAS, E. und PERSSON, H. (1994) *Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo*. Nature 367:368-371
- AREVALO, J. C., PEREIRA, D. B., YANO, H., TENG, K. K. und CHAO, M. V. (2006) *Identification of a Switch in Neurotrophin Signaling by Selective Tyrosine Phosphorylation*. J. Biol. Chem. 281:1001-1007

- BAMJI, S. X., MAJDAN, M., POZNIAK, C. D., BELLIVEAU, D. J., ALOYZ, R., KOHN, J., CAUSING, C. G., MILLER, F. D. (1998) *The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death*. J. Cell. Biol 140:911-923
- BARBACID, M. (1994) *The Trk Family of Neurotrophin Receptors*. J. Neurobiol. 25:1386-1403
- BARBACID, M. (1995) *Neurotrophic factors and their receptors*. Curr. Opin. Cell Biol. 7:148-155
- BARDE, Y.-A. (1989) *Trophic factors and neuronal survival*. Neuron 2:1525-1534
- BARDE, Y.-A., EDGAR, D. and THOENEN, H. (1982). *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J. 1: 549-553
- BARKER, P. A., LOMEN-HOERTH, C., GENSCH, E. M., MEAKIN, S. O., GLASS, D. J und SHOOTER, E. M. (1993) *Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor*. J. Biol. Chem. 268:15150-15157
- BARRES, B. A., SCHMID, R., SENDNTER, M. und RAFF, M. C. (1993) *Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival*. Development 118:283-295
- BARTHELD VON, C. S., BYERS, M. R., WILIAMS, R. und BOTHWELL, M. (1996) *Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system*. Lett. Nat. 379:830-833

- BEATTIE, M. S., Harrington, A. W., LEE, R., KIM, J. Y. BOYCE, S. L., LONGO, F. M., BRESNAHAN, J. C., HEMPSTEAD, B. L. und YOON, S. O. (2002) *ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury*. *Neuron* 36:375-386.
- BENNINGHOFF, A. (1985) *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Band 3. Verlag Urban & Schwarzenberg, 13./14. Auflage
- BERKEMEIER, L. R., WINSLOW, J. W., KAPLAN, D. R., NIKOLICS, K., GOEDEL, D. V. und ROSENTHAL, A. (1991) *Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB*. *Neuron* 7: 857-866
- BIBEL, M., HOPPE, E. und BARDE, Y. A. (1999) *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75<sup>NTR</sup>*. *EMBO J.* 18(3):616-622
- BIRREN, S. J., LO, L. und ANDERSON, D. J. (1993) *Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence*. *Development* 119: 597-610
- BLISS, T. V. P. und LØMO, T. (1973) *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. *J. Physiol* 232:331-356
- BLÖCHL, A. und SIRRENBURG, C. (1996) *Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75<sup>Lnt</sup> receptors*. *J. Biol. Chem.* 271:21100-21107

- BLÖCHL, A. und THOENEN, H. (1995) *Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway.* Eur. J. Neurosci. 7:1220-1228
- BLÖCHL, A. und THOENEN, H. (1996) *Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons.* Mol. Cell. Neurosci. 7:173-190
- BONHOEFFER, T. (1996) *Neurotrophins and activity-dependent development in the Neocortex.* Curr. Opin. Neurobiol. 6:119-126
- BORSON, S., SCHATTEMAN, G., CLAUDE, P. und BOTHWELL, M. (1994) *Neurotrophins in the Developing and Adult Primate Adenohypophysis: A New Pituitary Hormone System?* Neuroendocrinology 59:466-476
- BOTHWELL, M. (1991) *Keeping track of neurotrophin receptors.* Cell 65:915-918
- BOTHWELL, M. (1995) *Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors.* Annu. Rev. Neurosci. 18:223-253
- BRADSHAW, R. A. BLUNDELL, T. L., LAPATTO, R. et al. (1993) *Nerve growth factor revisited.* Trends Biochem Sci 18:48-52
- BROWN, T. H., KAIRISS, E. W. und KEENAN, C. L. (1990) *Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms.* Annu. Rev. Neurosci 13:475-511

- BURGERING, B. M. und COFFER, P. J. (1995) *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction*. Nature 376:599-602
- CABELLI, R. J., HOHN, A. und SHATZ, C. J (1995) *Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF*. Science 267(5204):1662-1666
- CAMPENOT, R. B. (1982) *Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II Local control of neurite survival by nerve growth factor*. Dev. Biol. 93 (1):13-21
- CANOSSA, M., GÄRTNER, A., CAMPANA, G., INAGAKI, N. und THOENEN, H. (2000) *Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate rous I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways*. EMBO J. 20:1640-1650
- CANOSSA, M., GRIESBECK, O., BERNINGER, B., CAMPANA, G., KOLBECK, R. und THOENEN, H. (1997) *Neurotrophins release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94:13279-13286
- CASTREN, E., THOENEN, H. und LINDHOLM D. (1995) *Brain-derived Neurotrophic Factor Messenger RNA is expressed in the Septum, Hypothalamus and in Adrenergic Brain Stem Nuclei of Adult Rat Brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular Nucleus*. Neuroscience 64(1):71-80

- CATANIA,, S., GERMANA, A., LAURA, R., GONZALEZ-MARTINEZ, T., CIRIACO, E. und V, J. A. (2003) *The crypt neurons in the olfactory epithelium of the adult zebrafish express TrkA-like immunoreactivity.* Neurosci Lett 350:5-8
- CELLERINO, A. und MAFFEI, L. (1996) *The action of neurotrophins in the development and plasticity of the visual cortex.* Prog. Neurobiol. 49:53-63
- CHAN, J. R., COSGAYA, J. M., WU Y. J. und SHOOTER E. M. (2001) *Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system.* Proc. Natl. Acad. Sci. 98(25):14661-14668
- CHAO, M. V. (1992) *Neurotrophin receptors: A window into neuronal differentiation.* Neuron 9:583-593
- CHAO, M. V. (2003) *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.* Nature Rev 4:299-309
- CORDON-CARDO, C., TAPLEY, P., JING, S., NANDURI, V., O'ROURKE, E., LAMBALLE, F., KOVARY, K., KLEIN, R., JONES, K. R., REICHHARDT, L. F. und BARBACID, M. (1991) *The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3.* Cell 66:173-183
- CUMMINGS, J. L. (1993) *Amnesia and memory disturbances in neurologic disorders.* In Oldham, J. M., RIBA, M. B., TASMAN, A. (Hg) Review of Psychiatry, Bd. 12 American Psychiatric Press, Washington DC

- DECHANT, G. und BARDE Y.-A. (2002) *The neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>: novel functions and implications for diseases of the nervous system.* Curr. Opin. Neurobiol. 10:381-391
- DAKO (1995) *Specification Sheet Code No. Z 0113.* Al/20.07.95
- DAVIES, A. M. (1990) *NGF synthesis and NGF receptor expression in the embryonic mouse trigeminal system.* J Physiol (Paris) 84(1):100-103
- DETHLEFFSEN, K., HEINRICH, G., LAUTH, M., KNAPIK, E. W. und MEYER, M. (2003) *Insert-containing neurotrophins in teleost fish and their relationship to nerve growth factor.* Mol Cell Neurosci 24:380-394
- DiCICCO-BLOOM, E., FRIEDMANN, W. J. und BLACK I. B. (1993) *NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival.* Neuron 33:9-12
- DiSTEFANO, P. S., FRIEDMANN, B., RADZIEJEWSKI, C., ALEXANDER, C., BOLAND, P., SCHICK, C. M., LINDSAY, R. M. und WIEGAND, S. J. (1992) *The neurotrophins, BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of axonal transport.* Neuron 8:983-993
- EGAN, S. E. und WEINBERG, R. A. (1993) *The pathway to signal achievement.* Nature 365:781-783
- ERNFORS, P., IBÁÑEZ, C. F., EBENDAL, T., OLSON, L. und PERSSON, H. (1990a) *Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5454-5458
- ERNFORS, P., WETMORE, C., OLSON, L. und PERSSON, H. (1990b)

*Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family.* Neuron 5:511-526

ESPOSITO, D., PATEL, P., STEPHENS, R. M., PEREZ, P., CHAO, M. V., KAPLAN, D. R. und HEMPSTEAD, B. L. (2001) *The Cytoplasmic and Transmembrane Domains of the p75 and TrkA Receptors Regulate High Affinity Binding to Nerve Growth Factor.* J. Biol. Chem. 276(35):32687-32695

FARINAS, I., JONES, K. R., BACKUS, C., WANG X-Y. und REICHARDT L. F. (1994) *Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3.* Nature 369:658-661

FIDLER, I. J. (2003) *The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited.* Nature Rev Cancer 3:1-6

FISCHER, W., GAGE, F. H. und BJORKLUND, A. (1989) *Degenerative Changes in Forebrain Cholinergic Nuclei Correlate with Cognitive Impairments in Aged Rats.* Eur. J. Neurosci. 1:34-45

FISCHER, W., BJORKLUND, A., CHEN, K. et al. (1991) *NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age.* J. Neurosci. 11:1889-1906

FRICK, H., LEONHARDT, H., STARCK, D. (1992) *Spezielle Anatomie I und II.* Thieme Verlag, 4. Auflage

- FRYER, R. H., KAPLAN, D. R., FEINSTEIN, S. C., RADEKE, M. J., GRAYSON, D. R. und KROMER, L. F. (1996) *Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain*. J Comp Neurol 374(1):21-40
- GALUSKE, R. A., KIM, D. S., CASTREN, E., THOENEN, H. und SINGER, W. (1996) *Brain-derived neurotrophic factor reversed experience-dependent synaptic modifications in kitten visual cortex*. Eur J Neurosci. 8(7):1554-1559
- GARTNER, A., SHOSTAK, Y., HACKEL, N., ETHELL, I. M. und THOENEN, H. (2000) *Ultrastructural identification of storage compartments and localization of activity-dependent secretion of neurotrophin 6 hippocampal neurons*. Mol Cell Neurosci 15:215-234
- GOTTSCHALK, W., POZZO-MILLER, L. D., FIGUROV, A. und LU, B. (1998) *Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus*. J. Neurosci. 18:6830-6839
- GÖTZ, R., KOSTER, R., WINKLER, C., RAULF, F., LOTTSPEICH, F., SCHARTL, M. und THOENEN, H. (1994) *Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family*. Nature, 372:266-269

