
Molekulare und zelluläre Mechanismen der Kontrolle adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen durch Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Bernadette Lehner

aus Landshut

im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 26.04.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Ernst Tamm

Prof. Dr. Ludwig Aigner

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
1. Einleitung	13
1.1. Neurogenese im adulten Gehirn	16
1.1.1. Die Entdeckung der Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn	16
1.1.2. Adulte Neurogenese	17
1.1.3. Neurale Stammzellen im adulten Gehirn	18
1.1.4. Die neurogenen Regionen des adulten Gehirns	20
1.1.4.i. Adulte Neurogenese in der Subventrikularzone der lateralen Ventrikel.....	21
1.1.4.ii. Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus	23
1.1.5. Die Regulation der adulten Neurogenese durch unterschiedliche Faktoren	25
1.1.6. Die Untersuchung der Neurogenese	29
1.2. Expression und Funktion von TGF-beta im Zentralnervensystem	32
1.2.1. Die Familie der TGF-betas.....	32
1.2.2. Die Expression von TGF-beta und TGF-beta-Rezeptoren im Nervensystem.....	33
1.2.3. Die TGF-beta-Signaltransduktion	34
1.2.4. Die vielfältigen Funktionen von TGF-beta1 im adulten Nervensystem	36
1.2.5. Die erhöhte Expression von TGF-beta1 bei Erkrankungen des Zentralnervensystems und ihre möglichen Auswirkungen auf die Neurogeneserate	39
1.3. Ziel der Arbeit	40
2. Material und Methoden	45
2.1. Material	45
2.1.1. Tiere	45
2.1.2. Medien, Zusätze und Wachstumsfaktoren für die Zellkultur.....	45
2.1.3. Sonstige Chemikalien und Reagenzien	45
2.1.4. Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (Kits)	47
2.1.5. Verwendete Puffer und Lösungen	47
2.1.6. Verwendete Standards	48
2.1.7. Verbrauchsmaterial	49
2.1.8. Verwendete Geräte	49
2.1.9. Verwendete Programme	50
2.2. Methoden.....	51
2.2.1. Methoden der Zellpräparation und Zellkultivierung	51

2.2.1.i. Gewinnung primärer Zellen aus dem Gehirn der Ratte	51
2.2.1.ii. Standardzellkultur	52
2.2.1.iii. Stimulation einer neu generierten Kultur (P0) mit TGF-beta1	54
2.2.1.iv. Stimulation einer bereits etablierten Kultur ($P \geq 2$) mit TGF-beta1	54
2.2.1.v. BrdU-Inkubation einer bereits etablierten Kultur ($P \geq 2$)	55
2.2.2. Proliferationsassays	56
2.2.3. Differenzierung adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen	57
2.2.3.i. Gezielte oligodendrogliale Differenzierung unter dem Einfluss von TGF-beta1 und BMPs	57
2.2.3.ii. Gezielte Differenzierung BrdU-behandelter, adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen.....	57
2.2.4. Zelltodassays	58
2.2.5. Nukleinsäuretechniken	59
2.2.5.i. Isolierung und Quantifizierung von Ribonukleinsäure (RNA)	59
2.2.5.ii. Reverse Transkription (RT) von mRNA und Polymerasekettenreaktion	60
2.2.5.iii. Qualitative Analyse der TGF-beta1-Rezeptorexpression durch RT-PCR	61
2.2.5.iv. Agarose-Gelelektrophorese	62
2.2.6. DNA-Array-Genexpressionsanalyse	62
2.2.6.i. RNA-Isolierung und Microarray-Analyse	62
2.2.6.ii. Statistische Analyse und Gene Ontology (GO)-Gruppenklassifikation.....	65
2.2.7. Quantitative Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR.....	66
2.2.8. Immunfärbungen an Zellen	70
2.2.8.i. Immunzytochemische Untersuchung von Zellkulturen	70
2.2.8.ii. Mikroskopie und Auswertung der Zellkultur-Immunhistologie	71
2.2.9. Proteinbiochemische/Immunologische Methoden	71
2.2.9.i. Gewinnung von Proteinextrakten.....	71
2.2.9.ii. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz	72
2.2.9.iii. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot	72
2.2.9.iv. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz und densitometrische Quantifizierung.....	74
2.2.9.v. Die Zymografie	74
2.2.9.vi. Der TGF-beta1-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	75
2.2.10. Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik	76

2.2.10.i. Fixierung der Zellen	77
2.2.10.ii. Zellpräparation für die einparametrische DNA-Färbung.....	77
2.2.10.iii. Zellpräparation für die zweiparametrische DNA-Färbung	77
2.2.10.iv. Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen	79
2.2.11. Elektrophysiologische Methoden	81
2.2.12. Kernspinresonanzspektroskopie.....	85
2.2.12.i. Theoretische Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie	85
2.2.12.ii. Durchführung der Kernspinresonanzspektroskopie	86
2.2.13. <i>In-vivo</i> -Experimente zur Analyse des Effekts einer BrdU-Markierung auf die Proliferation aNSZ	87
2.2.13.i. Analyse des Effekts einer intraperitonealen BrdU-Applikation auf die Proliferation endogener Zellen im Hippocampus	87
2.2.13.ii. Analyse des Effekts einer BrdU-Markierung auf die Proliferation ins Rückenmark transplanterter Zellen.....	87
2.2.13.iii. Perfusionsfixierung und Erstellen der Gewebeschnitte	88
2.2.13.iv. Immunhistochemische Untersuchung von Gewebe	89
2.2.13.v. Quantitative Auswertung der Immunfärbungen an Geweben.....	91
2.2.14. Statistische Auswertung	92
3. Ergebnis I: Der Einfluss von TGF-beta1 auf eine bereits etablierte aNSZ-Kultur ($P \geq 2$)	93
3.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ.....	93
3.1.1. Vergleich der globalen mRNA-Expressionsprofile anhand der kollektiven Auswertung zweier unabhängig durchgeföhrter Experimente	93
3.1.2. Kollektive biostatistische Auswertung der DNA-Microarray-Analysen	93
3.1.2.i. Korrelation der Microarray-Experimente	93
3.1.2.ii. Biostatistische Auswertung zur Analyse der differentiellen Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung	94
3.1.3. Funktionelle Zuordnung der durch TGF-beta1 regulierten Gene nach GO-Klassifikation	99
3.1.3.i. Regulation von Genen aus dem Bereich der Zellproliferation, des Zellzyklus und des Zellwachstums	102
3.1.3.ii. Regulation Neurogenese-assoziierter Gene	103
3.1.3.iii. Regulation Zellschicksal-assoziierter Gene sowie von Genen aus dem Bereich Neuron Differenzierung und Reifung.....	104
3.1.4. Pathway-bezogene Auswertung der DNA-Microarray-Ergebnisse	104

3.1.4.i. Downstream-Analysen	105
3.1.4.ii. Upstream-Analysen.....	106
3.1.5. Netzwerk-Analyse der nach TGF-beta1-Behandlung differentiell exprimierten Transkripte	107
3.1.6. Verifizierung der differentiellen Genexpression ausgewählter Kandidatengene nach TGF-beta1-Behandlung	110
3.1.7. Untersuchung der Genexpression von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ im zeitlichen Verlauf.....	112
3.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Expression der TGF-beta1-Rezeptoren	114
3.3. Der Einfluss von TGF-beta1 auf das Zellschicksal aNSZ	115
3.3.1. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Proliferation aNSZ.....	115
3.3.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Differenzierung aNSZ	116
3.3.2.i. Differentielle Expression von Markergenen für die Differenzierung in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung	116
3.3.2.ii. Nachweis einer erhöhten Dcx-Proteinexpression nach TGF-beta1-Behandlung	116
3.4. Die funktionelle Rolle von TGF-beta1.....	117
3.4.1. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften TGF-beta1-behandelter Zellen unter Proliferationsbedingungen	117
3.4.2. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften TGF-beta1-behandelter Zellen unter Differenzierungsbedingungen.....	119
3.5. Nachweis der neuroprotektiven Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ.....	120
3.6. Charakterisierung TGF-beta1-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ .	121
3.6.1. Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung.....	121
3.6.2. Charakterisierung der molekularen Veränderungen in der Expression von Zellzyklusgenen nach TGF-beta1-Behandlung	125
3.7. Der Einfluss von TGF-beta1 und BMPs auf die Differenzierung aNSZ unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen	126
4. Ergebnis II: Der Einfluss von TGF-beta1 auf eine neu generierte aNSZ-Kultur (P0)	131
4.1. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Größe und Anzahl der Spheres sowie den Phänotyp einer neu generierten aNSZ-Kultur	131
4.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Expansion einer neu generierten aNSZ-Kultur.	132
5. Ergebnis III: Der Einfluss von BrdU auf eine aNSZ-Kultur.....	134
5.1. Der Einfluss von BrdU auf die Proliferation aNSZ	134
5.2. Charakterisierung BrdU-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ.....	134

5.3. Der Einfluss von BrdU auf den Zelltod in aNSZ-Kulturen.....	136
5.4. Der Einfluss von BrdU auf die Adhäsion von aNSZ	137
5.5. Der Einfluss von BrdU auf die Differenzierung aNSZ	140
5.6. Der Einfluss von BrdU auf die endogene Proliferation aNSZ <i>in vivo</i>	142
5.7. Der Einfluss einer BrdU-Markierung auf die Proliferation aNSZ nach der Transplantation ins intakte Tier.....	143
6. Ergebnis IV: Der Einfluss von BrdU auf TGF-beta1-Expression und Smad2-Phosphorylierung in aNSZ-Kulturen.....	146
6.1. Der Nachweis einer erhöhten TGF-beta1-Expression in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen.....	146
6.1.1. Erhöhte Expression von TGF-beta1-mRNA nach BrdU-Behandlung.....	146
6.1.2. Erhöhte Expression von TGF-beta1-Protein nach BrdU-Behandlung.....	146
6.2. Der Nachweis der TGF-beta1-Signaltransduktion in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen	147
7. Diskussion	148
7.1. TGF-beta1-induzierte Veränderungen im Zellzyklus aNSZ	149
7.1.1. Die Inhibierung der Proliferation durch TGF-beta1.....	149
7.1.2. Der TGF-beta1-induzierte Zellzyklusarrest in der G0-Phase.....	150
7.1.3. Die Modulierung von Zellzykluskomponenten durch TGF-beta1	154
7.2. Die Modulation der adulten Neurogenese durch TGF-beta1 <i>in vitro</i>	161
7.2.1. Die Induktion des neuronalen Phänotyps in TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen.....	161
7.2.2. Die funktionelle Relevanz der TGF-beta1-vermittelten neuronalen Induktion ...	175
7.3. Die neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ.....	180
7.4. Die BrdU-Sensitivität aNSZ und deren mögliche Ursache.....	187
7.4.1. Der negative Einfluss von BrdU auf aNSZ-Kulturen	187
7.4.2. Die BrdU-induzierte TGF-beta1-Expression und -Signalübertragung in aNSZ-Kulturen.....	199
8. Anhang	201
8.1. Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers	201
8.2. Abkürzungsverzeichnis	201
9. Literaturverzeichnis.....	204
Eigene Publikationen.....	241
Danksagung.....	242

Zusammenfassung

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft existieren im adulten Gehirn zwei Regionen, in denen während des gesamten Lebens neue Nervenzellen gebildet werden: Dies ist zum einen die Subventrikulärzone (SVZ) der lateralen Ventrikel und zum anderen die Subgranulärschicht im Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (HC). Die kontinuierliche Bildung von Nervenzellen (Neurogenese) innerhalb dieser Areale basiert auf der Präsenz von neuralen Stammzellen, die sich durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung durch Teilung und das Potential zur Differenzierung in gliale (Astrozyten, Oligodendrozyten) und neuronale Zelltypen (Neurone) auszeichnen. Die Proliferation neuraler Stammzellen wird, neben weiteren Einflüssen, unter anderem durch Wachstumsfaktoren reguliert. Ein Faktor, der die Proliferation einer Vielzahl von Zellen moduliert, ist Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1). Im intakten Gehirn findet man das pleiotrope Zytokin vorwiegend im choroidalen Plexus und der Hirnhaut vor. Unter pathologischen Bedingungen wie Schlaganfall, Parkinson, Multiple Sklerose usw. wird der Wachstumsfaktor vorwiegend in Mikroglia, aber auch von neuronalen und astroglialen Zellen, in erhöhtem Maße exprimiert. Die Expression des für die Signalübertragung erforderlichen Rezeptors, TGFRII, lässt sich in beiden neurogenen Regionen des adulten Gehirns nachweisen; TGFRII-mRNA wird dort unter anderem in Neuronen, Astroglia und Mikroglia vorgefunden. Experimentelle Untersuchungen an Zellen aus der SVZ belegen, dass TGFRII-mRNA (und -Protein) darüber hinaus auch in adulten neuralen Stamm- und Vorläuferzellkulturen (aNSZ-Kulturen) exprimiert wird. Weiterführende Analysen konnten zudem zeigen, dass der Wachstumsfaktor TGF-beta1 das proliferative Potential dieser Kulturen verringert, während er das Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential nicht beeinflusst. Darüber hinaus sind die molekularen und zellulären Mechanismen der Kontrolle aNSZ durch TGF-beta1 jedoch weitgehend unbekannt, wenngleich verschiedene Aspekte zusätzliche Funktionen, unter anderem in Bezug auf das Zellschicksal aNSZ, vermuten lassen. Die vorliegende Arbeit beschreibt 1) die TGF-beta1-induzierte Regulation von 619 Genen in aNSZ-Kulturen unter Proliferationsbedingungen. Die signifikant regulierten Gene wurden im Rahmen der Identifizierung biologischer Funktionen unter anderem den „Gene Ontology“-Kategorien „Zellproliferation“ und „-wachstum“, „Regulation der Zellproliferation“, „Regulation des Zellzyklus“, „Neuron Reifung“, „Neuron Differenzierung“, „Determinierung des Zellschicksals“ sowie „Neurogenese“ zugeordnet. Die Arbeit zeigt außerdem, dass TGF-beta1 2) die Expression der zur Signalübertragung relevanten Rezeptoren tangiert; während die Expression von TGFRI unverändert blieb, wurde eine reduzierte Expression des alternativen

TGFRI, Acvrl1, sowie eine signifikant erniedrigte TGFRII-Expression deutlich. 3) inhibitorisch auf die Zellproliferation aNSZ wirkt, indem es eine Teilpopulation der Zellen dazu veranlasst, aus dem Zellzyklus auszutreten; die Überführung in die G0-Phase resultierte in einer verminderten S-Phase bei konstanter G1- und G2/M-Phase-Fraktion im Vergleich zu Kontroll-Kulturen. 4) die Zellidentität proliferierender aNSZ beeinflusst. So führte die Inkubation aNSZ mit TGF-beta1 nachweislich zu einer verminderten Expression des neuroektodermalen Stammzellmarkers Nestin (Nes) und des oligodendroglialen Markers Myelin basic protein (Mbp), während sich die Zahl der Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positiven Astrozyten nicht signifikant änderte. Gleichzeitig erhöhte TGF-beta1 die Expression des neurogenese-assoziierten Proteins Doublecortin (Dcx), welches spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird. 5) Der Anstieg der neuronalen Zellpopulation in TGF-beta1-behandelten Kulturen spiegelte sich in einer zunehmenden Dichte der Natriumströme wider und korrelierte mit der Existenz von Aktionspotentialen. In Kontroll-Kulturen waren dagegen keine Natriumströme detektierbar; dementsprechend war keine der vermessenen Zellen in der Lage, infolge der Strominjektion ein Aktionspotential auszulösen. Im Gegensatz dazu ließen unter Differenzierungsbedingungen weder kontroll- noch TGF-beta1-behandelte Zellen Natriumströme erkennen, sodass es beiden Kulturen nicht möglich war, Aktionspotentiale zu generieren. Weiter verweist die vorliegende Arbeit auf 6) den Einfluss von TGF-beta1 auf aNSZ unter gezielten, oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen. Die im Anschluss an die Differenzierung durchgeföhrte Analyse ergab - jeweils in Übereinstimmung mit den Daten, die unter Proliferationsbedingungen generiert wurden - keinen Einfluss auf die GFAP-Expression, allerdings eine signifikant reduzierte Anzahl an Mbp-exprimierenden Zellen. Des Weiteren führte die Kultivierung in mesenchymal-konditioniertem Medium zu einem vollständigen Verlust der Population A2B5-positiver, glialer Vorläuferzellen durch TGF-beta1, wohingegen der Wachstumsfaktor keinen Einfluss auf die Microtubule associated protein 2ab (Map2ab)-Expression zu haben schien. 7) die neuroprotektive Wirkung, welche TGF-beta1 auf aNSZ-Kulturen entfaltet. Die Inkubation aNSZ mit TGF-beta1 resultierte im Ausbleiben des spezifischen, mit Apoptose assoziierten Lipid-Signals bei 1.28 ppm, welches in Kontroll-Kulturen nachweisbar war. Die Quantifizierung des 1.28-ppm-Peaks ergab eine signifikant erniedrigte Lipid-Signalintensität in TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Darüber hinaus zeigten die erhobenen Daten, dass TGF-beta1 aNSZ sowohl vor nekrotischem Zelltod bewahrt als auch den Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. 8) die - schon nach wenigen Tagen - verminderte Anzahl pro-

liferierender Spheres in TGF-beta1-behandelten Kulturen, wenn TGF-beta1 von Beginn der Kultur an ins Nährmedium zugesetzt wurde. TGF-beta1-behandelte Kulturen wiesen außerdem, im Gegensatz zu Kontroll-Kulturen, adhärente Zellen mit teils neuron-artiger Morphologie auf. Darüber hinaus zeigten sich schon bald deutliche Unterschiede die Spheregröße betreffend; während in TGF-beta1-behandelten Kulturen nur vereinzelt Spheres von zudem geringer Größe anzutreffen waren, enthielten die Kontrollzellen eindeutig mehr und bei Weitem größere Spheres. Dementsprechend waren die ermittelten Zellzahlen am Ende von Passage 1 stark unterschiedlich. Die kontroll-behandelte Kultur expandierte stark; die Zellzahl der TGF-beta1-behandelten Kultur lag jedoch deutlich unter der ursprünglich ausgesäten Zahl an Zellen. Letztlich starben die TGF-beta1-behandelten Zellen nach der dritten Passage innerhalb weniger Tage. Die durch die vorliegende Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind von großer Relevanz, um die zukünftige Entwicklung von Medikamenten für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen voranzutreiben. Auch im Rahmen neurorekonstruktiver Therapieansätze lassen sich die Ergebnisse nutzen, um beispielsweise Zellen im Vorfeld einer Transplantation neuronal zu determinieren.

5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) wird vielfach zur Markierung sich teilender Zellen eingesetzt. Nach systemischer Gabe von BrdU wird das Basenanalogen während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut, wo es nachfolgend mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden kann. Die weitere Charakterisierung der BrdU-markierten Zellen wird durch die Kombination mit immunhistochemischen Markern wie z. B. Dcx zum Nachweis der Neurogenese ermöglicht. Bislang haben sich nur wenige Arbeitsgruppen mit der Frage befasst, ob sich eine BrdU-Markierung per se grundsätzlich negativ auf das jeweils untersuchte Modellsystem auswirkt; diesbezügliche Daten liegen daher derzeit nur in geringem Umfang vor. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand somit eine Reihe an Untersuchungen, welche die potentiellen Einflüsse des Thymidinanalogs auf aNSZ der Ratte *in vitro* und *in vivo* betreffen. Die Analyse BrdU-induzierter Effekte auf aNSZ nach 48-stündiger Inkubation mit dem Basenanalogen ergab 1) einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation aNSZ im Konzentrationsbereich von 1,0 µM bis 20,0 µM BrdU, wobei der maximale Effekt bereits bei einer Konzentration von 1,0 µM erreicht war. 2) eine Beeinträchtigung der Zellen beim Fortgang durch den Zellzyklus im Konzentrationsbereich von 1,0 µM bis 20,0 µM infolge des kontinuierlichen Einbaus von BrdU in die DNA. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg der G0/G1-Phase bei gleichzeitig signifikanter Abnahme der S- und G2/M-Phase. Entgegen der nur geringfügig inhibierten S-Phase bei der

Inkubation mit 0,2 µM BrdU (die mit einer konstanten Proliferation korrelierte), zeigte sich bei dieser Konzentration bereits ein signifikanter Anstieg der G0/G1-Phase sowie ein signifikanter Abfall der G2/M-Phase. Die Sensitivität aNSZ gegenüber der anti-proliferativen Wirkung von BrdU ließ sich trotz des Einsatzes von Desoxycytidin (DC) nicht reduzieren; die Zellzyklusverteilung blieb dennoch nahezu unverändert. 3) eine Zunahme des Zelltods in aNSZ-Kulturen infolge der BrdU-Exposition im gesamten, untersuchten Konzentrationsbereich von 0,2 µM - 20,0 µM. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen außerdem, dass 4) aNSZ durch die Inkubation mit BrdU adhärent werden. Der beobachtete Effekt war jedoch dosisabhängig: Eine Konzentration von 0,2 µM BrdU nahm keinen Einfluss auf die Spheres, wohingegen Spheres, die mit 1,0 µM BrdU behandelt wurden, vereinzelt adhärierten. Zudem wiesen diese Kulturen bereits eine signifikant niedrigere Zahl an freischwimmenden Spheres im Vergleich zur Kontrolle auf. Dagegen führten Konzentrationen zwischen 2,5 µM und 20,0 µM BrdU zu einem signifikanten Anstieg der Zahl adhärenter Zellen. Zymografische Untersuchungen konnten ein reduziertes Maß an aktiver Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) für die Induktion der Adhärenz innerhalb dieser Kulturen verantwortlich machen. 5) die Anwesenheit von BrdU im Kulturmedium die Differenzierung aNSZ beeinflusst. Zwar ergaben sich keine Hinweise auf eine veränderte Expression astroglialer Marker bei BrdU-Konzentrationen von 0,2 µM, 1,0 µM oder 20,0 µM; die Zahl Dcx-positiver, neuronaler Vorläuferzellen war allerdings schon bei 0,2 µM BrdU signifikant reduziert, wobei der beobachtete Effekt bei den höheren Konzentrationen noch deutlicher ausgeprägt war. Zudem war bei Konzentrationen von 1,0 µM und 20,0 µM BrdU die Expression des oligodendroglialen Markers Mbp signifikant erniedrigt. Trotz dieser nachgewiesenen Einflüsse von BrdU auf den Phänotyp aNSZ blieb deren grundlegende Fähigkeit zur Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone (Multipotenz) - selbst in der mit 20,0 µM BrdU behandelten Gruppe - erhalten. 6) BrdU in Konzentrationen von 50 mg/kg oder 200 mg/kg die endogene Proliferation aNSZ *in vivo* - konträr zu der *in-vitro*-Situation - nicht inhibiert. Die vorliegende Arbeit beschreibt weiter 7) den fehlenden Einfluss einer BrdU-Markierung mit 0,2 µM, 1,0 µM oder 2,5 µM auf die Proliferation transplantierter aNSZ. Allerdings könnte die kontinuierliche Proliferation der markierten Zellen nach der Transplantation zu einer starken Verdünnung der BrdU-Konzentration in der Niedrig-Dosis-Gruppe geführt haben, sodass letztlich nur ein Teil der Zellen, die mit 0,2 µM BrdU markiert wurden, detektiert wurde. Somit ist nicht auszuschließen, dass die Zahl BrdU-positiver Zellen in dieser Gruppe unterschätzt wurde, wodurch die möglicherweise doch verminderte Proliferation bei höheren Konzentrationen verdeckt worden sein könn-

te. Darauf deuten die Ergebnisse einer FACS-Analyse hin, die, verglichen mit der mit 1,0 µM BrdU behandelten Gruppe, eine deutlich schwächere BrdU-Färbe-Intensität in der mit 0,2 µM BrdU behandelten Gruppe belegen. 8) die Induktion von TGF-beta1-mRNA in aNSZ-Kulturen durch eine 48-stündige Inkubation mit 2,5 µM BrdU sowie eine signifikante Erhöhung von TGF-beta1-Protein nach der Inkubation mit 1,0 µM, 2,5 µM und 20,0 µM BrdU. 9) die Aktivierung des TGF-beta1-Signalweges (Phosphorylierung von Smad2) in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen. Diese Erkenntnisse verweisen auf die dringende Notwendigkeit, die Auswirkungen einer BrdU-Applikation auf das jeweilig untersuchte Modellsystem präzise abzuklären; zudem ermöglicht die Berücksichtigung dieser Befunde in Zukunft die angemessene Interpretation von Daten im Zusammenhang mit der Untersuchung aNSZ und beugt einer Fehlinterpretation derselben vor.

1. Einleitung

Neurologische Erkrankungen und Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind sehr häufig durch den Verlust neuronaler Zellen gekennzeichnet. Im Gegensatz zu anderen Geweben des menschlichen Organismus wie z. B. der Leber wird der Zellverlust im Gehirn autonom nicht in ausreichendem Maße ausgeglichen. Die Voraussetzung für eine Regeneration des ZNS, das Vorhandensein neuraler Stammzellen, ist allerdings durchaus gegeben: Proliferierende Stammzellen, die sich durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung durch Teilung und das Potential zur Differenzierung in neurale und gliale Zelltypen auszeichnen, existieren auch im erwachsenen Gehirn. Sie sind grundlegend dazu in der Lage, den Zellverlust bei neurodegenerativen Erkrankungen sowie den damit einhergehenden Funktionsverlust durch Proliferation, Induktion, Spezifizierung, Migration und Differenzierung zu kompensieren. Eine Kernfrage in diesem Zusammenhang ist daher, warum das Gehirn im Falle von Schädigungen davon absieht, das in den Stammzellen ruhende Potential zur Neuroregeneration zu nutzen. Da neurale Stamm- und Vorläuferzellen (NSZ) in eine zelluläre und extrazelluläre Mikroumgebung, die sogenannte Stammzellniche eingebettet sind (Doetsch, 2003), liegt die Vermutung nahe, dass *in vivo* inhibierende Faktoren der Mikroumgebung wirksam sind, die der Entstehung neuer Nervenzellen (Neurogenese) durch Teilung unreifer Stamm- und Vorläuferzellen entgegenwirken. Somit ist das Maß an Neurogenese unter pathologischen Bedingungen, wahrscheinlich bedingt durch molekulare und zelluläre Änderungen der Stammzellniche, deutlich verändert. Nach akuten Läsionen wie dem Schlaganfall zeigt sich nach einer kurzzeitigen Erhöhung eine langfristig erniedrigte Neurogeneserate. Ebenso beobachtet man bei chronisch neurodegenerativen und entzündlichen ZNS-Erkrankungen in der Regel eine verminderte Neurogenese.

In den vergangenen Jahren konnte eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden, die den komplexen Vorgang der Neurogenese *in vivo* auf unterschiedlichen Ebenen regulieren. Dies kann zum einen auf molekularer Ebene (durch Hormone, Neurotransmitter sowie Wachstumsfaktoren, ...) geschehen, zum anderen können aber auch externe Bedingungen (wie reizreiche Umgebung, physische Aktivität, ...) die Neurogenese modulieren. Trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse auf diesem Gebiet weiß man noch immer zu wenig von den vielschichtigen, molekularen und zellulären Mechanismen, die die Neurogenese beeinflussen und steuern. Ein großes Defizit besteht zudem noch um das Wissen über die Identität der beteiligten Zelltypen (Seri *et al.*, 2001; Gotz *et al.*, 2002; Sanai *et al.*, 2004). Auch über die

tatsächliche Bedeutung der kontinuierlichen Neubildung von Nervenzellen und die Funktion der adulten Neurogenese lässt sich derzeit, abgesehen von vergleichsweise wenigen Erkenntnissen, nur spekulieren. Nachgewiesen ist hingegen, dass die Proliferation der NSZ als ein Teilaspekt der Neurogenese ein entscheidender Faktor ist, der letztlich das Maß an Neurogenese mitbestimmt. Im Verlauf vieler neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, ist die Bildung neuer Nervenzellen, bedingt durch eine reduzierte Stammzellproliferation, erniedrigt (Monje *et al.*, 2003). Die genauen, molekularen Mechanismen, die zur verminderten Proliferation unter pathologischen Bedingungen führen, sind derzeit nur unzureichend bekannt. Erste Hinweise lassen jedoch vermuten, dass Entzündungsfaktoren an der Reduktion der Proliferation mitbeteiligt sind. Vor wenigen Jahren konnte der Wachstumsfaktor und Immunmodulator Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1) als ein wesentlicher Faktor identifiziert werden, der die Neurogenese *in vivo* inhibiert (Wachs *et al.*, 2006). Experimentell konnte gezeigt werden, dass TGF-beta1 die Proliferation adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen (aNSZ) *in vitro* und *in vivo* verringert, während das Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential der Zellen erhalten bleibt (Wachs *et al.*, 2006). Interessanterweise wird TGF-beta1 unter pathologischen Bedingungen im Gehirn in erhöhtem Maße exprimiert: So findet sich eine gesteigerte Expression von TGF-beta1 bei Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose, Kreutzfeldt-Jakob, Schlaganfall, Gehirntrauma sowie bei Multipler Sklerose.

Seit bekannt ist, dass nicht nur im embryonalen Nervensystem eine Vielzahl an Stammzellen existiert, sondern dass sich auch das adulte Säuger-Gehirn, einschließlich dem des Menschen, eine gewisse, wenn auch begrenzte Plastizität erhalten hat (Carpenter *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2003), sind neurale Stammzellen verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses der Neurowissenschaftler gerückt. Dieses Wissen um die Anwesenheit von Stammzellen im adulten Gehirn hat die Hoffnung geweckt, adulte neurale Stammzellen in näherer Zukunft therapeutisch einsetzen zu können, um Zellverluste bei neurodegenerativen Erkrankungen auszugleichen. Der Ersatz abgestorbener Neurone könnte einerseits durch Modulation der adulten Neurogenese über die Stimulierung endogener Stammzellen im Gehirn erfolgen. Denkbar wäre aber auch das Propagieren körpereigener Stammzellen *in vitro* mit anschließender Transplantation in die betroffene Gehirnregion. Neue Therapieformen zielen in der Regel primär auf eine Transplantation von neuronal determinierten Zellen in das erkrankte Gehirn ab. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass die Überlebensrate transplanterter Zellen bislang sehr niedrig einzustufen ist (Brundin *et al.*, 2000). Auch über das Verhalten der Zellen nach

der Transplantation ist noch wenig bekannt. Unabdingbare Voraussetzung für eine zukünftige klinische Anwendung neuraler Stammzellen, in der ein Verlust von Nervenzellen durch Steigerung der adulten Neurogenese oder Zelltransplantation ausgeglichen werden soll, ist demzufolge in erster Linie ein besseres Verständnis der Neurogenese. Im Sinne einer möglichst gezielten und effizienten Anwendung im Bereich neurologischer Erkrankungen, die mit einem Verlust von Neuronen im adulten Gehirn einhergehen, sollte man die physiologische Funktion der Stammzellen sowie die Regulation durch unterschiedliche Einflüsse genauestens kennen, um vielfältige Behandlungsmöglichkeiten zu erlauben. Darüber hinaus wären tiefere Einsichten in pathophysiologische Prozesse wünschenswert, um Strategien zu entwickeln, die es ermöglichen, adulte Stammzellen als autologe Quellen zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen zu nutzen. Eine Grundvoraussetzung, um die auf Stammzellen basierende Therapie sicher und wirkungsvoll zu machen, wäre zudem ein detailliertes Wissen darüber, was Stammzellproliferation (und -differenzierung) im Einzelnen beeinflussen kann. Besondere Beachtung verdienen deshalb Fragen nach den Mechanismen der Proliferation und ihrer Modulierung durch verschiedene Faktoren. Denn eine verminderte Stammzellproliferation hat sehr wahrscheinlich zur Folge, dass am Ende weniger neue Nervenzellen gebildet werden. So mit wäre hier eine Förderung der Proliferation angebracht, aber dennoch alleinig nicht ausreichend. Um abgestorbene Neurone zu ersetzen, gilt es insbesondere auch neuronale Induktion, Determinierung, Migration und Differenzierung zu begünstigen.

Die vorliegende Promotionsarbeit ist ein weiterer Baustein auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der molekularen und zellulären Grundlagen adulter Neurogenese und ihrer Regulation auf den Ebenen der Proliferation und Differenzierung. Einleitend werden nun zunächst die wissenschaftlichen Hintergründe, die in direktem Kontext mit dieser Arbeit stehen, zusammengefasst: Ausgehend von einem historischen Rückblick auf die Entdeckung der Neurogenese im adulten Gehirn, wird anschließend die Definition des Begriffs der „Adulten Neurogenese“ beleuchtet. Weiter werden grundsätzliche Eigenschaften von neuralen Stammzellen sowie die neurogenen Regionen des adulten Gehirns beschrieben. In der Folge wird dann auf die Regulation der adulten Neurogenese durch unterschiedliche Faktoren eingegangen und es werden Methoden zur Untersuchung adulter Neurogenese dargestellt. Außerdem wird die Expression und Funktion von TGF-beta1 im ZNS aufgezeigt und der Ablauf der Signaltransduktion veranschaulicht. Erläuterungen über die erhöhte Expression von TGF-beta1 bei Erkrankungen des ZNS und ihre möglichen Auswirkungen auf die Neurogeneserate führen hin zur Zielsetzung dieser Dissertation.

1.1. Neurogenese im adulten Gehirn

1.1.1. Die Entdeckung der Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn

Lange Zeit war die Meinung vorherrschend, dass Neurogenese, die Neubildung von Nervenzellen, mit dem Durchlaufen der Embryonalentwicklung abgeschlossen sei. Eine weitverbreitete und allgemein anerkannte Vorstellung war demzufolge das Fehlen jeglicher Neubildung von Nervenzellen im adulten Säuger-Gehirn. Dieses Dogma der Neurowissenschaften war auf frühe Studien gegen Ende des 19. Jahrhunderts zurückzuführen, die belegten, dass das Gehirn sehr bald nach der Geburt seine endgültige Struktur erreicht hätte und darüber hinaus nicht in der Lage sei, sich im Laufe des Lebens zu verändern (Koelliker, 1896; His, 1904). Ausgehend von diesen Beobachtungen formulierte der Nobelpreisträger Santiago Ramón y Cajal Anfang des letzten Jahrhunderts (Cajal, 1928) folgende, dogmatische These:

„... im adulten Gehirn sind die Nervenbahnen fixiert, beendet, unveränderlich. Alles kann sterben, nichts kann regeneriert werden. Es liegt, wenn möglich, in den Händen der zukünftigen Wissenschaft, dieses raue Urteil zu widerlegen ...“

Obwohl es bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts Hinweise gab, die dieser Lehrmeinung widersprachen, konnte der Nachweis für die Neubildung von Nervenzellen in unterschiedlichen Regionen des adulten Rattengehirns erst in den 60er Jahren durch Joseph Altman unter Verwendung von $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Autoradiografien erbracht werden (Altman, 1962; 1963; Altman & Das, 1965a; 1965b). Diesen, aus heutiger Sicht, bahnbrechenden Erkenntnissen wurde jedoch in den beiden folgenden Jahrzehnten nur wenig Beachtung geschenkt, zumal sie nicht den damaligen Vorstellungen entsprachen. Erst als Kaplan und Hinds in den 70er Jahren, 15 Jahre nach Altman's erster Veröffentlichung, durch elektronenmikroskopische Untersuchungen autoradiografisch-markierter Zellen adulte Neurogenese im Hippocampus (HC) und Riechkolben drei Monate alter Ratten bestätigten (Kaplan & Hinds, 1977), war der definitive Nachweis für die Neubildung von Nervenzellen gelungen und dieses Forschungsgebiet rückte langsam in den Mittelpunkt des Interesses der Neurowissenschaftler. Ein weiterer entscheidender Fortschritt auf dem Weg der Neurogeneseforschung konnte in den 90er Jahren mit der Einführung neuer Techniken, wie der 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)-Markierung proliferierender Zellen, der Konfokal-Mikroskopie sowie der Immunhistochemie, erzielt werden. Durch die Anwendung dieser Methoden in einer Vielzahl an Veröffentlichungen und der damit verbundenen, vereinfachten Identifizierung neuer Nervenzellen, konnten letzte Zweifel ausgeräumt werden, dass die Neubildung von Nervenzellen auch im adulten

Gehirn fortbesteht. Schließlich wurde gegen Ende der 90er Jahre adulte Neurogenese in Primaten (Gould *et al.*, 1997; Gould *et al.*, 1999; Kornack & Rakic, 1999), einschließlich des Menschen (Eriksson *et al.*, 1998), beschrieben.