- GRIESSBECK, O., CANOSSA, M., CAMPANA, G., GIRTNER, A., HOENER, M. C., NAWA, H., KOLBECK, R. und THOENEN, H. (1999) *Are there differences between the secretion characteristics of NGF und BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity.* Microsc. Res. Tech. 45:262-275
- HAFIDI, A., MOORE, T. und SANES, D. H. (1996) *Regional Distribution of Neurotrophin Receptors in the Developing Auditory Brainstem.* J. Comp. Neur. 367:454-464
- HALLBÖÖK, F., IBÁÑEZ, C. F., PERSSON, H. (1991) *Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary.* Neuron, 6: 845-858
- HALLBÖÖK, F., IBÁÑEZ, C. F., EBENDAL, T. und PERSSON, H. (1993) *Cellular Localization of Brain-derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 mRNA Expression in the Early Chicken Embryo.* Eur. J. Neurosci 5:1-14
- HEMPSTEAD, B. L., MARTIN-ZANCA, D., KAPLAN, D. R., PARADA, L. F. und CHAO, M. V. (1991) *High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor.* Nature 350:678-683
- HOFER, M., PAGLIUSI, S. R., HOHN, A., LEIBROCK, J. und BARDE, Y.-A. (1990) *Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain.* EMBO J. 9:2459-2464

- HOHN, A., LEIBROCK, J. BAILEY, K., und BARDE, Y.-A. (1990) *Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family*. Nature, 344:339-341
- HOLTZMANN, D. M., KILBRIDGE, J., LI, Y., CUNNINGHAM, E. T., LENN, N. J. CLARY, D. O., REICHARDT, L. F. und MOBLEY, W. C. (1995) *TrkA Expression in the CNS: Evidence for the Existence of Several Novel NGF-Responsive CNS Neurons*. J. Neurosci. 15(2):1567-1576
- HORIGOME, K., PRYOR, J. C., BULLOCK, E. D. und JOHNSON, E. M. JR. (1993) *Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation*. J Biol. Chem. 268:14881-14887
- HORY-LEE, F., RUSSELL, M., LINDSAY, R. M. und FRANK, E. (1993) *Neurotrophin 3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:2613-2617
- HUANG, E. und REICHARDT, L. (2001) *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu. Rev. Neurosci. 24:677-736
- IP, N. Y., IBÁÑEZ, C. F., NYE, S. H., McCLAIN, J., JONES, P. F., GIES, D. R., BELLUSCIO, L., LeBEAU, M. M., ESPINSOSA, R., SQUINTO, S. P., PERSSON, H. und YANCOPOULOS, G. D. (1992) *Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:3060-3064

- JING, S., TAPLEY, P. und BARBACID, M. (1992) *Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors*. Neuron 9:1067-1079
- JONES, K. R. und REICHHARDT, L. F. (1990) *Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8060-8064
- JOHNSON, D., LANAHAN, A., BUCK, C. R., SEHGAL, A., MORGAN, C. MERCER, E., BOTHWELL, M. und CHAO, M. (1986) *Expression and structure of the human NGF receptor*. Cell 47:545-554
- KAISHO, Y., YOSHIMURA, K. und NAKAHAMA, K. (1990) *Cloning and expression of cDNA encoding a novel human neurotrophic factor*. FEBS Lett. 266:187-191
- KALCHEIM, C., CARMELI, C. und ROSENTHAL, A. (1992) *Neurotrophin-3 is a mitogen for cultured neural crest cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1661-1665
- KALCHEIM, C. und GOLDSTEIN, R. S. (1991) *Segmentation of sensory and sympathetic ganglia: interactions between neural crest and somite cells*. J Physiol (Paris) 85(3):110-116
- KAPLAN, D. R., HEMPSTEAD, B. L., MARTIN-ZANCA, D., CHAO, M. V. und PARADA, L. F. (1991a) *The trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor*. Science 252:554-558

- KAPLAN, D. R., MARTIN-ZANCA, D. und PARADA L. F. (1991b) *Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF*. Nature 350:158-160
- KAPLAN, D. R. und MILLER, F. D. (2000) *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Curr. Opin. Neurobiol. 10:918-921
- KAPLAN, D. R. und STEPHENS, R. M. (1994) *Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor*. J. Neurobiol 25:1404-1417
- KATOH-SEMBA, R., KAISHO, Y., SHINTANI, A., NAGAHAMA, M. und KATO, K. (1996) *Tissue Distribution and Immunocytochemical Localization of Neurotrophin-3 in the Brain and Peripheral Tissues of Rats*. J Neurochem 66:330-337
- KLEIN, R., JING, S. Q., NANDURI, V., O'ROURKE, E. und BARBACID, M. (1991a) *The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor*. Cell 65:189-197
- KLEIN, R., LAMBALLE, F., BRYANT, S. und BARBACID, M. (1992) *The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4*. Neuron 8:947-956
- KLEIN, R., NANDURI, V., JING, S. Q., LAMBALLE, F., TAPLEY, P., BRYANT, S., CORDON-CARDO, C., JONES, K. R., REICHARDT, L. F. und BARBACID, M. (1991b). *The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3*. Cell 66:395-403

- KLEIN, R., PARADA, L. F., COULIER, F. und BARBACID, M. (1989) *trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development*. EMBO J. 8:3701-3709
- KLINKE, R. und SILBERNAGL, S. (1994) *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme-Verlag, 1. Auflage
- KNIPPER, M., LEUNG, L. S., ZHAO, D. und RYLETT, R. J. (1994) *Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF*. Neuroreport 5:2433-2436
- KORDOWER, J. H., CHEN, E-Y., SLADEK, J. R. und MUFSON, E. J. (1994) *TRK-Immunoreactivity in the Monkey Central Nervous System: Forebrain*. J. Comp. Neurol. 349:20-35
- KORTE M., CAROLL, P., WOLF, E., BREM, G., THOENEN, H. und BONHOEFFER, T. (1995) *Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92:8856-8860
- KORTE, M., GRIESBECK, O., GRAVEL, C., CARROLL, P., STAIGER, V., THOENEN, H. und BONHOEFFER, T. (1996) *Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 93:12547-12552
- KRÜTTGEN, A., MÖLLER, J. C., HEYMACH, J. V. und SHOOTER, E. M. (1998) *Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:9614-9619
- LAI, K. ., FU, W. Y., IP, F. C. und IP, N. Y. (1998) *Cloning an epression of a*

- novel neurotrophin, NT-7, from carp.* Mol Cell Neurosci 11:64-76
- LAMBALLE, F., KLEIN, R. und BARBACID, M. (1991) *trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3.* Cell 66:967-979
- LAMBALLE, F., TAPLEY, P. und BARBACID, M. (1993) *trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities.* EMBO J. 12:3083-3094
- LEE, F. S., CHAO, M. V. (2001a) *Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins.* PNAS 98(6):3555-3560
- LEE, R. KERMANI, P., TENG, K. . und HEMPSTEAD, B. L. (2001b) *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science 294: 1945-1948
- LEIBROCK, J., LOTTSPEICH, F., HOHN, A., HOFER, M., HENGERER, B., MASIAKOWSKI, P., THOENEN, H. und BARDE, Y.-A. (1989) *Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor.* Nature 341:149-152
- LESSMANN, V., GOTTMANN, K. und HEUMANN, R. (1994) *BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones.* Neuroreport 6:21-25
- LEVI-MONTALCINI, R. (1987) *The nerve growth factor 35 years later.* Science, 237:1154-1162

- LI, X., FRANZ, J., LOTTSPEICH, F. und GOTZ, R. (1997) *Recombinant fish neurotrophin-6 is a heparin-binding glycoprotein: implications for a role in axonal guidance*. *Biochem J.* 324:461-466
- LI, Y. X., ZHANG, Y. O., LESTER, H. A., SCHUMANN, E. M. und DAVIDSON, N. (1998) *Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons*. *J. Neurosci.*, 18:10231-10240
- LIN, S. Y., WU, K., LEVINE, E. S., MOUNT, H. T., SUEN, P. C. und BLACK, I. B. (1998) *BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55:20-27
- LINDHOLM, D., BERZAGHI, M. D., COOPER, J., THOENEN, H. und CASTREN, E. (1994) *Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 increase neurotrophin-3 expression in the rat hippocampus*. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12:745-751
- LINDSAY, R. M. (1993) *Brain-derived neurotrophic factors: an NGF-related neurotrophin*, in *Neurotrophic Factors* (Loughlin S. E. and Fallon J. F., eds), Academic Press, San Diego, pp 257-284
- LIU, J. C. und FU, W. M. (1997) *Regulation of quantal secretion from developing motoneurons by postsynaptic activity-dependent release of NT-3*. *J Neurosci.* 17(7):2459-68.

- LIOU, J. C., YANG, R. S. und FU, W. M. (1997) *Regulation of quantal secretion by neurotrophic factors at developing motoneurons in Xenopus cell cultures*. J Physiol. 503 ( Pt 1):129-139
- LO, D. C. (1995) *Neurotrophic factors and synaptic plasticity*. Neuron 15:979-981
- LO, KY, CHIN, WH, Ng, YP, CHENG, AW, CHEUNG, ZH, IP, NY (2005) *SLAM-associated protein as a potential negativ regulator of Trk signalling*. J Biol Chem 280(50):41744-41752
- LOEB, D. M., TSAO, H., COBB, M. H. und GREENE, L. A. (1992) *NGF and other growth factors induce an association between ERK1 and the NGF receptor, gp140<sup>prototr</sup>*. Neuron 9:1053-1065
- LOHOF, A. M., IP, N. Y. und POO, M. M. (1993) *Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophin NT-3 and BDNF*. Nature 363:350-353
- LU, B. und FIGAROV, A. (1997) *Role of neurotrophins in synapse development and plasticity*. Rev. Neurosci. 8:1-12
- MADISON, D. V., MALENKA, R. A. und NICOLL, R. A. (1991) *Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission*. Annu. Rev. Neurosci. 14:379-397
- MAFFEI, L., BERARDI, N., DOMENICI, L., PARISI, V., PIZZORUSSO, T. (1992) *Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats*. J Neurosci. 12(12):4651-4662
- MAISONPIERRE, P. C., BELLUSCIO, L., FRIEDMANN, B., ALDERSON, R. F.,

- WIEGAND, S. J., FURTH, M. E., LINDSAY, R. M. und Yancopoulos, G. D. (1990a) *NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression*. Neuron 5:501-509
- MAISONPIERRE, P. C., BELLUSCIO, L., SQUINTO, S. P., IP, N. Y., FURTH, M. E., LINDSAY, R. M. und YANCOPOULOS, G. D. (1990b) *Neurotrophin-3: A Neurotrophic Factor Related to NGF and BDNF*. Science 247:1446-1451
- MAJDAN, M. und MILLER, F. D. (1999) *Neuronal life and death decisions: Functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors*. Int. J. Dev. Neurosci 17(3):153-161
- MAMOUNAS, L. A., ALTAR, C. A., BLUE, M. E., KAPLAN, D. R., TESSAROLLO, L. und LYONS, W. E. (2000) *BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain*. J Neurosci. 20(2):771-782
- MARCHETTI, D., DENKINS, Y., REILAND, J. GREITER-WILE, A., GALJOUR, J. MURRY, B. BLUST, J. und ROY, M. (2003) *Brain-Metastatic Melanoma: a Neurotrophic Perspective*. Path Onc Res 9:147-158
- MARTIN-ZANCA, D., HUGHES, S. H. und BARBACID, M. (1986) *A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences*. Nature, 319: 743-748

- MARTIN-ZANCA, D., OSKAM, R., MITRA, G., COPELAND, T., und BARBACID, M. (1989) *Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene*. Mol. Cell. Biol. 9: 24-33
- McALLISTER, A. K., KATZ, L. C. und LO, D. C. (1995) *Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex*. Neuron 15:791-803
- McALLISTER, A. K., KATZ, L. C. und LO, D. C. (1996) *Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity*. Neuron 17:1057-1064
- McALLISTER, A. K., KATZ, L. C. und LO, D. C. (1997) *Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth*. Neuron 18:767-778
- McALLISTER, A. K., KATZ, L. C. und LO, D. C. (1999) *Neurotrophins and synaptic plasticity*. Annu. Rev. Neurosci 22:295-318
- MEAKIN, S. O. und SHOOTER, E. M. (1992a) *The nerve growth factor family of receptors*. Trends Neurosci 15:323-331
- MEAKIN, S.O., SUTER, U., DRINKWATER, C. C., WELCHER, A. A. und SHOOTER, E. M. (1992b) *The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2374-2378
- MENESINI-CHEN, M. G., GHEN, J. S. und LEVI-MONTALCINI, R. (1978) *Sympathetic nerve fibers ingrowth in the central nervous system of neonatal rodent upon intracerebral NGF injections*. Arch. Ital. Biol. 116(1):53-84

- MERLIO, J. P., ERNFORS, P., JABER, M. und PERSSON, H. (1992) *Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system*. *Neurosci* 3:513-532
- MIDDLEMAS, D. S., LINDBERG, R. A. und HUNTER, T. (1991) *trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors*. *Mol. Cell. Biol.* 11:143-153
- MILLER, F. D., KAPLAN, D. R. (2001a) *Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis*. *Cell Mol Life Sci* 58(8):1045-1053
- MILLER, F. D., KAPLAN, D. R. (2001b) *On Trk for retrograde signaling*. *Neuron* 32(5):767-770
- MILLER, F. D., KAPLAN, D. R. (2002) *Neurobiology. TRK makes the retrograde*. *Science* 295(5559):1471-1473
- MONTGOMERY, J. M. und MADISON, D. V. (2004) *Discrete synaptic states define a major mechanism of synaptic plasticity*. *Trends neurosci.* 27(12):744-750
- MOUNT, H. T. J., DREYFUS, C. F. und BLACK I. B. (1994) *Neurotrophin-3 selectively increases cultured Purkinje cell survival*. *Neuro report* 5(18): 2497-2500
- MOWLA, S. J., FARHADI, A. F., PAREEK, S., ATWAL, J. K., MORRIS, S. J., SEIDAH, N. G. und MURPHY, R. A. (2001) *Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor*. *J. Biol. Chem.* 276:12660-12666
- NICHOLLS, J. G., MARTIN, A. R. und WALLACE B. G. (2002) *Vom Neuron*

zum Gehirn Spektrum Akademischer Verlag GmbH

- NICOLSON, G. L., MENTER, D. G., HERRMANN, J. L et al (1996) *Brain metastasis: role of trophic, autocrine, and paracrine factors in tumor invasion and colonization of the central nervous system*. *Curr Top Microbiol Immunol* 213:89-115
- NILSSON, A. S., FAINZILBER, M., FALCK, P. und IBANEZ, C. F. (1998) *Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from zebrafish*. *FEBS Lett.* 424:285-290
- OBERMEIER, A., LAMMERS, R., WIESMÜLLER, K. H., JUNG, G., SCHLESSINGER, J. und ULLRICH, A. (1993) *Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex*. *J. Biol. Chem.* 268:22963-22966
- OHMACHI, M., DECKER, S. J., PANG, L. und SALTIEL, A. R. (1991) *Nerve growth factor binds to the 140 kd trk proto-oncogene product and stimulates its association with the src homology domain of phospholipase C<sub>γ</sub>1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 179:217-223
- OHMACHI, M., DECKER, S. J. und SALTIEL, A. R. (1992) *Activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase by Nerve Growth Factor Involves indirect Coupling of the trk Proto-Oncogene with src Homology 2 Domains*. *Neuron* 9:769-777
- ONCOGENE SCIENCE, INC. (1991) *Affinity purified Antibodies oncogene Proteins*. Cat# PC31 Rev. 9/14/92 C.S.
- ONCOGENE SCIENCE, INC. (1996) *Peptide Antigens*. Cat# PP01-PP62 Rev. 20-Sep-96 E.B.

- OPPENHEIM, R. W. (1991) *Cell death during development of the nervous system*. Annu. Rev. Neurosci 14: 453-501
- PATTERSON, S. L., ABEL, T., DEUEL, T. A. S., MARTIN, K. C., ROSE, J. C. und KANDEL, E. R. (1996) *Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice*. Neuron 16:1137-1145
- PAXINOS, G., WATSON, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Second Edition
- PELICCI, G., LANFRANCONE, L., GRIGNANI, F., McGLADE, J., CAVALLO, F., FORNI, G., NICOLETTE, I., GRIGNANI, F., PAWSON, T. und PELICCI, P. G. (1992) *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. Cell 70:93-104
- POO, M. M. (2001) *Neurotrophins as synaptic modulators*. Nature Rev. Neurosci. (2):24-31
- RADEKE, M. J., MISKO, T. P., HSU, C., HERZENBERG, L. A. und SHOOTER, E. M. (1987) *Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor*. Nature 325(6105):593-597
- RAFFIONI, S., BRADSHAW, R. A. und BUXSER, S. E. (1993) *The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins*. Annu. Rev. Biochem. 62:823-850

- RIDDLE, D. R., LO, D. C. und KATZ, L. C. (1995) *NT-4-mediated rescue of lateral geniculate neurons from effects of monocular deprivation*. Nature 378(6553):189-191
- ROBERTSON, E. D., ENGLISH, J. D. und SWEATT, J. D. (1996) *A biochemist's view of long-term potentiation*. Learn. & Mem. 3:1-24
- ROHEN, J. W. (1994) *Funktionelle Anatomie des Nervensystems*. Schattauer Verlag
- ROSENTHAL, A., GOEDEL, D. V., NGUYEN, T., LEWIS, M., SHIH, A., LARAMEE, G. R., NIKOLICS, K. und WINSLOW, J. W. (1990) *Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor*. Neuron 4:767-773
- ROSS, A. H. (1991) *Identification of tyrosine kinase Trk as a nerve growth factor receptor*. Cell Regulation 2:685-690
- SCHANEN-KING, C., NEL, A., WILLIAMS, L. K. und LANDRETH, G. (1991) *Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of MAP kinase in PC 12 cells*. Neuron 6:915-922
- SCHLESSINGER, J. und ULLRICH, A. (1992) *Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases*. Neuron 9:383-391
- SCHNELL, L., SCHNEIDER, R., KOLBECK, R. und al. (1994) *Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion*. Nature 367: 170-173

- SCHNEIDER, R. und SCHWEIGER, M. (1991) *A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors*. *Oncogene* 6:1807-1811
- SEGAL, R. A. und GREENBERG, M. E. (1996) *Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors*. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:463-489
- SHIEH, P. B., HU, S. C., BOBB, K., TIMMUSK, T. und GHOSH, A. (1998) *Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression*. *Neuron* 20:727-740
- SIGMA (1993), *Product No. R-5001 Anti-Rabbit IgG (whole molecule)*. Issued 05/93
- SNIDER, W. D. (1994) *Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us*. *Cell* 77:627-638
- SOLTHOFF, S. P., RABIN, S. L., CANTLEY, L. C. und KAPLAN, D. R. (1992) *Nerve growth factor promotes the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and its association with the trk tyrosine kinase*. *J. Biol. Chem.* 267:17472-17477
- SOPPET, D., ESCANDÓN, E., MARAGOS, J., MIDDLEMAS, D. S., REID, S. W., BLAIR, J., BURTON, L. E., STANTON, B. R., KAPLAN, D. R., HUNTER, T., NIKOLICS, K. und PARADA, L. F. (1991) *The neurotrophic factors, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor*. *Cell* 65:895-903

- SPITZER, M. (2000) *Geist im Netz, Modelle für Lernen, Denken und Handeln*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- SQUINTO, S., P., STITT, T. N., ALDRICH, T. H., DAVIS, S., BIANCO, S. M., RADZIEJEWSKI, C., GLASS, D. J., MASIAKOWSKI, P., FURTH, M. E., VALENZUELA, D. M., DISTEFANO, P. S. und YANCOPOULOS, G. D. (1991) *trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor*. *Cell* 65:885-893
- SQUIRE, L. R. und ZOLA-MORGAN, S. (1991) *The medial temporal lobe memory system*. *Science* 253:1380-1386
- STEININGER, T. L., WAINER, B. H., KLEIN, R., BARBACID, M., PALFREY, H. C. (1993) *High-affinity nerve growth factor receptor (Trk) immunoreactivity is localized in cholinergic neurons of the basal forebrain and striatum in the adult rat brain*. *Brain res* 612:330-335
- STEPHENS, R. M., LOEB, D. M., COPELAND, T. D., PAWSON, T., GREENE, L. A. und KAPLAN, D. R. (1994) *Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- $\gamma$ 1 to mediate NGF responses*. *Neuron* 12:691-705
- STERNBERGER, L. A. (1979) *The unlabeled antibody (PAP) method, introduction*. *J. Histochem. Cytochem.* 27 (12):1657
- STOOP, R., POO, M. M. (1995) *Potentialiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling*. *Science* 267:695-699