1.1.2. Adulte Neurogenese

Der Begriff „Adulte Neurogenese“ beschreibt die Bildung neuer Nervenzellen im adulten Gehirn. Obwohl Neurogenese oftmals lediglich mit der Proliferation von Vorläuferzellen assoziiert wird, stellt sie vielmehr einen komplexen Prozess dar, der mit der Teilung der Vorläuferzelle (Proliferation) beginnt, gefolgt von Migration und Differenzierung, und schließlich mit der Existenz und Integration eines neuen, vollständig funktionsfähigen, Neurons endet. Das beinhaltet, dass Neurogenese weitaus mehr ist, als nur die Teilung einer Vorläuferzelle. Um ausgehend von der Stammzelle über die Zwischenstufe unreifer Vorläuferzellen zur ausdifferenzierten Nervenzelle zu gelangen, sind zahlreiche Entscheidungen auf Ebene des zellulären Programms notwendig. So involviert Neurogenese zunächst Entscheidungen auf Vorläuferzellebene, wie die Frage, ob symmetrische Teilungen (mit identischen Tochterzellen) oder asymmetrische Teilungen (mit unterschiedlichen Tochterzellen) stattfinden werden (Kempermann, 2006). Nach Ablauf einer asymmetrischen Teilung und dem Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus bestimmen dann verschiedene, zum Teil genetische, Faktoren das Schicksal der entstandenen Zellen. Von Sonic hedgehog, Sox 1-3 und Notch/Hes weiß man, dass sie den Stammzellstatus einer Zelle erhalten können. Dagegen aktivieren C/EBP, Mash1, Neurogenin 1/2 sowie NeuroD und Math3 neuronale Gene und fördern unter Anwesenheit bestimmter Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor (FGF) die neuronale Differenzierung (Gangemi *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind es jedoch auch epigenetische Faktoren, die die neuronale Differenzierung aus Stammzellen lenken (Hsieh & Gage, 2004): hierzu zählt man unter anderem den Einfluss neurogener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des Chromatins. Die Neubildung von Nervenzellen beinhaltet in der Folge auch das Sicherstellen des Überlebens der entstandenen Zellen, da das Ergebnis der Neurogenese stark von der Fähigkeit der unreifen Neurone abhängt, zu überleben und nicht dem Zelltod zu unterliegen. Des weiteren schließt sie auch die Migration der differenzierenden Zelle sowie die Differenzierung selbst mit ein, in deren Ablauf Gene entsprechend dem neuronalen Profil an- und abgeschaltet werden (Kempermann, 2006). Die Neubildung von Nervenzellen bedingt im weiteren Verlauf zudem die Ausbreitung der zellulären Fortsätze wie der Dendriten und Axone, die Verbindungen herstellen und Synapsen ausbilden. Nicht zuletzt involviert Neurogenese die Erfüllung elektrophysiologischer Kriterien eines funktionsfähigen, reifen Neu-

rons: Schließlich müssen sich die entstandenen Neurone durch die Präsenz von Natriumkanälen und die Fähigkeit, Aktionspotentiale zu generieren, als funktionsfähig erweisen (Kempermann, 2006). Insgesamt leisten all diese Faktoren einen Beitrag zur Neurogenese und jeder für sich muss dementsprechend als ihr zugehörig betrachtet werden.

1.1.3. Neurale Stammzellen im adulten Gehirn

Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass adulte Neurogenese direkt mit der Anwesenheit multipotenter, neuraler Stammzellen verknüpft ist, und sogar bis ins hohe Alter aufrechterhalten wird (Gage, 2000). Unter physiologischen Bedingungen können proliferierende Stammzellen in größerer Anzahl nur in zwei Gehirnregionen gefunden werden: im Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (HC) sowie in der Subventrikulärzone (SVZ) der lateralen Ventrikel. Dennoch konnten in tierexperimentellen Versuchen neurale Stammzellen auch aus weiteren Regionen des erwachsenen Gehirns (z. B. Striatum, Neocortex, Amygdala und Rückenmark) isoliert werden (Palmer *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1999; Bernier *et al.*, 2002). Da die hierzu vorliegenden Forschungsbefunde jedoch keine Aufklärung über den Ursprung der aufgefundenen Stammzellen bieten, ist dieser bislang ungeklärt.

Stammzellen lassen sich allgemein aufgrund ihrer Eigenschaften nach unterschiedlichen Kriterien einteilen: 1) bezüglich ihrer Potenz als totipotent bis multipotent, 2) bezüglich ihres ontogenetischen Entwicklungsgrades in adulte oder embryonale Stammzellen und 3) gemäß ihrer Spezifität für bestimmte Organe. Die Potenz einer Stammzelle beschreibt ihre Möglichkeiten zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen. Während embryonale Stammzellen totipotente Eigenschaften aufweisen und demzufolge alle im Organismus vorhandenen Zelltypen aus embryonalen Stammzellen hervorgehen können, sind diese Eigenschaften bei sogenannten pluripotenten Stammzellen bereits deutlich eingeschränkt. Zwar sind sie in der Lage, über die jeweilige Organ- bzw. Keimblattgrenze hinaus Zellen zu bilden; allerdings besteht nicht mehr die Möglichkeit, den gesamten Organismus zu generieren. Multipotente, sogenannte gewebespezifische Stammzellen, haben die Fähigkeit, die verschiedenen Zelltypen eines Organs zu bilden, bleiben dabei aber auf ihr jeweiliges Keimblatt beschränkt. Ein Vertreter der Gruppe der multipotenten Stammzellen sind die neuralen Stammzellen des zentralen Nervensystems. Sie können über die Zwischenstufe der neuronal bzw. glial determinierten Vorläuferzellen in die drei hauptsächlichen, neuroektodermalen Zelltypen des ZNS, Neurone (neuronale Differenzierung), Astrozyten und Oligodendrozyten (gliale Differenzierung) ausreifen (vgl. Abbildung 1). Diese Zelltypen lassen sich in Zellkulturexperi-

menten mit Antikörpern gegen Markerproteine wie Map2ab für Nervenzellen, GFAP für Astrozyten und GalC für Oligodendrozyten nachweisen. Umstritten ist derzeit, inwieweit multipotente Stammzellen ihre Spezifität für ein bestimmtes Organ oder Gewebe - beispielsweise für das mesenchymale oder hämatopoetische System - wieder verlieren können, um nachfolgend Zellen anderer Gewebe - z. B. des ZNS - zu generieren. Zwar ließen sich hämatopoetische Zellen verschiedenen Studien zufolge bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* neuronal differenzieren (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001a; Priller *et al.*, 2001b; Jiang *et al.*, 2003). Die Hinweise darauf, dass organspezifische Stammzellen ihr Programm im Sinne einer Transdifferenzierung auf ein anderes Gewebe umstellen oder ihre Spezifität auf weitere Organe ausweiten (Dedifferenzierung) können, wurden jedoch durch Daten infrage gestellt, die belegen, dass hämatopoetische Stammzellen mit anderen Zellen fusionieren können (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003).

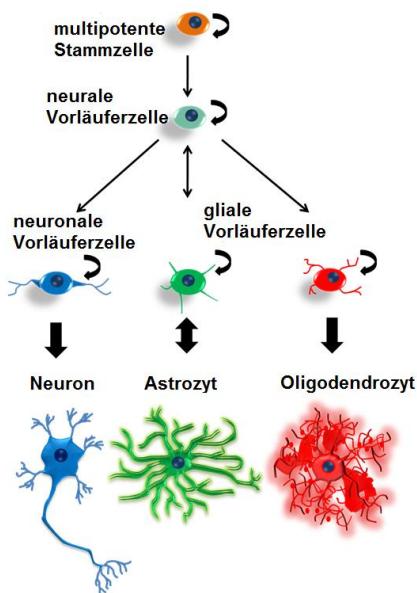


Abbildung 1: Neurale Stammzellen und ihr Differenzierungspotential. Neurale Stammzellen sind multipotent, können sich selbst erneuern sowie in Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen ausreifen. Im Vergleich zur Stammzelle besitzt die unreife, aber bereits determinierte, Vorläuferzelle ein eingeschränktes Entwicklungspotential.

Neben dem Potential zur Differenzierung in neuronale (Neurone) und gliale (Astrozyten und Oligodendrozyten) Zelltypen (Multipotenz) zeichnen sich neurale Stammzellen auch durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung durch Teilung aus (McKay, 1997). Durch das Kriterium der Selbsterneuerung wird sichergestellt, dass durch Teilung der Stammzelle mindestens eine identische Kopie der Mutterzelle erzeugt wird. Führt die Teilung zu zwei identischen Tochterzellen, spricht man von einer symmetrischen Teilung. Asymmetrische Teilungen hingegen produzieren eine Stammzelle, identisch zur Mutterzelle, und eine Zelle,

die einen Weg einschlägt, der irreversibel zur endgültigen Differenzierung führt. Diese, bereits glial oder neuronal determinierten Tochterzellen, weisen reduzierte Stammzelleigenschaften wie limitierte Selbsterneuerungsfähigkeit auf und werden als Vorläuferzellen bezeichnet. Sie sind, verglichen mit Stammzellen, durch ein höheres Proliferationspotential und die Möglichkeit, durch symmetrische Teilungen Tochterzellen hervorzubringen, die zwar in sich identisch, aber nicht identisch zur Ursprungszelle sind, gekennzeichnet (Kempermann, 2006).

1.1.4. Die neurogenen Regionen des adulten Gehirns

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft kennt man zwei Regionen des adulten Gehirns (vgl. Abbildung 2), in denen, unter physiologischen Bedingungen, während des gesamten Lebens kontinuierlich neue Nervenzellen in größerer Zahl gebildet werden: Dies ist zum einen die Subgranulärschicht des GD im HC (Altman & Das, 1965a; Kaplan & Bell, 1984; Palmer *et al.*, 1997) und zum anderen die SVZ der lateralen Ventrikel (Lois & Alvarez-Buylla, 1993; 1994; Doetsch *et al.*, 1999).

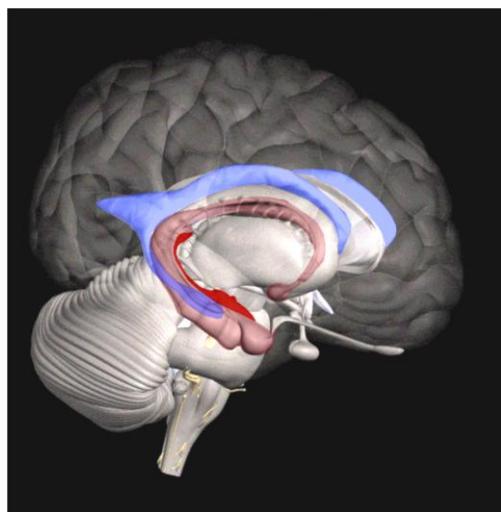


Abbildung 2: Neurogene Regionen des adulten Gehirns. Neurale Stammzellen, die sich selbst erneuern (symmetrische Teilung) und zudem Vorläufer von reifen Gliazellen und Neuronen hervorbringen (asymmetrische Teilung), existieren in der lateralen Ventrikelfassung (blau) sowie im HC (rot) in großer Zahl (modifizierte 3-D-Abbildung aus interBRAIN, Topografische Anatomie des ZNS des Menschen; CD-ROM).

Diese sogenannten neurogenen Regionen zeichnen sich durch die Präsenz unreifer Vorläuferzellen, aus denen sich neue Nervenzellen entwickeln können sowie eine Mikroumgebung aus, die es erlaubt, Neurogenese geschehen zu lassen. Bislang gibt es nur wenige Arbeiten, die adulte Neurogenese auch in anderen Regionen, z. B. dem Cortex, belegen (Gould *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000; Magavi *et al.*, 2000), obwohl neurale Stammzellen auch im Septum, Striatum (Palmer *et al.*, 1995), der Retina (Tropepe *et al.*, 2000), im Rückenmark (Shihabuddin *et al.*, 1997) und in Regionen weißer Substanz wie Corpus callosum und Nervus opticus (Palmer *et al.*, 1999) gefunden wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier inhibierende Faktoren

der Mikroumgebung der Neubildung von Nervenzellen entgegenwirken, während die Mikroumgebung der SVZ und des HC offensichtlich für die Neurogenese privilegiert sind (Kempermann, 2006).

1.1.4.i. Adulte Neurogenese in der Subventrikulärzone der lateralen Ventrikel

Die SVZ des adulten Gehirns ist ein Residuum des embryonalen Vorderhirns. Im Verlauf der Embryonalentwicklung entstehen dort neurale Stammzellen in der so genannten ventrikulären Zone (VZ), einer epithelialen Struktur, welche das frühe Neuralrohr auskleidet. Zu Beginn der Embryogenese steht zunächst die Vergrößerung des Stammzellpools durch die Bildung gleichartiger, proliferierender Tochterzellen infolge symmetrischer Teilungen. Danach setzen etwa am Embryonaltag 11 (E 11) der Maus bzw. in der 5. Schwangerschaftswoche beim Menschen (Sidman & Rakic, 1973; Meyer *et al.*, 2000) asymmetrische Teilungen ein: Während eine der entstehenden Tochterzellen als Stammzelle im Epithel verbleibt, sondert sich die andere Tochterzelle aus dem mit Stammzellen besetzten Epithel ab und wandert als postmitotische, neuronale Vorläuferzelle über mehrere Hundert Zell-Längen in den sich entwickelnden Hirnmantel (zerebraler Cortex) ein (Sidman & Rakic, 1973), ohne weitere Teilungen zu durchlaufen. Am Zielort angelangt, erfolgt die Ausreifung zur Nervenzelle sowie die Einbindung in das neuronale Netzwerk (Caviness *et al.*, 1995; Couillard-Despres *et al.*, 2001). Nachfolgend werden auch Astrogliazellen gebildet; Oligodendrozyten entstehen erst gegen Ende der Embryonalentwicklung bis nach der Geburt. Im Verlauf der gesamten Entwicklung verringert sich der Anteil an Stammzellen in dramatischer Weise. Während bei der Maus am Embryonaltag 8.5 50 % Stammzellen in der Wand des Neuralrohrs aufzufinden sind, besteht kurz nach der Geburt in der SVZ nur noch ein Anteil an Stammzellen von ca. 1 % (Temple, 2001).

Dennoch persistieren auch in der SVZ des adulten Gehirns multipotente Stammzellen, die durch Proliferation kontinuierlich neue Vorläuferzellen hervorbringen. Lange Zeit war umstritten, welcher der dort lokalisierten Zelltypen die eigentliche Stammzelle darstellt. 1997 konnte jedoch gezeigt werden, dass GFAP-exprimierende Astrozyten, sogenannte B-Zellen, als die primären Stammzellen in der adulten SVZ fungieren (Doetsch *et al.*, 1997). Man unterscheidet hier zwei Typen von Astrozyten: B1-Zellen nahe des Ependyms und B2-Zellen in der Nähe des Striatums (Doetsch *et al.*, 1997), wobei nicht eindeutig geklärt ist, inwieweit beide Teile zu der Population adulter Stammzellen in der SVZ beitragen.

Die GFAP-exprimierenden Stammzellen der SVZ generieren durch Teilung schnell proliferierende, unreife Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen), die ihrerseits zu unreifen Neuronen oder Neuroblasten (Typ-A-Zellen) führen. Nach ihrer Entstehung wandern diese neuronal determinierten, begrenzt proliferierenden Typ-A-Zellen über eine Distanz von mehreren Millimetern aus der SVZ des Nagerhirns durch den Rostralmigratorischen Strom (RMS) in Richtung des primären Riechzentrums, des Bulbus olfactorius (BO) (vgl. Abbildung 3).

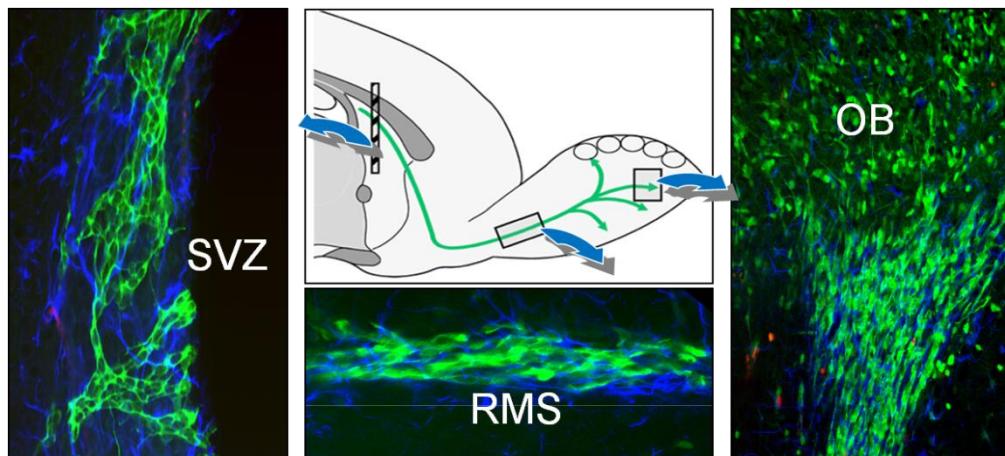


Abbildung 3: Durch Proliferation der Stammzellen in der SVZ der lateralen Ventrikel werden Vorläuferzellen generiert. Diese neu gebildeten Zellen (grün - BrdU Markierung) migrieren entlang des RMS in den BO, wo ca. 99 % der Zellen zu GABAergen Granulärzellen und 1 % der Zellen zu dopaminergen, periglomerulären Interneuronen ausdifferenzieren.

Die Migration erfolgt dabei, zu Ketten aufgereiht, entlang dünner Fortsätze der Typ-B2-Zellen („Chain Migration“). Diese sind allerdings nicht zwingend erforderlich, um eine Wanderung zu ermöglichen. Vielmehr stehen die migrierenden Zellen selbst in engem gegenseitigen Kontakt zueinander und weisen sich so den Weg (Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996). Aufgrund der fehlenden Existenz fester anatomischer Führungsstrukturen nimmt man an, dass zudem Adhäsionsmoleküle die Richtung der Migration steuern. Es konnte gezeigt werden, dass migrierende Typ-A-Zellen Marker für unreife, neuronale Zellen wie Polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) oder Doublecortin (Dcx), welches mit neuronaler Migration assoziiert wird (Gleeson *et al.*, 1999), exprimieren. Auch PSA-NCAM gilt als migrationsfördernd, ist allerdings weder spezifisch noch hinreichend (Hu *et al.*, 1996). Darüber hinaus scheint das Protein Slit bei der Migration insofern eine Rolle zu spielen, dass es als Repellent migrierende Zellen von der Wanderung in andere Gehirnregionen abhält (Wu *et al.*, 1999). Von übergeordneter Bedeutung ist in diesem Zusammenhang allerdings die Tatsache, dass migrierende Neuroblasten den für die Migration erforderlichen Faktor Slit über einen autokrin regulierten Mechanismus selbst exprimieren und ausschütten und dadurch die Richtung der Migration bestimmen.

Während der „Chain Migration“ entlang des RMS setzen die Typ-A-Zellen ihre Proliferation deutlich verlangsamt fort (Smith & Luskin, 1998) und initiieren in der Folge die neuronale Reifung (Menezes *et al.*, 1995). Sobald sie im primären Riechzentrum angekommen sind, werden die noch unreifen Neurone schließlich durch einen derzeit unbekannten Mechanismus dazu veranlasst, die Richtung ihrer Migration zu ändern und sich radial in die Granulärzellschicht und die Periglomerulärschicht (Kempermann, 2006) zu bewegen, wo sie zu GABAergen und dopaminergen Interneuronen differenzieren (Luskin, 1993) und ins neuronale Netzwerk integrieren.

Die Existenz des BO als Teil einer neurogenen Zone in der Ratte wurde bereits 1965 in einer Studie Altmans postuliert, in der er nach Injektion von [³H]-Thymidin in die SVZ innerhalb kurzer Zeit eine starke Abnahme der markierten Zellen dokumentierte. Im gleichen Jahr konnte er zeigen, dass Zellen, welche postnatal in der SVZ generiert wurden, in den Riechkolben migrieren und dort zu Neuronen ausreifen (Altman & Das, 1965a; 1965b). 1969 beschrieb Joseph Altman schließlich als Erster detailliert den RMS in der Ratte (Altman, 1969). Im Menschen wurde allerdings, bis heute, weder die anatomische Struktur eines RMS noch die „Chain migration“ nachgewiesen. Somit ist es fraglich, ob die Migration von Neuroblasten zwischen SVZ und BO auch im Menschen existiert (Sanai *et al.*, 2004).

1.1.4.ii. Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus

Auch im GD des HC erfolgt kontinuierlich eine Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn. Die Entstehung neuronaler Vorläuferzellen durch Proliferation von Stammzellen findet in einer dünnen Schicht, der Subgranulären Zone (SGZ), zwischen Granulärzellschicht und Hilus, statt. Im Vergleich zum olfaktorischen System (SVZ/RMS/BO) ist die hippocampale Neurogenese räumlich weitaus begrenzter. Während die Zellen der Ventrikelwand über weite Bereiche entlang des RMS in das primäre Riechzentrum einwandern, um dort zur Nervenzelle auszudifferenzieren, verwandeln sich die Zellen des HC in der Nähe ihres Entstehungsorts zu sogenannten Granulärnervenzellen. Zudem unterscheidet sich die Quantität beider neurogener Regionen in drastischer Weise: Der Generierung von täglich ca. 30000 Neuronen in der SVZ der Ratte steht die Entstehung von vergleichsweise wenig neuen Zellen, nämlich nur mehreren Tausend, im HC gegenüber (Cameron & McKay, 2001). Trotz dieser Einschränkung ist die Entdeckung der hippocampalen Neurogenese von außerordentlicher Wichtigkeit, insbesondere im Hinblick auf ihre potentiell höhere, funktionelle Relevanz beim Menschen. Bekannt ist, dass dem HC eine zentrale Rolle bei der Filterung von Information

zukommt, bevor die Langzeitspeicherung in neokortikalen Regionen erfolgt. Neue Befunde bestätigen zudem, dass neue Nervenzellen im HC mit dem Lernen und Abrufen von Gedächtnisinformationen in Verbindung stehen (Barnea & Nottebohm, 1996).

Die Stammzellen der adulten SGZ, sogenannte Typ-1-Zellen, stellen eine Population von Zellen dar, die, wie die Stammzellen der SVZ, Eigenschaften von Astrozyten aufweisen (Seri *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den korrespondierenden Typ-B-Zellen der SVZ zeigen die Typ-1-Zellen des GD eine charakteristische Morphologie, die denen radialer Gliazellen ähnelt. Ihre Ähnlichkeit kommt durch einen langen und starken, apikalen Fortsatz, der sich bis in die Granulärzellschicht erstreckt, zustande (Filippov *et al.*, 2003). Typ-1-Zellen exprimieren, neben Nestin, das Astrozyten-Protein GFAP, sind allerdings negativ für S100 β , einen weiteren astrozytären Marker (Seri *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2004). Die asymmetrische Teilung der Typ-1-Zellen führt zur Existenz von Typ-2-Zellen, welche ein ausgesprochen hohes Proliferationspotential besitzen (Filippov *et al.*, 2003). Man unterscheidet Typ-2a-Zellen, die sich durch eine fehlende immunhistologische Nachweisbarkeit von Dcx auszeichnen und Typ-2b-Zellen, die immunreakтив für Dcx (Marker für unreife, neuronale Zellen) sind (Kronenberg *et al.*, 2003). Untersuchungen konnten belegen, dass die Dcx-Expression mit der Initierung der neuronalen Differenzierung sowie Migration assoziiert werden kann (Francis *et al.*, 1999). Das Typ-2-Zellstadium beinhaltet somit den Übergang von einer gliaähnlichen Vorläuferzelle zur neuronal determinierten Zelle. Die nächste Stufe der Entwicklung stellt die Transition vom proliferativen Status der Typ-2-Zellen zu dem post-mitotischen Stadium unreifer Neurone dar, den Typ-3-Zellen. Diese Zellen exprimieren weiterhin Dcx, wogegen die Expression von Nestin bereits reduziert ist. Obwohl noch zur Teilung befähigt, vollziehen Zellen in diesem Stadium eher morphologische Veränderungen (Kempermann, 2006). Weiterhin erfolgt jetzt auch die radiale Migration der Zellen über eine kleine Distanz entlang der Fortsätze von existierenden Neuronen und radialen, gliaähnlichen Zellen in Richtung der Granulärzellschicht (Seki & Arai, 1999). Nachdem die Typ-3-Zellen den Zellzyklus verlassen haben, beginnen sie dort, die spezifischen, morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Granulärnervenzellen auszubilden und ins bestehende Netzwerk zu integrieren. Die neu gebildeten Neurone projizieren dabei ihre Axone in die CA3-Region des HC und bilden synaptische Verbindungen aus (Stanfield & Trice, 1988; Markakis & Gage, 1999; Carlen *et al.*, 2002). In elektrophysiologischen Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass die entstandenen Granulärzellen tatsächlich funktionelle Synapsen aufweisen und sich diesbezüglich nicht von Zellen, die während der frühen Entwicklung generiert wur-

den, unterscheiden (Snyder *et al.*, 2001). Sie exprimieren, nach der transienten Expression von Calretinin, den reifen Granulärzellmarker Calbindin sowie den postmitotischen, neuronalen Marker NeuN (Brandt *et al.*, 2003).

Sowohl während der embryonalen als auch der adulten Neurogenese generieren die Vorläuferzellen einen enormen Überschuss an neuronal vorbestimmten Zellen. Im GD der Ratte werden jeden Tag mehrere Tausend neue Zellen geboren (Cameron & McKay, 2001). Dies zeigt die immense Kapazität des adulten Gehirns, innerhalb der neurogenen Regionen neue Nervenzellen zu bilden. Dennoch werfen diese Erkenntnisse die Frage nach dem Schicksal dieser Zellen auf, zumal das Gehirn durch die Schädelknochen stark in seinem Volumen begrenzt ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch Selektionsvorgänge nur ein Bruchteil der neu gebildeten Zellen überlebt (Oppenheim, 1991) und rekrutiert wird. Die Mehrheit der Zellen wird, ähnlich wie bei der Entwicklung des Gehirns, einem Eliminierungsprozess durch programmierten Zelltod (Apoptose) unterworfen (Biebl *et al.*, 2000). So weisen Regionen adulter Neurogenese bis zu 100-mal mehr apoptotische Zellen auf als nicht-neurogene Bereiche. Das Ausmaß der hier wirkenden apoptotischen Mechanismen unterliegt allerdings unterschiedlichen Faktoren. Durch eine reizreiche Umgebung konnte in Studien der Prozentsatz an spontanem, apoptotischen Zelltod im HC um 45 % gesenkt werden (Young *et al.*, 1999). Zudem erwies sich auch der Rekrutierungsvorgang der Zellen als aktivitätsabhängig (Kempermann *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1998). Die molekularen Mechanismen, die steuern, ob eine neu geborene Zelle überlebt und sich funktionell in das bestehende Netzwerk integriert oder stirbt, sind aufgrund mangelnder Studien auf diesem Gebiet bis dato noch unzureichend erforscht.

1.1.5. Die Regulation der adulten Neurogenese durch unterschiedliche Faktoren

Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden, die auf unterschiedlichen Ebenen (Proliferation, Migration, Differenzierung und Zelltod) regulierend in den Ablauf der Neurogenese *in vivo* eingreifen. So kann Neurogenese von externen Bedingungen beeinflusst, aber auch auf molekularer Ebene sowohl positiv als auch negativ moduliert werden.

Externe und physiologische Bedingungen beeinflussen adulte Neurogenese. Tiere, die in einer reizreichen Umgebung mit der Möglichkeit zur Ausbildung motorischer, visueller, auditiver und sozialer Fähigkeiten gehalten wurden, zeigten eine verstärkte Bildung neuer Nervenzellen im Vergleich zu Kontrolltieren (Barnea & Nottebohm, 1994; Kempermann *et*

al., 1997b; Kempermann *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999; Kempermann *et al.*, 2002). Die reizreiche Umgebung schien dabei insbesondere neuroprotektiv auf junge Neurone, die unter Standardlaborbedingungen zum Teil durch Apoptose eliminiert werden, zu wirken (Young *et al.*, 1999). Tiere, die in einer reizreichen Umgebung lebten, zeigten zudem eine verbesserte Feinmotorik sowie bessere Ergebnisse bei Lernaufgaben (Nilsson *et al.*, 1999). Am bedeutendsten war jedoch, dass der stimulierende Effekt auf die Neurogenese auch bei Tieren im hohen Alter auftrat und sogar dann, wenn die Tiere nur für wenige Wochen den reizreichen Bedingungen ausgesetzt waren (Kempermann *et al.*, 1998). Auch die Möglichkeit der physischen Aktivität führte in Nagern zu einer gesteigerten Neurogeneserate (van Praag *et al.*, 1999a; van Praag *et al.*, 1999b), verursacht durch eine erhöhte Zellproliferation, welche sogar über mehrere Tage bis zu Wochen anhielt. So findet sich nach der Anbringung eines Laufrads in einen Standardlaborkäfig eine erhebliche Steigerung der hippocampalen Neurogenese (Isaacs *et al.*, 1992). Dagegen gibt es auch Faktoren, die sich nachteilig auf das Neurogenesepotential auswirken. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter ein Rückgang der Neubildung von Nervenzellen zu verzeichnen ist (Altman & Das, 1965a; Seki & Arai, 1995; Kuhn *et al.*, 1996; Kempermann *et al.*, 1998; Cameron & McKay, 1999; Bizon & Gallagher, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Neurogenese hier mit einer reduzierten Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen korreliert, während die Proliferation anderer Zellen unberührt bleibt (Kuhn *et al.*, 1996). Wie man heute weiß, ist der altersabhängige Abfall der Neurogenese teilweise auf einen Anstieg des Corticosteroidspiegels zurückzuführen. So zeigen alte Ratten nach einer Adrenalektomie (chirurgische Entfernung der Nebennieren) eine Neurogeneserate, die derjenigen junger Ratten entspricht (Cameron & McKay, 1999). Weitere Einflussfaktoren, die zu den negativen Stimuli gezählt werden, stellen Röntgenstrahlung oder der Geruch eines natürlichen Feindes dar. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Röntgenstrahlen eine Inhibierung der Proliferation in der SGZ des HC verursachen (Parent *et al.*, 1999; Monje *et al.*, 2002; Santarelli *et al.*, 2003; Raber *et al.*, 2004) und zu lang anhaltenden Schäden führen (Mizumatsu *et al.*, 2003; Rola *et al.*, 2004). Untersuchungen konnten außerdem belegen, dass Nagetiere, die dem Geruch ihrer natürlichen Feinde ausgesetzt waren, mit einer verminderten Zellproliferation im HC reagierten (Tanapat *et al.*, 2001). In diesem Kontext ist auch die prominente Rolle von Stress als weiterer negativer Modulator des Neurogenesepotentials zu erwähnen. Dass Stress die Neurogenese verringert, konnte sowohl in Nagetieren als auch bei Primaten gezeigt werden (Gould *et al.*, 1998; Tanapat *et al.*, 1998; Gould & Tanapat, 1999). Da akuter wie chro-

nischer Stress zu einer erhöhten Freisetzung von Glucocorticoidhormonen der Nebenniere sowie von erregenden Neurotransmittern führen (Gould *et al.*, 1997), ist dies auch keineswegs verwunderlich. So hat pränataler Stress einen lang anhaltenden Einfluss auf die adulte Neurogenese und scheint sogar den Grundumsatz adulter, hippocampaler Neurogenese zu beeinträchtigen (Lemaire *et al.*, 2000; Coe *et al.*, 2003). Hingegen ist aufgrund mangelnder Untersuchungen nicht bekannt, wie lang anhaltend der Effekt von Stress im Erwachsenenalter ist. Zumindest aber sind die negativen Effekte auf die adulte, hippocampale Neurogenese, sogar die durch lang anhaltenden Stress verursachten, reversibel (Heine *et al.*, 2004). Nicht zuletzt nehmen auch die genetische Prädisposition (Kempermann *et al.*, 1997a) sowie die Ernährung Einfluss auf das Neurogenesepotential. So bewirkte eine Kalorienreduktion bei Nagetieren eine Zunahme der Zellproliferation im GD des HC (Lee *et al.*, 2002).

Pathologische Bedingungen beeinflussen adulte Neurogenese. Zu den Stimuli, die Neurogenese fördern, zählen zudem pathologische Ereignisse wie z. B. zerebrale Ischämien (Takagi *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2001; Takasawa *et al.*, 2002) oder epileptische Anfälle (Bengzon *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997; Madsen *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2003). So führte die Induktion epileptischer Aktivität durch elektrische Stimulation oder die Applikation chemokonvulsiver Substanzen im Tiermodell zu einem Anstieg der Neurogeneserate (Bengzon *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2003). Darauf hinaus gelten mechanische Verletzungen des Gehirns als weitere Induktoren zur Stimulierung der Neubildung von Nervenzellen. Auch hier wird eine erhöhte Teilungsaktivität der Zellen als Grund für die steigende Neurogeneserate angesehen. Kontrovers diskutiert werden hingegen derzeit die Zusammenhänge zwischen Neurogenese und Depression (Duman *et al.*, 2001; Kempermann & Kronenberg, 2003; Henn & Vollmayr, 2004). In Tiermodellen konnte eine Verminderung der adulten Neurogenese während depressionsartiger Zustände beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich dokumentiert, dass Antidepressiva wie Fluoxetin, die den Serotoninspiegel anheben, eine Stimulation der hippocampalen Neurogenese zur Folge haben (Malberg *et al.*, 2000). Interessanterweise nimmt die Wirkung von Fluoxetin auf die Neubildung von Nervenzellen mit zunehmendem Alter ab. Somit zeigt sich, dass die therapeutischen Effekte von Antidepressiva, zumindest in älteren Patienten, nicht durch eine Modulierung der Neurogeneserate mediert sind. Insgesamt ist noch weitgehend unklar, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der klinischen Manifestation der Depression und Neurogenese besteht (Couillard-Despres *et al.*, 2009).

Hormone und Neurotransmitter beeinflussen adulte Neurogenese. Neben diesen Faktoren sind auch Hormone und Neurotransmitter beschrieben, die an der Regulation der adulten, hippocampalen Neurogenese beteiligt sind. Um den inhibierenden Effekt von Glucocorticoiden wie Cortisol und Corticosteron, die von der Nebennierenrinde sekretiert werden, zu belegen, wurde in Experimenten die Freisetzung dieser Hormone durch die Entfernung der Nebennieren gehemmt, was einen Anstieg der Zellproliferation nach sich zog (Gould *et al.*, 1992; Cameron & Gould, 1994; Cameron & McKay, 1999; Montaron *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte eine Förderung der Proliferation durch Östrogen festgestellt werden (Tanapat *et al.*, 1999). Weiter wurde dokumentiert, dass durch die Blockierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors mit dem Glutamat-Rezeptor-Antagonisten MK-801 eine gesteigerte Neurogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bewirkt werden kann (Gould *et al.*, 1994; Arvidsson *et al.*, 2001; Okuyama *et al.*, 2004). In Analogie dazu findet sich nach Aktivierung des Rezeptors ein Rückgang der Proliferationsrate (Cameron *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1998).

Wachstumsfaktoren beeinflussen adulte Neurogenese. Eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Beeinflussung der adulten Neurogenese auf den Ebenen der Proliferation und Differenzierung wird auch den Wachstumsfaktoren zugewiesen. Von *in-vitro*-Daten weiß man, dass Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) oder Epidermal Growth Factor (EGF) benötigt werden, um neurale Vorläuferzellen in einem nicht differenzierten, proliferativen Zustand zu halten (Reynolds *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 1993). *In-vivo*-Studien konnten belegen, dass die intraventrikuläre Infusion von EGF in das ventrikuläre System adulter Ratten eine deutliche Erhöhung der Proliferation in der SVZ nach sich zieht. Die intraventrikuläre Infusion hatte dagegen keinen proliferationsinduzierenden Effekt auf die SGZ des GD (Kuhn *et al.*, 1997). Überraschenderweise hatte EGF zudem keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen, sondern verursachte vielmehr eine Verschiebung des Gleichgewichts von der neuronalen zu gunsten der glialen Differenzierung. FGF-2 förderte hingegen Proliferation, Überleben und neuronale Differenzierung im System SVZ/RMS/BO, nicht aber im HC (Kuhn *et al.*, 1997). Darüber hinaus gelten die Infusion von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) bzw. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), die einen deutlichen Anstieg der Zahl neu gebildeter Neurone im BO bzw. GD zur Folge haben (Zigova *et al.*, 1998; Aberg *et al.*, 2000), als positive Regulatoren der Neurogenese. Im Gegensatz dazu konnte kürzlich der Wachstumsfaktor und Immunregulator TGF-beta1 als ein weiterer wesentlicher Faktor identifiziert werden, der die Neurogenese *in vivo* auf Ebene der Zellproliferation inhibiert (Wachs *et al.*, 2006).

1.1.6. Die Untersuchung der Neurogenese

Die Neubildung von Nervenzellen sowie die Regulation dieses Prozesses durch verschiedene Faktoren und Einflüsse können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht werden.

Untersuchung der Neurogenese in vivo. Für die Analyse der Neurogenese *in vivo* existieren verschiedene Nachweismethoden, die alle auf einer Markierung sich teilender Zellen basieren. Zur Darstellung der Neurogenese eignen sich einerseits sogenannte Mitosemarker wie PCNA oder aber Infektionen mit einem Retrovirus. Ein Nachteil dieser Methoden besteht allerdings in der fehlenden, weiteren Charakterisierbarkeit der Zellen. So können anhand dieser Verfahren Stammzellen sowie gliale und neuronale Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden. Der Einsatz von synthetischen Thymidin-Analoga wie BrdU bietet dagegen den Vorteil der einfachen Kombinierbarkeit mit immunhistochemischen Markern und ermöglicht so eine zusätzliche Charakterisierung der BrdU-markierten Zellen. Nach systemischer Gabe von BrdU wird es während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen eingebaut (Miller & Nowakowski, 1988). Die markierten Zellen können nachfolgend durch die Verwendung von Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht werden. Ein limitierender Faktor dieser Methode ist allerdings, dass BrdU zur Markierung der proliferierenden Zellen in den lebenden Organismus appliziert werden muss, bevor post mortem die Auswertung erfolgen kann. Dies schließt Studien am Menschen gänzlich aus und macht insgesamt Verlaufsbeobachtungen lebender Organismen unmöglich. Abgesehen von dieser Einschränkung ergeben sich bei der Anwendung von BrdU zur Markierung proliferierender Zellen weitere Schwierigkeiten im Hinblick auf eine angemessene Dosierung. Während bei einer Überdosierung die Gefahr einer toxischen Wirkung auf den Organismus besteht, werden bei zu geringer Applikation von BrdU die sich teilenden Zellen möglicherweise nur unzureichend markiert. Unterschätzt werden sollte auch nicht die potentielle Wechselwirkung zwischen BrdU und anderen zur Untersuchung der Regulation der Neurogenese verwendeten Substanzen und die mögliche Auswirkung auf verschiedene zu analysierende Faktoren. Dennoch stellt die Markierung mit BrdU eine bedeutsame Methode dar, um Neurogenese nachzuweisen, da sie eine zusätzliche Charakterisierung der markierten Zellen erlaubt. In diesem Zusammenhang hat sich in den letzten Jahren Dcx als Marker für neuronal determinierte Vorläuferzellen etabliert (Brown *et al.*, 2003; Rao & Shetty, 2004). Dcx wird transient in migrierenden, postmitotischen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und ist zudem weder in Stammzellen oder glialen Vorläuferzellen noch in adulten Nervenzellen nachweisbar. Diese spezifische Expression macht das Protein zu einem einzigartigen Marker für Neurogenese.

Durch die gleichzeitige Verwendung von Dcx- und BrdU-Antikörpern in immunhistochemischen Färbungen im Anschluss an die BrdU-Markierung wird ermöglicht, das Ausmaß der Neurogenese *in vivo* durch eine Quantifizierung der neugebildeten, neuronalen Zellen, im Besonderen auch unter modulierenden Bedingungen, abzuschätzen.

Kultivierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen zur Untersuchung der Neurogenese in vitro. Wie bereits erwähnt, sind zur Klärung und Untersuchung vieler biochemischer und zellbiologischer Fragestellungen direkte Experimente am lebenden Organismus nicht durchführbar. In diesem Fall bedient man sich verschiedenster Modellsysteme, die möglichst vergleichbare Bedingungen liefern und somit übertragbare Ergebnisse erwarten lassen. Ein weiterer Zweig der Neurogenese- und Stammzellforschung setzt sich daher mit der Kultivierung und Charakterisierung primärer Zellkulturen aus NSZ *in vitro* auseinander. Zur Aufklärung verschiedener Aspekte, die *in vivo* nicht dokumentiert werden können, werden aNSZ isoliert und in Kultur gebracht. Sie können dann einerseits als schwimmende Aggregate, sogenannte „Neurospheres“, im Nährmedium kultiviert werden (Reynolds & Weiss, 1992). Andererseits gelingt die Expansion aNSZ auch als adhärente Kultur, wobei die Zellen auf beschichteten Oberflächen ausgesät werden und binnen kurzer Zeit einen adhärent wachsenden Zellrasen am Boden des Kulturgefäßes formen. Zellen, die aus dem Gehirn von adulten Ratten oder Mäusen gewonnen werden, können in der beschriebenen Weise nur in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 kultiviert und über mehrere Passagen hinweg expandiert werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass undifferenzierte Vorläuferzellen aus dem adulten HC so über lange Zeit in Kultur gehalten werden können, ohne das Potential zur Differenzierung in neuronale und gliale Zelltypen zu verlieren. Nachdem sie in den HC einer adulten Ratte implantiert wurden, konnte sowohl eine neuronale als auch eine gliale Differenzierung beobachtet werden (Gage *et al.*, 1995a). Bei Implantation der Zellen in die SVZ wanderten sie entlang des RMS in den BO ein, um dort neuronal auszudifferenzieren (Suhonen *et al.*, 1996). Durch Entzug der Wachstumsfaktoren und zusätzlichen Einsatz von Serum kann die Differenzierung einer aNSZ-Kultur in die drei Hauptzelltypen des ZNS (Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone) induziert werden (Reynolds & Weiss, 1992; Gage *et al.*, 1995b; Johansson *et al.*, 1999; Arsenijevic *et al.*, 2001). Ein weiterer Vorteil der aNSZ-Kulturen besteht in der einfachen Charakterisierbarkeit hinsichtlich des Neurogenespotentials sowie weiteren Merkmalen durch eine Kombination verschiedenster immunhistochemischer Marker. Diese Eigenschaften und die gute Verfügbarkeit machen NSZ aus Ratten und Mäusen zu einem optimalen Versuchsmodell, das neue Einsichten in wichtige Konzepte

der Vorläuferzellbiologie wie Selbsterneuerung, Multipotenz, Spezifizierung und Differenzierung erlaubt.

Trotz all dieser Möglichkeiten sind die derzeitigen Methoden in der Zellkultur noch nicht in der Lage, die Situation *in vivo* hinsichtlich der dort vorherrschenden Mikroumgebung adäquat zu imitieren. Vielmehr bedeutet die Kultur *in vitro* noch immer einen radikalen Wechsel der Umwelt. Obwohl sich Stammzellen bereits über längere Zeiträume kultivieren lassen, darf nicht darüber hinweggesehen werden, dass es dabei zu einer langsamen Veränderung der Eigenschaften der Zellen in Bezug auf ihren Charakter, ihr Potential und ihr Verhalten kommen kann, was offensichtlich durch die unnatürliche Umgebung hervorgerufen wird. Ein weiterer limitierender Faktor ist der begrenzte Zugang zu kultivierbaren Zellen, der insbesondere humane Zellen betrifft. Zudem sind gerade in diesem Bereich die Kulturbedingungen aufgrund fehlender, weitreichender Erfahrungen deutlich erschwert. Ratten- oder Mauszellen sind dagegen vergleichsweise leicht zugänglich, allerdings beschränken hier nicht standardisierte Kulturbedingungen die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse sowie deren Aussagekraft. Ein weiteres Problem besteht auch in der Inhomogenität der extrahierten Zellpopulation, die von Präparation zu Präparation variieren kann. Da Aspekte wie Selbsterneuerungspotential und Multipotenz *in vivo* nur schwer analysiert werden können, scheint die *ex-vivo*-Analyse trotz gewisser Einschränkungen unvermeidlich und durchaus angebracht. Auch im Hinblick auf Zellersatz durch Transplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen ist die Expansion aNSZ *in vitro* von außerordentlicher Wichtigkeit. Studien konnten zeigen, dass im Fall von Morbus Parkinson näherungsweise 250000 dopaminerge Neurone zugrunde gehen, bevor klinische Symptome in Erscheinung treten (Dunnett & Bjorklund, 1999). Da bei einer Transplantation nur 5-20 % der transplantierten Neurone überleben (Dunnett & Bjorklund, 1999), erfordert eine erfolgreiche Zelltherapie des ZNS eine sehr hohe Zahl an Zellen, die *in vitro* generiert werden können. Erste Erfolge sprechen für sich: In humanen Patienten mit Morbus Parkinson konnte bereits durch die Implantation von fötalen Vorläuferzellen, die *in vitro* generiert wurden, eine teilweise, funktionelle Regeneration bewirkt werden (Piccini *et al.*, 1999; Brundin *et al.*, 2000; Freed *et al.*, 2001).

1.2. Expression und Funktion von TGF-beta im Zentralnervensystem

1.2.1. Die Familie der TGF-betas

Die Superfamilie der TGF-betas umfasst eine Vielzahl von Proteinen. Derzeit kennt man mehr als 100 zugehörige, verschiedene Eiweißstoffe, wovon in etwa 40 den Säugetieren zugeordnet werden. Neben vielen weiteren Faktoren wie z. B. Aktivin, Inhibin, Bone Morphogenetic Protein (BMP) und Faktoren für Wachstum und Differenzierung (Growth/Differentiation Factors = GDFs), wird die Superfamilie der TGF-betas unter anderem durch eine kleine Gruppe multifunktioneller Zytokine repräsentiert, den TGF-betas. Diese Unterfamilie zählt bei Säugern drei verschiedene Isoformen: TGF-beta1, TGF-beta2 und TGF-beta3 (Massague, 1998; Bottner *et al.*, 2000).

Die Peptide der drei Mitglieder der TGF-beta-Familie weisen strukturell große Ähnlichkeiten auf. Ihr Aufbau ist gegliedert in ein N-terminales Signal-Peptid von 20-30 Aminosäuren Länge für die Sekretion, eine Prodomäne (genannt latency associated peptide oder LAP) sowie eine 112-114 Aminosäuren lange, C-terminale Region. Die Struktur der TGF-betas entspricht damit dem typischen Aufbau sezernierter Signalmoleküle. TGF-betas werden von der Zelle als inaktive Vorläuferproteine abgesondert. So wird TGF-beta1 zunächst in einer 391 Aminosäuren langen Vorstufe synthetisiert; TGF-beta2 und TGF-beta3 sind hingegen in Form von 412 Aminosäuren verschlüsselt. Bevor die inaktiven Vorläuferproteine an die Zielstruktur auf der Zelloberfläche binden können, muss ihre Aktivierung erfolgen. Das reife TGF-beta-Molekül entsteht hierbei durch proteolytische Abspaltung der C-terminalen Region, aus der das reife Peptid entsteht, von dem am Aminoterminus gelegenen Sekretionssignal zusammen mit der Pro-Region. Im Fall von TGF-beta1 wird das reife Peptid aus einer 112 Aminosäuren langen, C-terminalen Region gebildet. In der Folge dimerisiert es in die biologisch aktive Form, ein 25 kDa Homodimer, bestehend aus zwei jeweils 12,5 kDa schweren Peptiden, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Bottner *et al.*, 2000; Dennler *et al.*, 2002).

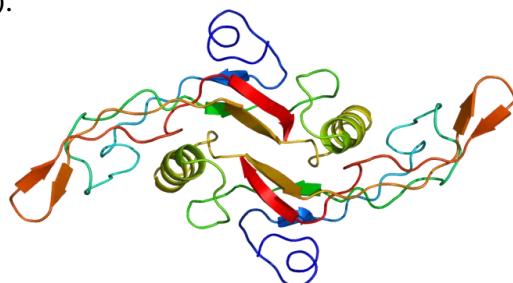


Abbildung 4: Die Proteinstruktur von TGF-beta1 (Emw, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-3.0, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>).

1.2.2. Die Expression von TGF-beta und TGF-beta-Rezeptoren im Nervensystem

Im adulten, intakten Gehirn findet man TGF-beta1 vorwiegend im Choroid Plexus und der Hirnhaut. Nach Verletzungen des ZNS wird TGF-beta1 zudem in astroglialen und neuronalen Zellen sowie vordergründig in Mikroglia exprimiert (Unsicker *et al.*, 1991; Constam *et al.*, 1992; Bottner *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Unsicker & Kriegstein, 2002). Verschiedene Gruppen konnten TGF-beta1-Expression auch in Neuronen und Astrozyten in Kultur nachweisen (Lindholm *et al.*, 1992; Morganti-Kossmann *et al.*, 1992; Vivien *et al.*, 1998; de Sampaio e Spohr *et al.*, 2002; Mittaud *et al.*, 2002; Sousa Vde *et al.*, 2004). Darüber hinaus nehmen die Hinweise zu, wonach TGF-beta1 während der Cortexentwicklung, im Sinne einer Expression in proliferativen Regionen, äußerst bedeutsam sein könnte (Miller, 2003).

Verglichen mit den Expressionsdaten, die für TGF-beta1 vorliegen, sind die Daten zur Verbreitung von TGF-beta2 und TGF-beta3 im ZNS weitaus umfangreicher und konsistenter. Während der frühen Embryonalentwicklung sind TGF-beta2 und TGF-beta3 sowie deren Rezeptoren in mehreren Arealen des ZNS anzutreffen: So findet sich ihre Expression in der Chorda Dorsalis, in der Bodenplatte und in der Mittelhirnanlage, wo die TGF-betas in Synergie mit anderen Wachstumsfaktoren das Überleben dopaminerger Neurone begünstigen. Es herrscht Übereinstimmung darüber, dass ihnen hier offensichtlich auch eine Rolle in der Regulation neuronaler Migration und Differenzierung, sowie darüber hinaus in der Proliferation und Differenzierung von glialen Zellen zukommt (Poulsen *et al.*, 1994; Farkas *et al.*, 2003; Roussa *et al.*, 2004; Roussa & Kriegstein, 2004). Während der Entwicklung wie auch im adulten Nervensystem werden TGF-beta2 und TGF-beta3, meist in Kombination, sowohl von Gliazellen als auch von Neuronen exprimiert und sind weit verbreitet (Flanders *et al.*, 1991; Pelton *et al.*, 1991; Flanders *et al.*, 1998; Bottner *et al.*, 2000; Unsicker & Strelau, 2000; Miller, 2003).

Auch die zur Signalübertragung erforderlichen Rezeptoren, TGFRI und TGFRII, sind im embryonalen sowie adulten ZNS nachweisbar (Bottner *et al.*, 1996; Vivien *et al.*, 1998; Bottner *et al.*, 2000). Der zur Aktivierung des TGFRI benötigte TGFRII ist im Gehirn auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, einschließlich Neuronen, Astroglia, Mikroglia, Endothelzellen und anderen nicht-neuronalen Zellen wie jenen des Choroid Plexus. Die Expression von TGFRII (und TGFRI) lässt sich darüber hinaus auch in radialen Gliazellen belegen

(Galter *et al.*, 1999; Miller, 2003). Zudem findet sich TGFRII-mRNA in verschiedensten Bereichen des Gehirns, darunter Mittelhirn, Kleinhirn, Hirnstamm, aber auch im zerebralen Cortex (Morita *et al.*, 1996; Ata *et al.*, 1999; De Groot *et al.*, 1999; Sousa Vde *et al.*, 2006). Kürzlich gelang der Nachweis des TGFRII *in vivo* in den beiden neurogenen Regionen des adulten Gehirns, dem HC und der SVZ. Im HC wurden TGFRII-immunreaktive Zellen vornehmlich im GD beobachtet. Im Bereich der SVZ zeigte sich eine Kolokalisation des Rezeptors in Zellen, die den neuralen Stammzellmarker Nestin exprimierten, jedoch selten in GFAP-positiven, astroglialen Zellen und beinahe nie in S100 β -immunreaktiven ependymal/glialen Zellen (Wachs *et al.*, 2006). *In vitro* konnte die mRNA-Expression von TGFRI, TGFRII und TGFRIII sowie die Expression von TGFRII-Protein in einer aNSZ-Kultur aus der SVZ der Ratte dokumentiert werden (Wachs *et al.*, 2006). Auch hier fand sich TGFRII-Expression vorwiegend in Nestin-positiven Zellen, während neuronale und astrogliale Marker sowie Marker für gliale Vorläuferzellen nicht oder nur schwach mit TGFRII ko-exprimiert waren.

1.2.3. Die TGF-beta-Signaltransduktion

Die Wirkung der TGF-betas auf die Zielzelle wird über Rezeptoren vom Typ-I (TGFRI, 53 kDa), Typ-II (TGFRII, 70-100 kDa) und Typ-III (TGFRIII, 200-400 kDa) an der Zelloberfläche vermittelt (Massague, 1990; Deryck & Feng, 1997; 1998). Typ-III-Rezeptoren (Betaglycan und Endoglin) spielen in erster Linie bei der Signalübertragung durch TGF-beta2 eine entscheidende Rolle. Hier erhöhen sie die Affinität von TGF-beta2 für den TGFRII und ermöglichen dadurch die Bindung des Liganden, ohne aber ein direktes Signal zu vermitteln. Im Gegensatz dazu erfolgt die Signaltransduktion von TGF-beta1 und TGF-beta3, unabhängig vom TGFRIII, über Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren (Berie & Moses, 2006). Derzeit sind sieben verschiedene Rezeptoren vom Typ-I und fünf vom Typ-II beschrieben (Berie & Moses, 2006). Diese Rezeptoren sind Glykoproteine und tragen zur Klasse der transmembranen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren bei. Sie bestehen aus einer kurzen, Cystein-reichen extrazellulären Domäne zur Bindung des Liganden, einem Transmembransegment und einer intrazellulären Region mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität (Massague, 1992; Wrana *et al.*, 1994; 1998; Bottner *et al.*, 2000; Massague & Chen, 2000b; Shi & Massague, 2003). Typ-I-Rezeptoren weisen zudem eine charakteristische, stark konservierte Sequenz auf, die reich an Glycin und Serin ist; sie bildet die sogenannte GS-Domäne (Shi & Massague, 2003). Darüber hinaus unterscheiden sich Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Aktivität. Während die Typ-II-Rezeptor-Kinase ständig aktiv ist, erfordert die Typ-I-Rezeptor-Kinase

zunächst eine Aktivierung. Diese wird durch Bindung von TGF-beta1 an den Typ-II-Rezeptor eingeleitet. Anschließend erfolgt die zusätzliche Anlagerung des Liganden an den Rezeptor I, wodurch sich ein kurzlebiger Komplex aus Rezeptor I, II und TGF-beta1 bildet (vgl. Abbildung 5). Nachfolgend findet eine Transphosphorylierung der GS-Domäne des Typ-I-Rezeptors durch die Typ-II-Rezeptor-Kinase statt (Wrana *et al.*, 1994). Dadurch kommt es zu einer Änderung der Konformation des Typ-I-Rezeptors, die mit der Aktivierung seiner Kinase einhergeht (Dennler *et al.*, 2002). Die aktivierte Typ-I-Rezeptoren können im Anschluss mit einer Reihe von spezifischen, zytoplasmatischen Proteinen in Interaktion treten. Als wichtigste Gruppe ist hier die Familie der Sma-mad-homology (Smad)-Proteine zu nennen. Diese sind Vertebraten-Homologe zu den Sma- bzw. Mad-Proteinen aus *Caenorhabditis elegans* bzw. *Drosophila melanogaster* (Gomes *et al.*, 2005).

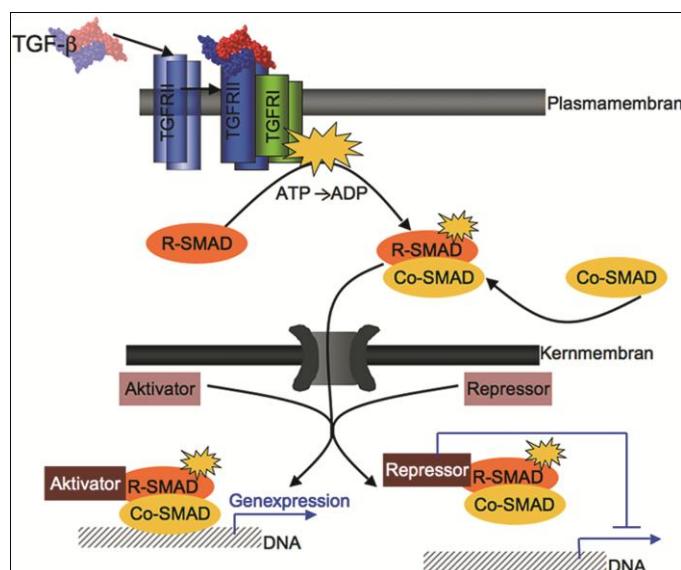


Abbildung 5: Die TGF-beta1-Signaltransduktion. Aktiviertes TGF-beta1 bindet an den TGFRII. Nachfolgend bildet sich ein kurzlebiger Komplex aus Rezeptor I und II sowie TGF-beta1. Der Typ-II-Rezeptor transphosphoryliert die GS-Domäne des Typ-I-Rezeptors und trägt dadurch zu dessen Aktivierung bei. Durch den aktivierte Typ-I-Rezeptoren kommt es zur Phosphorylierung intrazellulärer Smads sowie der Transduktion aktiverter Smads in den Nukleus, wo diese direkt und im Zusammenspiel mit weiteren Regulatoren die Genexpression beeinflussen. Das Signal wird schließlich durch Ubiquitinierung bzw. proteasomalen Abbau der Smads wieder abgeschaltet.

Charakteristisch für Smad-Proteine ist das Vorhandensein zweier, am Amino- und Carboxyende gelegenen Domänen, MH1 und MH2 (mad homology domains). MH1 wird für die Bindung an die DNA verantwortlich gemacht, während MH2 Funktionen, die die Interaktion mit anderen Proteinen wie Inhibitoren und Aktivatoren des Smad-Systems betreffen, zugeschrieben werden (Shi *et al.*, 1998). Nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften unterteilt man die Smads in drei Gruppen: rezeptorregulierte „R-Smads“ (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8), „Co-Smads“ (Smad 4) und inhibitorische „I-Smads“ (Smad6, Smad7)

(Dennler *et al.*, 2002). Rezeptorregulierte Smads werden direkt durch Typ-I-Rezeptor-Kinasen an Serinresten des Carboxyendes phosphoryliert und aktiviert (Souchelnytskyi *et al.*, 1997). Für den TGF-beta1-Signalweg sind dabei vor allem Smad2 und Smad3 von Bedeutung (Nakao *et al.*, 1997b). Nach der Aktivierung formen die „R-Smads“ über ihre MH2-Domänen Komplexe mit dem „Co-Smad“ Smad4. Der entstandene Smad/Proteinkomplex wandert in den Nukleus, um dort auf DNA-Ebene die Transkription der Zielgene zu regulieren (Dennler *et al.*, 2002). Die inhibitorischen Smads wirken als Antagonisten, indem sie die Aktivierung signaltransduzierender „R“- und „Co-Smads“ verhindern. „I-Smads“ interagieren effizient mit Typ-I-Rezeptoren und konkurrieren mit „R-Smads“ um die Bindung an den aktivierte Typ-I-Rezeptor (Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997a).

1.2.4. Die vielfältigen Funktionen von TGF-beta1 im adulten Nervensystem

TGF-beta1 wurde erstmals 1981 aufgrund seiner Fähigkeit, Wachstum in Nieren- und Fibroblastenzelllinien von Ratten zu induzieren, entdeckt, und danach benannt (Moses *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981). Schon kurze Zeit später wurde jedoch deutlich, dass seine biologische Aktivität keineswegs auf die wachstumsfördernde Wirkung beschränkt ist. Vielmehr konnte eine multifunktionelle Natur des Proteins - die offenbar stark von der jeweiligen Umgebung der Zelle sowie dem Zusammenwirken mit zusätzlichen, modulierenden Faktoren abhängt - nachgewiesen werden (Roberts, 1998): So entfaltet TGF-beta1, entgegen der ursprünglichen Vorstellung einer wachstumsfördernden Wirkung, unter anderem auch anti-proliferative Eigenschaften. Seit den 90er Jahren ist bekannt, dass TGF-beta auch im Nervensystem exprimiert wird und dort vielerlei Funktionen erfüllt (Bottner *et al.*, 2000). Auf welche Art und Weise die TGF-betas ihre vielseitigen Wirkweisen auf zellulärer Ebene regulieren, ist allerdings noch nicht endgültig geklärt. Man nimmt an, dass neben zelltyp-spezifisch exprimierten Rezeptoren andere Modulatormoleküle wie extra- und intrazelluläre Inhibitoren bzw. Aktivatoren bedeutsam sind, um die vielfältigen Effekte durch TGF-beta1 zu vermitteln (Shi & Massague, 2003). Vermutlich führen auch Unterschiede in der Struktur der Rezeptoren, die Dauer der Bindung an den Rezeptor sowie die örtliche Verteilung des Proteins dazu, dass im jeweiligen molekularen und zellulären Kontext die beabsichtigte Wirkung eintritt (Massague, 2000; Dennler *et al.*, 2002). Dementsprechend ist TGF-beta1 dazu in der Lage, gleichzeitig Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration von verschiedenen Zelltypen sowie die Bildung von Proteinen der extrazellulären Matrix zu modulieren. Abhängig von Zelltyp und Umgebung, fördert TGF-beta1 daher das Überleben der Zelle oder induziert Apoptose, stimuliert Zellproliferation oder begünstigt Differenzierung

und ruft Entzündungen hervor oder löst diese auf (Roberts & Sporn, 1996; Massague *et al.*, 2000a; Dennler *et al.*, 2002). Die vielfältigen Funktionen des Wachstumsfaktors werden im Anschluss näher beschrieben.

TGF-beta1 als Entzündungsmodulator im ZNS. Eine Schlüsselfunktion kommt TGF-beta1 in der Regulation der Immunantwort zu (Franzen *et al.*, 1993). Jede Art von Schädigung des ZNS, ob durch akut entzündliche Vorgänge (z. B. Enzephalitis oder Multiple Sklerose), Neurodegeneration (z. B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer) oder ischämische/hypoxische Ereignisse hervorgerufen (z. B. Schlaganfall, Herzstillstand), geht mit einer Aktivierung von mikroglialen Zellen einher. Diese sezernieren verschiedene signalgebende Zytokine, unter anderem TGF-beta1, welches nach einem entsprechenden Schaden am ZNS schwere, inflammatorische Reaktionen reguliert und eindämmmt, indem es die Proliferation und Aktivierung von Mikroglia unterdrückt (Suzumura *et al.*, 1993; Boche *et al.*, 2006).

TGF-beta1 als neurotropher Faktor. TGF-beta1 zeichnet sich außerdem durch seine neuroprotektive Wirkung gegenüber zahlreichen Toxinen aus (Flanders *et al.*, 1998), indem es seine schützenden Einflüsse auf eine Vielzahl peripherer und zentraler Neurone entfaltet. Darüber hinaus trägt der Wachstumsfaktor zur Überwachung des neuronalen Zelltods bei und fördert in diesem Zusammenhang das Überleben der Nervenzellen (Kriegstein *et al.*, 1998a; Kriegstein *et al.*, 1998b; Kriegstein *et al.*, 1998c; Roussa *et al.*, 2004). In Übereinstimmung belegen Studien, dass sich der Verlust von TGF-beta1 in TGF-beta1-deletierten Mäusen negativ auf die Überlebensrate neuronaler Zellen auswirkt. So weisen diese Tiere vermehrt apoptotische Neurone sowie eine weitverbreitete Aktivierung von mikroglialen Zellen auf (Brionne *et al.*, 2003).

TGF-beta1 beeinflusst die Migration von Zellen. Zudem konnte eine Beteiligung TGF-betas an der Zellmigration im zerebralen Cortex während der Entwicklung nachgewiesen werden (Siegenthaler & Miller, 2004). Bekannt ist außerdem, dass TGF-beta1 Einfluss auf die Migration und Motilität von Astrozyten nimmt. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass TGF-beta1 *in vitro* Zell-Zell-Kontakte von astroglialen Zellen verringert, wohingegen fokale Kontakte begünstigt werden. In der Folge erhöht sich die Bewegungsfähigkeit der Zellen (Baghdassarian *et al.*, 1993; Siegenthaler & Miller, 2004).

TGF-beta1 beeinflusst die Produktion extrazellulärer Matrix. TGF-beta1 ist ein pleiotropes Zytokin mit einer zentralen Funktion in der Wundheilung und Wiederherstellung von Geweben (Border & Noble, 1997). So kommt dem Wachstumsfaktor eine bedeutende Rolle

bei der extrazellulären Matrixbildung, z. B. bei der Bildung von Narben nach Läsionen des ZNS, zu (Brionne *et al.*, 2003). Hier fördert TGF-beta1 insbesondere die Produktion von Molekülen der extrazellulären Matrix (engl.: extracellular matrix, ECM) und beeinflusst maßgeblich deren Gestalt (Moon & Fawcett, 2001). Letztere Funktion ist jedoch keineswegs auf das läsierte Gehirn beschränkt; vielmehr kann TGF-beta1 die ECM auch im intakten ZNS verändern. In Astrozyten-Kulturen und transgenen Mäusen, die TGF-beta1 spezifisch in Astrozyten überexprimieren, steigert TGF-beta1 die Expression von ECM-Molekülen wie Laminin und Fibronektin (Wyss-Coray *et al.*, 1995). In Analogie weisen TGF-beta1-Knock-out-Mäuse eine verminderte Expression von Laminin auf (Brionne *et al.*, 2003).

TGF-beta1 beeinflusst das Zellwachstum und inhibiert Neurogenese in vivo. Entgegen seiner ursprünglich postulierten Eigenschaften, Wachstum in Nieren- und Fibroblastenzelllinien von Ratten zu induzieren, besitzt TGF-beta1 unter anderem auch anti-proliferative Eigenschaften. Proliferationshemmende Effekte durch TGF-beta1 wurden erstmals an *in vitro* kultivierten Astrozyten beschrieben (Johns *et al.*, 1992; Lindholm *et al.*, 1992; Morganti-Kossmann *et al.*, 1992; Baghdassarian *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1993; Rich *et al.*, 1999). Heute weiß man allerdings, dass TGF-beta1 zudem Schlüsselfunktionen bei der Differenzierung der astrogialen Zellen zukommen (Sousa Vde *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor die Proliferation von Mikroglia und Oligodendroglia inhibiert (McKinnon *et al.*, 1993; Suzumura *et al.*, 1993) und seine anti-proliferative Wirkung auf fötale kortikale, postnatale cerebelläre sowie retinale Neuroblasten und Vorläuferzellen entfaltet (Constam *et al.*, 1994; Miller & Luo, 2002; Close *et al.*, 2005). Erste *in-vitro*-Studien über den Einfluss von TGF-beta1 auf aNSZ des HC und der SVZ belegen außerdem, dass auch die Proliferation dieser Zellen nach 7-tägiger Inkubation mit TGF-beta1 deutlich verlangsamt ist. In Übereinstimmung zeigte eine durchfluszytometrische Zellzyklusanalyse eine Zunahme der G0/G1-Population nach TGF-beta1-Behandlung. Zeitgleich wurde eine dosisabhängige Reduktion der aNSZ-Expansion beobachtet, die sich in einer reduzierten Zellzahl widerspiegelte. TGF-beta1 hatte dabei keinen messbaren Einfluss auf die Fähigkeit der Stammzellen zur Selbsterneuerung und Differenzierung in die drei neuralen Zelltypen, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Wachs *et al.*, 2006). Des Weiteren blieb die Anzahl der Neurosphäroide unverändert; auch gab es keinen Anhaltspunkt, der auf einen vermehrten, apoptotischen Zelltod hingedeutet hätte. Eine 7-tägige intracerebroventrikuläre Infusion von TGF-beta1 *in vivo* bestätigte die *in vitro* gewonnenen Daten und zeigte ebenfalls eine reduzierte Zellproliferation in den neurogenen Regionen auf. Zudem fanden sich dort nach der

Infusion weniger Dcx-positive, neuronale Vorläuferzellen (Wachs *et al.*, 2006). Kürzlich vorgestellte Ergebnisse von Untersuchungen an transgenen Mäusen, die TGF-beta1 unter dem Promotor des GFAP-Gens spezifisch in Astrozyten überexprimieren, konnten die angeführten Daten *in vitro* und *in vivo* verifizieren und ebenso eine stark eingeschränkte Proliferation der NSZ nachweisen (Buckwalter *et al.*, 2006).

1.2.5. Die erhöhte Expression von TGF-beta1 bei Erkrankungen des Zentralnervensystems und ihre möglichen Auswirkungen auf die Neurogeneserate

Während TGF-beta1 in der Entwicklung eine herausragende Rolle spielt, ist der Wachstumsfaktor im intakten, adulten Nervensystem gewöhnlich nur geringfügig nachweisbar (Bottner *et al.*, 2000). Hier ist die Funktion von TGF-beta1 vorwiegend im Zusammenhang mit Läsionen und degenerativen Erkrankungen zu sehen: Unter pathologischen Bedingungen wird TGF-beta1 im Gehirn in erhöhtem Masse exprimiert. Dies betrifft zum einen akute Schädigungen und Traumata wie sie bei Ischämien oder Epilepsien auftreten (Klempt *et al.*, 1992; Krupinski *et al.*, 1996; Aronica *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001). Andererseits findet sich erhöhte TGF-beta1-Expression auch im Verlauf neuroinflammatorischer Ereignisse wie der Multiplen Sklerose (Link *et al.*, 1994; Nicoletti *et al.*, 1998; De Groot *et al.*, 1999). Gesteigerte TGF-beta1-Konzentrationen werden zudem bei neurodegenerativen Erkrankungen vorgefunden (van der Wal *et al.*, 1993; Grammas & Ovase, 2002; Tarkowski *et al.*, 2002). Durch *in-vivo*-Studien an transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die chronische Überproduktion von TGF-beta1 durch Astrozyten die mikrovaskuläre Degeneration sowie Amyloidbildung, welche primär mit der Alzheimer'schen Krankheit assoziiert werden, fördert (Wyss-Coray *et al.*, 2000). Auch in Parkinson-Patienten konnten signifikant erhöhte Mengen an TGF-beta1 in den dopaminergen Regionen des Striatums und im zerebrospinalen Fluid detektiert werden (Mogi *et al.*, 1995; Vawter *et al.*, 1996). Erhöhte Gehirnexpression von TGF-beta1 findet sich außerdem bei Amyotropher Lateral Sklerose (ALS) (Houie *et al.*, 2002; Ilzecka *et al.*, 2002) sowie zahlreichen weiteren Erkrankungen des ZNS, wie Rückenmarksverletzungen und -kontusionen (Semple-Rowland *et al.*, 1995), Hydrozephalus (Takizawa *et al.*, 2001), Kreutzfeldt-Jakob (Baker *et al.*, 1999) und Gehirntrauma (Rimaniol *et al.*, 1995). Aber auch im alternden Gehirn sind erhöhte Mengen an TGF-beta1 vorhanden (Bye *et al.*, 2001). Verstärkte Expression lässt sich zudem in Tumoren nachweisen; hier fungiert TGF-beta1 zwar einerseits als Tumorsuppressor-Protein, kann aber andererseits die Krebserkrankung auch begünstigen (Deryck *et al.*, 2001).

Die angeführten neurologischen Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Expression von TGF-beta1 einhergehen, können die Neurogeneserate auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So können insbesondere akute Schädigungen des Gehirns nach Schlaganfall oder Ischämie die Neubildung von Nervenzellen im HC und der SVZ kurzzeitig erhöhen (Arvidsson *et al.*, 2002; Parent *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ist während vielen chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer sowie entzündlichen ZNS-Erkrankungen die Neurogeneserate vermindert (Monje *et al.*, 2003). Obwohl die an der Regulation der Neurogenese beteiligten Signalmoleküle noch weitgehend unbekannt sind, scheint es naheliegend, dass TGF-beta1 zu den molekularen Ursachen für die veränderte Neurogenese unter pathologischen Bedingungen zählt, da sowohl bei akuten wie auch chronischen Läsionen am ZNS eine Aktivierung von mikroglialen Zellen erfolgt, welche in der Folge eine Entzündungsreaktion hervorrufen und TGF-beta1 sezernieren (Lehrmann *et al.*, 1998). Vermutlich ist die gleichzeitig angenommene neurogenesefördernde bzw. -inhibierende Wirkung TGF-betas im Anschluss über eine Vielzahl an weiteren Faktoren moduliert, sodass TGF-beta1 seine Einflüsse als multifunktionelles Protein abhängig vom jeweiligen zellulären und molekularen Kontext entfalten kann. Inwieweit TGF-beta1 letzten Endes aber tatsächlich als (Mit-)Ursache für die veränderte Neurogenese unter pathologischen Bedingungen angesehen werden kann und die Ausprägung verschiedener neurologischer Erkrankungen, die mit dem Absterben von Neuronen einhergehen, beeinflusst, liegt derzeit noch im Dunkeln und bedarf noch vieler weiterführender Studien.

1.3. Ziel der Arbeit

Wie in den vorhergehenden Abschnitten eingehend dargestellt, gehen neurologische Erkrankungen und Läsionen des ZNS sehr häufig mit dem Verlust neuronaler Zellen einher. Zudem ist das Ausmaß der Neubildung von Nervenzellen unter pathologischen Bedingungen, meist verursacht durch eine reduzierte Stammzellproliferation, erniedrigt. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl an Faktoren identifiziert werden, die den komplexen Vorgang der Neurogenese unter physiologischen Bedingungen regulieren. Die vielschichtigen molekularen und zellulären Mechanismen und Zusammenhänge, die zu einer verminderten Proliferation der aNSZ beitragen und infolgedessen zu einer reduzierten Neurogenese im Verlauf neurologischer Erkrankungen führen, sind dennoch nur in Ansätzen verstanden. Diese müssen zweifelsohne noch sehr viel eingehender untersucht werden, um letztlich die Voraussetzung für eine gezielte Modulation der Neurogenese im Rahmen einer klinischen Anwendung zu

schaffen. In der Literatur gibt es erste Daten, die darauf hindeuten, dass Entzündungsfaktoren an der Reduktion der Neurogenese unter pathologischen Bedingungen beteiligt sind. Der Wachstumsfaktor TGF-beta1 wird bei Erkrankungen des ZNS im Gehirn in erhöhtem Maße exprimiert und gilt in diesem Zusammenhang als ein wesentlicher Faktor, der zu einer verminderten Stammzellproliferation führt und dadurch die Neurogenese beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-beta1 die Proliferation von aNSZ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verringert (Wachs *et al.*, 2006). Ein großes Defizit besteht hingegen noch immer um das Wissen über den Einfluss von TGF-beta1 auf die Differenzierung aNSZ. Präliminäre Daten einer DNA-Array-Genexpressionsanalyse TGF-beta1-behandelter aNSZ weisen darauf hin, dass TGF-beta1 möglicherweise die Zellidentität sowie Komponenten der TGF-beta1-Signaltransduktion verändert. Die Daten zeigen

- eine verminderte Expression des neuroektodermalen Stammzellmarkers Nestin (Nes)
- eine erhöhte Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Doublecortin (Dcx)
- eine verminderte Expression des oligodendroglialen Markers Myelin basic protein (Mbp) sowie
- eine verminderte Expression des TGF-beta1-Binderezeptors TGFRII

nach TGF-beta1-Behandlung.

Basierend auf den angeführten Vorarbeiten und den präliminären Daten lassen sich nun folgende Ziele für die Promotionsarbeit formulieren:

1.) Im ersten Teil der Arbeit soll eine vollständige Auswertung der DNA-Array-Genexpressionsanalyse TGF-beta1-behandelter aNSZ erfolgen. Hierzu sollen die Ergebnisse des DNA-Arrays zunächst vergleichend den Ergebnissen eines anderen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Arrays, gegenübergestellt und nachfolgend gemeinsam analysiert werden. Durch Realtime-PCR-Analysen soll im Anschluss die veränderte Expression von ausgewählten Kandidatengenen nach TGF-beta1-Behandlung verifiziert werden. Darüber hinaus soll mithilfe dieser Methode das Expressionsmuster verschiedener Zielgene im zeitlichen Verlauf bestimmt werden.