- SUEN, K. L., BUSTELO, X. R., PAWSON, T. und BARBACID, M. (1993) *Molecular cloning of the mouse grb2 gene: differential interaction of the Grb2 adapter protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors.* Mol. Cell. Biol. 13:5500-5512
- TANAKA, T., SAITO, H. und MATSUKI, N. (1997) *Inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus.* J. Neurosci. 17:2959-2966
- TAO, X., FINKBEINER, S., ARNOLD, D. B., SHAYWITZ, A. J. und GREENBERG, M. E. (1998) *Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism.* Neuron 20:709-726
- THOENEN, H. (1991) *The changing scene of neurotrophic factors.* Trends Neurosci 14:165-170
- THOENEN, H. (1995) *Neurotrophins and neuronal plasticity.* Science 270:593-598
- THOENEN, H., BANDTLOW, C. und HEUMANN, R. (1987) *The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery.* Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109:145-178
- TOJO, H., TAKAMI, K., KAISHO, Y., NAKATA, M., ABE, T., SHIHO, O. und IGARASHI, K. (1995) *Neurotrophin-3 is expressed in the posterior lobe of mouse cerebellum, but does not affect the cerebellar development.* Neurosci Lett 192:169-172
- TSOULFAS, P., SOPPET, D., ESCANDON, E., TESSAROLLO, L, MENDOZA-

- RAMIREZ, J. L., ROSENTHAL, A., NIKOLICS, K. und PARADA, L. F. (1993) *The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC 12 cells.* Neuron 10:975-990
- TSOULFAS, P., STEPHENS, R. M., KAPLAN, D. R. und PARADA, L. F. (1996) *TrkC Isoforms with Inserts in the Kinase Domain Show Impaired Signaling Responses.* J. Biol. Chem. 271:5691-5697
- URFER, R., TSOULFAS, P., SOPPET, D., ESCANDÓN, E., PARADA, L., AND PRESTA, L. (1994) *The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin.* EMBO J. 24: 5896-5909
- VAILLANT, A. R., MAZZONI, I., TUDAN, C., BOUDREAU, M., KAPLAN, D. R. und MILLER, F. D. (1999) *Depolarization and Neurotrophins Converge on the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway to Synergistically Regulate Neuronal Survival.* J. Cell. Biol 146(5):955-966
- VALENZUELA, D. M., MAISONPIERRE, P. C., GLASS, D. J., ROJAS, E., NUNEZ, L., KONG, Y., GIES, D. R., STITT, T. N., IP, N. Y. und YANCOPOULOS, G. D. (1993) *Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities.* Neuron 10:963-974
- VESA, J., KRÜTTGEN, A. und SHOOTER, E. M. (2000) *p75 Reduces TrkB Tyrosin Autophosphorylation in Response to Brain-derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 4/4.* J. Biol. Chem. 275:24414-24420
- VETTER, M. L., MARTIN-ZANCA, D., PARADA, L. F. BISHOP, J. M. und KAPLAN D. R. (1991) *Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine*

- phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associate with the product of the trk protooncogene.* Proc. Natl. Acad. Sci. 88:5650-5654
- WANG, J. H., KO, G. Y. und KELLY, P. T. (1997) *Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity.* J Clin Neurophysiol 14(4): 264-293
- WANG, X. H. und POO, M. M. (1997) *Potentialiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4.* Neuron 19:825-835
- WATSON, R. E. Jr., WIEGAND, S. J., CLOUGH, R. W. AND HOFFMANN, G. E. (1986) *Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology.* Peptides 7: 155-159
- WEIMANN, E. und KIESS, W. (1991) *Wachstumsfaktoren: Grundlagen, Biochemie und klinische Bedeutung.* Schattauer, Stuttgart 1-16
- WIDMER, H. R., KAPLN, D. R., RABIN, S. J., BECK, K. D., HEFTI, F. und KNUSEL, B. (1993) *Rapid phosphorylation of phospholipase C $\gamma$ 1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons.* J. Neurochem. 60:2111-2123
- WU, K., XU, J. L., SUEN, P. C., LEVINE, E., HUANG, Y. Y., MOUNT, H. T., LIN, S.Y. und BLACK I. B. (1996) *Functional *trkB* neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density.* Brain Res. Mol. Brain Res. 43:286-290
- XIE, K., WANG, T., OLAFSSON, P., MIZUNO, K. und LU., B. (1997) *Activity-dependent expression of NT-3 in muscle cells in culture: Implication in the development of neuromuscular junctions.* J. Neurosci. 17:2947-2958

- XU, B., GOTTSCHALK, W., CHOW, A. WILSON, R. I., SCHNELL, E., ZANG, K., WANG, D., NICOLL, R. A., LU, B. und REICHARDT, L. F. (2000) *The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptors in the Mature Hippocampus: Modulation of Long-Term Potentiation through a Presynaptic Mechanism involving TrkB*. J. Neurosci. 20(18):6888-6897
- YAMAMOTO, N. und HANAMURA, K. (2005) *Formation of the thalamocortical projection regulated differentially by BDNF- und NT-3-mediated signalling*. Rev. Neurosci. 16(3):223-231
- YAN, Q., ROSENFELD, R. D., MATHESON, C. R. HAWKINS, N., LOPEZ, O. T., BENNETT, L. und WELCHER, A. A. (1997) *Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system*. Neuroscience 78(2):431-48
- YANO, H., LEE, F. S., Kong, H., CHUANG, J-Z., AREVALO, J. C., PEREZ, P., SUNG, C-H., CHAO, M. V. (2001) *Association of Trk Neurotrophin Receptors with Components of the Cytoplasmic Dynein Motor*. J. Neurosci. 21:RC125:1-7
- YANO, S., SHINOHARA, H., HERBST, R. S. et al (2000) *Expression of vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis*. Cancer Res 60:4959-4967

ZHANG, FX., LAI, CH., TSE, YC., SHUM, DK., CHAN, YS (2005) *Expression of Trk receptors in otolith-related neurons in the vestibular nucleus of rats.*

Brain Res 1062(1-2):92-100

ZHOU, X-F., RUSH, R. A. (1994) *Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system.* Brain Research

643:162-172

## 7 Anhang

### 7.1 Verwendete Abkürzungen

Die für Kerngebiete und weiße Substanz im Text und den angefertigten Skizzen verwendeten Abkürzungen wurden in Anlehnung an *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (PAXINOS AND WATSON, 1986) gewählt:

3	Nucleus nervi oculomotorius
7	Nucleus facialis
10	Nucleus dorsalis nervi vagi
7n	Nervus facialis (einschließlich Wurzel)
3V	3. Ventrikel
4V	4. Ventrikel
ac	Commissura anterior
AD	Nucleus anterodorsalis thalami
Amb	Nucleus ambiguus
Arc	Nucleus arcuatus
as	Striae acusticae dorsales
B	Nucleus basalis Meynert
CA1 - 3	CA1- bis CA3-Felder des Cornus ammonis
cc	Corpus callosum
CPu	Striatum (Nucleus caudatus und Putamen)

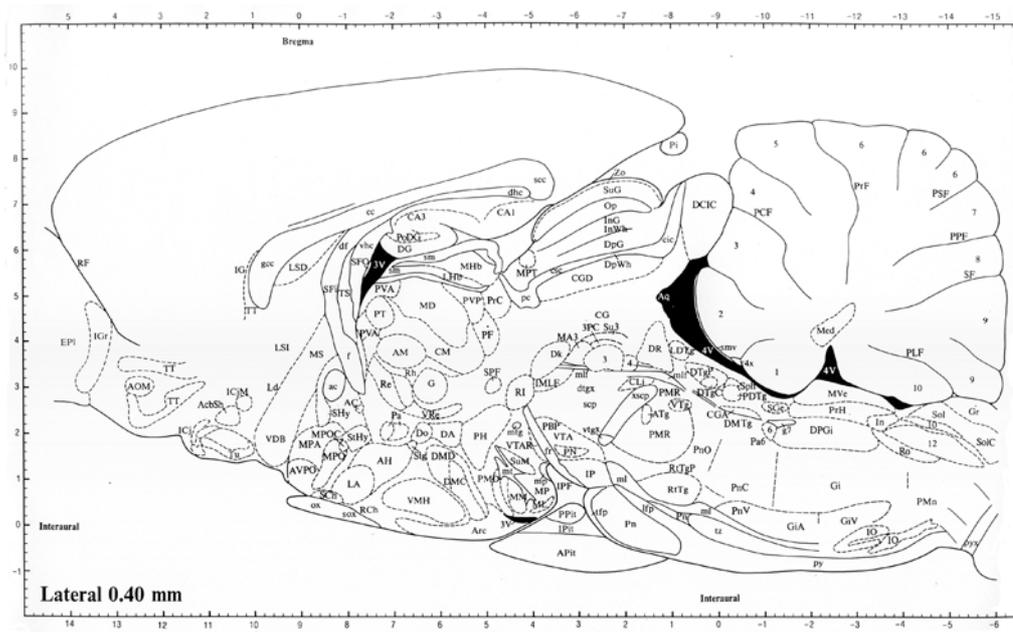
DG	Gyrus dentatus
DM	Nucleus hypothalamici dorsomedialis
DR	Nucleus raphes dorsalis
DTg	Nucleus tegmentalis dorsalis (GUDDEN)
ECu	Nucleus cuneatus externus
f	Fornix
fi	Fimbria hippocampi
HDB	horizontales diagonales Band
Hp	Regio hypothalamica posterior
ic	Capsula interna
IC	Nucleus colliculi inferioris
Int	Nucleus cerebellaris interpositus
IO	Nucleus olivaris inferior = Olivaria principalis
LC	Locus coeruleus
LSO	Nucleus olivaris accessorius
LV	lateraler Ventrikel
Med	Nucleus cerebellaris medialis
ml	Lemniscus medialis
mlf	Fasciculus longitudinalis medialis
Mo5	Nucleus motorius nervi trigemini
mt	Tractus mamillothalamicus = Fasciculus mamillothalamicus = Vicq d'Azyrsches Bündel
mtg	Tractus mamillosegmentalis
opt	Tractus opticus

ox	Chiasma opticum
Pa	Nucleus paraventricularis
PMR	Nucleus raphes paramedianus
Pn	Nucleus pontis
PPTg	Nucleus tegmentalis pedunculo pontinus
R	Nucleus ruber
Rt	Nucleus reticularis
RtTg	Nucleus reticulotegmentalis pontis
scp	Pedunculus cerebellaris superior
Se	Septale Kerne
sm	Stria medullaris thalami
SNC	Substantia nigra, Pars compacta
SNR	Substantia nigra, Pars reticulata
SO	Nucleus supraopticus
Sol	Nucleus tractus solitarii
SOR	Nucleus supraopticus, Pars retrochiasmalis
st	Stria terminalis
SubC	Nucleus subcoeruleus
VDB	vertikales diagonales Band
Ve	Vestibularkomplex
vhc	Commissura hippocampalis ventralis
VMH	Nucleus hypothalamici ventromedialis
VTA	Area ventralis tegmenti (TSAI)

### 7.2 Verwendete Skizzenvorlagen

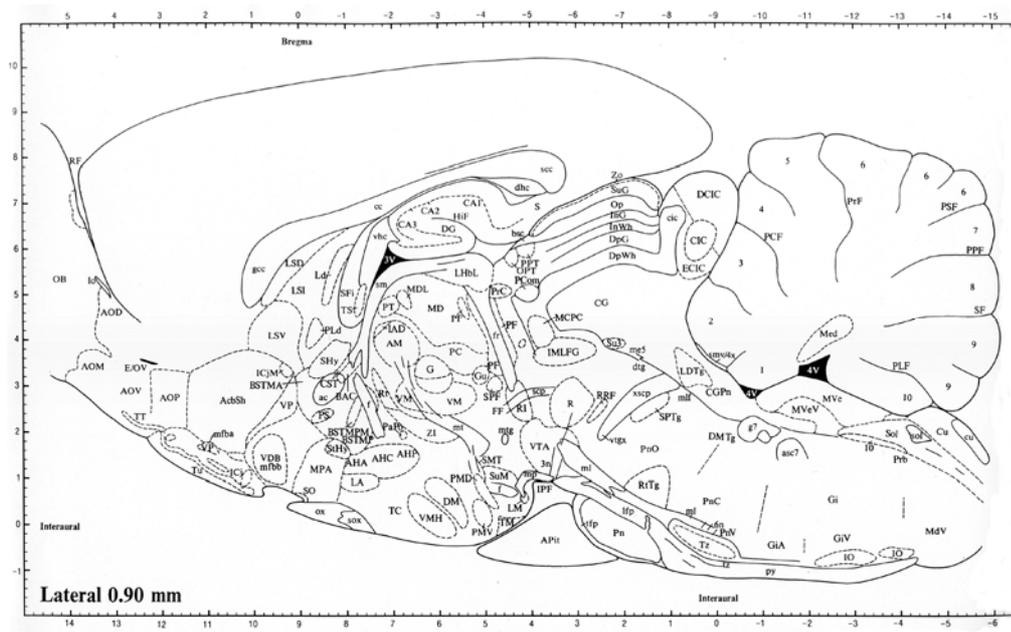
Als Grundlage für die in dieser Arbeit angefertigten Skizzen der sagittalen Hirnschnitte mit den darin dargestellten Neuronenpopulationen, in denen trkC nachweisbar ist (sh. 3.1), dienten die im folgenden abgebildeten Skizzenvorlagen 77 bis 82 aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (PAXINOS AND WATSON, 1986).





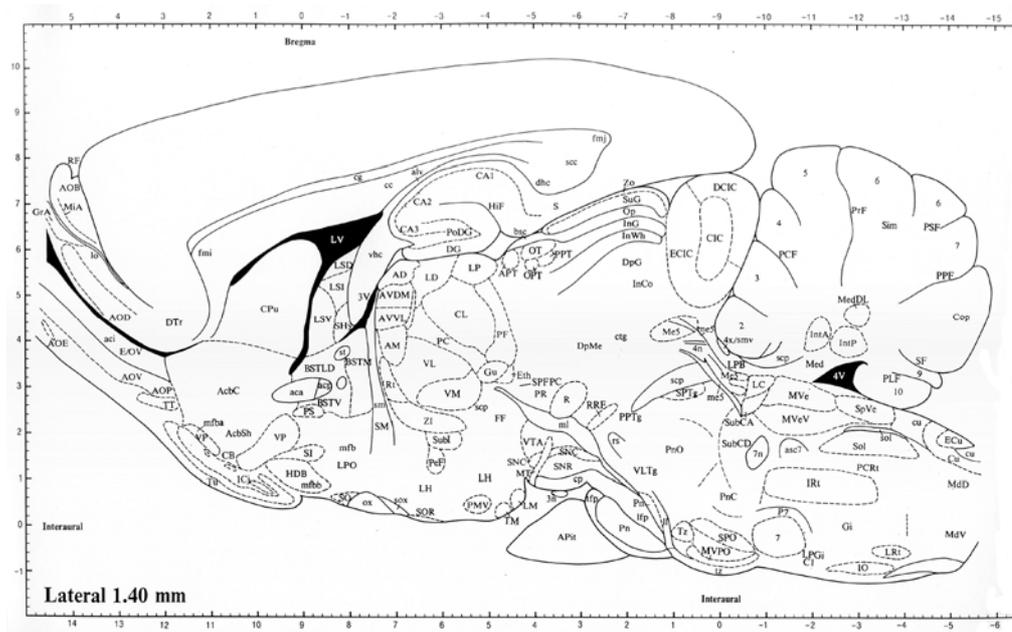
- |  |                                       |                                       |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1-10 cerebellar lobules                  | CM central medial thal nu             | ICj islands of Calleja                |
| 3 oculomotor nu                          | DA dorsal hypoth area                 | ICJM islands of Calleja, major island |
| 3PC oculomotor nu parvocellular          | DCIC dorsal cortex inf colliculus     | IG indusium griseum                   |
| 3V 3rd ventricle                         | df dorsal fornix                      | IGr internal granular layer olf bulb  |
| 4 trochlear nu                           | DG dentate gyrus                      | IMLF interstitial nu mlf              |
| 4V 4th ventricle                         | dhc dorsal hippocampal commissure     | In intercalated nu (medulla)          |
| 4x trochlear decussation                 | Dk nucleus Darkschewitsch             | InG intermediate gray layer sup col   |
| 6 abducens nu                            | DMC dorsomedial hypoth nu, compact    | InWh intermediate white layer sup col |
| 10 dorsal motor nu vagus                 | DMD dorsomedial hypoth nu, diffuse    | IO inferior olive                     |
| 12 hypoglossal nu                        | DMTG dorsomedial tegmental area       | IP interpeduncular nu                 |
| ac anterior commissure                   | Do dorsal hypoth nu                   | IPF interpeduncular fossa             |
| AC anterior commissural nu               | DpG deep gray layer of superior coll  | IPit intermediate lobe pituitary      |
| AcbSh accumbens nu, shell                | DPGi dorsal paragigocellular nu       | LA lateroanterior hypoth nu           |
| AH anterior hypoth area                  | DpWh deep white layer of sup coll     | Ld lambdoid septal zone               |
| AM anteromedial thal nu                  | DR dorsal raphe nu                    | LDTG laterodorsal tegmental nu        |
| AOM anterior olfactory nu, medial        | DTGC dorsal tegmental nu, central     | lfp longitudinal fasciculus pons      |
| APit anterior lobe pituitary             | DTGP dorsal tegmental nu, pericentral | LHb lateral habenular nu              |
| Aq aqueduct                              | dtgx dorsal tegmental decussation     | LSD lateral septal nu, dorsal         |
| Arc arcuate hypoth nu                    | EPI external plexiform layer olf bulb | LSI lateral septal nu, intermediate   |
| ATg anterior tegmental nu                | f fornix                              | MA3 medial acs oculomotor nu          |
| AVPO anteroventral preoptic nu           | fr fasciculus retroflexus             | MD mediadorsal thal nu                |
| CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn       | G gelatinous thal nu                  | Med medial cerebellar nu              |
| cc corpus callosum                       | g7 genu facial nerve                  | MHb medial habenular nu               |
| CG central gray                          | gcc genu corpus callosum              | ML medial mammillary nu, lateral      |
| CGA central gray, alpha                  | Gi giganto-cellular reticular nu      | ml medial lemniscus                   |
| CGD central gray, dorsal                 | GIA gigantocell reticular nu, alpha   | mif medial longitudinal fasciculus    |
| cic commissure inferior colliculus       | Giv gigantocell reticular nu, vent    | MM medial mammillary nu, medial       |
| CLI caudal linear nu raphe               | Gr gracile nu                         | MP medial mammillary nu, posterior    |
| mp mammillary peduncle                   | PnV pontine reticular nu, ventral     | smv superior medullary velum          |
| MPA medial preoptic area                 | PoDG polymorph layer dentate gyrus    | Sol nu solitary tract                 |
| MPO medial preoptic nu                   | PPF prepyramidal fissure              | SolC nu solitary tract commissural    |
| MPOC medial preoptic nu, central         | PPit posterior lobe pituitary         | sox supraoptic decussation            |
| MPT medial pretectal nu                  | PrC precommissural nu                 | SPF subparafascicular thal nu         |
| MS medial septal nu                      | PrF primary fissure                   | Sph sphenoid nu                       |
| mt mammillothalamic tract                | PSF posterior superior fissure        | Stg stigmoid hypoth nu                |
| mtg mammillotegmental tract              | PT paratenial thal nu                 | SHy striohypothalamic nu              |
| MVe medial vestibular nu                 | PVA paraventricular thal nu, anterior | Su3 supraoculomotor central gray      |
| Op optic nerve layer superior colliculus | PVP paraventricular thal nu, post     | SuG superficial gray layer sup col    |
| ox optic chiasm                          | py pyramidal tract                    | SuM supramammillary nu                |
| Pa paraventricular hypoth nu             | pyx pyramidal decussation             | tfp transverse fibers pons            |
| Pa6 paraabducens nu                      | RCh retrochiasmatic area              | TS triangular septal nu               |
| PBP parabrachial pigmented nu            | Re reuniens thal nu                   | TT tenia tecta                        |
| pc posterior commissure                  | RF rhinal fissure                     | Tu olfactory tubercle                 |
| PCF preculminate fissure                 | Rh rhomboid thal nu                   | tz trapezoid body                     |
| PDTg posterodorsal tegmental nu          | RI rostral intersitial nu mlf         | VDB nu vertical limb diagonal band    |
| PF parafascicular thal nu                | Ro nu Roller                          | vhc ventral hip commissure            |
| PH posterior hypoth area                 | RiTg reticulotegmental nu pons        | VMH ventromedial hypoth nu            |
| Pi pineal gland                          | RiTgP reticuloteg nu pons, pericent   | VRe ventral reuniens nu               |
| PLF posterolateral fissure               | sec splenium corpus callosum          | VTA ventral tegmental area            |
| PMD premammillary nu, dorsal             | SCh suprachiasmatic nu                | VTAR vent tegmental area, rostral     |
| PMn paramedian reticular nu              | scp superior cerebellar peduncle      | VTG ventral tegmental nu              |
| PMR paramedian raphe                     | SF secondary fissure                  | vtgx ventral tegmental decussation    |
| Pn pontine nucleus                       | SFI septofimbrial nu                  | axcp decussation sup Cb peduncle      |
| PN paramarginal nu                       | SGe supragenual nu                    | Zo zonal layer superior colliculus    |
| PnC pontine reticular nu, caudal         | SHy septohypothalamic nu              |                                       |
| PnO pontine reticular nu, oral           | sm stria medullaris thal              |                                       |

Abbildung 11: Skizzenvorlage 78 mit zugehöriger Legende aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von PAXINOS und WATSON, 1986