2.) In einem zweiten Schritt soll die geplante Arbeit den Einfluss von TGF-beta1 auf das Zellschicksal aNSZ im Detail analysieren, das heißt sowohl auf zellulärer (Proliferation, Differenzierung) wie auch auf molekularer Ebene. Die präliminären Daten weisen diesbezüglich auf eine TGF-beta1-induzierte Veränderung der neuralen Stamm- und Vorläuferzellidentität hin, die mit einer Induktion des neuronalen Phänotyps korreliert. Möglicherweise treibt

TGF-beta1 die Zellen von einem neuralen Stammzellphänotyp (Verlust von Nestin) hin zu einem neuronalen Vorläuferzellphänotyp (erhöhte Expression des neuronalen Vorläuferzell-markers Dcx). Diese Hypothese soll im Rahmen der Promotionsarbeit an Zellkulturen aNSZ ausführlich getestet werden. Um Aufschluss über den Einfluss von TGF-beta1 auf das Zellschicksal zu erhalten, sollen neben mRNA-Untersuchungen auch Expressionsanalysen auf Proteinebene durchgeführt werden. Eine besondere Berücksichtigung soll hierbei das Schicksal der neuronalen Zellen finden. Des Weiteren soll der potentielle Einfluss von TGF-beta1 auf neu generierte, nicht etablierte Kulturen beurteilt werden.

3.) Ausgehend von der veränderten Proliferation nach TGF-beta1-Behandlung richtet sich ein weiterer Fokus der Arbeit auf die Charakterisierung TGF-beta1-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ mittels durchflusszytometrischer Analysen. Zu diesem Zweck soll eine FACS-Methode etabliert werden, die es erlaubt, die Anteile der Zellpopulationen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus aNSZ zu quantifizieren. Unter Einbezug der Array-Daten sollen Zellzyklusgene, deren Expression durch TGF-beta1 verändert ist, in einer Übersicht zusammengestellt werden. Diese stellen mögliche Zielgene zur Entwicklung pharmakologischer Substanzen dar, die das Maß an adulter Neurogenese erhöhen, und damit zur strukturellen und funktionellen Verbesserung bei neurodegenerativen Erkrankungen beitragen können.

4.) Das vorgestellte Projekt dient darüber hinaus der Abklärung und Spezifizierung einer möglichen, funktionellen Rolle TGF-betas. Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen soll geklärt werden, ob die neuronal determinierten Zellen nach TGF-beta1-Behandlung elektrische Eigenschaften von Nervenzellen aufweisen und damit funktionell von Bedeutung sind. Weiter soll in diesem Zusammenhang die postulierte neuroprotektive Wirkung TGF-betas durch NMR-Analysen an aNSZ überprüft und sein möglicher Einfluss auf Zelltod evaluiert werden.

Die auf diesem Wege gewonnenen Daten sollen einen Beitrag dazu leisten, die Regulation adulter Neurogenese, insbesondere unter pathologischen Bedingungen (in deren Verlauf TGF-beta1 verstärkt exprimiert wird), besser zu verstehen. Gerade im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika ist ein umfassenderes Verständnis darüber, wie verschiedene Faktoren die Neurogenese im Einzelnen beeinflussen von großer Relevanz, gleichzeitig aber auch unabdingbare Voraussetzung, um das latent vorhandene, körpereigene Regenerationspotential in Zukunft in optimaler Weise therapeutisch nutzen zu können. Ausgehend von neuen

Erkenntnissen könnten gezielt Medikamente entwickelt werden, die basierend auf einer Erhöhung der Neurogeneserate, den neuronalen Zellersatz bei neurodegenerativen Erkrankungen und damit strukturelle und funktionelle Verbesserungen fördern sollen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von BrdU auf aNSZ. Wie bereits beschrieben (vgl. 1.1.6.), wird BrdU standardmäßig eingesetzt, um in Kombination mit einem Marker für neuronale Vorläuferzellen (Dcx) den Nachweis für Neurogenese bei verschiedenen Bedingungen (z. B. TGF-beta1-Stimulation) zu erbringen. In Studien, in denen BrdU zur Markierung sich teilender Zellen angewendet wird, werden mögliche Wechselwirkungen mit anderen Substanzen sowie direkte Einflüsse des Thymidinanalogs auf die jeweiligen Zellen in der Regel aber nicht berücksichtigt. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher auch eine Reihe von Untersuchungen, die dem Zweck dienen, die potentiellen Auswirkungen einer BrdU-Markierung auf aNSZ *in vitro* und *in vivo* zu erfassen. Insbesondere sollen folgende spezifischen Ziele erreicht werden:

- 1.) Es soll eine mögliche Beeinflussung der Zellproliferation aNSZ durch BrdU sowie gegebenenfalls des Zellzyklus mittels durchfluszytometrischer Analysen untersucht werden.
- 2.) Unter gezielten oligodendroglialen, neuronalen und astrogialen Differenzierungsbedingungen soll darüber hinaus der Einfluss von BrdU auf die Differenzierung aNSZ analysiert werden. Hierzu sollen Expressionsanalysen (mRNA: Realtime-PCR) unter Anwendung zelltyp-spezifischer Marker durchgeführt werden, um deren möglicherweise veränderte Expression nach BrdU-Markierung nachzuweisen und die Identität der betroffenen Zellen zu ermitteln. Anhand dieser Daten soll außerdem geklärt werden, ob BrdU womöglich auch die Neubildung von Nervenzellen beeinflussen kann.
- 3.) Nach einer ausreichenden Charakterisierung soll weiterhin überprüft werden, ob BrdU Zelltod in aNSZ verursacht. In Vorversuchen, in denen BrdU in Zellkulturen appliziert wurde, wurde beobachtet, dass die BrdU-behandelten Zellen nach einer gewissen Zeit adhärent werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollen an diesem Prozess beteiligte Faktoren identifiziert werden.
- 4.) Darüber hinaus soll der Einfluss von BrdU auf die Proliferation und das Überleben aNSZ *in vivo* evaluiert werden. Hierfür soll einerseits BrdU direkt in Versuchstiere injiziert werden; andererseits sollen Zellen, die *in vitro* mit BrdU markiert wurden, durch eine Transplantation in Versuchstiere eingebracht werden. Im Anschluss soll jeweils eine Quantifizierung erfolgen.

Die Ergebnisse dieses Teilprojekts der vorliegenden Promotionsarbeit sollen ermöglichen, umfangreichere Kenntnisse über die grundlegenden Auswirkungen einer BrdU-Markierung auf proliferierende aNSZ zu erlangen. Ein erweitertes Verständnis der Zusammenhänge soll darüber hinaus dazu beitragen, künftig Effekte, die durch eine BrdU-Markierung verursacht sind, eindeutig von Effekten, die durch die im jeweiligen Versuch applizierten Substanzen (z. B. TGF-beta1) hervorgerufen werden, abzugrenzen. Dies ist insbesondere auch im Hinblick auf die Untersuchung der Neurogenese von außerordentlicher Wichtigkeit, um die Möglichkeit einer Fehleinschätzung von Daten auszuschließen, die im Falle einer Beeinflussung aNSZ durch BrdU gegeben wäre. Der tatsächliche Nachweis einer Wirkung von BrdU auf aNSZ würde deshalb erfordern, dass in letzter Konsequenz andere Methoden zur Markierung der proliferierenden Zellen zum Einsatz kommen, die selbst keinen Einfluss auf das zu untersuchende System ausüben und somit nicht die Gefahr einer fehlerhaften Einschätzung der Datenlage in sich bergen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

In diesem Kapitel sind Materialien und deren Herkunft aufgeführt, die nicht eigens im Methodenteil erwähnt werden.

2.1.1. Tiere

Für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit sowie zur Gewinnung primärer Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, adulte (ca. 3-4 Monate alte), weibliche Fischer-344-Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet.

2.1.2. Medien, Zusätze und Wachstumsfaktoren für die Zellkultur

Chemikalie	Firma
α -minimal essential medium (MEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Accutase TM	Innovative Cell Technologies, USA
Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
B27 supplement	Gibco BRL, Karlsruhe
2'-Desoxycytidin (DC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dispase II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I	Worthington Biochemicals, USA
Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Epidermal Growth Factor (EGF)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN TM BIOTECH GmbH, Aidenbach
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laminin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	PAN TM BIOTECH GmbH, Aidenbach
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Menadion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neurobasal Medium (NB)	Gibco BRL, Karlsruhe
Papain	Worthington Biochemicals, USA
Penicillin	PAN TM BIOTECH GmbH, Aidenbach
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	PAN TM BIOTECH GmbH, Aidenbach
Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

2.1.3. Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma
Acepromazinmaleat	Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf
Acrylamid-Bisacrylamid 30 % (v/v) /0,8 % (v/v)	Bio-Rad Laboratories, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Calbiochem, USA
Agarose für DNA-Elektrophorese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Chemikalie/Reagenz	Firma
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % w/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brij 35	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie brilliant blue R-250	Merck, Darmstadt
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat (DAPI)	Molecular Probes, USA
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure (DSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Merck, Darmstadt
Deuterium-Wasser (D_2O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
Esel-Serum	PAN TM BIOTECH GmbH, Aidenbach
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethyldiamin-Tetraacetat (EDTA)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethylenglykol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt
FACS Clean Reinigungsflüssigkeit	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse Spülflüssigkeit	Becton Dickinson, Heidelberg
Fischhaut-Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluoromount-G	Southern Biotech, USA
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelschaum	Braun, Melsungen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Ketamin	WDT, Garbsen
Kochsalz (NaCl)-Lösung	Braun, Melsungen
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Master Mix 2,5 x	Eppendorf, Hamburg
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Neo-Mount	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalie/Reagenz	Firma
Prolong Gold antifade reagent	Molecular Probes, USA
2-Propanol (70 %)	B. Braun, Melsungen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Quanti Tect® Primer Assays	Qiagen GmbH, Hilden
RNase A	Roche, Grenzach-Wyhlen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sucrose	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura, USA
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma® Base (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylazinhydrochlorid	Bayer, Leverkusen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4. Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (Kits)

Kit	Firma
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Grenzach-Wyhlen
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, England
Quanti Tect™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rat TGF-beta1-ELISA	Bender MedSystems GmbH, Österreich
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, USA

2.1.5. Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Auftragspuffer (10 x)	0,3 % w/v Bromphenolblau, 0,3 % w/v Xylencyanol, 0,02 M EDTA, pH 8.0, 60 % v/v Glycerin
Entfärbelösung	50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 40 % dH ₂ O
Entwicklungs puffer (1 x)	50 mM Tris, 50 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,02 % Brij 35
Fish Skin Gelatine (FSG)-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0,15 M NaCl, 1 % w/v BSA, 0,2 % v/v Fischhaut-Gelatine, optional: 0,1 % v/v Triton X-100

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Fish Skin Gelatine (FSG)-Puffer für Western blot	20 mM Tris-HCl pH 7.3, 0,9 % w/v NaCl, 1 % v/v Fischhaut-Gelatine, 0,1 % v/v Tween-20
Kryoprotekt-Lösung	25 % v/v Glycerin, 25 % v/v Ethylen-Glykol, 50 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4
Laufpuffer	25 mM Tris, 1,92 M Glycerin, 1 % SDS
Laufpuffer für Zymografie (1 x)	24 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS
Loading dye (6 x)	0,35 M Tris-HCl pH 6.8, 30 % v/v Glycerin, 10 % w/v SDS, 0,6 M DTT, 0,012 % w/v Bromphenolblau in dH ₂ O
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS
PFA-Lösung	4 % w/v PFA, 2,5 mM NaOH, 0,4 mM CaCl ₂ , 50 mM Sucrose, 0,1 M Na ₃ PO ₄
PPD-Lösung	0,01 % Papain, 0,1 % Dispase II, 0,01 % DNase I, 12,4 mM MgSO ₄ in HBSS (ohne Mg ⁺⁺ und Ca ⁺⁺)
Probenpuffer (2 x)	25 % 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 40 % v/v SDS (10 % w/v), 20 % v/v Glycerin, 5 % v/v Bromphenolblau, 10 % dH ₂ O
Renaturierungspuffer (10 x)	2,5 % v/v Triton X-100 in dH ₂ O
SUB-Puffer	0,5 % SDS, 2 % 2-Mercaptoethanol, 8 M Harnstoff
TBE-Puffer (0,5 x)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0
TBS	0,1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0,15 M NaCl
Transferpuffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin

2.1.6. Verwendete Standards

Nukleinsäurestandards:	Firma
PCR Marker, Bandenspektrum 50-766 bp	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Protein-Gelelektrophorese-Standards:	Firma
E-PAGE TM MagicMark TM Unstained Protein Standard, Bandenspektrum 20 bis 220 kDa	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
E-PAGE TM SeeBlue® Pre-Stained Standard, Bandenspektrum 20 bis 260 kDa	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.7. Verbrauchsmaterial

Material	Firma
BD Plastipak™ Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Microlance™ Kanülen (Nr. 1)	Becton Dickinson, Heidelberg
Chamberslides	Nunc, Dänemark
Deckgläser und Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, USA
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim; Semperit, Österreich
Kryoröhrchen	Nunc, Dänemark
Netzeinsätze	Corning, München
NMR-Röhrchen	Shigemi Inc., USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefässe	Eppendorf, Hamburg; Falcon BD, Heidelberg; Sarstedt, Nümbrecht; TPP, Schweiz
Well-Platten (12-, 24-, und 96-Well)	TPP, Schweiz
Whatman-Papier	Whatman Int. Ltd., England
Zellkulturflaschen T 25 (100 ml)	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen T 75 (250 ml)	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.8. Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank HERA cell	Heraeus/Kendro, Hanau
Consort E 835 Netzgerät	Fröbel Labortechnik, Lindau
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Emax Precisions Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hiz GmbH, Hamburg
Fastblot Elektroblotter	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Leica DMR mit SPOT Dokumentationssystem	Leica, Solms Diagnostic Instruments, USA
¹ H-NMR Avance 600 und 800 MHz Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Inverses Fluoreszenzmikroskop für die Zellkultur: Olympus IX 70 mit Color View Dokumentationssystem	Olympus, Hamburg Soft Imaging Systems, Münster
Konfokales Scanning-Lasermikroskop mit Leica Confocal Software	Leica, Heidelberg
Kryostat CM 3000	Leica, Bensheim
Kühl-Tischzentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop DM RBE	Leica, Bensheim
Lichtmikroskop Olympus CK 30	Olympus, Hamburg
Megafuge 1.0 R	Heraeus/Kendro, Hanau
Milli Q Water System	Millipore S. A., Frankreich
Minigel Twin Apparatur für SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Mx 3000 P® QPCR System	Stratagene, USA
My Cycler™ thermal cycler	BIO-RAD Laboratories, USA
Picospritzer II	General Valve, USA
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Photodokumentation Ethidiumbromid Gele	MWG-Biotech, Ebersberg
Photometer Ultrospec 2000	Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg
Schlittenmikrotom SM 2000 R	Leica, Bensheim
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus/Kendro, Hanau
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf mini spin plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA

Gerät	Firma
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.9. Verwendete Programme

Programm	Firma oder Internetadresse
Adobe Illustrator 10	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop® CS 2 v 9.0	Adobe Systems GmbH, München
Analysis Color View 3.0	Soft Imaging Systems, Münster
BD CELL Quest™ Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Expo 32 v 1.2	Phoenix Flow Systems, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Microsoft Office	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Mx Pro™ QPCR Software	Stratagene, USA
PRIMER3	Biology Workbench of the San Diego Supercomputer Center: http://workbench.sdsc.edu
Softmax	Molecular Devices, USA
Stereoinvestigator	MicroBrightField, USA
Spot 3.5.9. für Mac OS	Diagnostic Instruments, USA
Win Cycle 32 v 11.05.02 Beta	Phoenix Flow Systems, USA
Win MDI 2.8	http://facs.scripps.edu/software.html

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Zellpräparation und Zellkultivierung

2.2.1.i. Gewinnung primärer Zellen aus dem Gehirn der Ratte

Das experimentelle System der vorliegenden Arbeit bildeten NSZ-Kulturen der adulten Ratte. Alle Experimente wurden an Zellen aus der SVZ durchgeführt.

Zellen aus dem Gehirn weiblicher Fischer-344-Ratten wurden gemäß eines modifizierten, bereits beschriebenen Protokolls (Wachs *et al.*, 2003), isoliert. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit der European Communities Council Directive (86/609/EEC) und gemäß den Richtlinien des Instituts für Neurologie durchgeführt. Fünf Ratten pro Präparation wurden zunächst mit einer Mischung aus Ketamin (24,8 mg/ml; 10 % Ketamin), Acepromazinmaleat (0,248 mg/ml; Vetranquil) und Xylazinhydrochlorid (1,26 mg/ml; Rompun) anästhesiert, getötet und dekapitiert. Im Anschluss wurden die Gehirne unter sterilen Bedingungen freigelegt, um dann die SVZ des Gehirns zu entnehmen. Die Gewebeproben wurden in einer Sicherheitswerkbank mechanisch mit einer Rasierklinge zerkleinert, in 15-ml-Röhrchen mit ca. 10 ml eiskalter Dulbeccos phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS) überführt und einmal für 5 min bei 120 x *g* und 4°C gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4 ml PPD-Lösung aufgenommen und während der nächsten 30 bis 40 min bei 37°C alle 10 min kräftig mit einer 10-ml-Pipette trituriert. Die dissoziierten Zellen wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 120 x *g* pelletiert und einmal in 10 ml NB-B27-not-all-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) gewaschen. Zuletzt wurden sie in NB-B27-all-Medium (Proliferationsmedium, Zusammensetzung siehe Tabelle 1) resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät. Diese Zellen werden im Folgenden als Passage 0 (P0)-Zellen bezeichnet.

NB-B27-not-all	NB-B27-all
Neurobasal Medium (NB)	Neurobasal Medium (NB)
1:50 v/v B27-Supplement	1:50 v/v B27-Supplement
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin	0,1 mg/ml Streptomycin
	20 ng/ml EGF
	20 ng/ml FGF-2
	2 µg/ml Heparin

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

In Anwesenheit des epidermalen Wachstumsfaktors EGF und/oder des Fibroblastenwachstumsfaktors FGF-2 proliferieren, unter serumfreien Bedingungen, selektiv NSZ und generieren sogenannte „Neurospheres“ oder „Neuroosphäroide“ (Wachs *et al.*, 2003), welche als Sus-

pensionszellen, frei im Nährmedium schwimmend, wachsen. Da diese Primärkulturen, im Gegensatz zu etablierten Zelllinien, mit höherer Passagenzahl (>20) ihr multiples Differenzierungspotential verlieren und chromosomal Veränderungen unterworfen sind (Wachs *et al.*, 2003), mussten im Rahmen der vorliegenden Arbeit regelmässig aNSZ-Kulturen generiert werden. Zu Beginn jeder Kultivierung musste in kurzen Zeitabständen das Medium erneuert werden.

2.2.1.ii. Standardzellkultur

Allgemeines. Sämtliche Kulturen eukaryontischer Zellen erfolgten in wasserdampfgesättigter, 5 % CO₂-enthaltender Atmosphäre bei 37°C im Begasungsbrutschrank „HERA cell“. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden zum Schutz vor Kontamination an einer Sicherheitswerkbank („HERA safe“) ausgeführt.

Alle Zellen wurden - sofern nicht anders angegeben - in Gewebe-Kulturflaschen aus Plastik mit 75 cm² Fläche in einer Zelldichte von 5 x 10⁴ Zellen/ml in 10 ml NB-B27-all-Medium ausgesät. Jeweils an Tag 4 wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Hierbei wurde die Hälfte des teilweise verbrauchten Mediums durch Neues ersetzt.

Passagieren der Zellen. Nachdem die P0-Zellen über einen Zeitraum von ca. 7 Tagen kultiviert worden waren, wurden sie mit Accutase vereinzelt. Zum Passagieren der Sphäroiden (P0 => P1) wurde zunächst die Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 120 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl Accutase resuspendiert. Die Zellsuspension wurde kräftig trituriert und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Zellen zu vereinzelnen. Das Abstoppen der Accutase-Reaktion erfolgte durch Zugabe von 900 µl NB-B27-all-Medium. Anschließend musste zunächst die Zellzahl bestimmt werden, bevor die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät werden konnten. Im Allgemeinen wurden die Primärzellkulturen dann nach einem weiteren Proliferationszyklus von 7 Tagen wieder passagiert (P1 => P2). Um sicherzustellen, dass die für die Experimente benutzten Kulturen angemessen proliferierten und zudem größtenteils frei von Verunreinigungen (z. B. Zellschrott, unerwünschte Zelltypen) waren, wurden - sofern nicht anders angegeben - für alle Experimente aNSZ ab P2 (bis P8) verwendet.

Bestimmung der Zellzahl. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Aus einer mit Accutase vereinzelten Zellsuspension wurde ein Aliquot von 10 µl steril entnommen und mit 90 µl Trypanblau-Lösung verdünnt (1:10). Die Verdün-

nung wurde auf die Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgewertet. Es wurden alle 4 Quadranten, welche jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt waren, ausgezählt. Durch das Trypanblau werden tote Zellen blau gefärbt, lebende hingegen erscheinen farblos. Nach dem Auszählen lässt sich die Zellzahl pro ml folgendermaßen berechnen:

$$\text{Zellzahl}/4 \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

Einfrieren von Zellen. Um die Zellen einzufrieren, wurden sie nach der Ernte 5 min bei 120 x g pelletiert und anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden in 500 µl kaltem Einfriermedium (70 % NB-B27-all, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nachdem sie einige Tage bei -80°C gelagert wurden, konnten sie zur Langzeitlagerung bei -179°C in einen Flüssigstickstofftank überführt werden.

Auftauen von Zellen. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und rasch im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Dann wurden die Zellen mit warmen NB-B27-not-all-Medium gewaschen und anschließend in NB-B27-all-Medium in Kulturflaschen ausgesät.

Vorbehandlung und Beschichtung von Glasdeckgläsern für die Kultivierung von Zellen. Die Glasdeckgläser wurden zunächst für 4-6 h bei 60°C mit 1 M HCl inkubiert und anschließend dreimal mit dH₂O gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie in 70%igem (v/v) Isopropanol aufbewahrt. Unter der Sicherheitswerkbank wurden die vorbehandelten Glasdeckgläser dann mit einer Pinzette aus dem Isopropanol entnommen und einzeln in die Vertiefungen einer Well-Platte gestellt. Nachdem der Alkohol verdampft war, wurden sie vorsichtig in die Vertiefungen gelegt und mit je 500 µl Poly-L-Ornithin (250 µg/ml) bedeckt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C im Begasungsbrutschrank. Im Anschluss daran wurde das Poly-L-Ornithin abgesaugt und die Platte dreimal mit je 500 µl dH₂O pro Well gewaschen. Die Glasdeckgläser wurden an der Luft getrocknet und mit je 500 µl Laminin (15 µg/ml) in DPBS beschichtet. Die folgende Inkubationszeit im Brutschrank betrug ebenfalls 2 h. Während der letzten halben Stunde wurden die Zellen, die später auf der beschichteten Platte ausgesät werden sollten, bereits durch Vereinzeln und Auszählen vorbereitet und in der gewünschten Dichte in Medium aufgenommen. Nachdem die zweistündige Inkubation beendet war, wurde das Laminin vorsichtig abgesaugt. Unmittelbar danach wurden die Zellen auf die Glasdeckgläser ausgesät.

2.2.1.iii. Stimulation einer neu generierten Kultur (P0) mit TGF-beta1

P0-Zellen aus der SVZ der Ratte wurden nach der Isolierung (vgl. 2.2.1.i.) in NB-B27-all-Medium in T25-Kulturflaschen ausgesät. Da es aufgrund von Verunreinigungen (Zellschrott, unerwünschte Zelltypen) in der neu generierten Kultur unmöglich war, die Zellen zu zählen, wurden zunächst gleiche Volumina an Zellsuspension für Kontrollzellen und TGF-beta1-behandelte Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag (Tag 1) erfolgte die erste Zugabe von TGF-beta1, gelöst in 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Stockkonzentration: 10 µg/ml), in einer Endkonzentration von 10 ng/ml. Im Folgenden wurde TGF-beta1 zweimal wöchentlich, jeweils an bestimmten Tagen, bei gleicher Konzentration zugesetzt. Kontrollzellen erhielten zu allen Zeitpunkten der TGF-beta1-Stimulation anstelle des Wachstumsfaktors entsprechende Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA. Da es sich um eine neu generierte Kultur handelte, wurden, wenn nötig, jeweils am Tag der TGF-beta1-Zugabe Medienwechsel durchgeführt und TGF-beta1 erst im Anschluss zugesetzt. Ebenso wurden die Zellen nach Bedarf vereinzelt und in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml Medium wieder in Kulturflaschen ausgesät.

2.2.1.iv. Stimulation einer bereits etablierten Kultur ($P \geq 2$) mit TGF-beta1

TGF-beta1-Standardstimulation (7d). Zellen der SVZ ($P \geq 2$) wurden nach dem Passagieren in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät (Tag 0). Am darauffolgenden Tag (Tag 1) erfolgte die Zugabe von TGF-beta1, gelöst in 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Stockkonzentration: 10 µg/ml), in einer Endkonzentration von 10 ng/ml. Weiter wurde TGF-beta1 an Tag 4 sowie Tag 7 bei gleicher Konzentration zugesetzt. Kontrollzellen erhielten zu allen Zeitpunkten der TGF-beta1-Stimulation anstelle des Wachstumsfaktors entsprechende Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA. Während der 7-tägigen Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 bzw. HCl/BSA wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 8 wurden die Zellen unterschiedlichen Analysemethoden unterzogen.

TGF-beta1-Stimulation im zeitlichen Verlauf (2h, 24h, 4d, 7d, 10d). Zur Untersuchung der Expression verschiedener Kandidatengene unter dem Einfluss von TGF-beta1 für 2h, 24h, 4d, 7d und 10d erfolgte die Aussaat aNSZ der SVZ ($P \geq 2$) in unterschiedlichen Zelldichten (Tag 0). Für die 4-, 7- und 10-tägige Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 wurden die Zellen in der üblichen Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in 10 ml NB-B27-all-Medium in T75-Kulturflaschen ausgesät. Zur Kurzzeitbehandlung mit TGF-beta1 (2h, 24h) wurden 20×10^5 Zellen pro 10 ml Kulturmedium (4fache Dichte) ausgesät. An Tag 1 war für alle An-

sätze eine Stimulation mit 10 ng/ml TGF-beta1 bzw. 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) vorgesehen. Die erste RNA-Isolierung (vgl. 2.2.5.i.) wurde 2h nach der Zugabe durchgeführt (2h-Wert); weiterhin wurde RNA nach 24 h isoliert (24h-Wert). Für alle übrigen Ansätze war eine weitere Behandlung mit TGF-beta1 (10 ng/ml) an Tag 4 festgelegt. Im Folgenden wurde RNA jeweils einen Tag nach der letzten TGF-beta1-Zugabe extrahiert. So erfolgte die RNA-Isolierung für den 4d-Wert an Tag 5 der Kultivierung. An Tag 7 wurde abermals TGF-beta1 (10 ng/ml) in die verbliebenen Ansätze (7d und 10d) zugegeben und an Tag 8 RNA für den 7d-Wert isoliert. Für den 10d-Wert war die letzte Stimulation mit 10 ng/ml TGF-beta1 an Tag 10 geplant, gefolgt von der RNA-Isolierung an Tag 11 der Kultivierung. Kontrollzellen erhielten zu allen Zeitpunkten der TGF-beta1-Stimulation anstelle des Wachstumsfaktors entsprechende Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA. Während der 2-stündigen bis 10-tägigen Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 bzw. HCl/BSA wurde kein Mediumwechsel vorgenommen. Schließlich wurde mittels Realtime-PCR (vgl. 2.2.7.) die Expression verschiedener Kandidatengene nach TGF-beta1-Behandlung im zeitlichen Verlauf analysiert.

2.2.1.v. BrdU-Inkubation einer bereits etablierten Kultur ($P \geq 2$)

BrdU-Standardstimulation (48h). Zellen der SVZ ($P \geq 2$) wurden nach dem Passagieren in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät (Tag 0). An Tag 2 wurde dem Medium BrdU (gelöst in DPBS, Stockkonzentration: 1 mM) in einer Endkonzentration von 0,2 μ M, 1,0 μ M, 2,5 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M und 20,0 μ M zugesetzt. Kontrollzellen erhielten zum Zeitpunkt der Zugabe von BrdU entsprechende Volumina an DPBS. Während der folgenden 48-stündigen Inkubation in Anwesenheit von BrdU bzw. DPBS wurde kein Medienwechsel durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen unterschiedlichen Analysemethoden unterzogen. Um die Zellen, welche aufgrund des Einbaus von BrdU in die DNA sensitiv gegenüber kurzwelligem Licht waren, dabei vor lichtinduzierten Schäden zu schützen, wurde versucht, die Expositionszeit möglichst gering zu halten.

In einem separaten Versuchsansatz wurde an Tag 2 neben BrdU auch 2'-Desoxycytidin (DC) in den jeweils entsprechenden, halb-äquimolaren Mengen in das Kulturmedium zugesetzt, um potentiellen BrdU-induzierten Störungen des Nukleotidstoffwechsels entgegenzuwirken (Kaufman & Davidson, 1978; Davidson & Kaufman, 1979). Auch diese Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation mit BrdU/DC bzw. DPBS der Analyse unterzogen.

BrdU-Stimulation zur Untersuchung der Smad2-Phosphorylierung in BrdU-behandelten Kulturen. Um den Smad2-Phosphorylierungsgrad BrdU-behandelter aNSZ-Kulturen zu analysieren, wurden Zellen der SVZ nach dem Passagieren in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in jeweils 500 µl NB-B27-all-Medium auf Poly-L-Ornithin/Laminin-beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) 24-Well-Platten ausgesät (Tag 0). An Tag 2 wurde den dafür vorgesehenen Ansätzen BrdU (gelöst in DPBS, Stockkonzentration: 1 mM) in einer Konzentration von 2,5 µM oder TGF-beta1 (Konzentration: 10 ng/ml; Positivkontrolle für pSmad2-Phosphorylierung) zugesetzt. Unbehandelte Kontrollzellen erhielten anstelle von BrdU entsprechende Volumina an DPBS. Während der folgenden 48-stündigen Inkubation wurde kein Medienwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 30 min in PFA fixiert und bis zur immunzytochemischen Untersuchung der Smad2-Phosphorylierung (2.2.8.i.) bei 4°C gelagert.

2.2.2. Proliferationsassays

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay. Zur Durchführung des MTT-Assays wurden 5×10^4 Zellen pro Well in je einem Milliliter Medium in 12-Well-Platten ausgesät und im Anschluss mit BrdU (vgl. 2.2.1.v.) oder TGF-beta1 (vgl. 2.2.1.iv.) behandelt. Nach der 48-stündigen Inkubation mit BrdU bzw. der 7-tägigen Inkubation mit TGF-beta1 wurde pro Well 1/10 der Mediummenge an MTT (Stockkonzentration: 5 mg/ml) zugesetzt (100 µl MTT pro 1 ml Medium). Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Zellsuspensionen wurden aus den Wells in 1,5-ml-Röhrchen überführt und die Wells mit jeweils 200 µl DPBS nachgespült. Danach wurden die Zellen für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die Überstände größtenteils abgenommen. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und schließlich das Medium vollständig entfernt. Im Anschluss wurde das Pellet in 200 µl MTT-Solvent (0,1 M HCl in Isopropanol) resuspendiert und für kurze Zeit inkubiert. Nachdem sich das MTT gelöst hatte, wurden die Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert und am Emax Precisions Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 590 nm - 650 nm vermessen.

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Assay). Für den MTS-Assay wurden 5×10^4 Zellen pro Well in je 100 µl Medium in 96-Well-Platten ausgesät und im Anschluss mit BrdU (vgl. 2.2.1.v.) behandelt. Nach der 48-stündigen Inkubation mit BrdU bzw. DPBS wurden pro Well 20 µl CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (MTS) zugegeben. Die Well-Platten wurden für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss wurde die Absorption am Emax Precisions Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

2.2.3. Differenzierung adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen

2.2.3.i. Gezielte oligodendrogliale Differenzierung unter dem Einfluss von TGF-beta1 und BMPs

Zur Untersuchung des Einflusses von TGF-beta1 bzw. BMP2 und BMP4 auf aNSZ wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in 500 µl α-minimal essential medium (MEM) mit 10 % FCS in beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) 24-Well-Platten ausgesät (Tag 0). Am nächsten Tag erfolgte für die Hälfte der Wells ein Mediumwechsel zu mesenchymal konditioniertem Medium (mesenchymal conditioned medium, MSC-CM), um die Zellen gezielten oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen auszusetzen (Rivera *et al.*, 2006). Das MSC-CM wurde im Vorfeld aus dem Überstand mesenchymaler Zellen, welche für drei Tage in Anwesenheit von α-MEM mit 10 % FCS kultiviert worden waren, gewonnen. Direkt im Anschluss an den Medienwechsel wurde TGF-beta1 oder BMP2 und BMP4 oder TGF-beta1 und BMP2 und BMP4 jeweils in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Kontrollzellen erhielten anstelle von TGF-beta1 bzw. BMPs entsprechende Volumina an α-MEM, MSC-CM oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA. Ein weiterer Mediumwechsel mit erneuter Zugabe der Faktoren wurde an Tag 5 durchgeführt. An Tag 8 wurden die Zellen fixiert und im Anschluss der immunzytochemischen Untersuchung (vgl. 2.2.8.i.) unterzogen.

2.2.3.ii. Gezielte Differenzierung BrdU-behandelter, adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Analyse BrdU-behandelter aNSZ unter gezielten astroglialen, neuronalen oder oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen wurden die Zellen zunächst in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) T75-Kulturflaschen oder 24-Well-Platten in NB-B27-all-Medium ausgesät. Im weiteren Verlauf wurde BrdU, wie unter 2.2.1.v. beschrieben, in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. 48 h später wurde ein Medienwechsel zu oligodendroglialem (MSC-CM), astroglialem (NB-B27-all-Medium mit 10 ng/ml BMP2 und 10 ng/ml BMP4) oder neuronalem (NB-B27-not-all + 5 % FCS + 2 µM Retinsäure) Differenzierungsmedium durchgeführt. Die Zellen wurden für weitere 7 Tage unter den jeweiligen Differenzierungsbedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde aus den Zellen in den Kulturflaschen RNA isoliert (vgl. 2.2.5.i.) und mittels Realtime-Quantifizierung (vgl.

2.2.7.) die Expression von Myelin basic protein (Mbp) unter oligodendroglialen Bedingungen, Doublecortin (Dcx) unter neuronalen Bedingungen und Glial fibrillary acidic protein (GFAP) unter astrogialen Bedingungen bestimmt. Die Zellen in den 24-Well-Platten wurden fixiert und einer immunzytochemischen Untersuchung (vgl. 2.2.8.i.) hinsichtlich der Expression von GFAP (astrogiale Bedingungen), Microtubule associated protein 2ab (Map2ab; neuronale Bedingungen) und Galactocerebrosid (GalC; oligodendrogliale Bedingungen) unterzogen.

2.2.4. Zelltodassays

CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Zur Durchführung des CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assays wurden 5×10^4 Zellen pro Well in je einem Milliliter Medium in 12-Well-Platten ausgesät und im Anschluss mit BrdU (vgl. 2.2.1.v.) oder TGF-beta1 (vgl. 2.2.1.iv.) behandelt. Nach der 48-stündigen Inkubation mit BrdU bzw. der 7-tägigen Inkubation mit TGF-beta1 wurden die Zellen aus den Well-Platten in 1,5-ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei $240 \times g$ zentrifugiert. Es wurden je 50 µl Medium pro Probe aus dem Überstand abgenommen und in 96-Well-Platten pipettiert. Weiter erfolgte die Zugabe von 50 µl Substrat-Mix pro Well. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei R.T. wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung beendet. Im Anschluss wurde die Absorption am Emax Precisions Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Für die Untersuchung, ob BrdU bzw. TGF-beta1 bei aNSZ Apoptose und/oder Nekrose induziert, wurden 5×10^4 Zellen pro Well in je einem Milliliter Medium in 12-Well-Platten ausgesät und wie unter 2.2.1.v. bzw. 2.2.1.iv. beschrieben behandelt. Nach der Inkubation mit BrdU bzw. TGF-beta1 wurden die Zellen aus den Well-Platten zunächst in 1,5-ml-Röhrchen überführt und 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Zur Detektion von Nekrose wurde im Anschluss der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde zur Untersuchung der Apoptose in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei R.T. inkubiert. Danach wurden die Lyssate für 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. 20 µl des Überstands (zytoplasmatische Fraktion) wurden zur Analyse in Streptavidin-beschichtete Mikroplatten transferiert. Ebenso wurden 20 µl der Kulturüberstände, die zwischenzeitlich bei 4°C gelagert wurden, auf die Mikroplatten überführt. Es folgte die Zugabe von 80 µl Immunreagenz pro Well. Daraufhin wurde die Mikroplatte mit einer selbstklebenden Folie bedeckt und für 2 h bei R.T. auf einem Schüttler inkubiert. Das Immunreagenz wurde vorsichtig abgesaugt und die Platte dreimal mit je 250 µl

Inkubationspuffer gewaschen. Im Anschluss wurden pro Well 100 µl ABTS Lösung pipettiert und es wurde bis zu einer ausreichenden Farbentwicklung auf dem Schüttler inkubiert (ca. 10-20 min). Zuletzt wurde ABTS-Stopp-Lösung (100 µl pro Well) zugegeben, bevor die Proben am Emax Precisions Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen werden konnten.