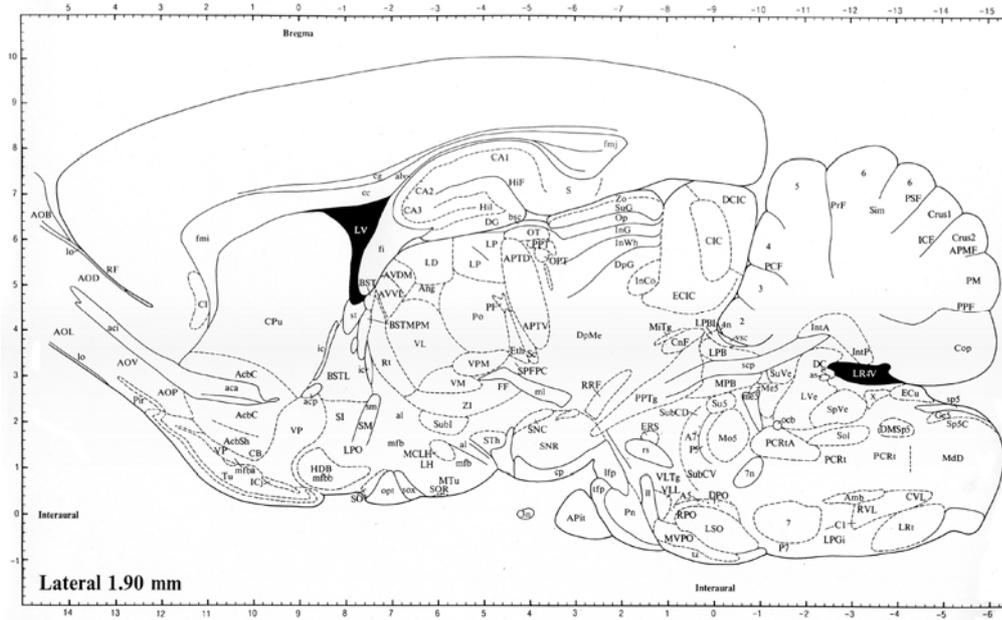
1-10 cerebellar lobules	cic commissure inferior colliculus	ICjM islands of Calleja, major island
3n oculomotor nerve or its root	CST nu commissural stria term	IMLFG interstitial nu mlf, greater
4V 4th ventricle	cu cuneate fasciculus	InG intermediate gray layer sup col
4x trochlear decussation	Cu cuneate nu	InWh intermediate white layer sup col
6n root of abducens nerve	D3V dorsal third ventricle	IO inferior olive
10 dorsal motor nu vagus	DCIC dorsal cortex inf colliculus	IPF interpeduncular fossa
ac anterior commissure	DG dentate gyrus	LA lateroanterior hypoth nu
AcbSh accumbens nu, shell	dhc dorsal hippocampal commissure	Ld lambdoid septal zone
AHA anterior hypoth area, anterior	DM dorsomedial hypothalamic nu	LDTg laterodorsal tegmental nu
AHC anterior hypoth area, central	DMTg dorsomedial tegmental area	lfp longitudinal fasciculus pons
AHP anterior hypoth area, posterior	DpG deep gray layer of superior coll	LHbL lateral habenular nu, lateral
AM anteromedial thal nu	DpWh deep white layer of superior coll	LM lateral mammillary nu
AOD anterior olfactory nu, dorsal	dtg dorsal tegmental bundle	lo lateral olfactory tract
AOM anterior olfactory nu, medial	E ependyma and subependymal layer	LSD lateral septal nu, dorsal
AOP anterior olfactory nu, posterior	ECIC external cortex inf colliculus	LSI lateral septal nu, intermediate
AOV anterior olfactory nu ventral	f fornix	LSV lateral septal nu, ventral
APit anterior lobe pituitary	FF fields of Forel	MCPC magnocellular nu post com
asc7 ascending fibers facial nerve	fr fasciculus retroflexus	MD mediadorsal thal nu
BAC bed nu anterior commissure	g7 genu facial nerve	MDV medullary reticular nu, ventral
bsc brachium superior colliculus	G gelatinosus thal nu	me5 mesencephalic trigeminal tract
BSTMA bed nu stria ter, med div, ant	gcc genu corpus callosum	Med medial cerebellar nu
BSTMP bed nu st, med div, posterior	Gi gigantocellular reticular nu	miba medial forebrain bundle, a
BSTMPM bed nu st, med posteromed	GIA gigantocell reticular nu, alpha	mibb medial forebrain bundle, b
CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn	GIV gigantocell reticular nu, vent	ml medial lemniscus
cc corpus callosum	Gu gustatory thal nu	mlf medial longitudinal fasciculus
CG central gray	HIF hippocampal fissure	mp mammillary peduncle
CGPn central gray pons	IAD interanterodorsal thalamic nucleus	MPA medial preoptic area
CIC central nu inferior colliculus	ICj islands of Calleja	
mt mammillothalamic tract	PSF posterior superior fissure	TC tuber cinereum
mtg mammillotegmental tract	PT paratenial thal nu	tfp transverse fibers pons
MVe medial vestibular nu	py pyramidal tract	TS triangular septal nu
MVeV medial vestibular nu, ventral	R red nu	TT tenia tecta
OB olfactory bulb	RF rhinal fissure	Tu olfactory tubercle
Op optic nerve layer superior colliculus	RI rostral interstitial nu mlf	TM tuberomammillary nu
OPT olivary pretectal nu	RRF retrobulbar fields	Tz nu trapezoid body
OV olfactory ventricle	Rt reticular thal nu	tz trapezoid body
ox optic chiasm	RTg reticulotegmental nu pons	VDB nu vertical limb diagonal band
PaPo paraventricular hypoth nu, post	S subiculum	vhc ventral hip commissure
PC paracentral thal nu	sec splenium corpus callosum	VM ventromedial thal nu
PCF preculminate fissure	scp superior cerebellar peduncle	VMH ventromedial hypoth nu
PCom nu posterior commissure	SF secondary fissure	VP ventral pallidum
PF parafascicular thal nu	SFI septofimbrial nu	VTA ventral tegmental area
PLd paralambdoid septal nu	SHy septohypothalamic nu	vigx ventral tegmental decussation
PLF posterolateral fissure	sm stria medullaris thal	xscp decussation sup Cb peduncle
PMD premammillary nu, dorsal	SMT submammillothalamic nu	ZI zona incerta
PMV premammillary nu, ventral	smv superior medullary velum	
Pn pontine nuclei	SO supraoptic nu	
PnC pontine reticular nu, caudal	Sol nu solitary tract	
PnO pontine reticular nu, oral	sol solitary tract	
PnV pontine reticular nu, ventral	sox supraoptic decussation	
PPF prepyramidal fissure	SPF subparafascicular thal nu	
PPT posterior pretectal nu	SPTg subpeduncular tegmental nu	
Prb nu Probst's bundle	SHy striohypothalamic nu	
PrC precommissural nu	Su3 supraoculomotor central gray	
PrF primary fissure	SuG superficial gray layer sup col	
PS parastrial nu	SuM supramammillary nu	

Abbildung 12: Skizzenvorlage 79 mit zugehöriger Legende aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von PAXINOS und WATSON, 1986