2.2.5. Nukleinsäuretechniken

2.2.5.i. Isolierung und Quantifizierung von Ribonukleinsäure (RNA)

Isolierung von RNA. RNA wurde aus kultivierten Zellen (vgl. 2.2.1.iv. und 2.2.3.ii.) - sofern nicht anders angegeben - mithilfe des RNeasy Mini Kits weitestgehend entsprechend dem darin enthaltenen Protokoll „Animal Cells Spin“ extrahiert. Hierfür wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden sie bei 120 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgesaugt und das Röhrchen auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und kräftig trituriert. Die Probe wurde zunächst mechanisch homogenisiert, indem das Lysat einige Male durch eine Spritze auf und ab gezogen wurde und dann durch Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol denaturiert. Im Folgenden wurden maximal 700 µl des Zelllysats auf eine RNeasy-Minisäule in einem 2-ml-Sammelröhrchen aufgebracht und wiederum 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es schloss sich ein Waschschnitt mit 350 µl RW1-Puffer an, woraufhin ebenfalls zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Um jegliche Verunreinigungen durch DNA zu eliminieren, wurde als Nächstes ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer (RNase-Free DNase Set) in ein 0,2-ml-Röhrchen pipettiert und nur durch leichtes Schwenken gemischt, da die DNase sehr empfindlich für mechanische Denaturierung ist. Der DNase-Inkubations-Mix wurde direkt auf die Säule aufgebracht und für 15 min bei R.T. inkubiert. Es erfolgte wiederum ein Waschschnitt mit 350 µl RW1-Puffer, woraufhin zentrifugiert (15 s bei 8000 x g) und der Durchfluss verworfen wurde. Die Minisäule wurde in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen überführt, 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde entleert und der vorherige RPE-Schritt wiederholt. Allerdings wurde nun 2 min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die RNeasy-Minisäule wurde in ein neues Sammelröhrchen gesteckt und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde sie wiederum in ein neues 1,5-ml-Sammelröhrchen überführt, woraufhin 40 µl RNase-freies Wasser (RNase-Free DNase Set) direkt auf die

Membran pipettiert wurden. Durch Zentrifugation für 1 min bei 8000 x g wurde die RNA von der Säulenmembran eluiert und konnte im Anschluss am Photometer vermessen werden.

Quantifizierung von RNA. Um die Konzentration der RNA in Lösung zu bestimmen, wurde ein Aliquot von 2 µl entnommen und mit sterilem Wasser 1:50 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in eine Quarzküvette (Quarzglas-Suprasil, 100 µl, Hellma, Müllheim) überführt und mit einem Spektralphotometer vermessen. Es wurde die optische Dichte (OD) gegen Wasser bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient beider Absorptionen dient als Anhaltspunkt für die Reinheit der Präparation, wobei für RNA Werte um 2,0 angestrebt werden. Die Konzentration der RNA lässt sich gemäß folgender Formel berechnen:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ (Faktor für RNA)} \times \text{Verdünnung} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht somit einer Massenkonzentration von 40 µg/ml RNA.

2.2.5.ii. Reverse Transkription (RT) von mRNA und Polymerasekettenreaktion

RT von mRNA in cDNA. Da RNA selbst nicht als Template für eine Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) geeignet ist, musste zunächst eine RT erfolgen, in der zur RNA komplementäre („complementary“) DNA, genannt cDNA, hergestellt wurde. Diese Erststrangsynthese erfolgte mithilfe des Reverse Transcription Systems. Es wurde 1 µg total-RNA mit sterilem Wasser verdünnt (maximales Gesamtvolumen: 9 µl) und für 10 min im Thermocycler auf 70°C erhitzt, sodass die Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen wurden (Hitzedenaturierung). Im Anschluss wurde das Probenröhrchen aus dem Cyler entnommen und auf Eis gestellt, um 11 µl des bereits im Vorfeld hergestellten Mastermix (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) zuzugeben.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
1 µg RNA	x µl
Nuklease-freies Wasser	9-x µl
	Gesamtvolumen: 9 µl
Mastermix	
MgCl ₂ , 25mM	4 µl
10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP Mixture, 10mM	2 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,7 µl
Random Primer	1 µl
Nuklease-freies Wasser	0,8 µl
	Endvolumen: 20 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für die RT.

Unter Anwesenheit von dNTPs, AMV RTase, RNasin, MgCl₂, 10 x RT-Puffer, Random Primern sowie Wasser erfolgte die Synthese von cDNA dann in einem nächsten Schritt während 10 min bei R.T. und anschließend während 15 min bei 42°C im Thermocycler. Zuletzt wurde das Enzym AMV RTase durch Inkubation bei 95°C und 4°C, jeweils für 5 min, inaktiviert. Das Pipettierschema für die RT ist in Tabelle 2 gezeigt.

PCR. Anschließend wurden spezifische Sequenzabschnitte der so gewonnenen cDNA in einer PCR vermehrt. Für den zu amplifizierenden Abschnitt wurden spezifische Primer (Konzentration je 10 pmol/μl) und ein 2,5 x Master Mix (62,5 units/ml Taq DNA-Polymerase, 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8,3, 3,75 mM Mg(OAc)₂, 0,25 % Igepal®-CA630, 500 μM pro dNTP und Stabilisatoren) benötigt. Auf einen 4-minütigen Denaturierungsschritt (94°C) folgten 35 bis 40 Zyklen, jeweils mit 45 s bei 94°C, 45 s bei der je nach Primer-Sequenz variierenden Annealing-Temperatur sowie 1 min Elongation bei 72°C. An diese zyklische Temperaturfolge schloss sich ein letzter Elongationsschritt (8 min bei 72°C) an, um noch nicht fertiggestellte Amplikons zu vervollständigen. Das Pipettierschema für die qualitative PCR ist in Tabelle 3 dargestellt.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
Master Mix 2,5 x	10 μl
Nuklease-freies Wasser	13 μl
Forward Primer	0,5 μl
Reverse Primer	0,5 μl
cDNA	1 μl
	Endvolumen: 25 μl

Tabelle 3: Pipettierschema für die qualitative PCR.

2.2.5.iii. Qualitative Analyse der TGF-beta1-Rezeptorexpression durch RT-PCR

Im Folgenden sind die für die qualitative Untersuchung der TGF-beta1-Rezeptorexpression verwendeten Primer und Primer-Assays gezeigt. Die Sequenzen für die TGFRII-Primer wurden mit Hilfe des PRIMER3-Programms, wie unter 2.2.7. beschrieben, erstellt und bei MWG Biotech geordert. Die QuantiTect® Primer Assays (vgl. 2.2.7.) für TGFRI (ALK 5) und Activin receptor-like kinase 1 (Acvr1l, ALK 1) wurden über die Firma Qiagen bezogen. Die genauen Reaktionsbedingungen für jeden Primer wurden mittels eines Temperaturgradienten von 53°C bis 57°C am Thermocycler Mastercycler gradient ausgetestet.

Gen	Sequenz (forward)	Sequenz (reverse)	Amplikon-Länge	T (°C)
TGFRI (ALK 5)	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	147 bp	55
Acvr1l (ALK 1)	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	86 bp	55
TGFRII	GGCTCCCTGAACACTACCAA	AGGGAGCAAGTCCTTGGTTT	139 bp	55

Tabelle 4: Primer-Sequenzen mit Amplikon-Länge und Annealing-Temperatur.

Zur Bestimmung der Expression der TGF-beta1-Rezeptoren in Zellkulturen der SVZ wurde die RT-PCR, wie unter 2.2.5.ii. dargestellt, durchgeführt.

2.2.5.iv. Agarose-Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurde die DNA pro Ansatz mit je 2 µl Auftragspuffer (10 x) vermischt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurden 1,5 bis 2,0%ige Agarosegele mit TBE-Laufpuffer (0,5 x) verwendet. Diese wurden im Vorfeld mit Ethidiumbromid (EtBr, Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt, wodurch sich die DNA indirekt nachweisen lässt. Erfolgt eine Anregung durch UV-Strahlung ($\lambda = 254$ nm), so wird vom EtBr-Molekül sichtbares Licht ($\lambda = 590$ nm) zurückgeworfen; diese Fluoreszenz ist deutlich stärker, wenn EtBr an die DNA gebunden vorliegt. Als Spannungsquelle diente der Consort E835, wobei die Feldstärke 5 V/cm betrug.

2.2.6. DNA-Array-Genexpressionsanalyse

2.2.6.i. RNA-Isolierung und Microarray-Analyse

Isolierung von RNA. Zur Gewinnung von RNA für die Microarray-Analyse wurden die Zellen in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/ml Medium in Kulturflaschen ausgesät. Nach der 7-tägigen Inkubation mit TGF-beta1 bzw. HCl/BSA (vgl. 2.2.1.iv.) wurde die RNA mithilfe des RNeasy Midi Kits nach dem darin enthaltenen Protokoll „Animal Cells“ extrahiert. Dieser Kit ist im Wesentlichen identisch zu dem in Kap. 2.2.5.i. beschriebenen RNeasy Mini Kit, ist allerdings für höhere Zellmengen ausgelegt.

Microarray-Analyse. In Zusammenarbeit mit dem Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten DNA-Microarray-Analysen, jeweils von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen, durchgeführt. Die Ergebnisse beider Experimente (im Folgenden als Experiment 1 und 2 bezeichnet) wurden im Anschluss miteinander verglichen.

Ausgehend von 1-5 µg total-RNA wurde im ersten Schritt biotinylierte cRNA entsprechend dem Standard Affymetrix Protokoll (Affymetrix, 2001) hergestellt. Nach der Fragmentierung wurde die cRNA auf die DNA-Microarrays (Experiment 1: GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array; Experiment 2: GeneChip® Rat Expression 230A Array) hybridisiert. Danach wurden die Arrays gewaschen und in der Affymetrix Fluidics Station 400 gefärbt. Anschließend wurden sie mit dem Hewlett-Packard GeneArray Scanner G2500A gescannt, um die Intensität der Hybridisierungen sichtbar zu machen (vgl. Abbildung 6).

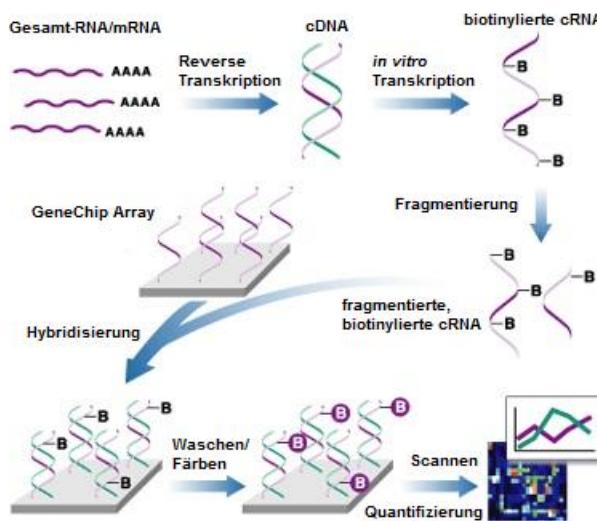


Abbildung 6: Übersicht über den Ablauf einer DNA-Array-Analyse (www.affymetrix.com, modifiziert).

Aus den gescannten Bildern wurde mithilfe der Affymetrix Gene Chip Operating Software (GCOS 1.2) und der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS 5.0) unter Benutzung von Affymetrix Standardeinstellungen die Intensität (=Expressionssignal) jedes Spots ermittelt. Zudem wurden mit dem GCOS/MAS 5.0 Algorithmus die Detection Calls ("present", "absent", and "marginal") und Detection p-values für 31099 (GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array, Experiment 1) und 15923 (GeneChip® Rat Expression 230A Array, Experiment 2) Proben-DNAs kalkuliert. Der errechnete Detection Call gibt an, ob ein Gen exprimiert (present: P), schwach exprimiert (marginal: M) oder nicht exprimiert (absent: A) wird. Der zugehörige Detection p-value spiegelt die Konfidenz des Detection Calls wider. In unserer Analyse wurden Transkripte mit Detection $p < 0.04$ als "present" definiert. "Marginal" Detections waren solche Transkripte mit $0.04 < p < 0.06$ und Transkripte mit $p > 0.06$ wurden als "absent" bezeichnet.

Um die Qualität der durchgeführten GeneChip® Expressionsanalysen bzw. der dabei erhaltenen Originaldaten von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen beurteilen zu können, wurde vom KFB für jeden Array eine Affymetrix GCOS Expression Report Datei generiert. Diese enthielt Informationen über die detektierte Hintergrundfluoreszenz, die Signalwerte der Hybridisierungskontrollen, das 3'-5'-Verhältnis der internen Kontrollen und den Scale Factor. Die Werte für die unspezifische Hintergrundfluoreszenz lagen bei allen vier Arrays unterhalb des Grenzwertes, was auf eine spezifische Hybridisierung hindeutet. Zudem konnten sämtliche Hybridisierungskontrollen, die als gespeckte B2-Kontrolloligos auf Affymetrix-Chips vorhanden waren, als exprimiert detektiert werden. Somit wurde sichergestellt, dass keine Fehler bei der Hybridisierung vorlagen. Über sog. Housekeeping Controls wurde zudem die

Güte der enzymatischen Reaktion während der cDNA- bzw. cRNA-Synthese überprüft. Hierfür wurden bei den internen Kontrollen β -Aktin und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) jeweils Expressionssignale am 3'- und am 5'-Ende bestimmt. Aus dem berechneten 3'- zu 5'-Verhältnis, das idealerweise nahe bei 1 liegen und nicht größer als 3 sein sollte, konnten ineffiziente Reaktionen wie eine nicht vollständige cDNA- bzw. cRNA-Synthese sowie schlechte RNA-Qualität ausgeschlossen werden.

Um einen späteren Vergleich mehrerer Arrays untereinander zu ermöglichen, wurde Global Scaling als Normalisierungsmethode für jeden der insgesamt 4 Arrays (TGF-beta1-behandelte und Kontrollzellen aus Experiment 1 und Experiment 2) gewählt. Somit konnten Assayvariablen wie z. B. Pipettierfehler oder Fehler bei der Hybridisierung ausgeglichen werden. Die mittlere Fluoreszenzintensität jedes Arrays wurde hierfür unter Verwendung eines Scale Factors auf einen benutzerdefinierten Wert (= Target (TGT) value), standardmäßig 100, normalisiert. Der niedrigste Wert des Skalierungsfaktors aller Arrays unterschied sich nicht mehr als um den Faktor drei vom höchsten, was eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen DNA-Microarrays untereinander gewährleistet.

Nach der Überprüfung der Qualität und der Normalisierung der erhaltenen Daten wurden in einem nächsten Schritt mit der GCOS/MAS 5.0 Software Change Calls (“increase”, “marginal increase”, “decrease”, “marginal decrease” and “no change”), Change p-values und Signal Log Ratios (SLR) durch paarweisen Arrayvergleich (TGF-beta1-behandelte gegen kontroll-behandelte Zellen) für jedes Experiment separat berechnet. Der Change Call gibt an, ob es zu einer Erhöhung (increase: I bzw. marginal increase: MI), zu einer Erniedrigung (decrease: D bzw. marginal decrease: MD) oder zu keiner Veränderung (no change: NC) der Transkription kommt, während der Change p-value zeigt, ob die detektierte Veränderung statistisch signifikant ist. Der SLR repräsentiert die Veränderung der Expression in TGF-beta1-behandelten Zellen verglichen mit der Kontrolle unter Verwendung des logarithmischen Maßstabs mit der Basis 2. Folglich bedeutet ein SLR von +1 eine zweifache Erhöhung des Transkriptlevels der TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen ein SLR von -1 auf eine zweifache Erniedrigung schließen lässt (SLR=0, keine Veränderung).

Nachdem die Image-Analyse beendet war, wurden die erhaltenen Daten aus Experiment 1 und Experiment 2 vom KFB jeweils in Form eines Excel-Worksheets exportiert. Zuletzt wurden die Daten beider Experimente in einem Excel-Worksheet vergleichend gegenübergestellt und in dieser Form zur Auswertung an uns ausgehändigt.

2.2.6.ii. Statistische Analyse und Gene Ontology (GO)-Gruppenklassifikation

Die statistische Auswertung des DNA-Microarrays erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Wurst am Institut für Entwicklungsgenetik des Helmholtz Zentrums München.

Die vergleichende Gegenüberstellung der Daten aus Experiment 1 und Experiment 2 im Excel-Worksheet (2.2.6.i.) wurde als Grundlage für funktionelle Analysen nach der Gene Ontology (GO)-Klassifikation eingesetzt. Als Auswahlkriterium wurden aus dieser Liste nur Transkripte berücksichtigt, die in mindestens einem der vier Arrays als "present" detektiert wurden. Zudem wurde gefordert, dass die Transkripte differentielle Expression für TGF-beta1- und kontroll-behandelte Zellen aufwiesen und die daraus resultierenden Change Calls in die gleiche Richtung zeigten. Folglich wurde ein unterschiedlich exprimiertes Gen dann ausgewählt, wenn sein korrespondierender Change Call im Fall der Hochregulierung "increase" in beiden Experimenten oder "increase" und "marginal increase" oder im Fall der Erniedrigung "decrease" in beiden Experimenten oder "decrease" und "marginal decrease" zeigte. Gene, welche einen "no change" Change Call aufwiesen, wurden hingegen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. 90 % der Gene, die auf diese Art und Weise selektiert wurden, wurden durch den Detection Call aller 4 Arrays als "present" zugeordnet. Um die Korrelation beider Experimente zu beurteilen, wurden die SLR-Werte von Experiment 1 und Experiment 2 mit der statistischen Software R (<http://www.r-project.org>) in einem „Scatter Plot“ gegenüber aufgetragen.

Die in beiden Experimenten signifikant regulierten Gene (619 Gene) wurden im Anschluss mit der GeneRanker Software (Genomatix, Germany) analysiert und GO-Kategorien zugeordnet, um ihre biologische Funktion zu identifizieren. Zur Ermittlung überrepräsentierter GO-Terme wurde von der GeneRanker Software für jeden Term ein z-score berechnet. Dieser repräsentiert den Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Annotation und ist auf die Standardabweichung einer hypergeometrischen Verteilung normalisiert. Ein z-score von 1.96 entspricht einem p-value von 0.05. Um „Multiples Testen“ zu berücksichtigen, wurde nach Umrechnung jedes z-scores in den entsprechenden p-Wert eine false discovery rate (fdr) für jeden z-score mithilfe der R-Funktion p.adjust im package „stats“ kalkuliert. Wir berücksichtigten GO-Terme mit einem fdr-Wert kleiner als 0,19; fdr-Werte < 0,085 gelten als signifikant.

Die gesamten Genexpressionsdatensätze wurden in der NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank (Edgar *et al.*, 2002) abgelegt und sind dort unter der Kennung GSE14562 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14562>) und GPL1355 (Experiment 1) sowie GSE14556 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14556>) und GPL341 (Experiment 2) zugänglich.

2.2.7. Quantitative Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR

Gewöhnlich wird bei der Realtime-PCR cDNA als Template-DNA eingesetzt. Zur Bestimmung der Expression verschiedener Gene nach TGF-beta1- (vgl. 2.2.1.iv.) bzw. BrdU-Behandlung (vgl. 2.2.1.v. und 2.2.3.ii.) wurden vorbehandelte Zellen deshalb zunächst einer RNA-Isolierung (vgl. 2.2.5.i) mit anschließender RT zur Umschreibung in cDNA (vgl. 2.2.5.ii.) unterzogen. Bevor die so gewonnene cDNA als Template-DNA für die Quantifizierung verwendet werden konnte, mussten in einem nächsten Schritt passende Primer für die Kandidatengene generiert werden.

Primer-Design. Die Primer-Sequenzen für unmodifizierte Primer wurden mithilfe des PRIMER3-Programms erstellt. Hierfür wurde zunächst unter Benutzung der iHOP-Datenbank (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>) die gesamte Sequenz des zu untersuchenden Gens in der gewünschten Spezies ermittelt. Die Gensequenz wurde über einen Link (NCBI RefSeq) in der NCBI-Nucleotide-Datenbank angezeigt und konnte dann in das PRIMER3-Programm eingelesen werden, um unter Anwendung geeigneter Auswahlkriterien (gewünschte Amplikon-Länge, optimale Schmelztemperatur, usw.) passende Primer zu generieren. Diese wurden im Anschluss über MWG-Biotech oder Invitrogen bezogen.

Darüber hinaus wurden bereits optimierte Primer, sogenannte Quanti Tect® Primer-Assays, über Qiagen erworben. Diese Assays bestehen aus spezifischen „forward“- und „reverse“-Primern, welche von Gensequenzen abgeleitet wurden, die in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>) enthalten sind. Die Primersequenzen wurden, wenn möglich, so gewählt, dass der „forward“- und der „reverse“-Primer an unterschiedliche Exons binden, um eine Koamplifikation genomischer DNA zu verhindern. In Tabelle 5 sind die Sequenzen aller verwendeten Primer gezeigt.

Gen	Sequenz (forward)	Sequenz (reverse)	Amplikon-Länge	T (°C)
Acvrl1 (ALK 1)	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	86 bp	55
Ascl1	GGCTCAACTTCAGTGGCTTC	TGGAGTAGTTGGGGGAGATG	291 bp	58
Bmpr1a	AAAGGCCGGTATGGAGAAGT	ACCGGTGCCTTAATGTCTG	177 bp	58
Ccnb1	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	88 bp	55
Ccnd2	TTACCTGGACCGTTCTTGG	TGCTCAATGAAGTCGTGAGG	240 bp	58
Cdkn1c	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	96 bp	55
Dcx	GGAAGGGGAAAGCTATGTCTG	TTGCTGCTAGCCAAGGACTG	138 bp	58
Dll1	ATATCTGTAGCACCGCACCC	AAATACGCCAGAGCTCCAGA	249 bp	58
FGFRI	ACCAAGAAGAGCGACTTCCA	TTATCCAGACCGATGGCTTC	299 bp	58
G6PDH	CCAGCCTCCACAAGCACCTCA AC	AATTAGCCCCACGACCCTC AGTA	406 bp	58
GFAP	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	131 bp	55
Gfra1	GGAGCTGAACCTTGAGTGGC	CACTGCCTTAGTGTGCGGTA	282 bp	58
Grin1	AAGCTACAGTGGGGGCCTAT	GCGTCTGAGGAAGCCTATTG	290 bp	58
Hes1	AAACCCTCAACTGCTCCGTA	GCGCCTCTCTCCATGATAG	273 bp	58
Jag1	CTCCTGTCGGGATTTGGTTA	CTTGCCTCGTAGCCTCAG	289 bp	58
Mbp	GCTTCTTAGCGGTGACAGG	CCAGCTAAATCTGCTGAGGG	290 bp	58
Nes	CATTGAGGCCTCCAGAACAG	TGTTCCCTCTGGTCCGTCC	301 bp	58
Pdgfra	ATTGAGCGCAGATACTGGCT	GATAGACACTCCGAGCCTGC	261 bp	58
Qscn6	ATGGTTCTGTTCCCAGGTG	GGCCAATACTGCCACAAACT	287 bp	58
TGF-beta1	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	145 bp	55
TGFRI (ALK 5)	keine Angabe durch den Hersteller	keine Angabe durch den Hersteller	147 bp	55
TGFRII	GGCTCCCTGAACACTACCAA	AGGGAGCAAGTCCTGGTTT	139 bp	58
Wif1	CAAGTTGGTTCCCGTGTCT	CAGAACGCCAGGAGTGACACA	287 bp	58

Tabelle 5: Primer-Sequenzen mit Amplikon-Länge und Annealing-Temperatur.

Herstellung der Standards. Im Vorfeld der Realtime-PCR musste zudem eine Standardgerade in Form einer 6-stufigen Verdünnungsreihe für die Quantifizierung der cDNAs erzeugt werden. Hierfür wurden cDNAs von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen bzw. kontroll- und BrdU-behandelten Zellen gemischt und zur Erstellung der Verdünnungsreihe mit gleichen Volumina an Wasser versetzt (z. B. 20 µl cDNA kontroll-behandelter Zellen + 20 µl cDNA TGF-beta1-behandelter Zellen + 40 µl Wasser). Im nächsten Schritt wurden 40 µl der ersten Verdünnungsstufe 1:2 mit Wasser verdünnt. Auf diese Weise wurde eine 12-stufige Verdünnungsreihe erstellt, von welcher die Stufen eins (1:2), drei (1:8), fünf (1:32), sieben (1:128), neun (1:512) und elf (1:2048) zur Erstellung der Standardgerade eingesetzt wurden.

Durchführung der Realtime-PCR. Die Realtime-PCR wurde an einem Mx 3000 P® QPCR System Realtime-Cycler der Firma Stratagene durchgeführt. Als Template-DNA wurden sowohl die cDNA-Proben der kontroll-behandelten und der TGF-beta1-behandelten Zellkulturen bzw. der kontroll-behandelten und BrdU-behandelten Zellkulturen als auch die oben beschriebenen Standard-Verdünnungsstufen eingesetzt, und jeweils die relative Kopienzahl gemessen. Da die cDNA eine komplementäre Form der mRNA ist, konnte anhand der Er-

gebnisse eine Aussage über die ursprünglich vorhandene Menge der mRNA eines jeden Gens und somit über das Ausmaß seiner Expression getroffen werden.

Die Reaktion erfolgte in 0,2 ml fassenden, transparenten Reaktionsgefäßten. Die Proben-cDNAs wurden zunächst 1:5 mit Wasser verdünnt und zusammen mit den Standards für die Messung vorbereitet. Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten und die Handhabung zu erleichtern, wurde für jedes Primerpaar ein Mastermix erstellt, der alle Reagenzien, außer der Template-cDNA, enthielt. Dieser wurde dann auf die entsprechenden Reaktionsgefäßte aufgeteilt, sodass im letzten Schritt nur noch die unterschiedlichen cDNAs der Proben und der Standards zugegeben werden mussten. Dabei wurden alle Ansätze in dreifacher Ausführung angefertigt.

Die einzelnen Ansätze wurden nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 6) vorbereitet:

Reagenz	Volumen pro Reaktion
Primer	1 µl
Template-cDNA	4 µl
RNase-freies Wasser	5 µl
2 x Quanti Tect™ SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
	Gesamtvolumen: 20 µl

Tabelle 6: Pipettierschema für die Realtime-PCR.

Um den Mastermix auf eventuelle Verunreinigungen zu überprüfen, wurde bei jeder Messung zusätzlich eine Non-Template-Kontrolle mitgeführt, die anstelle der Template-cDNA Wasser enthielt. Zudem wurde eine sog. -RT-Kontrolle eingesetzt, wodurch eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA in den Proben auszuschließen war. Hierfür wurde die RNA direkt, das heißt, ohne vorhergehende RT, für die PCR verwendet.

Bevor die Messung begonnen werden konnte, wurde zunächst der Realtime-Cycler konfiguriert. Erst danach wurden die Ansätze in das Gerät überführt und die Messung gestartet. Der Ablauf des PCR-Programms für die Realtime-PCR ist in Tabelle 7 gezeigt.

Temperatur und Dauer	Schritt
95°C für 10 min	Einmalige Denaturierung zu Beginn der PCR
95°C für 30 s	Denaturierung
x°C für 1 min (x abhängig von Primern)	Annealing
72°C für 1 min	Elongation
95°C für 1 min	Fluoreszenzmessung
Schmelzkurve von 65°C bis 95°C	

Tabelle 7: PCR-Programm für die Realtime-PCR.

Direkt im Anschluss an die PCR erfolgte zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation eines DNA-Fragments die Bestimmung der charakteristischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts mittels einer Schmelzkurvenanalyse. Hierfür wurde die Temperatur kontinuierlich von 65°C auf 95°C erhöht und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Beim Erreichen der spezi-

fischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts denaturiert der DNA-Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Dadurch wird SYBR® Green I freigesetzt, was sich in einer Abnahme der Fluoreszenz zeigt. Unspezifische Primer-Dimere können durch niedrigere Schmelzpunkte von spezifischen PCR-Produkten abgegrenzt werden.

Auswertung der Messergebnisse mithilfe der Mx Pro™ QPCR Software. Die gemessenen Daten wurden mithilfe der Mx Pro™ QPCR Software analysiert. Dafür wurden sie zunächst auf eventuelle Ausreißer bei den Messwerten, welche beispielsweise durch Pipettierfehler verursacht werden können, überprüft. Da solche Werte die Qualität der Standardkurve enorm beeinträchtigen können, wurden diese, wo nötig, im nächsten Schritt eliminiert und aus den verbliebenen Werten wurde eine neue Standardkurve berechnet. Mittels der Auftragung der Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl (C_T -Wert) wurde dann der Fluoreszenz-Schwellenwert ermittelt, bei dem sich die Fluoreszenz der Proben signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhob. Anschließend wurden die jeweils zugehörigen C_T -Werte pro Probe auf Höhe des Schwellenwerts bestimmt. Ausgehend von diesen C_T -Werten wurden anhand der Standardgerade die relativen Quantitäten (= Kopienzahl/Reaktion) der einzelnen Proben berechnet, bevor die Daten zur weiteren Auswertung in Excel exportiert wurden.

Normalisierung. Um Unterschiede in der Probenbehandlung sowie Variationen im RNA-Gehalt und in der Effizienz der RT zu kompensieren und einen Vergleich der einzelnen Proben (z. B. Kontrolle versus TGF-beta1) untereinander erlauben zu können, musste eine Normalisierung der Ausgangsmenge an cDNA jeder einzelnen Probe durchgeführt werden. Die Normalisierung wurde durch Abgleich der relativen Kopienzahl des Targetgens gegen ein Referenzgen erreicht, welches sich durch die Eigenschaft auszeichnet, als Antwort auf die experimentelle Behandlung nicht in seiner Expression zu variieren. Hierfür wurde im Vorfeld eine weitere Realtime-PCR (analog zu den oben beschriebenen Bedingungen) unter Verwendung von 18s-rRNA- bzw. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Primern durchgeführt. Die Normalisierung der einzelnen Proben erfolgte gemäß der nachstehenden Formel:

Gen (normalisiert) = relative Kopienzahl (Targetgen) / relative Kopienzahl (Referenzgen)

Die unterschiedliche Expression zweier Proben A und B (z. B. Kontrolle gegen TGF-beta1) relativ zueinander wird als Quotient dargestellt und ergibt eine n-fache Expression:

Gen (normalisiert) (Gruppe A) / Gen (normalisiert) (Gruppe B) = n-fache Expression Gruppe A zu Gruppe B

2.2.8. Immunfärbungen an Zellen

2.2.8.i. Immunzytochemische Untersuchung von Zellkulturen

Gemäß der hier beschriebenen Methode wurden die unter 2.2.1.iv. bzw. 2.2.3.i. beschriebenen TGF-beta1-behandelten Zellkulturen sowie die unter 2.2.1.v. bzw. 2.2.3.ii. beschriebenen BrdU-behandelten Zellkulturen aus der SVZ adulter Ratten immunzytochemisch untersucht. Hierfür wurden sie im Vorfeld auf Poly-L-Ornithin/Laminin-beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) 24-Well-Platten in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in jeweils 500 µl Medium ausgesät und kultiviert.

Fixieren der Zellen. Um die Zellen zu fixieren, wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 500 µl 37°C warme, phosphat-gepufferte, 4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung pH 7.4 pro Well ersetzt. Die Fixierung erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei R.T..

Färbung der Zellen. Nach der Fixierung wurden die auf den Glasdeckgläsern adhärenten Zellen dreimal für 5 min mit je 500 µl TBS gewaschen. Anschließend wurde mindestens 2 h bei R.T. mit Fish Skin Gelatine (FSG)-Puffer blockiert. Da bei Oberflächenantigenen (wie z. B. GalC) die immunhistologische Detektion empfindlich gegenüber der Anwesenheit von Triton X-100 ist, wurde in diesem Fall auf einen Zusatz von Triton X-100 in den FSG-Puffer verzichtet. Die Markierung der Zellen mit den primären, gegen verschiedene Marker-Proteine gerichteten Antikörpern, erfolgte über Nacht bei 4°C in FSG-Puffer. Die verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle 8 aufgeführt.

Primärantikörper	Zelltyp/Molekül	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen anti-Dcx	neuronale Vorläuferzellen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	1:500
Kaninchen anti-GalC	Oligodendrozyten	Chemicon, USA	1:200
Kaninchen anti-GFAP	Astrozyten	Dako Cytomation, Dänemark	1:1000
Kaninchen anti-pSmad2	phosphoryliertes Smad2	Cell Signaling Technology Inc., USA	1:100
Maus anti-A2B5	gliale Vorläuferzellen	Chemicon, USA	1:100
Maus anti-GalC	Oligodendrozyten	Chemicon, USA	1:500
Maus anti-Map2ab	junge Neurone	Sigma, Taufkirchen	1:250
Maus anti-Mbp	Oligodendrozyten	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg	1:750
Meerschweinchen anti-GFAP	Astrozyten	Progen, Heidelberg	1:500

Tabelle 8: Die verwendeten, primären Antikörper mit der Angabe des Zelltyps, der detektiert wird, des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung.

Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Waschschritten à 10 min in FSG-Puffer unterzogen. Die sekundären, Fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden anschließend im selben Puffer verdünnt (Volumen: 500 µl), auf die Zellen gegeben und für mindestens 4 h inkubiert (bei R.T.). Tabelle 9 zeigt die verwendeten Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor 488®-konjugierter Esel anti-Kaninchen	Molecular Probes, USA	1:1000
Alexa Fluor 488®-konjugierter Esel anti-Maus	Molecular Probes, USA	1:1000
Alexa Fluor 488®-konjugierter Esel anti-Meerschweinchen	Molecular Probes, USA	1:1000
Rhodamine Red™-X-konjugierter Esel anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:1000
Rhodamine Red™-X-konjugierter Esel anti-Maus	Dianova, Hamburg	1:1000

Tabelle 9: Die verwendeten, sekundären Antikörper mit der Angabe des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung.

Alle Inkubationsschritte für Fluoreszenzmarkierungen wurden unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt, um einem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe entgegenzuwirken. Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat) in 500 µl FSG-Puffer. DAPI wurde mit einer Stockkonzentration von 0,25 µg/µl in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Die Färbung erfolgte während 15 min bei R.T.. Es wurden zwei weitere Waschschritte mit 500 µl FSG-Puffer und 500 µl DPBS pro Well für 10 min durchgeführt. Danach wurden die Glasdeckgläser mithilfe einer Pinzette aus der 24-Well-Platte entnommen und einzeln auf mit Fluoromount-G- oder ProLong Gold-Medium betropfte Glas-Objektträger geklebt. Bei Doppelfärbungen wurde erst das Oberflächenantigen unter Vermeidung von Triton X-100 detektiert; nach einer weiteren Fixierung wurde dann in Histologie-Gelatinepuffer mit Triton X-100 permeabilisiert und schließlich gegen das zelluläre Antigen gefärbt.

2.2.8.ii. Mikroskopie und Auswertung der Zellkultur-Immunhistologie

Bestimmung verschiedener Parameter im Vergleich zur Gesamzellzahl. Das Fluoreszenzmikroskop Leica DMR ermöglichte unter den Anregungs-Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 358 nm die getrennte Detektion von Alexa Fluor 488®, Rhodamine Red™ sowie DAPI. Unter einer Vergrößerung von 20 x je Probe wurden 3 zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei wurde zunächst die Gesamtzahl der im Gesichtsfeld vorhandenen Zellen über die Kernfärbung bestimmt, und anschließend, je nach Ansatz, die Zahl der für den bzw. die gefärbten Marker positiven Zellen. Schließlich wurden die Mittelwerte aus den drei Gesichtsfeldern errechnet und daraus prozentuale Anteile an den jeweiligen Marker-exprimierenden Zellen in Bezug auf die Gesamzellzahl bestimmt.

2.2.9. Proteinbiochemische/Immunologische Methoden

2.2.9.i. Gewinnung von Proteinextrakten

Gewinnung von Proteinextrakten für Westernblot. Zur Herstellung von Proteinextrakten aus TGF-beta1-behandelten Zellkulturen (vgl. 2.2.1.iv.) wurde zunächst die Zellsuspension

aus der Kulturflasche in ein 15-ml-Zentrifugenrörchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei $120 \times g$ wurde das Zellpellet in 50 μl SUB-Puffer resuspendiert. Das Material wurde homogenisiert, indem man es mindestens 5-mal durch eine auf eine 2-ml-Einwegspritze aufgesetzte Injektionsnadel mit 0,9 mm Durchmesser presste. Anschließend wurde das Zelllysat 10 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und die Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

Gewinnung von Proteinextrakten für Zymografie. Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus BrdU-behandelten Zellkulturen (vgl. 2.2.1.v.) wurden die adhärenten Zellen zunächst sorgfältig von der Kulturflasche abgespült und in ein 15-ml-Zentrifugenrörchen überführt. Danach war ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei $120 \times g$ vorgesehen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 100 μl Lysepuffer resuspendiert. Die Lysate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.9.ii. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Zunächst wurde eine Standardgerade mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen etabliert. Hierfür wurden 200 μl Bradford-Reagenz mit verschiedenen Volumina an BSA versetzt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 500 μl aufgefüllt. Zuletzt wurden jeweils 5 μl SUB-Puffer pro Ansatz zugegeben. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 5 μl der Probe mit 200 μl Bradford-Reagenz und 300 μl Wasser verdünnt. Nachdem alle Ansätze in eine 96-Well-Platte überführt wurden, wurde anschließend mit einem ELISA-Reader die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm bestimmt. Anhand der erstellten Standardgerade konnte dann die Proteinkonzentration in den zu analysierenden Proben berechnet werden.

2.2.9.iii. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht kam die von Laemmli beschriebene Methode der SDS-PAGE zur Anwendung. Die Elektrophorese erfolgte in der Minigel Twin Apparatur der Firma Biometra unter Benutzung von diskontinuierlichen Gelen, welche aus Sammel- (pH 6.8) und Trenngel (pH 8.8) bestehen (Zusammensetzung siehe Tabelle 10).

Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
1,1 ml destilliertes Wasser	0,87 ml destilliertes Wasser
1,2 ml 0,5 % SDS	0,4 ml 0,5 % SDS
1,2 ml 1,88 nM Tris-HCl pH 8,8	0,4 ml 0,625 % Tris-HCl pH 6,8
2,5 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	0,33 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
15 µl TEMED	5 µl TEMED
50 µl 10 % APS	15 µl 10 % APS

Tabelle 10: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Die Gele wurden vor jeder Anwendung frisch gegossen. Dazu mussten zunächst die Acrylamid-Lösung, SDS, Tris-HCl und Wasser gemischt werden, bevor TEMED und APS zugegeben werden konnten. Wegen der im Anschluss unmittelbar einsetzenden Polymerisation wurden die Gele dann schnellstmöglich gegossen. Nach dem Ende der Polymerisation wurden sie in die Elektrophorese-Apparatur eingebracht und mit Laufpuffer überschichtet. Ein Probenvolumen entsprechend 1 - 5 µg Protein wurde mit 3 µl Loading Dye (6 x) versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min aufgekocht, auf Eis gestellt, und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard auf ein Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 10 mA und 150 W, bis die Lauffront die Grenze von Sammelgel zu Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde auf 25 mA und 500 W erhöht und die Elektrophorese für 1,7 h fortgeführt.

Westernblot. Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte im Anschluss an die SDS-PAGE im Fastblot Elektroblotter der Firma Biometra. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese von den Glasplatten abgelöst und auf eine in Transferpuffer getränkten Nitrozellulose-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Protran BA 85, Schleicher+Schuell, Dassel) gebracht. Weiter wurde das Gel samt Membran, beidseitig eingebettet in mit Transferpuffer getränktem Whatmanpapier (je ca. 3 Stück), auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur überführt. Der Aufbau wurde abschließend mit der Kathodenplatte bedeckt, um das Protein bei 250 mA und 10 W auf die Membran zu übertragen (0,7 h). Zur Überprüfung, ob Protein auf die Membran geblottet wurde, wurde diese im Folgenden mit Ponceau S gefärbt, welches reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen bindet. Damit die Membran danach für den immunchemischen Nachweis der gebundenen Proteine weiterverwendet werden konnte, wurde die Ponceau S-Färbung dann in mehreren Waschschritten mit Wasser wieder entfernt.

2.2.9.iv. Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz und densitometrische Quantifizierung

Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz. Das Blockieren der Membran, die Waschschrifte sowie die Inkubation mit Antikörpern geschahen in FSG-Puffer für Westernblot. Um Dcx oder Aktin (als Kontrolle) immunologisch nachzuweisen, wurde die Membran für 1 h bei R.T. gegen unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen blockiert. Anschließend wurden die geblotteten Proteine über Nacht bei 4°C folgenden Antikörpern ausgesetzt: anti-Dcx (Kaninchen IgG, 1:2000, Cell Signaling, USA) oder anti-Aktin (Kaninchen IgG, 1:5000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Membranen wurden am nächsten Tag dreimal für 10 min auf einem Rotationsschüttler gewaschen und danach mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Esel anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg; Verdünnung 1:10000) für 2 h bei R.T. inkubiert. Nach 3 bis 4 weiteren Waschschriften zur Entfernung von überschüssigem, nicht gebundenem Antikörper, erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität, gestützt auf das ECL-Plus Western Blotting Detection System. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert dabei unter Katalyse von H₂O₂ das zyklische Diacylhydrazin Luminol, was zur Freisetzung von Licht führt (Chemolumineszenz). Hierfür wurde die Membran mit der Proteinseite nach unten auf eine saubere, durchsichtige Folie gelegt, auf der zuvor 2 ml Reagenz A und 50 µl Reagenz B gemischt wurden. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Membran ohne Luftblasen zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Entwicklerkammer gebracht. Um die Lumineszenz zu detektieren, wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia, Freiburg) auf die Folie gelegt, für einige Sekunden exponiert und der Film entwickelt.

Densitometrische Quantifizierung. Die Expression von Dcx wurde quantitativ anhand der Intensität des Signals (Schwärzung der Banden) auf dem Röntgenfilm erfasst; dies geschah mittels densitometrischer Auswertung unter Verwendung der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), wobei zwei Westernblots unabhängig erstellt und ausgewertet wurden.

2.2.9.v. Die Zymografie

Die Durchführung der Zymografie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Christian Bauer am Institut für Organismische Biologie der Universität Salzburg.

Im Anschluss an die Proteinextraktion aus BrdU-behandelten Zellen (vgl. 2.2.9.i.) wurden die Proben 1:2 mit Probenpuffer (2 x) verdünnt und für 10 min inkubiert. Danach wurden gleiche Ausgangsmengen an Protein in 10-25 µl Probenvolumen auf 7,5%ige Polyacrylamidgele mit 0,1 % Gelatine (1 mg/ml) geladen. Die Gele wurden für 1-2 h bei konstanter Spannung (125 V) in Laufpuffer (1 x) laufen gelassen und der Lauf beendet, sobald der Bromphenolblau-Farbstoff die Unterkante des Gels erreicht hatte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min unter leichtem Schütteln in 100 ml Renaturierungspuffer inkubiert (R.T.). Der Puffer wurde abgesaugt und durch 100 ml Entwicklungspuffer ersetzt. Die Inkubation erfolgte während 30 min bei R.T. und weiter für mindestens 4h in frischem Entwicklungspuffer bei 37°C. Um maximale Sensitivität zu erreichen, wurden die Gele über Nacht inkubiert. Danach wurden sie für 30 min mit 0,5 % Coomassie brilliant blue R-250 gefärbt und mit einer Entfärbungs-Lösung entfärbt, bis die Bereiche mit Proteaseaktivität als klare Banden vor einem dunkelblauen Hintergrund erkennbar waren.

2.2.9.vi. Der TGF-beta1-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der TGF-beta1-Konzentration in BrdU-behandelten Zellen kam der Rat TGF-beta1-ELISA Kit zur Anwendung.

Durchführung des ELISAs. Dissozierte NSZs wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in 12-Well-Platten ausgesät (Tag 0) und an Tag 2 mit unterschiedlichen BrdU-Konzentrationen von 0,2 - 20,0 µM (vgl. 2.2.1.v) behandelt. An Tag 4 wurde der TGF-beta1-ELISA, entsprechend dem Protokoll des Herstellers, durchgeführt. Dazu wurden die Zellen aus den Well-Platten in Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 120 x g für 5 min zentrifugiert. Aus jeder zu untersuchenden Probe wurden 20 µl des Überstands abgenommen und mit 180 µl Assay-Puffer verdünnt. Dann wurden 20 µl 1 N HCl pro Probe zugegeben und es wurde 1h bei R.T. inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Neutralisation durch 20 µl 1 N NaOH. Die Mikrowellplatten wurden zweimal mit je 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen, der Waschpuffer wurde abgesaugt und eine Standardreihe erstellt. Hierfür wurden in die Standard-Wells zunächst 100 µl Assay-Puffer vorgelegt. Zur Erstellung der ersten Verdünnungsstufe wurden 100 µl Standard mit einer Konzentration von 4000 pg/ml in eines der Wells pipettiert (1:2-Verdünnung). Nach ausreichender Durchmischung mit dem Assay-Puffer wurden 100 µl des 1. Standards in das darauffolgende Well überführt. Auf diese Weise wurde eine 7-stufige Verdünnungsreihe von 2000 pg/ml - 31,3 pg/ml erstellt. Standards sowie Proben wurden jeweils in doppelter Ausführung angefertigt. 100 µl der 1:12-verdünnten Proben

wurden ebenfalls auf die Mikrowellplatten überführt, die Platten wurden mit einer selbstklebenden Folie bedeckt und für 2 h bei R.T. auf einem Plattformschüttler inkubiert. Danach wurden sie fünfmal mit je 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und es wurden 100 µl Biotin-Konjugat (1:100-Verdünnung in Assay-Puffer) je Well zugegeben. Nach 1-stündiger Inkubation bei R.T. und anschließenden fünf Waschschriften wurden je 100 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats (1:100 in Assay-Puffer) zugegeben, 1h auf dem Schüttler inkubiert und die ELISA-Platte anschließend wiederum fünfmal gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung pro Well hervorgerufen. Als Inkubationszeit waren hierfür maximal 30 min bei R.T. vorgesehen. Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung beendet, sobald der höchste Standard eine dunkelblaue Farbe entwickelt hatte. Schließlich wurde die Absorption der Substratlösung am Emax Precisions Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Auswertung der ELISA-Daten. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden aus den doppelt bestimmten Proben und Standards jeweils die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen gebildet. Als nächstes wurde eine Standard-Eichkurve durch Auftragung der gemittelten Standardabsorptionen gegen die TGF-beta1-Konzentration erstellt. Anhand dieser Ausgleichskurve wurde die Konzentration des zirkulierenden TGF-beta1 für jede Probe auf Höhe der jeweilig gemessenen Absorption bestimmt. Zuletzt wurde der ermittelte Wert mit 12 multipliziert, um die Verdünnung der Probe bei der Versuchsdurchführung zu berücksichtigen.

2.2.10. Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen hinsichtlich ihrer biologischen, physikalischen, chemischen und physiologischen Eigenschaften zu analysieren. Hierfür werden Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom in geordneter Reihenfolge an einer fokussierenden Lichtquelle (Laser) vorbeigeleitet. Über die Messung der dabei erzeugten Vorwärts-, „forward scatter light“, FSC) und Seitwärtsstreulichtsignale („sideward scatter light“, SSC) können Informationen über die Größe und die Granularität einer Zelle gewonnen werden. Die Anwendung von DNA-Farbstoffen und fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern erlaubt zudem, die Zellen und Zellpopulationen über die beobachtbaren Fluoreszenzlichtsignale (FL) in Bezug auf ihren DNA-Gehalt sowie ihre Antigenexpression zu charakterisieren.

2.2.10.i. Fixierung der Zellen

Für die durchflusszytometrische Analyse mussten die Zellen - sofern nicht anders angegeben - fixiert werden. Mit BrdU oder TGF-beta1 vorbehandelte Zellen (vgl. 2.2.1.v. bzw. 2.2.1.iv.) wurden zunächst vereinzelt (vgl. 2.2.1.ii.) und danach für 5 min bei 120 x g zentrifugiert. Die Accutase wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 1 ml eiskaltem, 70%igen Ethanol resuspendiert. Die Fixierung erfolgte mindestens über Nacht bei -20°C.

2.2.10.ii. Zellpräparation für die einparametrische DNA-Färbung

In einparametrischen DNA-Färbungen wurden aNSZ der SVZ auf eine Beeinflussung der Zellproliferation durch eine 48-stündige BrdU-Inkubation untersucht. Die fixierten, BrdU-behandelten Zellen (2.2.1.v.) wurden einer Zentrifugation für 5 min bei 120 x g unterzogen. Anschließend wurde der Ethanol abgesaugt und durch 470 µl DPBS ersetzt. Es wurden je 5 µl RNase A mit einer Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration: 10 µg/ml) ergänzt und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die DNA-Färbung erfolgte durch Zugabe von 25 µl 1 mg/ml Propidiumiodid (PI, Endkonzentration: 50 µg/ml). Die Proben wurden durch kurzes Vortexen gemischt und bis zur Vermessung am Durchflusszytometer mit den in Tabelle 22 aufgelisteten Geräteeinstellungen im Dunkeln gelagert. Aus den erstellten Histogrammen wurden die prozentualen Anteile der Zellen in der S-Phase sowie der G0/G1- und G2/M-Phase bestimmt.

2.2.10.iii. Zellpräparation für die zweiparametrische DNA-Färbung

Zellpräparation für die Ki67/PI-Färbung. Um zu untersuchen, an welcher Stelle des Zellzyklus TGF-beta1-behandelte aNSZ arretiert sind, wurden sie, wie unter 2.2.1.iv. dargestellt, vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen dissoziiert, in je 1 ml eiskaltem, 70%igen Ethanol fixiert (vgl. 2.2.10.ii) und bis zur Färbung bei -20°C gelagert. Frühestens am nächsten Tag wurden die Zellen nach einem teilweise modifizierten Protokoll von Endl *et al.* (1997) gefärbt. Zu Beginn der Färbung wurden zunächst 2 ml eiskaltes DPBS pro Ansatz zugegeben. Die Zellen wurden während 5 min bei 600 x g zentrifugiert und in 500 µl kaltem DPBS mit 0,1 % Triton X-100 resuspendiert. Es schloss sich eine 5-minütige Inkubation auf Eis an, worauf die Zellen zweimal mit 2 ml DPBS gewaschen wurden, gefolgt von zwei Zentrifugationsschritten bei 600 x g. Die Markierung mit den FITC-konjugierten Maus anti-Mensch Ki67- bzw. IgG1-Isotypkontrollantikörpern (FITC Mouse anti-human monoclonal antibody set, BD Pharmingen, USA) erfolgte während einer 45-minütigen Inkubation im

Dunkeln nach den Angaben des Herstellers in 100 µl DPBS mit 20 µl Antikörper. Im Anschluss wurden die Zellen noch einmal gewaschen und in 470 µl DPBS aufgenommen. Um eine mögliche Wechselwirkung von PI mit RNA zu umgehen, wurden 5 µl RNase A (1 mg/ml; Endkonzentration 10 µg/ml) zu jedem Ansatz gegeben und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Schließlich wurden 25 µl PI (1 mg/ml; Endkonzentration: 50 µg/ml) in die Ansätze pipettiert und die Proben bis zur Vermessung am Durchflusszytometer bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

BrdU-Inkubation und Zellpräparation für die Pulsmarkierung (anti-BrdU-Technik)/PI-Färbung. Die anti-BrdU-Technik bietet die Möglichkeit, BrdU-behandelte Zellen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren. Dazu werden die Zellen zunächst für kurze Zeit dem halogenierten Basenanalogenon BrdU ausgesetzt, welches während der Replikation in der S-Phase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Die BrdU-Inkorporation kann im Anschluss durch eine Färbung mit einem gegen BrdU gerichteten, FITC-konjugierten Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Aufgrund des kürzeren, zum BrdU-Einbau zur Verfügung stehenden zeitlichen Intervalls, zeigen Zellen, die während des BrdU-Pulses in die S-Phase eintreten oder gerade aus ihr austreten, hierbei einen geringeren BrdU-Gehalt und folglich eine geringere FITC-Fluoreszenzintensität. Durch eine zusätzliche Färbung mit dem stöchiometrisch in die DNA interkalierenden Farbstoff PI können außerdem anhand einer zweidimensionalen Auftragung beider Parameter, BrdU und PI, die Anteile der BrdU-positiven Zellen in der S-Phase und der BrdU-negativen Zellen in der G0/G1- bzw. G2/M-Phase zur Zeit der Probenentnahme sowie die Intensität der Färbung bei den unterschiedlichen BrdU-Konzentrationen bestimmt werden.

In Vorbereitung auf die anti-BrdU-Technik wurden aNSZ in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät (Tag 0) und für 4 Tage kultiviert. Danach war ein BrdU-Puls für 20 min vorgesehen. Dazu wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 µM, 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM oder 20,0 µM zugesetzt und im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in Zentrifugenröhren überführt, für 5 min bei $120 \times g$ zentrifugiert und mit DPBS gewaschen. Dann wurden sie, wie unter 2.2.10.i. beschrieben, mit Accutase vereinzelt und schließlich über Nacht in Ethanol fixiert. Vor Beginn der Färbung wurden die Zellen für 5 min abzentrifugiert und dreimal mit kaltem DPBS mit 2 % BSA gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl DPBS mit 2 % BSA resuspendiert und mit 100 µl einer 1 mg/ml RNase-A-Stammlösung für 12 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 40-minütiger Inkubation bei R.T. und einem Waschschnitt wurde das Pellet in

50 µl DPBS mit 2 % BSA aufgenommen, für 3 min bei 37° erwärmt und 4 min mit 1 ml frisch herstellter Pepsinlösung (5 mg Pepsin in 15 ml 0,01 N HCl) inkubiert, um das Zytoplasma und die Zytoplasmamembran zu verdauen und so unspezifische Bindungen von Farbstoff und Antikörpern zu verhindern. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 3 ml kaltem DPBS mit 2 % BSA gestoppt. Die Zellkerne wurden während 3-5 min abzentrifugiert und die DNA mit 400 µl 2 N HCl denaturiert, sodass sie für den gegen BrdU gerichteten Antikörper zugänglich wurde. Dazu wurden die Zellen für 10 min bei R.T. inkubiert. Danach erfolgten mindestens zwei Waschschritte; diese mussten jedoch so lange wiederholt werden, bis der pH-Wert der Zellsuspension im neutralen Bereich lag. Die Zellen wurden zentrifugiert, und in 100 µl DPBS mit 2 % BSA aufgenommen. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden im Anschluss 20 µl eines FITC-konjugierten Maus anti-BrdU-Antikörpers bzw. Maus anti-IgG1-Isotypkontrollantikörpers zugesetzt (FITC Mouse Anti-BrdU Set, BD Pharmingen, USA). Nach 45-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellkerne gewaschen und in 200 µl DPBS resuspendiert. Zuletzt wurden 0,5 µl einer 1 mg/ml PI-Stammlösung zugesetzt und die Zellen nach wenigen Minuten am FACS Calibur mit den in Tabelle 23 aufgelisteten Geräteeinstellungen vermessen.

2.2.10.iv. Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen

Standardsoftware. Alle Messungen, die am Durchflusszytometer durchgeführt wurden, erfolgten an einem Macintosh Computer mit der Software BD CELL QuestTM Pro. Die gewonnenen Daten, die zunächst als *list-mode*-Datenfile FCS 2.0 (Flow Cytometry Standard 2.0) gespeichert wurden, wurden zur Auswertung auf einen Standard-PC übertragen. Die quantitative, einparametrische Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte mithilfe der Software Expo 32 v 1.2 und Win Cycle 32 Version 11.05.02 Beta. Zweiparametrische DNA-Messungen wurden mit Win MDI 2.8 ausgewertet.

Datendarstellung und Datenverarbeitung. Zur graphischen Darstellung zweier gemessener Parameter wurde in Win MDI 2.8 ein zweidimensionaler Dot-Plot erstellt. Dazu wurde zunächst das FSC-Signal (Grösse der Zelle) auf der Abszisse gegen das SSC-Signal (Granularität) auf der Ordinate aufgetragen (vgl. Abbildung 7 A). Da Zelltrümmer und Farbstoffaggregate (Debris) schwache FSC- und SSC-Signale liefern, kann anhand dieser Darstellung die Zellpopulation mit intakten, vitalen Zellen identifiziert werden. Die gewünschte Zellpopulation wurde mithilfe einer Region (R1), die um die Population gezeichnet wurde, markiert. Durch die Definition dieser Region als „Gate“ bot sich die Möglichkeit, nur den Datensatz der

Zellen, die sich innerhalb der gewählten Region befanden, zu extrahieren und zur graphischen Darstellung in einen weiteren Dot-Plot zu übertragen, um im Anschluss zusätzliche Eigenschaften dieser Zellen (z. B.: den DNA-Gehalt) zu untersuchen. Zunächst mussten aber Zellaggregate, sogenannte Zelldoubletten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Dafür wurde in einem Dot-Plot die Signalfläche der PI-Fluoreszenz (FL3-A, Signalintegral) auf der Ordinate gegen deren Signalweite (FL3-W, Signaldauer) auf der Abszisse aufgetragen (vgl. Abbildung 7 B). Zelldoubletten zeichnen sich im Vergleich zu Einzelzellen durch größere FSC-Signale aus und benötigen demzufolge mehr Zeit, um den Laserstrahl zu passieren. Da sich dieser Sachverhalt folglich in einer längeren Signaldauer widerspiegelt, konnten mithilfe einer Region 2 (R2) Zellaggregate leicht von Einzelzellen abgegrenzt werden. Ferner wurden dabei auch Zelltrümmer, die zwar eine gewisse Fluoreszenz aufwiesen, aber nicht zu der gewünschten Population zählten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. In einem letzten Schritt wurden die zur Auswertung verbliebenen Zellen (R2) auf zusätzliche Eigenschaften hin untersucht. Für die Auftragung eines einzelnen Parameters wie beispielsweise des DNA-Gehalts (PI-Fluoreszenz = FL3) wurde die Darstellung als Histogramm gewählt. Dazu wurde die Anzahl der Ereignisse (Häufigkeit des Ereignisses) auf der y-Achse gegen die Signalfläche (FL3-A) der PI-Färbung auf der x-Achse aufgetragen (Abbildung 7 C).

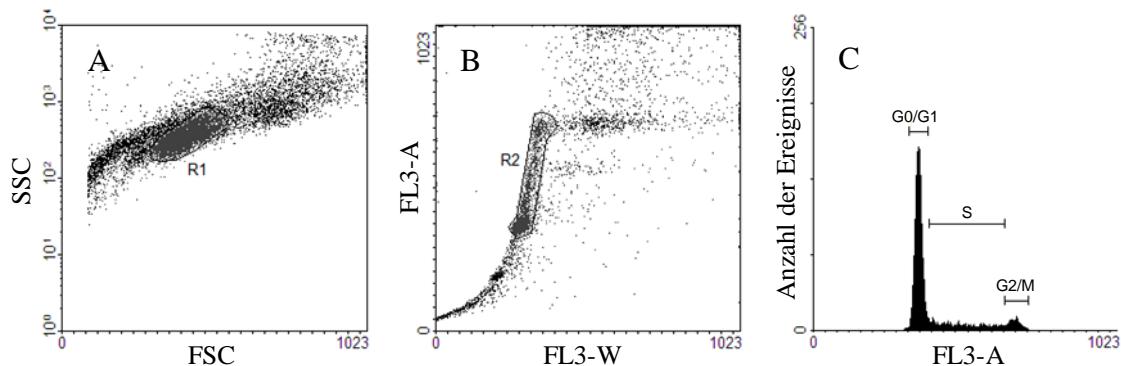


Abbildung 7: A: Gating in einem FSC (Größe der Zellen)/SSC (Granularität der Zellen)-Dot-Plot: Durch die Region R1 wird die Population vitaler Zellen markiert. B: Die in A ausgewählten Zellen sind in einer Auftragung der Signalfläche (FL3-A) der PI-Fluoreszenz gegen die Signaldauer (FL3-W) der PI-Fluoreszenz abgebildet. Durch die Region R2 werden Zelldoubletten von der Auswertung ausgeschlossen. C: Der DNA-Gehalt der in R2 ausgewählten Zellen wird anhand der Auftragung der Anzahl der Ereignisse gegen die Signalfläche (FL3-A) der PI-Fluoreszenz in einem Histogramm dargestellt.

Bei Verwendung basenpaarspezifischer DNA-Farbstoffe wie PI entsprach das erstellte Histogramm dem Verteilungsmuster der DNA (G0/G1-, S- und G2/M-Phase) der untersuchten Zellpopulation. Mithilfe des Programms Win Cycle 32 Version 11.05.02 Beta konnte im Anschluss die Zellzyklusverteilung der einparametrischen DNA-Messung quantitativ ermittelt werden. Die Auswertung des S-Phase-Anteils wurde dabei mit einer S-Phasen-Bestimmung nullter Ordnung durchgeführt, das heißt die Verteilung der G0/G1- und G2/M-Phase-Peaks

wurde zunächst als symmetrisch und „gaußverteilt“ angenähert, bevor, unter der Annahme geringer Überlappung, der dazwischenliegende Bereich der S-Phase zugeordnet wurde (Rabinovitch, 1993). Alternativ wurden Zellzyklusverteilungen auch mit Win MDI 2.8 berechnet. Für die gleichzeitige Auftragung zweier gemessener Parameter (z. B.: Ki67-Expression und DNA-Gehalt) der in R2 verbliebenen Zellen wurde wiederum die graphische Darstellung als Dot-Plot (siehe oben) gewählt, um die Zellen auf zusätzliche Eigenschaften hin zu untersuchen.

2.2.11. Elektrophysiologische Methoden

Elektrophysiologische Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olaf Strauß am Institut für Experimentelle Ophthalmologie der Universitätsklinik Regensburg. Zur Analyse der elektrischen Eigenschaften von Nervenzellen wurden aNSZ, die unter Proliferations- oder Differenzierungsbedingungen in Anwesenheit von TGF-beta1 kultiviert worden waren, herangezogen.

Proliferierende Zellen wurden hierfür im Vorfeld wie unter 2.2.1.iv. beschrieben mit TGF-beta1 stimuliert und im Anschluss an die 8-tägige Inkubation auf Poly-L-Ornithin-Laminin-beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) 24-Well-Platten in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen in 500 µl NB-B27-all-Medium pro Well ausgesät. Im Verlauf der nächsten drei Tage wurden die Zellen jeweils elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen, wobei am Morgen des zweiten Tages (Tag 10) nochmals TGF-beta1 in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt wurde.

Zur Analyse der elektrischen Eigenschaften differenzierter Zellen, wurden die Zellen nach dem Passagieren direkt auf beschichteten (vgl. 2.2.1.ii.) 24-Well-Platten ($2,5 \times 10^4$ Zellen in 500 µl Medium pro Well) ausgesät, zunächst jedoch unter Proliferationsbedingungen. Am nächsten Tag wurden die Zellen einem Medienwechsel auf Differenzierungsmedium (NB-B27-not-all-Medium mit 5 % v/v FCS) unterzogen. Einige Stunden später erfolgte die erste Stimulation mit TGF-beta1. Weitere Zugaben wurden an Tag 4 und Tag 7, wie unter 2.2.1.iv. beschrieben, durchgeführt. An Tag 8 bis 10 wurden die Zellen vermessen, wobei am Morgen des zehnten Tages nochmals TGF-beta1 zugesetzt wurde.

Die Patch-Clamp-Technik. Die Patch-Clamp-Technik ist eine von Neher und Sakmann entwickelte elektrophysiologische Methode (Neher & Sakmann, 1976), die ermöglicht, elektrische Ströme durch Ionenkanäle in der Zellmembran einer Zelle darzustellen und zu analysieren. Sie basiert auf der Technik der Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Technik), und erlaubt im Gegensatz dazu, neben der Messung von Strömen der gesamten Zellmembran auch

die Messung von Strömen auf Einzelkanalebene. Anders als die Voltage-Clamp-Technik, die eine Elektrode benötigt, um eine Halte- oder Kommando-Spannung vorzugeben, während mit einer weiteren Elektrode die auftretenden Ströme über die Membran aufgezeichnet werden, erfordert die Patch-Clamp-Technik darüber hinaus nur die Verwendung einer einzelnen Elektrode. Diese wird sowohl zur Strominjektion als auch zur Messung des Potentials eingesetzt. Eine zweite Elektrode, die sogenannte Badelektrode, dient hierbei lediglich als Referenzelektrode (Numberger & Draguhn, 1996; Molleman, 2003).

Durchführung der Messung. Zur Durchführung einer Patch-Clamp-Messung wurde ein Deckglas mit den zu untersuchenden, adhärenten Zellen in der Perfusionskammer platziert und mit Badlösung umspült. Mithilfe eines Inversmikroskops wurde im nächsten Schritt eine adäquate, intakte Zelle zur Vermessung ausgewählt. Nach Erzeugen eines Überdrucks wurde die Patchpipette in die Badlösung eingetaucht und behutsam mithilfe des Mikromanipulators in die Nähe der ausgewählten Zelle gebracht. Indem die Pipettenspitze auf die Zellmembran aufgesetzt wurde, wurde eine elektrisch dichte Verbindung zwischen Pipettenspitze und Membran erzeugt und folglich ein Membranfleck (sog. „patch“) isoliert. Der dadurch hervorgerufene Anstieg des Widerstandes wurde durch einen Abfall des Kontrollstromes sichtbar. Nach Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette kam es zur Ausbildung der sogenannten „cell-attached“-Konfiguration. Da die entstehenden elektrischen Widerstände zwischen dem Pipetten-Innenraum und der Badlösung in der Größenordnung von mehreren Giga-Ohm (10^9 Ohm) liegen, wird diese Verbindung auch als „Giga-Seal“ (engl.: to seal – versiegeln) bezeichnet. Durch Bildung des Giga-Seals werden die vorhandenen Leckströme zwischen Membranoberfläche und Pipettenspitze auf ein Minimum reduziert und so das Hintergrundrauschen insgesamt verringert. Ausgehend von der „cell-attached-Konfiguration“ als Basiskonfiguration wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die „whole-cell“-Konfiguration verwendet, bei der keine Einzelkanalströme, sondern die Gesamtstromantwort einer Zelle als Summe aller aktiven Kanäle gemessen wurde.

Der Messplatz. Um Störeinflüssen durch mechanische Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung vorzubeugen, wurde die Messapparatur, bestehend aus Mikroskop, Perfusionskammer, Mikromanipulator mit Pipettenhalter und Vorverstärker, auf einem schwingungsdämpften Tisch angebracht. Zur elektrischen Abschirmung wurde die gesamte Messapparatur von einem Faradaykäfig umgeben. Alle Messungen wurden unter optischer Kontrolle mithilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert FS, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt, wobei die Zellen bei 40facher Vergrößerung ausgewählt wurden. Signalübertragung

und Datenerfassung erfolgten außerhalb des Faradaykäfigs mithilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers (EPC-10-Amplifier HEKA, Lamprecht, Deutschland), eines AD/DA-Wandlers (Battelle, Frankfurt) sowie eines Computers, der mit entsprechender Software (TIDA, Turbo Pascal Interface for Data Aquisition, HEKA) zur Datenaufnahme und -analyse ausgestattet war. Alle Komponenten des Systems waren elektrisch geerdet. Der Vorverstärker war mit dem Hauptverstärker (EPC-10-Amplifier HEKA electronics, Lambrecht, Deutschland) verbunden, der das Stromsignal erfasste und als Spannung auslas (Strom-Spannungs-Wandler).

Die Patchpipetten. Die verwendeten Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) hergestellt. Um sicherzustellen, dass die Membran der Zelle durch Aufsetzen der Pipettenspitze nicht durchstochen wird, wurden die Kapillaren mithilfe eines automatischen Pipettenziehgerätes (DMZ Universal Microelectrode Puller, Zeitz, Augsburg) in einem zweistufigen Ziehverfahren direkt vor der Benutzung gezogen. Die Pipetten erhielten dadurch einen stumpfen Öffnungsradius mit einem Durchmesser $<1\text{ }\mu\text{m}$. Im nächsten Schritt wurden die Pipetten durch einen Heizdraht poliert. Dadurch wird eine bessere Haftung zwischen Pipette und Membran erreicht, was zu einer Verlängerung der Lebensdauer des „patch“ führt und die Ausbildung eines Giga-Seals begünstigt. Die entstandene Pipette wurde mit einer intrazellulären Pipettenlösung (Zusammensetzung: vgl. Tabelle 11 c) gefüllt. Nachdem sichergestellt wurde, dass die Lösung in der Pipette frei von Luftbläschen war, wurde die Pipette über den Elektrodendraht im Pipettenhalter gestülpt. Der Widerstand betrug 3-5 Mega-Ohm (10^6 Ohm).

Die Patch- und die Referenzelektrode bestanden jeweils aus dünnen Silberdrähten, die mit einer Schicht aus Silberchlorid überzogen waren. Die Patchelektrode war mit einem elektrisch betriebenen Mikromanipulator verbunden (Scientific Precision Instruments SPI, Oppenheim/Rhein), der eine präzise dreidimensionale Bewegung der Pipette ermöglichte. Darüber hinaus war die Pipette über ein Schlauchsystem und einen Dreiegehahn an einer U-Wassersäule angeschlossen, sodass je nach Bedarf das Anlegen eines Über- oder Unterdruckes möglich war. Die Referenzelektrode befand sich in der mit Badlösung durchspülten Messkammer, die Messelektrode dagegen in der mit Pipettenlösung gefüllten Patchpipette.

Elektrische Stimulation und Pulskontrolle. Um die Vergleichbarkeit der Daten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhalten worden waren, zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig zwei verschiedene Stimulationsprotokolle für die Patch-Clamp-Messungen verwendet, das R50- und das R500-Pulsprotokoll. Eine Mo-

mentaufnahme der zellulären Stromantwort auf verschiedene Potentiale erfolgte mit dem R50-Pulsprotokoll. Ausgehend von einem Initialwert von -80 mV (-40 mV für den Nachweis von Kaliumkanälen) wurde die zu vermessende Zelle für den Nachweis von Natriumkanälen insgesamt 18 verschiedenen Spannungen von je 50 ms Dauer ausgesetzt. Mit den ersten 9 Schritten wurde die Zelle bis auf ein Potential von +10 mV depolarisiert (+50 mV für den Nachweis von Kaliumkanälen), anschließend folgten 9 hyperpolarisierende Schritte bis zu einem Spannungswert von -170 mV (-130 mV für den Nachweis von Kaliumkanälen). Die Amplitudendifferenz zwischen den aufeinanderfolgenden Spannungsschritten betrug jeweils 10 mV. Die Anwendung dieses Protokolls ermöglichte die exakte Zuordnung der gemessenen Stromstärke zum exponierten Potential und somit die Berechnung einer Strom-/Spannungskurve. Zur Beobachtung des Inaktivierungsverhaltens der Ströme erfolgte die Stimulation durch das R500-Pulsprotokoll (Dauer der Stimulation: 500 ms). Um darüber hinaus die Anwesenheit von Natriumkanälen zu verifizieren, wurde vor der Vermessung Tetrodotoxin (TTX) in einer Konzentration von 10 nM in die Extrazellulärösung gegeben. Durch TTX können Natriumkanäle reversibel geblockt werden.

Lösungen für Patch-Clamp-Experimente. Für jedes Experiment wurde jeweils eine extrazelluläre Badlösung und eine intrazelluläre Pipettenlösung benötigt. Alle Lösungen wurden nach der Zubereitung gefiltert und, um den pH-Wert stabil zu halten, mit HEPES gepuffert. Der pH-Wert der extrazellulären Badlösungen wurde mit NaOH, der der Intrazellulärösung mit KOH auf 7.3 eingestellt. Badlösungen wurden im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt und innerhalb von 7 Tagen aufgebraucht, wohingegen die intrazelluläre Pipettenlösung aliquotiert und bei -20° C eingefroren wurde.

Die genaue Zusammensetzung der für die Patch-Clamp-Messungen verwendeten Lösungen ist in den Tabellen 11 a-c zusammengefasst:

Chemikalie	Konzentration (mM)	Stammlösung (mM)	Menge pro 1 (g bzw. ml)
NaCl	130		7,59 g
CsCl	5		0,84 g
MgCl ₂	4		0,81 g
CaCl ₂	1	100	10 ml
EGTA	2,5		0,95 g
HEPES	10		2,38 g
Glukose	5		0,99 g

Tabelle 11 a: Zusammensetzung der extrazellulären Badlösung für Neurone, kalium-frei.

Chemikalie	Konzentration (mM)	Stammlösung (mM)	Menge pro 1 l (g bzw. ml)
NaCl	130		7,59 g
KCl	5		0,37 g
MgCl ₂	4		0,81 g
CaCl ₂	1	100	10 ml
EGTA	2,5		0,95 g
HEPES	10		2,38 g
Glukose	5		0,99 g

Tabelle 11 b: Zusammensetzung der extrazellulären Badlösung für Neurone, kalium-haltig.

Chemikalie	Konzentration (mM)	Stammlösung (mM)	Menge pro 100 ml (g bzw. ml)
KCl	140		1,04 g
MgCl ₂	2	100	2,0 ml
CaCl ₂	1	100	1,0 ml
EGTA	2,5		0,10 g
HEPES	10		0,24 g
ATP	3	100	0,3 ml

Tabelle 11 c: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung für Neurone.

2.2.12. Kernspinresonanzspektroskopie

2.2.12.i. Theoretische Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie; von engl.: *nuclear magnetic resonance*) ist eine spektroskopische Methode, welche die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkungen mit seinen Nachbaratomen erlaubt. Sie ermöglicht dadurch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktureigenschaften biologischer Moleküle und erfasst darüber hinaus auch deren Dynamik. Bei der Strukturaufklärung spielen vor allem die ¹H-Isotope des Wasserstoffs, die in organischen Molekülen in großer Zahl vorhanden sind, eine wichtige Rolle. Weitere NMR-aktive Atomkerne sind zudem ¹⁵N- und ¹³C-Kerne.

Die hochauflösende NMR-Spektroskopie eignet sich, neben der grundlegenden Analyse einzelner Moleküle unter der Einwirkung eines starken Magnetfelds, auch für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen. So können beispielsweise Proteinstrukturen und deren Wechselwirkungen mit anspruchsvollen, multidimensionalen spektroskopischen Methoden ermittelt werden. Des weiteren können biologische Fluide sowie Gewebe- und Zellextrakte analysiert werden, indem bis zu Tausende Stoffwechselprodukte simultan vermessen werden. Trotz seiner moderaten Sensitivität *in vivo* kann die NMR-Spektroskopie auch in lebenden Zellen und Organismen angewandt werden. Hier bietet sie die Möglichkeit, die molekulare Komposition von Zellen und Geweben unter physiologischen Bedingungen aufzuklären. Als nicht-in-

vasive Technik ist sie folglich für das Verständnis grundlegender Prozesse in der Zelle prädestiniert und ermöglicht hoch multivariate Untersuchungen des zellulären Stoffwechsels, wie beispielsweise des Lipidstoffwechsels. Zahlreiche Berichte lassen darauf schließen, dass der 1.28-ppm-Peak in NMR-Spektren verschiedener Zelltypen mit einer Gruppe von zellulären Lipid-Molekülen, genannt NMR-sichtbare mobile Lipide (Hakumaki & Kauppinen, 2000), korreliert und mit der Induktion von Apoptose und/oder Wachstumsarrest assoziiert werden kann (Blankenberg *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang wurde dem spezifischen NMR-Signal bei 1.28 ppm kürzlich auch in NSZ die Eigenschaft als Sensor für Prozesse wie Apoptose und Stammzellquieszenz, die stark mit der Neurogenese und NSZ *in vivo* verbunden sind, zugeordnet (Ramm *et al.*, 2009). So konnte dieses Signal unter wachstumsarrest-fördernden Bedingungen oder Apoptose nachgewiesen werden, nicht aber in frisch isolierten NSZ-Kulturen (Ramm *et al.*, 2009). Weiter konnte gezeigt werden, dass das 1.28-ppm-Signal auch in NSZ mit dem Auftreten von mobilen Lipid-Tröpfchen einhergeht (Ramm *et al.*, 2009).