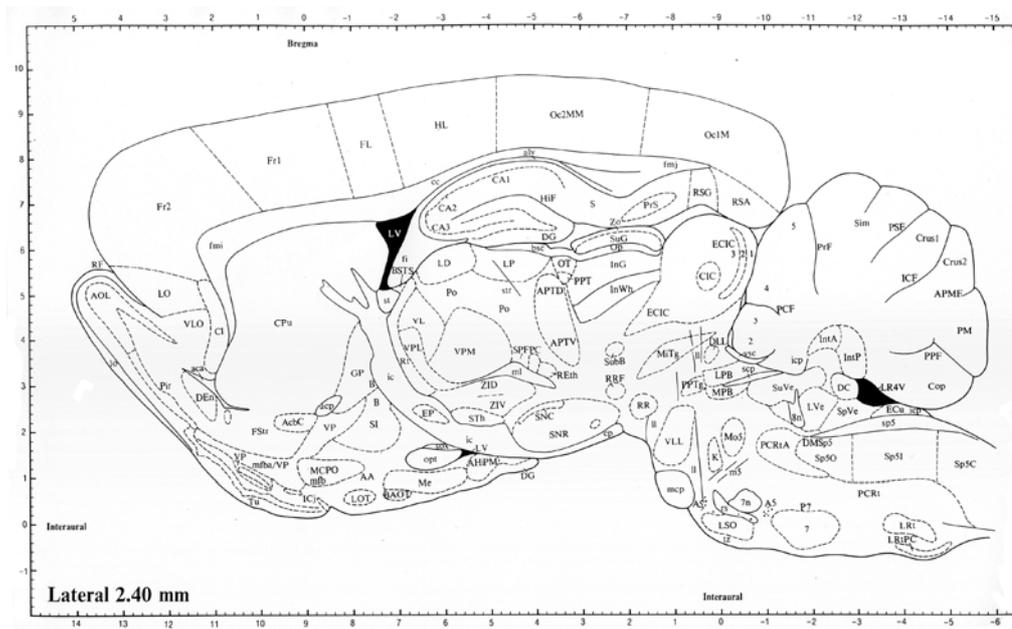
- |                                       |                                      |                                       |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1-10 cerebellar lobules               | BSTV bed nu stria ter, ventral div   | GRA granule cell layer acs' olf bulb  |
| 3n oculomotor nerve or its root       | C1 C1 adrenaline cells               | Gu gustatory thal nu                  |
| 3V 3rd ventricle                      | CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn   | HDB nu horizontal limb diagonal band  |
| 4n trochlear nerve or its root        | CB cell bridges ventral striatum     | HIF hippocampal fissure               |
| 4V 4th ventricle                      | cc corpus callosum                   | ICj islands of Calleja                |
| 4x trochlear decussation              | cg cingulum                          | InG intermediate gray layer sup col   |
| 7 facial nu                           | CIC central nu inferior colliculus   | InCo intercollicular nu               |
| 7n facial nerve or its root           | CL centrolateral thal nu             | IntA interposed cerebellar nu, ant    |
| aca anterior commissure, anterior     | Cop copula pyramis                   | IntP interposed cerebellar nu, post   |
| AcBC accumbens nu, core               | cp cerebral peduncle, basal          | InWh intermediate white layer sup col |
| AcBsh accumbens nu, shell             | CPu caudate putamen                  | IO inferior olive                     |
| aci anterior commissure, intrabulbar  | cig central tegmental tract          | IRt intermediate reticular nu         |
| acp anterior commissure, posterior    | cu cuneate fasciculus                | LC locus coeruleus                    |
| AD anterodorsal thal nu               | Cu cuneate nu                        | LD laterodorsal thal nu               |
| alv alvius hippocampus                | DCIC dorsal cortex inf colliculus    | lfp longitudinal fasciculus pons      |
| AM anteromedial thal nu               | DG dentate gyrus                     | LH lateral hypoth area                |
| AOB accessory olfactory bulb          | dhc dorsal hippocampal commissure    | ll lateral lemniscus                  |
| AOD anterior olfactory nu, dorsal     | DpG deep gray layer of superior coll | LM lateral mammillary nu              |
| AOE anterior olfactory nu, external   | DpMe deep mesencephalic nu           | lo lateral olfactory tract            |
| AOP anterior olfactory nu, posterior  | DpWh deep white layer of sup coll    | LP lateral posterior thal nu          |
| AOV anterior olfactory nu, ventral    | DTr dorsal transition zone           | LPB lateral parabulbar nu             |
| APit anterior lobe pituitary          | E ependyma and subependymal layer    | LPGi lateral paragigantocellular nu   |
| APT anterior pretecal nu              | ECIC external cortex inf colliculus  | LPO lateral preoptic area             |
| asc7 ascending fibers facial nerve    | ECu external cuneate nu              | LRt lateral reticular nu              |
| AVDM anteroventral thal nu, dorsomed  | Eth ethmoid thal nu                  | LSD lateral septal nu, dorsal         |
| AVVL anteroventral thal nu, ventrolat | FF fields of Forel                   | LSI lateral septal nu, intermediate   |
| bsc brachium superior colliculus      | fmi forceps minor corpus callosum    | LSV lateral septal nu, ventral        |
| BSTLD bed nu stria ter, lat div, dors | fmi forceps minor corpus callosum    | LV lateral ventricle                  |
|                                       | fmj forceps major corpus callosum    |                                       |
| MdV medullary reticular nu, ventral   | PnO pontine reticular nu, oral       | SOR supraoptic nu, retrochiasmatic    |
| Me5 mesencephalic trigeminal nu       | PodG polymorph layer dentate gyrus   | sox supraoptic decussation            |
| me5 mesencephalic trigeminal tract    | PPF prepyramidal fissure             | SPO superior paraolivary nu           |
| Med medial cerebellar nu              | PPT posterior pretecal nu            | SPTg subpeduncular tegmental nu       |
| MedDL medial CB nu dorsolat           | PPTg pedunculo-pontine tegmental nu  | SpVe spinal vestibular nu             |
| mfb medial forebrain bundle           | PR pretrabral field                  | st stria terminalis                   |
| mfa medial forebrain bundle, a        | PrF primary fissure                  | SubCA subcoeruleus nu, alpha          |
| mfb medial forebrain bundle, b        | PS parastrial nu                     | SubCD subcoeruleus nu, dorsal         |
| MiA mitral cell layer acs olf bulb    | PSF posterior superior fissure       | Subl subincertal nu                   |
| ml medial lemniscus                   | R red nu                             | SuG superficial gray layer sup col    |
| MT med terminal nu accessory optic tr | RF rhinal fissure                    | tfp transverse fibers pons            |
| MVe medial vestibular nu              | RRF retrorubral fields               | TM tuberomammillary nu                |
| MVeV medial vestibular nu, ventral    | rs rubrospinal tract                 | TT tenia tecta                        |
| MVPO medioventral periolivary nu      | Rt reticular thal nu                 | Tu olfactory tubercle                 |
| Op optic nerve layer sup coll         | S subiculum                          | Tz nu trapezoid body                  |
| OPT olivary pretecal nu               | sec splenium corpus callosum         | tz trapezoid body                     |
| OT nu optic tract                     | scp superior cerebellar peduncle     | vhc ventral hip commissure            |
| OV olfactory ventricle                | SF secondary fissure                 | VL ventrolateral thal nu              |
| ox optic chiasm                       | SHy septohypothalamic nu             | VLtg ventrolateral tegmental area     |
| P7 perifacial zone                    | SI substantia innominata             | VM ventromedial thal nu               |
| PC paracentral thal nu                | Sim simple lobule                    | VP ventral pallidum                   |
| PCF preculminate fissure              | SM nu stria medullaris               | VTA ventral tegmental area            |
| PCRT parvocellular reticular nu       | sm stria medullaris thal             | Zi zona incerta                       |
| PeF perifornical nu                   | smv superior medullary velum         | Zo zonal layer superior colliculus    |
| PF parafascicular thal nu             | SNC substantia nigra, compact        |                                       |
| PLF posterolateral fissure            | SNR substantia nigra, reticular      |                                       |
| PMV preammillary nu, ventral          | SO supraoptic nu                     |                                       |
| Pn pontine nuclei                     | Sol nu solitary tract                |                                       |

Abbildung 13: Skizzenvorlage 80 mit zugehöriger Legende aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von PAXINOS und WATSON, 1986



- |                         |                                 |                                |             |                             |                           |                           |                                   |                         |                           |                                      |                                    |                        |                 |                     |                              |                                   |                                    |                                      |                                    |                              |                             |                                    |                                     |                   |                                   |                                    |                                 |                             |                                    |                                  |                                    |                                  |                    |             |                                    |              |                  |                    |                             |                     |                             |                             |                                     |                       |                                   |                  |                                    |                                      |                            |                               |                                     |                         |                       |                     |                    |                        |                                   |                                   |                                       |                                      |                         |                         |                     |                        |                        |                         |                                     |                                    |                                     |                                       |                         |                                  |                        |                      |                            |                              |                             |  |                                     |                           |                                  |                          |                            |                      |                           |                                  |                                       |                                 |                                    |                             |                                |                                |                              |                     |                         |                            |                       |                                  |                          |                               |                 |                          |                   |                        |                    |                          |                                 |                                   |                           |                     |                      |                   |                                 |                          |                            |                                    |                     |                                |                   |                                |                        |                      |                      |                                      |             |                        |                                  |                          |                   |                        |                          |                              |                                 |                  |                       |                                    |                            |                             |                                   |                                      |                           |                     |                    |                        |                               |                                |                     |                                    |                             |                            |                       |                   |                          |                                  |                                   |                         |                     |                                   |                                   |             |                  |                                    |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------|------------------------------------|--------------|------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------|------------------------------------|
| 1-10 cerebellar lobules | 3n oculomotor nerve or its root | 4n trochlear nerve or its root | 7 facial nu | 7n facial nerve or its root | A5 A5 noradrenaline cells | A7 A7 noradrenaline cells | aca anterior commissure, anterior | AcBc accumbens nu, core | AcBSh accumbens nu, shell | aci anterior commissure, intrabulbar | acp anterior commissure, posterior | alv alveus hippocampus | Amb ambiguus nu | Ang angular thal nu | AOB accessory olfactory bulb | AOD anterior olfactory nu, dorsal | AOL anterior olfactory nu, lateral | AOP anterior olfactory nu, posterior | AOV anterior olfactory nu, ventral | APit anterior lobe pituitary | APMF ansoparamedian fissure | APTD anterior pretectal nu, dorsal | APTV anterior pretectal nu, ventral | as acoustic stria | AVDM anterovent thal nu, dorsomed | AVVL anterovent thal nu, ventrolat | bc brachium superior colliculus | BST bed nu stria terminalis | BSTL bed nu stria ter, lateral div | BSTMpM bed nu st, med posteromed | CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn | CB cell bridges ventral striatum | cc corpus callosum | cg cingulum | CIC central nu inferior colliculus | Cl claustrum | CnF cuneiform nu | Cop copula pyramis | cp cerebral peduncle, basal | CPu caudate putamen | Crus1 crus1 ansiform lobule | Crus2 crus2 ansiform lobule | CVL caudoventrolateral reticular nu | DC dorsal cochlear nu | DCIC dorsal cortex inf colliculus | DG dentate gyrus | DMSp5 dorsomedial spinal trigem nu | DpG deep gray layer of superior coll | DpMc deep mesencephalic nu | DPO dorsal periolivary region | ECIC external cortex inf colliculus | ECu external cuneate nu | ERS epirubrospinal nu | Eth ethmoid thal nu | FF fields of Forel | fi fimbria hippocampus | fmi forceps minor corpus callosum | fml forceps major corpus callosum | Ge5 gelatinous layer caudal sp trigem | HDB nu horizontal limb diagonal band | HIF hippocampal fissure | Hil hilus dentate gyrus | ic internal capsule | ICF intercrucl fissure | ICj islands of Calleja | InCo intercollicular nu | InG intermediate gray layer sup col | IntA interposed cerebellar nu, ant | IntP interposed cerebellar nu, post | InWh intermediate white layer sup col | LD laterodorsal thal nu | lfp longitudinal fasciculus pons | LH lateral hypoth area | ll lateral lemniscus | lo lateral olfactory tract | LP lateral posterior thal nu | LPB lateral parabrachial nu | LPBI lateral parabrachial nu, internal | LPGi lateral paragigantocellular nu | LPO lateral preoptic area | MVPO medioventral periolivary nu | LRI lateral reticular nu | LSO lateral superior olive | LV lateral ventricle | Lve lateral vestibular nu | MCLH magnocellular nu lat hypoth | MdD medullary reticular field, dorsal | Me5 mesencephalic trigeminal nu | me5 mesencephalic trigeminal tract | mfB medial forebrain bundle | mfb medial forebrain bundle, a | mfb medial forebrain bundle, b | MiTg microcellular tegmental | ml medial lemniscus | Mo5 motor trigeminal nu | MPB medial parabrachial nu | MTu medial tuberal nu | MVPO medioventral periolivary nu | ocb olivocochlear bundle | Op optic nerve layer sup coll | opt optic tract | OPT olivary pretectal nu | OT nu optic tract | P5 peritrigeminal zone | P7 perifacial zone | PCF preculminate fissure | PCRt parvocellular reticular nu | PCRtA parvocellular ret nu, alpha | PF parafascicular thal nu | Pir piriform cortex | PM paramedian lobule | Pn pontine nuclei | Po posterior thal nuclear group | PPF prepyramidal fissure | PPT posterior pretectal nu | PPTg pedunculopontine tegmental nu | PrF primary fissure | PSF posterior superior fissure | RF rhinal fissure | RPO rostral periolivary region | RRF retrorubral fields | rs rubrospinal tract | Rt reticular thal nu | RVL rostroventrolateral reticular nu | S subiculum | Sc superior colliculus | scp superior cerebellar peduncle | SI substantia innominata | Sim simple lobule | SM nu stria medullaris | sm stria medullaris thal | SNC substantia nigra compact | SNR substantia nigra, reticular | SO supraoptic nu | Sol nu solitary tract | SOR supraoptic nu, retrochiasmatic | sox supraoptic decussation | sp5 spinal trigeminal tract | Sp5C spinal trigeminal nu, caudal | SPFPC subparafascicul thal nu, parvo | SpVe spinal vestibular nu | st stria terminalis | STh subthalamic nu | Su5 supratrigeminal nu | SubCD subcoeruleus nu, dorsal | SubCV subcoeruleus nu, ventral | SubI subincertal nu | SuG superficial gray layer sup col | SuVe superior vestibular nu | tfp transverse fibers pons | Tu olfactory tubercle | tz trapezoid body | VL ventrolateral thal nu | VLL ventral nu lateral lemniscus | VLtg ventrolateral tegmental area | VM ventromedial thal nu | VP ventral pallidum | VPM ventral posteromedial thal nu | vsc ventral spinocerebellar tract | X nucleus X | ZL zona limitans | Zo zonal layer superior colliculus |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------|------------------------------------|--------------|------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------|------------------------------------|