2.2.12.ii. Durchführung der Kernspinresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektroskopie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg.

Um lebende Zellen NMR-spektroskopisch zu untersuchen, wurde eine Probe der Zellsuspension in ein starkes Magnetfeld gebracht und durch Einstrahlung von Radiowellen angeregt. Für die Durchführung wurden 3-10 Millionen Zellen, die mit TGF-beta1 vorbehandelt waren (vgl. 2.2.1.iv.), aus mehreren Kulturflaschen zusammengefasst, zweimal in DPBS gewaschen und in 500 µl DPBS mit 10 % Deuterium-Wasser (D_2O) und 40 µM 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure (DSS) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in ein 5-mm-Shigemi-NMR-Röhrchen überführt, welches die Sedimentation innerhalb des empfindlichen Volumens der Radio-Frequenz-Spule erlaubte. Die Proben wurden auf 5°C gekühlt, und die Magnetresonanz-Messung wurde innerhalb von 15 min gestartet. Alle Messungen wurden an hochauflösenden 1H -NMR Bruker Avance 600 und 800 MHz Spektrometern unter Verwendung einer gradientenbasierten Wasserunterdrückungspulssequenz bei 5°C durchgeführt. Es wurden jeweils 64 Scans mit 64k Datenpunkten und 4,7 s Wiederholungszeit akkumuliert, gefolgt von einer exponentiellen Linienverbreiterung von 0.3 Hz. Nach der Fourier-Transformation wurden die Spektren manuell Phasen- und Basislinien-

korrigiert. DSS wurde als interner Referenzstandard (0 ppm) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Dekonvolution der zu analysierenden Spektralregion zwischen 1.5 und 0.7 ppm mithilfe einer Matlab-fitting-Routine. Der Fettsäuremethylenpeak in der Nähe von 1.28 ppm und das makromolekulare Methyl-Multiplett zwischen 1.05 und 0.80 ppm, welches zur Normalisierung auf die Zelldichte verwendet wurde, wurden von den überlappenden Multipletts kleiner Moleküle wie Laktat, Ethanol und Aminosäuren separiert. Diese Evaluationsprozedur unterschätzt die 1.28-ppm-Peak-Intensität bei hohen Werten aufgrund des nicht unbedeutenden Fettsäuremethyl-Beitrags zur makromolekularen Methyaintensität eher und ist folglich zur Verifizierung von signifikanten Fettsäuresignalerhöhungen geeignet. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$) getestet. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

2.2.13. In-vivo-Experimente zur Analyse des Effekts einer BrdU-Markierung auf die Proliferation aNSZ

2.2.13.i. Analyse des Effekts einer intraperitonealen BrdU-Applikation auf die Proliferation endogener Zellen im Hippocampus

15 männliche Fischer-344-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g wurden zufällig in drei Gruppen (5 Tiere pro Gruppe) eingeteilt. An Tag 1 und 2 erhielten die Tiere intraperitoneale Injektionen von BrdU gelöst in NaCl-Lösung (Gruppe 2: 50 mg/kg BrdU; Gruppe 3: 200 mg/kg BrdU) oder NaCl-Lösung (Gruppe 1) als Kontrolle. An Tag 4 wurden alle Tiere intrakardial mit einer 0,9 % Kochsalzlösung, gefolgt von 4 % PFA in 0,1 M Phosphat-Puffer, perfundiert (vgl. 2.2.13.iii.). Um das Ausmaß der Proliferation nach intraperitonealer BrdU-Applikation zu bestimmen, wurden die Gehirne im Anschluss der immunhistochemischen Untersuchung durch eine chromogene PCNA-Färbung unterzogen.

2.2.13.ii. Analyse des Effekts einer BrdU-Markierung auf die Proliferation ins Rückenmark transplanterter Zellen

Dieses Experiment wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Axonale Regeneration unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Weidner an der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt.

Vorbehandlung der Zellen für die Transplantation. aNSZ wurden im Vorfeld der Transplantation für 48 h in Proliferationsmedium mit 0,2 μ M, 1,0 μ M oder 2,5 μ M BrdU inkubiert (vgl. 2.2.1.v.). Im Anschluss wurden die Zellen passagiert, ein Aliquot der Einzelzellensus-

pensionslösung wurde mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer zur Ermittlung der Zellzahl ausgewertet. Die restliche Einzelzellsuspension wurde zweimal gewaschen und schließlich in einer Endkonzentration von $1,2 \times 10^5$ NSZ/ μl in DPBS resuspendiert, um die Zellen für die Transplantation vorzubereiten.

Zelltransplantation in das intakte Rückenmark. Für alle chirurgischen Eingriffe wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin (62,5 mg/kg), Xylazinhydrochlorid (3,175 mg/kg) und Acepromazinmaleat (0,625 mg/kg) in 0,9 % steriler Kochsalzlösung anästhesiert. Zur Transplantation BrdU-markierter Zellen in das intakte Rückenmark wurden adulte, weibliche Fischer-344-Ratten mit einem Gewicht von 160-180 g (Alter: 3-4 Monate) verwendet. Die Tiere erhielten zunächst eine partielle Laminektomie auf Höhe des dritten Halswirbels. Dann wurde ein Gesamtvolumen von 2 μl Zellsuspension mit $1,2 \times 10^5$ Zellen/ μl , welche mit a) 0,2 μM BrdU ($n=6$), b) 1,0 μM BrdU ($n=5$) oder c) 2,5 μM BrdU ($n=6$) gelabelt waren, unter stereotaktischer Führung (medio-laterale Mittellinie, dorso-ventral -0,08) mit Hilfe des Picospritzer II durch eine gezogene Glasmikropipette (100 μm Innendurchmesser) in das Rückenmark injiziert. Die Glasmikropipette wurde geringfügig angehoben und für mindestens 1 min an der Injektionsstelle belassen, um die Zelldiffusion hoch in den Nadelkanal zu minimieren. Zuletzt wurde die Implantationsstelle mit Gelschaum bedeckt, bevor die Muskelschichten neu arrangiert wurden und die Haut über der Läsion geklammert wurde. 4 Tage nach der Operation wurden die Tiere transkardial mit einer 0,9 % Kochsalzlösung, gefolgt von 4 % PFA in 0,1 M Phosphat-Puffer, perfundiert (vgl. 2.2.13.iii.). Um das Ausmaß der Proliferation der transplantierten, BrdU-markierten Zellen zu bestimmen, wurden die Rückenmärker im Anschluss der immunhistochemischen Untersuchung durch eine BrdU/PCNA-Fluoreszenzfärbung unterzogen. Die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen wurde über eine chromogene BrdU-Färbung ermittelt.

2.2.13.iii. Perfusionsfixierung und Erstellen der Gewebeschnitte

Perfusionsfixierung. Vor Beginn der Perfusionsfixierung wurden die Ratten zunächst tief narkotisiert, und zwar mit einer Mischung aus Ketamin (24,8 mg/ml; 10 % Ketamin), Acepromazinmaleat (0,248 mg/ml; Vetranquil) und Xylazinhydrochlorid (1,26 mg/ml; Rompun). Den Tieren wurde der Brustraum geöffnet, eine Perfusionsnadel wurde in die linke Herzkammer eingeführt und bis zur Aorta vorgeschoben. Anschließend wurde der rechte Vorhof des Herzens geöffnet, um venöses Blut abfließen zu lassen. Dann wurde über die Perfusionsnadel für 5 min eisgekühltes 0,9 % (w/v) NaCl in den Blutkreislauf des Tieres ge-

pumpt, und schließlich ebenfalls für 5 min mit 4 % (w/v) PFA in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, durchströmt.

Im Anschluss wurden die Tiere dekapiert, um die Gehirne zu entnehmen bzw. die Rückenmärker freigelegt und über Nacht bei 4 °C in 4 % (w/v) PFA, gelöst in 0,1 M Phosphat-Puffer, nachfixiert. Das Gewebe wurde für mindestens 48 h bei 4°C in 30 % (w/v) Sucrose/0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelagert, und danach bis zur Erstellung der Gewebeschnitte in Kryoprotekt-Lösung aufbewahrt.

Gewebeschnitte am Schlittenmikrotom. Das Schneiden der perfusionsfixierten Gehirne erfolgte mithilfe eines modifizierten Schlittenmikrotoms. Anstelle des vorgesehenen Kopfes des Mikrotoms wurde ein speziell angefertigter Kupferschlitten eingesetzt, der das Auffrieren der Gehirne erlaubte. Hierzu wurde der Schlitten zunächst mit einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol vorgekühlt, und anschließend eine Schicht Tissue Tek Einbettmedium aufgebracht. Die Gehirne wurden darauf mit einem Tropfen Phosphat-Puffer festgefroren und mit Trockeneis überhäuft, um sie durchzufrieren. Danach wurden sagittale Gehirnschnitte von 40 µm Dicke erstellt und bis zur Immunfärbung in Kryoprotekt-Lösung bei -20°C gelagert. Jeder sechste Schnitt (240 µm Intervall) der am Schlittenmikrotom erstellten Gehirnschnitte der linken Hemisphäre wurde pro Tier einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen.

Schneiden im Kryostaten. Zervikale Rückenmarksschnitte (sagittal) von 35 µm Dicke wurden im Kryostaten erstellt. Die Schnitte wurden bis zur immunhistochemischen Untersuchung in 25 % Glycerin und 25 % Ethylenglykol in 0,1 M Natriumphosphat-Lösung bei 4°C aufbewahrt. Jeder 7. Schnitt wurde zur Durchführung einer Nissl-Färbung gesammelt, um den Schnitt, der die Einstichstelle der Injektionsnadel bei der Transplantation zeigte, zu bestimmen. Ausgehend von diesem Schnitt wurden die Schnitte der benachbarten Wells, welche folglich die meisten transplantierten Zellen enthielten, für weitere immunhistochemische Untersuchungen ausgewählt.

2.2.13.iv. Immunhistochemische Untersuchung von Gewebe

Immunfärbungen. Färbung wie Waschschrifte erfolgten unter ständigem Schütteln in Zellkulturschalen; Netzeinsätze ermöglichen das Umsetzen zwischen den verschiedenen Lösungen. Freischwimmende Gewebeschnitte wurden zunächst 3 x 5 min in TBS gewaschen und für 30 min in 0,6 % H₂O₂/TBS inkubiert, um die endogene Peroxidase zu hemmen und dadurch unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Danach wurden die Schnitte wiederum 3

Waschschritten à 5 min in TBS unterzogen. Als Nächstes musste das Gewebe durch DNA-Denaturierung vorbehandelt werden, sodass in die DNA eingebautes BrdU für Antikörper zugänglich wurde. Hierfür wurden die Schnitte bei 65°C für 2 h in einer Lösung aus 50 % (v/v) Formamid/2xSSC (0,3 M NaCl, 30 mM Citrat-Puffer, pH 7.0) inkubiert, danach 5 min in 2xSSC gewaschen, und anschließend bei 37°C für 30 min in 2 M HCl inkubiert. Schließlich wurde ein weiterer Waschschritt in 0,1 M Borat-Puffer, pH 8.5, für 10 min bei R.T. durchgeführt. Nach 4 Waschschritten für 5 min in TBS wurden die Schnitte für 2 h in FSG-Puffer mit 0,1 % Triton-X100 blockiert. Im Anschluss wurden sie über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern in FSG-Puffer mit 0,1 % Triton-X100 gefärbt.

Primärantikörper	Zelltyp	Hersteller	Verdünnung
Maus anti-PCNA	proliferierende Zellen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:500
Ratte anti-BrdU	proliferierende Zellen	AbDSerotec, United Kingdom	1:500

Tabelle 12: Die verwendeten, primären Antikörper mit der Angabe des Zelltyps, der detektiert wird, des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung.

Am nächsten Tag wurde die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen und anschließend zur chromogenen oder epifluoreszenten Immundetektion mit spezifischen Sekundärantikörpern inkubiert.

Chromogene Immundetektion. Zur chromogenen Immundetektion mittels 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) wurden die Schnitte im Anschluss für 1h mit biotin-konjugierten, spezies-spezifischen Sekundärantikörpern in FSG-Puffer mit 0,1 % Triton-X100 gefärbt.

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Biotin-konjugierter Esel anti-Maus	Dianova, Hamburg	1:500
Biotin-konjugierter Esel anti-Ratte	Dianova, Hamburg	1:500

Tabelle 13: Die verwendeten, sekundären Antikörper mit der Angabe des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung.

Nachdem die Schnitte wiederum 3-mal für 5 min in TBS gewaschen worden waren, wurden sie für 1h in Avidin-Biotin-Peroxidase-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit) inkubiert und dreimal 5 min in TBS gewaschen. Die Peroxidase-Aktivität der Immun-Komplexe wurde unter Verwendung einer Lösung aus 0,25 mg/ml DAB, 0,01 % (v/v) H₂O₂ und 0,04 % (w/v) NiCl₂ in TBS im Verlauf von 5-10 min sichtbar gemacht. Nach weiteren 4 Waschschritten mit Wasser wurden die Schnitte auf gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und mithilfe von Neo-Mount eingedeckt.

Immundetektion mittels Epifluoreszenz. Gefolgt auf die drei Waschschritte, wurde im Fall epifluoreszenter Immunfärbungen für 2 h bei R.T. mit dem spezies-spezifischen, fluoro-chrom-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert.

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor 488®-konjugierter Esel anti-Maus	Molecular Probes, USA	1:1000
Rhodamine Red™-X-konjugierter Esel anti-Ratte	Dianova, Hamburg	1:1000

Tabelle 14: Die verwendeten, sekundären Antikörper mit der Angabe des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung.

Nachdem die Schnitte ein letztes Mal in TBS gewaschen worden waren, wurden sie auf Objektträger aufgezogen und mit Prolong Gold antifade reagent eingedeckelt.

2.2.13.v. Quantitative Auswertung der Immunfärbungen an Geweben

Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen (DAB-Färbung) im GD des HC. Zur Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen in sagittalen Gehirnschnitten wurde jeder sechste Schnitt (Intervall 240 µm) der linken Gehirn-Hemisphäre pro Tier herangezogen. Mithilfe einer gekühlten CCD-Videokamera wurde ein Bild der Färbung aufgenommen, auf einen Computer übertragen und mittels eines halbautomatischen Stereologie-Systems mit dem Analyse-Programm „Stereoinvestigator“ ausgewertet. Dieses Programm ermöglicht die Volumen- und Zelldichtebestimmung von Gehirnstrukturen. Das Referenz-Volumen des GD wurde für jeden Schnitt aus der Fläche der Granulärzellenschicht, die mithilfe eines Zählrahmens automatisch ermittelt wurde, multipliziert mit der Schnittdicke (40 µm) errechnet. Um die Zellproliferation im GD zu erfassen, wurde die Anzahl der PCNA-positiven Zellen innerhalb des Zählrahmens in einer 40 x Vergrößerung bestimmt. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl der PCNA-positiven Zellen bzw. des Gesamtvolumens des GD wurde eine Hochrechnung durchgeführt, indem die ermittelten Zellzahlen bzw. Volumina der einzelnen Schnitte jeweils addiert und mit 6 multipliziert wurden. Daraus konnte die Dichte der PCNA-positiven Zellen im gesamten GD berechnet werden. Alle Endergebnisse beziehen sich auf eine Gehirn-Hemisphäre und müssen zur Bestimmung der Gesamtzahl je Gehirn verdoppelt werden.

Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen (DAB-Färbung) im Rückenmark. Um das Überleben der transplantierten aNSZ abzuschätzen, wurden die BrdU-markierten Zellen in den beiden Schnitten, die die meisten transplantierten Zellen enthielten, mithilfe eines Leica DMR Mikroskops mit SPOT Dokumentationssystem ausgezählt. Die Schnitte wurden dabei so ausgewählt, dass sie mindestens einen Abstand von 70 µm zueinander aufwiesen, um sicherzustellen, dass kein Zellkern doppelt erfasst wurde.

Die auszuzählende Fläche wurde unter Nutzung eines 5 x Objektivs durch ein Rechteck mit definierter Größe festgelegt. Die Größe des Rechtecks (16 cm x 10,5 cm, entsprechend einer Fläche von 124960 µm²) wurde so gewählt, dass die Mehrheit der BrdU-markierten Zellen aus allen Gruppen (0,2 µM BrdU; 1,0 µM BrdU; 2,5 µM BrdU) eingeschlossen war. Zur

Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen je Schnitt wurde das Rechteck jeweils an der Injektionsstelle über die transplantierten Zellen positioniert und die BrdU-positiven Zellen wurden in je 20 zufällig gewählten Quadranten ($50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) unter Benutzung eines $20 \times$ Objektivs ausgezählt. Daraus wurde jeweils die Zahl der BrdU-positiven Zellen im gesamten Rechteck (Fläche: $124960 \mu\text{m}^2$) für jeden Schnitt kalkuliert. Als Erstes wurde hierzu die tatsächlich ausgezählte Fläche pro Schnitt folgendermaßen berechnet:

Fläche des ausgezählten Quadrats x Anzahl der ausgezählten Quadrate:

$$50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 20 = 50000 \mu\text{m}^2.$$

Dann wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen, die in $50000 \mu\text{m}^2$ gezählt wurden, auf die Zahl BrdU-positiver Zellen im gesamten Rechteck (Fläche: $124960 \mu\text{m}^2$) extrapoliert:

gesamte auszuzählende Fläche ($124960 \mu\text{m}^2$) / tatsächlich ausgezählte Fläche ($50000 \mu\text{m}^2$) x gezählte Zellzahl = Zahl BrdU-positiver Zellen im gesamten Rechteck

Zuletzt wurde aus den beiden analysierten Schnitten eines Tieres der Mittelwert berechnet.

Quantifizierung der BrdU/PCNA-positiven Zellen (Fluoreszenz-Färbung) im Rückenmark. Um das Ausmaß der Proliferation der transplantierten, BrdU-markierten Zellen im Rückenmark zu beurteilen, wurde ein Schnitt je Tier am konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die Anteile BrdU/PCNA-doppelt-positiver Zellen wurden mittels der Analyse von 30-35 optischen Schnitten durch die Z-Achse eines $35 \mu\text{m}$ dicken, sagittalen Schnitts bei $400 \times$ Vergrößerung bestimmt. Die Kolokalisation galt als bestätigt, sobald der Proliferationsmarker PCNA in mehreren aufeinanderfolgenden optischen Schnitten räumlich mit der BrdU-Kernfärbung zur Deckung kam.

2.2.14. Statistische Auswertung

Für alle Untersuchungen wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die Daten sind als Durchschnittswerte mit ihren zugehörigen Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 5 Software ausgeführt. Hierbei wurden Unterschiede mit $p < 0.05$ als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnis I: Der Einfluss von TGF-beta1 auf eine bereits etablierte aNSZ-Kultur ($P \geq 2$)

3.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ

3.1.1. Vergleich der globalen mRNA-Expressionsprofile anhand der kollektiven Auswertung zweier unabhängig durchgeföhrter Experimente

In früheren Studien aus unserer Arbeitsgruppe wurde das Genexpressionsprofil TGF-beta1-behandelter aNSZ im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen mittels Microarray-Technologie untersucht. Dazu wurde total-RNA aus TGF-beta1- und kontroll-behandelten Zellen eingesetzt, die im Verlauf einer 8-tägigen Kultivierung dreimal (Tag 1, 4, 7) mit 10 ng/ml TGF-beta1 bzw. entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) stimuliert worden waren. Die Expressionsprofile wurden unter Verwendung von Affymetrix Rat Expression 230A Array Genchips analysiert. Um die Regulation der Genexpression dieser ersten Studie zu vervollständigen und zu verifizieren, verglichen wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit deren Genexpressionsprofile mit denen eines weiteren Experiments unter Anwendung von Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrays. Bei diesem Modell handelt es sich um ein neuere Generation des Affymetrix Rat Expression 230A Array Genchips. Neben einer Vielzahl weiterer Proben-DNAs, sind darauf alle auf dem Rat Expression 230A Array repräsentierten Proben-DNAs inkludiert.

3.1.2. Kollektive biostatistische Auswertung der DNA-Microarray-Analysen

3.1.2.i. Korrelation der Microarray-Experimente

Um die Qualität der Korrelation der Microarray-Experimente zu überprüfen, wurden die Signal Log Ratios (vgl. 2.2.6.i.) aus Experiment 1 und Experiment 2 mit dem Statistikprogramm „R“ gegeneinander aufgetragen. Die Korrelation zwischen beiden Datensätzen ist in Abbildung 8 als Scatter-Plot dargestellt. Durch die Datenpunkte wurde eine lineare Regressionsgerade gelegt, aus der sich ein Korrelationskoeffizient von 0,81 berechnen ließ. Das Ergebnis dieser Auftragung zeigt somit eine enge Korrelation beider Experimente, d. h., der überwiegende Anteil an Genen mit verminderter Expression in Experiment 1 nach TGF-beta1-Behandlung zeigt ebenso eine verringerte Expression in Experiment 2 (Quadrant links unten). Dementsprechend sind die in Experiment 1 erhöhten Expressionen bestimmter Gene

auch in Experiment 2 reproduzierbar (Quadrant rechts oben), während nur ein relativ geringer Anteil von Genen eine differentielle Regulation in beiden Experimenten aufweist (Quadrant links oben und rechts unten).

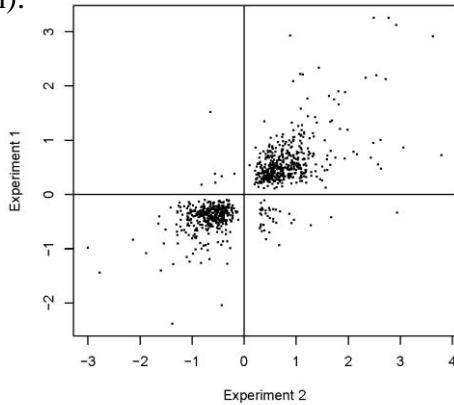


Abbildung 8: Die Auftragung der Signal Log Ratios (SLRs) im Scatter-Plot zeigt eine enge Korrelation zwischen Experiment 1 und 2. aNSZ wurden im Verlauf einer 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) stimuliert. Danach wurde eine DNA-Array-Analyse durchgeführt. Die SLRs, welche die Veränderung der Expression in TGF-beta1-behandelten Zellen verglichen mit der Kontrolle repräsentieren, wurden mit der GCOS/MAS 5.0 Software berechnet. Ein SLR von +1 bedeutet eine zweifache Erhöhung des Transkript-levels, wohingegen ein SLR von -1 auf eine zweifache Erniedrigung schließen lässt.

3.1.2.ii. Biostatistische Auswertung zur Analyse der differentiellen Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung

Die Ergebnisse von Microarray-Analysen spiegeln eine Vielzahl von simultan ablaufenden biologischen Prozessen wider, wobei nur ein Teil der auftretenden Expressionsänderungen direkt durch die jeweiligen experimentellen Bedingungen (z. B. TGF-beta1-Behandlung) verursacht wird. Eine Hauptaufgabe der detaillierten Analyse von Microarray-Daten besteht deshalb darin, Gene zu identifizieren, deren Expression sich bedingt durch die experimentellen Gegebenheiten ändert und sie in der Folge eindeutig von Effekten biologischer Ungleichheit oder allgemeiner Stressantwort der Zelle zu unterscheiden. Um mRNA mit statistisch signifikant veränderten Expressionsleveln zu identifizieren und sich auf aussagekräftige Regulationereignisse zu beschränken, wurden für die biostatistische Auswertung nur Transkripte mit folgenden Eigenschaften berücksichtigt:

- 1) Die Transkripte mussten in mindestens einem der vier Arrays als „present“ ($p_{\text{Detection}} < 0.04$) detektiert werden.
- 2) Weiterhin mussten sie eine differentielle Expression für TGF-beta1- und kontroll-behandelte Zellen aufweisen und die daraus resultierenden Change Calls beider Experimente mussten in die gleiche Richtung zeigen. Folglich wurde ein unterschiedlich exprimierte Gen dann ausgewählt, wenn sein korrespondierender Change Call im Fall der Hochregulierung „in-

crease” (p_{Change} nahe 0) in beiden Experimenten oder „increase“ und „marginal increase“ oder im Fall der Erniedrigung „decrease“ (p_{Change} nahe 1) in beiden Experimenten oder „decrease“ und „marginal decrease“ zeigte.

3) Gene, welche einen „no change“ (p_{Change} nahe 0,5) Change Call aufwiesen, wurden hingegen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Analyse der Expressionsprofile nach diesen Kriterien belegte eine in beiden Experimenten übereinstimmende, signifikante Regulierung im Fall von 872 Proben-DNAs (448 mit erhöhter Expression, 424 mit erniedriger Expression) nach TGF-beta1-Behandlung. Es zeigte sich, dass entsprechend 619 Gene eine kongruente Regulierung aufwiesen, wovon die Mehrzahl der Gene (335; 54,1 % aller signifikant regulierten Gene) eine reduzierte Expression erkennen ließen wie zum Beispiel der Transforming Growth Factor Receptor II (TGFRII), der Stammzellmarker Nestin (Nes), der Oligodendrozytenmarker Myelin basic protein (Mbp), die Mitogen activated protein kinase 3 (Mapk3) sowie der Zellzyklusinhibitor Cyclin-dependent kinase inhibitor 1c (Cdkn1c). Der Übersichtlichkeit halber sind in der Folge nur die 100 Gene gezeigt, deren Expression nach TGF-beta1-Behandlung am stärksten verringert war (Tabelle 15). Für die vergleichende Analyse der Expressionswerte (TGF-beta1 versus Kontrolle) wurden die Fold change Werte jedes Experiments gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Fold change} = (-1) * 2^{\text{Signal Log Ratio}} \text{ für Signal Log Ratio} < 0.$$

Name des Gens	Gensymbol	Fold change (TGF-beta1 versus Kontrolle)		
		Experiment 1	Experiment 2	Mittelwert
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	Serpinb7	-2,83	-6,50	-4,66
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	Id3	-5,28	-2,46	-3,87
myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	Myc	-2,14	-3,73	-2,94
selenoprotein P, plasma, 1	Sepp1	-1,74	-4,29	-3,01
prostaglandin D2 synthase	Ptgds	-4,29	-1,41	-2,85
CD44 antigen	Cd44	-2,30	-2,64	-2,47
asparagine synthetase	Asns	-1,87	-2,83	-2,35
G protein-coupled receptor 37	Gpr37	-2,46	-1,74	-2,10
similar to RIKEN cDNA 1810029B16 (predicted)	RGD1305222_predicted	-1,41	-3,03	-2,22
similar to RIKEN cDNA 2310075C12 (predicted)	RGD1305625_predicted	-2,00	-2,00	-2,00
eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Eif4ebp1	-1,74	-2,30	-2,02
nucleoporin 107	Nup107	-1,32	-3,03	-2,18
Transforming growth factor, beta receptor II	Tgfb2	-2,00	-1,87	-1,93
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	Cdkn1c	-2,00	-1,87	-1,93
serine hydroxymethyl transferase 2 (mitochondrial) (predicted)	Shmt2_predicted	-1,62	-2,30	-1,96
Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Nr2f2	-2,00	-1,74	-1,87
similar to tetraspanin similar to TM4SF9 (predicted)	RGD1305714_predicted	-1,74	-2,00	-1,87
Similar to RIKEN cDNA 1300002C08 gene (predicted)	---	-1,74	-2,00	-1,87
processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae) (predicted)	Pop1_predicted	-1,74	-2,00	-1,87
similar to FLI-LRR associated protein-1	LOC367314	-1,74	-2,00	-1,87
serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble) (predicted)	Shmt1_predicted	-1,62	-2,14	-1,88

nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	Nolc1	-1,52	-2,30	-1,91
similar to Putative methyltransferase HUSSY-03 (Williams-Beuren syndrome chromosome region 22 protein homolog) /// similar to Putative methyltransferase HUSSY-03 (Williams-Beuren syndrome chromosome region 22 protein homolog)	LOC360830 /// LOC368084	-1,52	-2,30	-1,91
plasticity-related protein PRG-2	RGD:727823	-2,14	-1,52	-1,83
actin related protein 2/3 complex, subunit 1B	Arpc1b	-1,87	-1,74	-1,80
Suppressor of cytokine signaling 2	Socs2	-1,87	-1,74	-1,80
glutamate oxaloacetate transaminase 1	Got1	-1,74	-1,87	-1,80
similar to RIKEN cDNA D430044G18 (predicted)	RGD1309038_predicted	-2,00	-1,62	-1,81
phosphoserine aminotransferase 1	Psat1	-1,62	-2,00	-1,81
myosin IG (predicted)	MyoIg_predicted	-1,41	-2,30	-1,86
inosine 5-monophosphate dehydrogenase 2	Impdh2	-1,41	-2,30	-1,86
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Slc7a1	-1,62	-1,87	-1,75
3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	-1,62	-1,87	-1,75
spermidine/spermine N1-acetyl transferase	Sat	-1,62	-1,87	-1,75
nestin	Nes	-1,41	-2,14	-1,78
Similar to RIKEN cDNA 2010309E21 (predicted)	---	-1,41	-2,14	-1,78
similar to hypothetical protein FLJ12442 (predicted)	RGD1305524_predicted	-1,32	-2,30	-1,81
similar to A230072I16Rik protein (predicted)	RGD1306819_predicted	-1,23	-2,46	-1,85
replication factor C (activator 1) 4 (predicted)	Rfc4_predicted	-1,15	-2,64	-1,89
myelin basic protein	Mbp	-2,30	-1,23	-1,76
tropomyosin 3, gamma /// tropomyosin isoform 6	Tpm3 /// RGD:708368	-1,52	-1,87	-1,69
similar to methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD) (EC 1.5.1.15) / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (EC 3.5.4.9) precursor - mouse	LOC313410	-1,41	-2,00	-1,71
similar to RIKEN cDNA 6720458F09 gene	MGC94251	-1,41	-2,00	-1,71
similar to nucleolar protein family A, member 1	LOC499709	-1,41	-2,00	-1,71
Cell division cycle associated 7 (predicted)	---	-1,32	-2,14	-1,73
kinesin family member 20A (predicted)	Kif20a_predicted	-1,32	-2,14	-1,73
Fibrillarin (predicted)	---	-1,23	-2,30	-1,76
spermidine synthase	Srm	-1,23	-2,14	-1,69
Origin recognition complex, subunit 6-like (<i>S. cerevisiae</i>) (predicted)	---	-1,23	-2,14	-1,69
similar to RIKEN cDNA 1810014L12 (predicted)	RGD1307423_predicted	-1,23	-2,14	-1,69
aldehyde dehydrogenase 2	Aldh2	-1,87	-1,41	-1,64
nidogen 2 (predicted)	Nid2_predicted	-1,87	-1,41	-1,64
FtsJ homolog 3 (<i>E. coli</i>) (predicted)	Ftsj3_predicted	-1,52	-1,74	-1,63
isoleucine-tRNA synthetase (predicted)	Iars_predicted	-1,52	-1,74	-1,63
matrix metalloproteinase 11	Mmp11	-1,41	-1,87	-1,64
Unknown function	Bing4	-1,41	-1,87	-1,64
S-adenosylhomocysteine hydrolase	Ahcy	-1,32	-2,00	-1,66
macrophage migration inhibitory factor	Mif	-1,32	-2,00	-1,66
translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a (yeast)	Timm8a	-1,32	-2,00	-1,66
similar to hypothetical brain protein similar to X96994 BR-1 protein (<i>Helix pomatia</i>)	MGC95260	-1,32	-2,00	-1,66
polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit (predicted)	Pold2_predicted	-1,32	-2,00	-1,66
RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (predicted)	---	-1,32	-2,00	-1,66
similar to ribosomal protein P0-like protein; 60S acidic ribosomal protein PO; ribosomal protein, large, P0-like (predicted)	RGD1311709_predicted	-1,32	-2,00	-1,66
Ribosomal protein, mitochondrial, L12	---	-1,32	-2,00	-1,66
Stromal cell-derived factor 2-like 1 (predicted)	---	-1,15	-2,30	-1,72
similar to RIKEN cDNA 2610029G23	LOC363485	-1,15	-2,30	-1,72
mitogen activated protein kinase 3	Mapk3	-1,87	-1,32	-1,59
hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Hprt	-1,41	-1,74	-1,58
adenosine kinase	Adk	-1,41	-1,74	-1,58
guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	Gnl3	-1,41	-1,74	-1,58
NMDA receptor-regulated gene 1 (predicted)	Narg1_predicted	-1,41	-1,74	-1,58
complement component 1, q subcomponent binding protein	C1qbp	-1,32	-1,87	-1,59
AKT1 substrate 1 (proline-rich) (predicted)	Akt1s1_predicted	-1,32	-1,87	-1,59
nudix-type motif 5	Nudt5	-1,32	-1,87	-1,59
minichromosome maintenance protein 7	RGD:1303018	-1,23	-2,00	-1,62

Ly1 antibody reactive clone (predicted)	Lyar_predicted	-1,23	-2,00	-1,62
Similar to RIKEN cDNA 2810037C03 (predicted)	---	-1,23	-2,00	-1,62
Eukaryotic translation initiation factor 1A (predicted)	LOC317163	-1,23	-2,00	-1,62
similar to hypothetical protein FLJ10156 (predicted)	RGD1308747_predicted	-1,23	-2,00	-1,62
Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (predicted)	---	-1,23	-2,00	-1,62
similar to spermine synthase	LOC363469	-1,23	-2,00	-1,62
ribosomal protein s25	Rps25	-1,15	-2,14	-1,65
FK506 binding protein 3 (predicted)	Fkbp3_predicted	-1,15	-2,14	-1,65
similar to prefoldin 4	LOC364186	-1,15	-2,14	-1,65
Chimerin (chimaerin) 2	Chn2	-1,62	-1,52	-1,57
glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (predicted)	Eprs_predicted	-1,62	-1,52	-1,57
N-methylpurine-DNA glycosylase	Mpg	-1,52	-1,62	-1,57
apoptosis antagonizing transcription factor	Aatf	-1,52	-1,62	-1,57
threonyl-tRNA synthetase	Tars	-1,52	-1,62	-1,57
ornithine decarboxylase 1	Odc1	-1,32	-1,74	-1,53
cyclin G1	Ccng1	-1,32	-1,74	-1,53
solute carrier family 38, member 2	Slc38a2	-1,32	-1,74	-1,53
PDZ and LIM domain 1 (elfin)	Pdlim1	-1,32	-1,74	-1,53
farnesyl diphosphate synthase	Fdps	-1,32	-1,74	-1,53
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	Dnajc2	-1,32	-1,74	-1,53
lamin B1	Lmnb1	-1,32	-1,74	-1,53
tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein	Trap1	-1,32	-1,74	-1,53
RuvB-like 2 (E. coli) (predicted)	Ruvbl2_predicted	-1,32	-1,74	-1,53
WD repeat domain 3 (predicted)	Wdr3_predicted	-1,32	-1,74	-1,53
pyrrole-5-carboxylate synthetase (glutamate gamma-semialdehyde synthetase) (predicted)	Pycs_predicted	-1,32	-1,74	-1,53

Tabelle 15: In Experiment 1 und 2 kongruent herabregulierte Gene. Es sind die 100 der insgesamt 335 Gene gezeigt, deren Expression nach TGF-beta1-Behandlung am stärksten verringert war. aNSZ wurden während der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt. Danach erfolgte eine DNA-Array-Analyse.