Abbildung 14: Skizzenvorlage 81 mit zugehöriger Legende aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von PAXINOS und WATSON, 1986



- |                                     |                                       |  |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1-10 cerebellar lobules             | DC dorsal cochlear nu                 | ll lateral lemniscus                     |
| 7 facial nu                         | DEN dorsal endopiriform nu            | LO lateral orbital cortex                |
| 7n facial nerve or its root         | DG dentate gyrus                      | lo lateral olfactory tract               |
| 8n vestibulocochlear nerve          | DLL dorsal nu lateral lemniscus       | LOT nu lateral olfactory tract           |
| A5 A5 noradrenaline cells           | DMSp5 dorsomedial spinal trigem nu    | LP lateral posterior thal nu             |
| AA anterior amygdaloid area         | ECIC external cortex inf colliculus   | LPB lateral parabrachial nu              |
| aca anterior commissure anterior    | ECu external cuneate nu               | LR4V lateral recess 4th ventricle        |
| AcbC accumbens nu core              | EP entopeduncular nu                  | LRt lateral reticular nu                 |
| acp anterior commissure, posterior  | fi fimbria hippocampus                | LRtPC lat reticular nu, parvocellular    |
| AHIPM amygdalohip area, posteromed  | FL forelimb area of cortex            | LSO lateral superior olive               |
| alv alveus hippocampus              | fmi forceps minor corpus callosum     | LV lateral ventricle                     |
| AOL anterior olfactory nu, lateral  | fmj forceps major corpus callosum     | LVe lateral vestibular nu                |
| APMF ansoparamedian fissure         | Fr1 frontal cortex, area 1            | m5 motor root trigeminal nerve           |
| APTD anterior pretectal nu, dorsal  | Fr2 frontal cortex, area 2            | mcp middle cerebellar peduncle           |
| APTV anterior pretectal nu, ventral | FStr fundus striati                   | MCPO magnoocellular preoptic nu          |
| B basal nu Meynert                  | GP globus pallidus                    | Me medial amygdaloid nu                  |
| BAOT bed nu accessory olfactory tr  | HIF hippocampal fissure               | mfb medial forebrain bundle              |
| bsc brachium superior colliculus    | HL hindlimb area of cortex            | mfbA medial forebrain bundle, a          |
| BSTS bed nu stria ter supracapsular | ic internal capsule                   | MITg microcellular tegmental nu          |
| CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn  | ICF intercrural fissure               | mI medial lemniscus                      |
| cc corpus callosum                  | ICJ islands of Calleja                | Mo5 motor trigeminal nu                  |
| CIC central nu inferior colliculus  | ICP inferior cerebellar peduncle      | MPB medial parabrachial nu               |
| Cl claustrum                        | InG intermediate gray layer sup col   | Oc1M occipital Cx, area 1, monocular     |
| Cop copula pyramis                  | IntA interposed cerebellar nu, ant    | Oc2MM occipital Cx, area 2, mediomed     |
| cp cerebral peduncle, basal         | IntP interposed cerebellar nu, post   | Op optic nerve layer superior colliculus |
| CPU caudate putamen                 | InWh intermediate white layer sup col | opt optic tract                          |
| Crus1 crus1 ansiform lobule         | K nucleus K                           | OT nu optic tract                        |
| Crus2 crus2 ansiform lobule         | LD laterodorsal thal nu               | P7 perifacial zone                       |
|                                     |                                       |  |
| PCF preculminate fissure            | Sp5C spinal trigeminal nu, caudal     |  |
| PCRt parvocellular reticular nu     | Sp5I spinal trigem nu, interpolar     |  |
| PCRtA parvocellular ret nu, alpha   | Sp5O spinal trigeminal nu, oral       |  |
| Pir piriform cortex                 | SPFPC suprafascicular thal nu, parvo  |  |
| PM paramedian lobule                | SpVe spinal vestibular nu             |  |
| Po posterior thal nuclear group     | st stria terminalis                   |  |
| PPF prepyramidal fissure            | STh subthalamic nu                    |  |
| PPT posterior pretectal nu          | str superior thal radiation           |  |
| PPTg pedunculopontine tegmental nu  | SubB subbrachial nu                   |  |
| PrF primary fissure                 | SuG superficial gray layer sup col    |  |
| PrS presubiculum                    | SuVe superior vestibular nu           |  |
| PSF posterior superior fissure      | Tu olfactory tubercle                 |  |
| REth retroethmoid nu                | tz trapezoid body                     |  |
| RF rhinal fissure                   | VL ventrolateral thal nu              |  |
| RR retrorubral nu                   | VLL ventrolateral lateral lemniscus   |  |
| RRF retrorubral fields              | VLO ventrolateral orbital cortex      |  |
| rs rubrospinal tract                | VPL ventral pallidum                  |  |
| RSA retrosplenial agranular Cx      | VPM ventral posterolat thal nu        |  |
| RSg retrosplenial granular Cx       | VPM ventral posteromedial thal nu     |  |
| Rt reticular thal nu                | vsc ventral spinocerebellar tract     |  |
| S subiculum                         | ZID zona incerta, dorsal              |  |
| scp superior cerebellar peduncle    | ZIV zona incerta, ventral             |  |
| SI substantia innominata            | Zo zonal layer superior colliculus    |  |
| Sim simple lobule                   |                                       |  |
| SNC substantia nigra, compact       |                                       |  |
| SNR substantia nigra, reticular     |                                       |  |
| sox supraoptic decussation          |                                       |  |
| sp5 spinal trigeminal tract         |                                       |  |

Abbildung 15: Skizzenvorlage 82 mit zugehöriger Legende aus *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von PAXINOS und WATSON, 1986

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgesellschaft unterstützt.

Persönlich gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. med. J. Unger zum einen für die Überlassung des Themas und des Laborplatzes, und zum anderen für die fundierten fachlichen Diskussionen, Mitauswertungen und die Korrektur der Arbeit. Ohne seine Geduld wäre die Arbeit niemals zum Abschluss gekommen.

In gleichem Maße danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Lange. Unter seiner Institutsleitung durfte ich das Labor benutzen, und er stand mit seinem Wissen gerne für meine Mikroskopiertätigkeiten zur Verfügung.

Als nächstes haben die Mitarbeiterinnen des Labors 80 an der Anatomischen Anstalt der Universität München wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Namentlich waren das Frau I.-R. Holman, Frau C. Unger und Frau I. Wild. Sie ersetzten mir oft meine fehlende "dritte oder vierte Hand", halfen mit Humor über das eine oder andere Missgeschick hinweg, und hatten immer ein offenes Ohr für terminliche Probleme.

Danken möchte ich auch meiner Schwester, Frau Dipl.-Ing. Architektin G. Rieder, die mich mit Engagement und viel Erfahrung beim Erstellen der Abbildungen und beim Layout dieser Arbeit unterstützt hat und Frau Dr. med. J. Steckenbiller, die zuverlässig und akribisch eine erste mühevoll Durchsicht der "fremden" Dissertation vorgenommen hat. Frau Michaela und Herr Max

## 8 DANKSAGUNG

---

Schulhauser suchten für mich den einen oder anderen Tippfehler und "glätteten" mediziner-typische Formulierungen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner langjährigen Freundin, Frau A. M. Piendl, die über die lange Zeit der Entstehung dieser Arbeit mit Geduld meine Launen ertrug. Ihr möchte ich diese Dissertation widmen.

## 9 Curriculum vitae

**Geburtsdatum:** 23.04.1970

**Geburtsort:** D-84032 Landshut

**Eltern:** Eva-Maria Rieder, geb. Bolland  
Albin Rieder

**Schulbildung:** 1976 - 1980 Private Volksschule Seligenthal, Landshut

1980 - 1982 Grund- und Teilhaupts. Seligenthal, Landshut

1982 - 1986 Vierjährige Wirtschaftsschule der  
Cistercienserinnen Seligenthal, Landshut

Abschl.: 23.07.1986 Mittlere Reife

**Berufsausbildung:** 1986 - 1988 Ausbildung zur Industriekauffrau

Carl-Brandt, Landshut

Abschl.: 05.07.1988 Kaufmannsgehilfenprüf.

**Schulbildung:** 1988 - 1991 Bayernkolleg Augsburg

Staatl. Inst. zur Erlangung der Hochschulreife

Abschl.: 10.07.1991 Allg. Hochschulreife

**Hochschulstudium:** Studium der Humanmedizin an der LMU München

1993 - 1995 Vorklinischer Studienabschnitt

11.09.1995 Ärztliche Vorprüfung

1995 - 2000 Klinischer Studienabschnitt

23.09.1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

23.03.1999 Zweiter Abschnitt der Ärztl. Prüfung

08.05.2000 Dritter Abschnitt der Ärztl. Prüfung

**Famulaturen:** 11.03.1996 - 09.04.1996 Chirurgie, Kkh Landshut-Achdorf

06.03.1997 - 04.04.1997 Neurologie, Nervenkl. Bamberg

01.03.1998 - 15.04.1998 Hämatologie/Onkologie

Dr. Vehling-Kaiser, Landshut

01.08.1998 - 31.08.1998 Hämatologie/Onkologie

Dr. Vehling-Kaiser Landshut

**Praktisches Jahr:** 26.04.1999 - 15.08.1999 Med. Klinik I, Klinikum Landshut

16.08.1999 - 05.12.1999 Neurol. Klinik, Kl. Großhadern

06.12.1999 - 26.03.2000 Chir. Klinik, Klinikum Landshut

### Ärztin

**im Praktikum:** 15.06.2000 – 14.12.2001 Med. Klinik I, Klinikum Landshut

**Assistenzärztin:** 15.12.2001 - aktuell Med. Klinik I, Klinikum Landshut