Die übrigen 284 Gene (45,9 % aller signifikant regulierten Gene), darunter Achaete-scute complex homolog-like 1 (Ascl1), Delta-like 1 (Dll1), Platelet derived growth factor receptor alpha (Pdgfra), Jagged 1 (Jag1), Cyclin D2 (Ccnd2), Quiescin Q6 (Qscn 6), Bone morphogenetic protein receptor 1A (Bmpr1a), Fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1) und Doublecortin (Dcx), wiesen in beiden Experimenten eine vermehrte Expression nach TGF-beta1-Behandlung auf. Der Übersichtlichkeit halber sind in der Folge auch hier nur die 100 Gene gezeigt, deren Expression nach TGF-beta1-Behandlung am stärksten erhöht war (Tabelle 16). Für die vergleichende Analyse der Expressionswerte wurden die Fold change Werte (TGF-beta1 versus Kontrolle) jedes Experiments gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Fold change} = 2^{\text{Signal Log Ratio}} \text{ für Signal Log Ratio} \geq 0.$$

Name des Gens	Gensymbol	Fold change (TGF-beta1 versus Kontrolle)		
		Experiment 1	Experiment 2	Mittelwert
transmembrane, prostate androgen induced RNA (predicted)	Tmepai_predicted	9,19	7,46	8,33
biglycan	Bgn	9,19	6,96	8,08
similar to chromosome 20 open reading frame 58 (predicted)	RGD1305809_predicted	4,59	6,96	5,78
similar to RIKEN cDNA 1810057C19	MGC108778	4,59	5,66	5,13
delta-like 1 (Drosophila)	Dll1	1,87	8,57	5,22
N-myc downstream regulated gene 2	Ndrg2	3,73	3,73	3,73
similar to RIKEN cDNA D330045A20	LOC315911	3,73	3,73	3,73
similar to hypothetical protein FLJ30973	LOC363091	8,00	1,74	4,87

Ng23 protein /// similar to Ng23 protein	Ng23 /// LOC499403	2,14	6,06	4,10
crystallin, alpha B	Cryab	4,92	2,64	3,78
prostaglandin F2 receptor negative regulator	Ptgfrn	3,48	3,48	3,48
similar to SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1 (predicted)	RGD1309319_predicted	3,48	3,25	3,37
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5	Ptpn5	3,03	3,48	3,26
crystallin, lamda 1	Cryl1	2,00	5,28	3,64
tenascin R	Tnr	1,52	5,66	3,59
calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	Camk1g	2,14	4,00	3,07
cAMP responsive element binding protein-like 2 (predicted)	Crebl2_predicted	1,32	6,06	3,69
quiescin Q6	Qscn6	1,41	5,66	3,54
Endothelial PAS domain protein 1	Epas1	2,64	3,03	2,84
Dipeptidylpeptidase 6	Dpp6	2,46	3,03	2,75
neurexin 1	Nrxn1	1,62	4,29	2,96
cyclin D2	Ccnd2	2,83	2,46	2,65
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	Atp1b2	1,62	4,00	2,81
similar to RIKEN cDNA 6330512M04 gene	LOC293632	3,03	2,14	2,59
septin 8 (predicted)	Sept8_predicted	2,00	3,03	2,52
immediate early response 3	RGD:1303321	2,64	2,30	2,47
Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	Cacng4	1,87	3,03	2,45
jagged 1	Jag1	2,14	2,64	2,39
weetey homolog 1 (Drosophila) (predicted)	Tthy1_predicted	1,62	3,25	2,44
cytosolic cysteine dioxygenase 1	Cdo1	2,64	2,00	2,32
chondroitin sulfate proteoglycan 5	Cspg5	1,52	3,25	2,38
chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	1,62	3,03	2,33
procollagen, type IX, alpha 1 (predicted)	Col9a1_predicted	2,00	2,46	2,23
Ca<2+-dependent activator protein for secretion	Cadps	2,14	2,30	2,22
sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide	Scn1b	2,30	2,14	2,22
Purkinje cell protein 4	Pcp4	1,87	2,46	2,16
C1q and tumor necrosis factor related protein 5 (predicted)	C1qtnf5_predicted	2,00	2,30	2,15
Calsenilin, presenilin binding protein, EF hand transcription factor	Csen	2,14	2,14	2,14
Fas apoptotic inhibitory molecule 2	Faim2	2,14	2,14	2,14
amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 homolog (human)	Als2cr3	1,41	3,03	2,22
ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide	Atp1a2	2,00	2,14	2,07
Syndecan 3	Sdc3	2,00	2,14	2,07
Similar to rap2 interacting protein x	---	1,62	2,64	2,13
abl-interactor 1	Abi1	1,32	3,03	2,18
nuclear factor I/X	Nfix	1,52	2,64	2,08
Beta-2 microglobulin	B2m	1,74	2,30	2,02
protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	Ptprn	2,00	2,00	2,00
dedicator of cytokinesis 9	Dock9	2,14	1,87	2,00
Kazal-type serine protease inhibitor domain 1 (predicted)	Kazald1_predicted	2,14	1,87	2,00
Similar to RIKEN cDNA 1810054O13 (predicted)	---	2,14	1,87	2,00
synaptosomal-associated protein 25	Snap25	1,74	2,14	1,94
Monoglyceride lipase	Mgll	1,74	2,14	1,94
peptidyl arginine deiminase, type II	Padi2	2,14	1,74	1,94
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	1,62	2,30	1,96
low density lipoprotein receptor-related protein 1 (predicted)	Lrp1_predicted	1,62	2,30	1,96
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	Abcg1	1,87	2,00	1,93
low density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	1,41	2,46	1,94
syndecan 2	Sdc2	1,62	2,14	1,88
G0/G1 switch gene 2 (predicted)	G0s2_predicted	1,74	2,00	1,87
neurexophilin 1	Nxph1	1,87	1,87	1,87
Down syndrome cell adhesion molecule	Dscam	1,87	1,87	1,87
amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)	Accn1	1,52	2,30	1,91
RGD:735085 hypothetical protein	LOC362246	1,52	2,30	1,91
similar to Ras-related protein Rab-27B	LOC363410	2,64	1,32	1,98
low density lipoprotein receptor-related protein 6 (predicted)	Lrp6_predicted	1,32	2,46	1,89

glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	Grik4	1,87	1,74	1,80
RAB14, member RAS oncogene family	Rab14	1,15	2,83	1,99
Similar to RIKEN cDNA 5330414D10 (predicted)	---	1,15	2,83	1,99
glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	Gria3	1,23	2,64	1,94
Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	Bmpr1a	1,23	2,64	1,94
tyrosine kinase, non-receptor, 2 (predicted)	Tnk2_predicted	1,41	2,30	1,86
synaptogyrin 3 (predicted)	Syngr3_predicted	1,62	2,00	1,81
glutathione S-transferase, mu 1	Gstm1	1,41	2,14	1,78
glutamate receptor, ionotropic, 4	Gria4	1,41	2,14	1,78
tropomodulin 2	Tmod2	1,41	2,14	1,78
SH3-domain binding protein 4	Sh3bp4	1,41	2,14	1,78
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	1,41	2,14	1,78
phospholipase C-like 1	Plcl1	1,62	1,87	1,75
syntaxin 1B2	Stx1b2	1,74	1,74	1,74
contactin 6	Cntn6	1,74	1,74	1,74
transmembrane 4 superfamily member 11	Tm4sf11	1,74	1,74	1,74
nasal embryonic LHRH factor	Nelf	1,74	1,74	1,74
zinc finger and BTB domain containing 4 (predicted)	Zbtb4_predicted	1,74	1,74	1,74
similar to maestro	LOC361348	1,74	1,74	1,74
Pyroglutamyl-peptidase I	Pgpep1	1,87	1,62	1,75
diacylglycerol kinase, beta	Dgkb	2,00	1,52	1,76
neurotrimin /// hypothetical gene supported by NM_017354	Hnt /// LOC360435	1,23	2,30	1,76
neuronal growth regulator 1	Negr1	1,23	2,30	1,76
ER transmembrane protein Dri 42	Ppap2b	1,23	2,30	1,76
potassium voltage gated channel, Shal-related family, member 3	Kcnd3	1,32	2,14	1,73
TSPY-like 4 (predicted)	Tspyl4_predicted	1,32	2,14	1,73
aldolase C, fructose-biphosphate	Aldoc	1,41	2,00	1,71
achaete-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	Ascl1	1,41	2,00	1,71
similar to RIKEN cDNA 0610030G03	LOC287472	1,41	2,00	1,71
leucine rich repeat neuronal 6A (predicted)	Lrrn6a_predicted	1,41	2,00	1,71
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	Atp1b1	1,52	1,87	1,69
erythrocyte protein band 4.1-like 1	Epb4.1ii1	1,52	1,87	1,69
discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1	Dlgap1	1,52	1,87	1,69
Olf-1/EBF associated Zn finger protein Roaz	RGD:621664	1,52	1,87	1,69
doublecortin	Dcx	1,23	2,14	1,69

Tabelle 16: In Experiment 1 und 2 kongruent hochregulierte Gene. Es sind die 100 der insgesamt 284 Gene gezeigt, deren Expression nach TGF-beta1-Behandlung am stärksten erhöht war. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 oder HCl/BSA kultiviert. Im Anschluss erfolgte die DNA-Array-Analyse.

3.1.3. Funktionelle Zuordnung der durch TGF-beta1 regulierten Gene nach GO-Klassifikation

Zur detaillierteren Analyse wurden die Microarray-Daten der 619 nach TGF-beta1-Behandlung signifikant regulierten Gene im nächsten Schritt einer funktionellen Analyse durch die GeneRanker Software (Genomatix, Germany) unterzogen. Hierbei handelt es sich um ein Programm, welches unter Anwendung von Gen-Annotationsdaten aus der Literatur ("literature mining") und aus Datenbanken die Identifizierung besonders betroffener Kategorien von Genen bei den gegebenen Versuchsbedingungen erlaubt. Dazu werden die signifikant regulierten Transkripte des Arrays auf im GeneRanker enthaltene Gene abgebildet und biologisch relevanten Gruppen zugeordnet. Der GeneRanker berücksichtigt dabei alle Annotationen, unabhängig von Co-Zitaten (vgl. Kap. 3.1.5.), und bietet zudem die Möglichkeit, aus verschie-

denen Annotationsdatensätzen zur Analyse auszuwählen. Neben einigen weiteren (MeSH Disease, usw.) stehen auch die Genannotationen des Gene Ontology Consortiums (GO Molecular Function, GO Cellular Component, GO Biological Process) zur Verfügung. In unseren Analysen beschränkten wir uns auf die Zuordnung zu GO-Kategorien im Rahmen der Identifizierung biologischer Funktionen (GO Biological Process). Zur Ermittlung über- und unterrepräsentierter GO-Terme innerhalb der regulierten Gene wurde von der GeneRanker Software für jeden Term ein z-score kalkuliert. Die Abbildung der Microarraydaten auf nach GO klassifizierte, biologische Prozesse zeigte u.a. eine besonders gehäufte differentielle Expression in den Kategorien der Zellproliferation, des Zellwachstums, der Regulation des Zellzyklus und der Neuron Reifung ($z>1,96$; $p<0.05$).

Zellproliferation: $z=2.44$; $p=0.015$; fdr=0,035	
Name des Gens	Regulation
7-dehydrocholesterol reductase	↓
achaete-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	↑
acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member B	↓
Basic helix-loop-helix domain containing, class B3	↑
caveolin	↑
cellular nucleic acid binding protein 1	↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
Disabled homolog 2 (Drosophila)	↑
Discs, large homolog 3 (Drosophila)	↑
endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5	↑
Fibroblast growth factor receptor 1	↑
fibroblast growth factor receptor-like 1	↑
guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	↑
guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	↓
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	↑
hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	↓
immediate early response 3	↑
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	↓
inosine 5-monophosphate dehydrogenase 2	↓
jagged 1	↑
macrophage migration inhibitory factor	↓
minichromosome maintenance protein 7	↓
myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	↓
nucleophosmin 1 // similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin)	↓
nucleosome assembly protein 1-like 1	↓
phosphatidic acid phosphatase 2a	↓
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	↑
polo-like kinase 1 (Drosophila)	↓
prothymosin alpha	↓
quiescin Q6	↑
tetraspan 2	↑
TGFB inducible early growth response	↑
thioredoxin reductase 1	↓
Transforming growth factor, beta receptor II	↓
tumor protein p53	↓
ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	↓
v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	↑

Zellwachstum: $z=3.01$; $p=0.003$; fdr=0,008	
Name des Gens	Regulation
chondroitin sulfate proteoglycan 5	↑
cyclin E	↓
cyclin G1	↓
Disabled homolog 2 (Drosophila)	↑
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	↓
Fibroblast growth factor receptor 1	↑
nucleolar protein 5	↓
RuvB-like protein 1	↓
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	↓
suppressor of cytokine signaling 2	↓
tumor protein p53	↓
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	↑

Regulation des Zellzyklus: $z=1.98$; $p=0.048$; fdr=0,084	
Name des Gens	Regulation
apoptosis antagonizing transcription factor	↓
cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	↓
chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	↓
cyclin B1	↓
cyclin D2	↑
cyclin E	↓
cyclin G1	↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	↓
Hexokinase 2	↓
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	↓
mitogen activated protein kinase 3	↓
myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	↓
nuclear autoantigenic sperm protein	↓
polo-like kinase 1 (Drosophila)	↓
prothymosin alpha	↓
quiescin Q6	↑
signal transducer and activator of transcription 1	↑
tumor protein p53	↓
von Hippel-Lindau syndrome homolog	↑

Tabelle 17: Übersicht über GO-Kategorien mit besonders gehäufteter, differentieller Genexpression nach 7-tägiger Kultivierung mit TGF-beta1.

Neuron Reifung: z=2.46; p=0.014; fdr=0,033	
Name des Gens	Regulation
agrin	↑
CD9 antigen	↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
myelin basic protein	↓
neuroligin 1	↑
transmembrane 4 superfamily member 11	↑

Um die genauen Mechanismen der Regulation aNSZ nach TGF-beta1-Behandlung besser zu verstehen, wurden die differentiell exprimierten Gene darüber hinaus auch folgenden funktionellen Gruppen ($z<1,96$; $p>0.05$) zugeteilt:

Regulation der Zellproliferation: z=1.72; p=0.085; fdr=0,125	
Name des Gens	Regulation
7-dehydrocholesterol reductase	↓
acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member B	↓
caveolin	↑
cellular nucleic acid binding protein 1	↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
Discs, large homolog 3 (Drosophila)	↑
endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5	↑
Fibroblast growth factor receptor 1	↑
fibroblast growth factor receptor-like 1	↑
guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	↓
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	↑
immediate early response 3	↑
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	↓
jagged 1	↑
macrophage migration inhibitory factor	↓
myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	↓
nucleophosmin 1 // similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38)	↓
nucleosome assembly protein 1-like 1	↓
phosphatidic acid phosphatase 2a	↓
quiescin Q6	↑
TGFB inducible early growth response	↑
Transforming growth factor, beta receptor II	↓
tumor protein p53	↓
v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	↑

Determinierung des Zellschicksals: z=1.42; p=0.157; fdr=0,189	
Name des Gens	Regulation
achaeate-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	↑
delta-like 1 (Drosophila)	↑
jagged 1	↑

Tabelle 18: Übersicht über die erweiterte funktionelle Zuordnung der nach TGF-beta1-Behandlung differentiell exprimierten Gene. Eine Vielzahl der regulierten Gene konnte den Bereichen „Regulation der Zellproliferation“, „Determinierung des Zellschicksals“, „Neuron Differenzierung“ sowie dem Bereich „Neurogenese“ zugeordnet werden. Man beachte hier die erhöhte Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Dcx, bei gleichzeitig erniedrigter Expression von Nes und Mbp.

Tabelle 17 (Fortsetzung): Übersicht über die GO-Kategorien mit besonders gehäufteter, differentieller Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung.

Neuron Differenzierung: z=1.45; p=0.147; fdr=0,185	
Name des Gens	Regulation
achaeate-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	↑
agrin	↑
CD9 antigen	↑
chondroitin sulfate proteoglycan 5	↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
Dihydropyrimidinase-like 3	↑
Eph receptor B1 // similar to Ndr3 protein // similar to N-myc downstream regulated gene 3	↑
Fibroblast growth factor receptor 1	↑
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A	↑
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	↑
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	↓
myelin basic protein	↓
nestin	↓
neurexin 1	↑
neuroligin 1	↑
reticulon 1	↑
suppressor of cytokine signaling 2	↓
transmembrane 4 superfamily member 11	↑
ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	↓

Neurogenese: z=1.61; p=0.108; fdr=0,148	
Name des Gens	Regulation
achaeate-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	↑
agrin	↑
CD9 antigen	↑
chondroitin sulfate proteoglycan 5	↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
Dihydropyrimidinase-like 3	↑
doublecortin	↑
Eph receptor B1 // similar to Ndr3 protein	↑
Fibroblast growth factor receptor 1	↑
glutamate receptor, ionotropic, NMDA 3A	↑
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	↑
Inhibitor of DNA binding 3	↓
myelin basic protein	↓
nestin	↓
neurexin 1	↑
neuroligin 1	↑
Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	↓
reticulon 1	↑
serine proteinase inhibitor, clade E, member 2	↑
suppressor of cytokine signaling 2	↓
transmembrane 4 superfamily member 11	↑
ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	↓

3.1.3.i. Regulation von Genen aus dem Bereich der Zellproliferation, des Zellzyklus und des Zellwachstums

Entsprechend den bereits bekannten anti-proliferativen Eigenschaften von TGF-beta1 wurde ein beträchtlicher Anteil der nach TGF-beta1-Behandlung differentiell exprimierten Gene dem wesentlichen Bereich der „Zellproliferation“ zugeordnet (Tabelle 17). So fand sich beispielsweise eine veränderte Transkription von Genen, die für Rezeptoren von Wachstumsfaktoren kodieren. Insbesondere kam es hier zu einer vermehrten Expression von Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFRalpha) und Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFRI), der über die Bindung seines Liganden FGF-2 eine wesentliche Rolle dabei spielt, neurale Vorläuferzellen in einem nicht differenzierten, proliferativen Zustand zu halten (Ray *et al.*, 1993). Eine erhöhte Expression wiesen darüber hinaus das TGF-beta1-Rezeptor-Adaptormolekül Disabled homolog 2 (Dab2), dem eine besondere Bedeutung bei der Einbindung der TGF-beta-Rezeptoren in den Smad-Pathway zukommt (Hocevar *et al.*, 2001), sowie die mit Zellproliferation assoziierten Gene Jagged 1 (Jag1) und Hairy and enhancer of split 1 (Hes1) auf. Die Behandlung aNSZ mit TGF-beta1 führte des Weiteren zu einer Induktion von Achaete-scute complex homolog-like 1 (Ascl1) und TGFB inducible early growth response (KLF10). Der überwiegende Anteil der regulierten Gene war jedoch vermindert exprimiert, darunter der TGF-beta1-Binderezeptor Transforming Growth Factor-beta Receptor II (TGFRII), der Cylin-abhängige Kinase Inhibitor 1C (p57), der Tumorsuppressor p53 (Tp53), die Polo-like kinase 1 (Plk1) sowie das minichromosome maintenance protein 7 (Mcm7), dem bereits eine Beteiligung beim Übergang von der G1- zur S-Phase nachgewiesen werden konnte (Petrocca *et al.*, 2008).

Innerhalb der Kategorie „Regulation der Zellproliferation“ (Tabelle 18) waren induzierte und reprimierte Gene zahlenmäßig annähernd gleich verteilt, wobei die zugeordneten Gene im Wesentlichen auch im Bereich der „Zellproliferation“ enthalten waren.

Besonders auffällig war die Regulation der Gene in der Kategorie „Regulation des Zellzyklus“ (Tabelle 17), innerhalb der die Mehrzahl der Gene nach TGF-beta1-Behandlung vermindert exprimiert war. So wiesen für die Zellzyklusregulation wesentliche Cycline wie Cyclin G1 (CCNG1), welches in der frühen G1-Phase induziert wird (Horne *et al.*, 1996), Cyclin E (CCNE), das am Übergang von der G1- zur S-Phase exprimiert wird, und Cyclin B1 (CCNB1), welches überwiegend in der G2/M-Phase der Zellteilung nachweisbar ist (Pines & Hunter, 1989), eine reduzierte Expression auf. Zudem fand sich eine reprimierte Expression

des Cylin-abhängigen Kinase Inhibitors 1C (p57), für den eine Bedeutung als negativer Regulator der Zellproliferation durch Inhibierung verschiedener Cyclin/CDK-Komplexe der G1-Phase nachgewiesen wurde (Lee *et al.*, 1995). Auch das für die Zellteilung essentielle Gen Cell division cycle 20 homolog (cdc20) und der Tumorsuppressor p53 (TP53) waren nach TGF-beta1-Behandlung in ihrer Expression vermindert. Unter normalen Bedingungen ist der Transkriptionsfaktor p53 sehr instabil und nur in geringem Ausmaß in der Zelle vorhanden. Kommt es beispielsweise infolge von Röntgenstrahlung zu einer Schädigung der DNA, so erfolgt rapide eine Erhöhung der p53-Konzentration. p53 bewirkt in der Folge eine Transkription von Genen, die Zellzyklusarrest, Apoptose, DNA-Reparatur oder Veränderungen im Metabolismus induzieren. Daneben scheint ihm auch eine Rolle bei der Induktion von Cyclin G1 zuzukommen (Bates & Vousden, 1996). Des Weiteren fand sich eine Hemmung der Polo-like kinase 1 (Plk1) sowie der in die Zellzyklusprogression involvierten Mitogen activated protein kinase 3 (Mapk3), während Cyclin D2 (CCND2), das in der G1-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, und das Zellzyklus-assoziierte Gen Quiescin Q6 (QSCN6) vermehrt exprimiert waren. Von Quiescin Q6 ist bekannt, dass es eine Rolle beim Übergang in die quieszente Phase des Zellzyklus spielt.

Auch aus dem Bereich des „Zellwachstums“ (Tabelle 17) war nach 7-tägiger TGF-beta1-Behandlung ein Großteil der Gene vermindert exprimiert, wie zum Beispiel Cyclin E (CCNE), Cyclin G1 (CCNG1) und der Suppressor of cytokine signaling 2 (Socs2). Andererseits zeigten der Wachstumsfaktor-Rezeptor Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFRI) sowie das TGF-beta1-Rezeptor-Adaptormolekül Disabled homolog 2 (Dab2) eine vermehrte Expression nach TGF-beta1-Behandlung.

3.1.3.ii. Regulation Neurogenese-assozierter Gene

Eine hohe Zahl an differentiell regulierten Genen konnte auch im Bereich der „Neurogenese“ (Tabelle 18) gefunden werden, wobei die Mehrzahl der Gene eine erhöhte Expression aufwies. Interessanterweise war unter anderem die Expression des Zelloberflächenrezeptors Neurexin 1 (NRXN1) sowie seines Liganden Neuroligin 1 (NLGN1) erhöht. Deren Komplexbildung ist einerseits unabdingbar für eine effiziente Neurotransmission, andererseits ist sie entscheidend in die Ausbildung synaptischer Kontakte involviert (Reissner *et al.*, 2008). Auch das für die Neurogenese essentielle Protein Hairy and enhancer of split 1 (Hes1) sowie der Glutamate receptor ionotropic NMDA 3A (GRIN3A), der zur Superfamilie glutamat-regulierter Ionenkanäle gehört und in Neuronen des gesamten ZNS präsent ist (Andersson *et al.*,

2001), zeigte eine erhöhte Expression nach TGF-beta1-Behandlung. Darüber hinaus war das ausschließlich in unreifen Neuronen exprimierte, Microtubuli-assoziierte Protein Doublecortin (Dcx), welches als Marker für Neurogenese eingesetzt wird, induziert. Gleichzeitig fand sich eine erniedrigte Expression des neuroektodermalen Stammzellmarkers Nestin (Nes) sowie des oligodendroglialen Markers Myelin basic protein (Mbp).

3.1.3.iii. Regulation Zellschicksal-assozierter Gene sowie von Genen aus dem Bereich Neuron Differenzierung und Reifung

Zusätzlich war nach TGF-beta1-Behandlung auch die Kategorie der „Neuron Differenzierung“ (Tabelle 18) deutlich betroffen. Ähnlich wie in der Kategorie „Neurogenese“ zeigte der Großteil der regulierten Gene in diesem Bereich eine erhöhte Expression. Mit wenigen Ausnahmen umfassten beide Kategorien die gleichen Gene.

Ein kleiner Anteil der differentiell exprimierten Gene kam aus dem Bereich „Determinierung des Zellschicksals“ (Tabelle 18). Diese Kategorie zeigte als einzige Kategorie ausschließlich hochregulierte Gene, darunter die Notch-Liganden Delta-like 1 (Dll1) und Jagged1 (Jag1). Der Notch-Signalweg beeinflusst die Determinierung des Zellschicksals sowie die Differenzierung von Zellen. Durch die Aktivierung der Notch1-Signalkaskade wird die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Status adulter neuronaler Stammzellen begünstigt, was letztlich zu einer Blockierung der Neurogenese führt (Lutolf *et al.*, 2002; Nyfeler *et al.*, 2005).

Im Bereich der „Neuron Reifung“ (Tabelle 17) fanden sich sowohl induzierte als auch reprimierte Gene. So war der neuronale Aggregationsfaktor Agrin (AGRN), welcher die Aggregation von Azetylcholinrezeptoren und anderen postsynaptischen Proteinen auf Muskelfasern induziert und wichtig für die Ausbildung neuromuskulärer Knotenpunkte ist, ebenso wie Neuroligin 1, hochreguliert. Auf die Expression von Myelin Basic Protein (Mbp) hatte TGF-beta1 dagegen einen hemmenden Einfluss, sodass es zu einer verminderten Transkription kam.

3.1.4. Pathway-bezogene Auswertung der DNA-Microarray-Ergebnisse

Um die an Regulationsvorgängen beteiligten Gene und deren Zugehörigkeit zu regulatorischen Pathways zu identifizieren, wurde eine Pathway-bezogene Auswertung der Microarray-Ergebnisse durchgeführt. Diese erfolgte mit Hilfe des ArrayAnalyzers von Transpath der Firma Biobase (<http://www.biobase-international.com/index.php?id=481>). Hierbei handelt es sich, anders als bei GeneRanker, der auf Literatur-Mining und Genannotationsdatenbanken

beruht, um eine manuell erstellte Signaltransduktionsdatenbank, die Gene und deren Interaktionen beinhaltet. Derzeit enthält die Transpath-Datenbank über 100.000 bekannte metabolische oder Signaltransduktionspathways und ca. 23.000 Gene unterschiedlicher Spezies. Zur Analyse wurden, ähnlich wie bei den GO-Kategorien, zunächst die regulierten Gene vom Microarray auf vorhandene Signalkaskaden in der Datenbank abgebildet, um zu bestimmen, wie viele Transkriptionsfaktoren und an Signaltransduktionsvorgängen beteiligte Gene innerhalb der regulierten Gene in bestimmten Pathways auftreten. Mit dem in der Transpath-Signaltransduktionsdatenbank integrierten ArrayAnalyzer Tool wurden weiter separat Upstream- und Downstream-Analysen, basierend auf 90 regulierten Genen vom Microarray, die im Signalnetzwerk der Transpath-Datenbank enthalten waren, durchgeführt. Der ArrayAnalyzer sucht, basierend auf den manuell gespeicherten Interaktionen, in den Inputgenen up- oder downstream nach sogenannten „most common molecules“, Schlüsselregulatoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen kontrollieren. Das „most common molecule“ ist demnach das Gen oder Protein, das durch überdurchschnittlich viele Reaktionen, ausgehend von den Inputgenen, erreicht wird (Krull *et al.*, 2003). Im Fall der Downstream-Analysen enden hier viele Pathways. Abbildung 9 zeigt die Legende zu den in der Folge dargestellten Pathways.

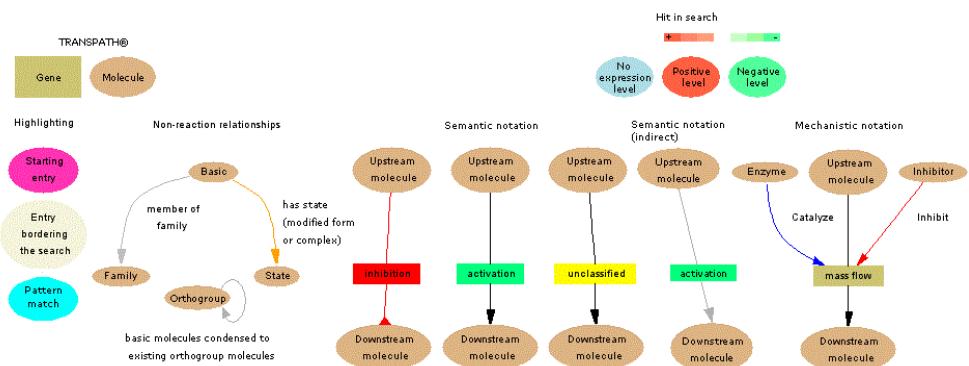


Abbildung 9: Übersicht über die Bedeutung der Symbole, die in den in der Folge dargestellten Pathways verwendet wurden.

3.1.4.i. Downstream-Analysen

In der Downstream-Untersuchung der Signaltransduktionswege wurden die R-Smads als die am stärksten gewichteten Schlüsselmoleküle identifiziert. Die Signalwege downstream von Mapk3, Mapk10, Calm1, Ptpn5, EphB1, Lyn, Cav und TGFRII kreuzen sich bei dieser Molekülfamilie. Die Smad-Kaskade kann somit für die koordinierte Aktivierung/Repression der genannten Moleküle und weiter auch für die differentielle Expression von Genen in kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen verantwortlich sein.

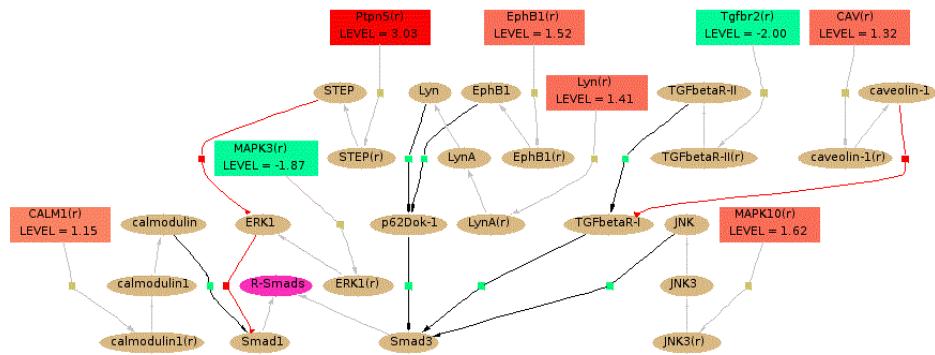


Abbildung 10: Schlüsselmoleküle der Downstream-Analyse und ihre umgebenden Netzwerke. Die ArrayAnalyzer-Suche identifizierte die R-Smads als „most common molecules“. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 oder HCl/BSA (Kontrolle) kultiviert. Im Anschluss wurde eine DNA-Microarray-Analyse durchgeführt. Schließlich wurden die Ergebnisse mit dem ArrayAnalyzer von Transpath analysiert, um Schlüsselregulatoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen kontrollieren, zu identifizieren.

3.1.4.ii. Upstream-Analysen

In der Upstream-Analyse wurde Mek1 (Map2k1) als wichtigster Schlüsselregulator ermittelt. Signalwege upstream von Cryab, Prnp, Gr, Hspcb, C-fos, Hsp60, Cpt1a, Cebpd, Odc, Pthya, Tp53, Phas-1, Gnai2, CD44, Slc3a2, Mmp-2, Nr1, Parp-1, PDGFRa, Gria2, Atp1a2, Stat1, TGFRII, Aldc, c-Myc sowie Hes1 überschneiden sich bei diesem Molekül. Somit scheint Mek1 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Genexpression in TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen zu spielen.

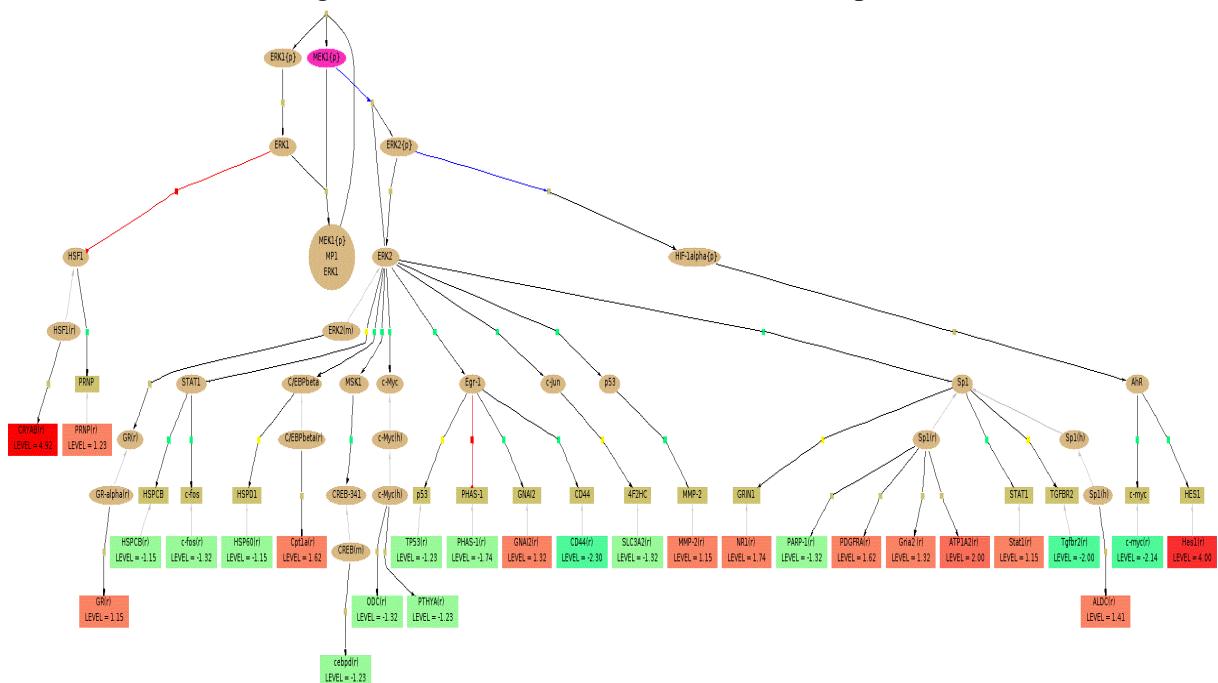


Abbildung 11: Das Schlüsselmolekül der Upstream-Analyse und seine umgebenden Netzwerke. Die ArrayAnalyzer-Suche resultierte in der Identifizierung von Mek1 als Schüsselmolekül.

Ein weiteres stark gewichtetes Schlüsselmolekül war außerdem der Transkriptionsfaktor NeuroD (für „neurogenic differentiation“), der in die Determinierung des Zelltyps involviert ist. Die Signalwege zahlreicher Gene, darunter Gabbr1, Rareg-2.2, Nr1, Gr, CD44, Odc, c-Myc,

Aldc, Parp-1, Atp1a2, PDGFRa, Gria2, Tp53, Gnai2, Mmp-2, Stat1, TGFRII, C-fos sowie Aox verbinden sich bei diesem Molekül. Somit scheint auch NeuroD bedeutsam für die differentielle Genexpression in kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen zu sein.

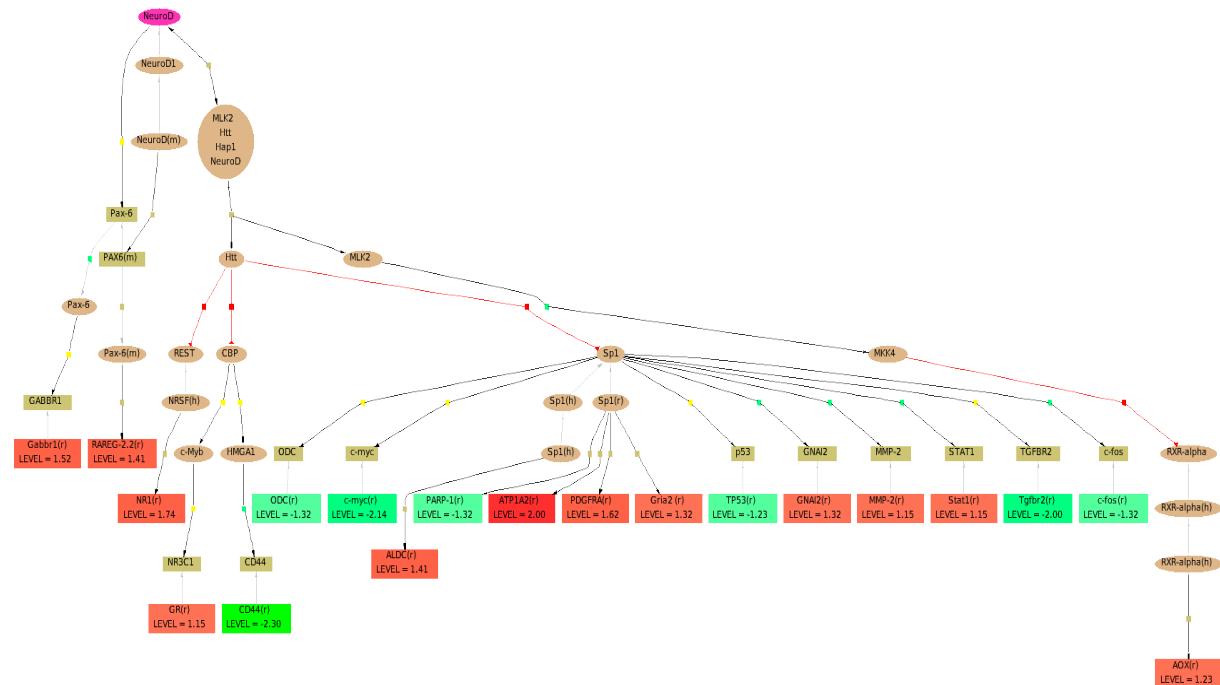


Abbildung 12: Ein weiteres stark gewichtetes Schlüsselmolekül der Upstream-Analyse, NeuroD, und seine umgebenden Netzwerke. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 oder HCl/BSA kultiviert. Im Anschluss an die DNA-Microarray-Analyse wurden die Ergebnisse mit dem ArrayAnalyzer von Transpath analysiert, um Schlüsselregulatoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren, zu identifizieren.

3.1.5. Netzwerk-Analyse der nach TGF-beta1-Behandlung differentiell exprimierten Transkripte

Um tiefe Einblicke in die zugrunde liegenden regulatorischen Gen-Netzwerke nach TGF-beta1-Behandlung zu erlangen, wurde im nächsten Schritt eine Literatur-basierte Netzwerk-Analyse der signifikant regulierten Transkripte, welche in den Microarray-Experimenten detektiert wurden, durchgeführt. Dies hatte zum Ziel, funktionelle Subcluster innerhalb der Inputgene zu finden und Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die die Expression dieser Gene kontrollieren. Hierzu benutzten wir die Bibiosphere PathwayEdition Software (Genomatix Software GmbH), die die biologische Evaluierung von wechselseitigen Beziehungen zwischen Genen sowie zwischen Genen und Transkriptionsfaktoren erlaubt. Die Software greift dazu auf über 12 Millionen Abstracts aus wissenschaftlichen Artikeln der PubMed-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zu, um, ausgehend von Co-Zitaten, mögliche Verbindungen zwischen den regulierten Transkripten zu erkennen und diese in Form von Netzwerken aufzuzeigen. Als Inputdatei wurde die Liste der 619 nach TGF-beta1-Behandlung signifikant regulierten Gene in die Bibiosphere Software importiert. Dadurch konnten

Verbindungen zwischen den regulierten Transkripten und weiteren Genen bzw. Transkriptionsfaktoren, die mit Genen der Inputliste co-zitiert waren, aufgedeckt werden. Um die Ergebnisse des Literaturninings für so eine Größenordnung an Genen übersichtlich zu halten und Netzwerke fokussiert auf bestimmte Fragestellungen darzustellen, mussten verschiedene Filter eingesetzt werden. Zunächst wurde der MeSHAnatomy-Filter angewandt. Da RNA aus Zellen der SVZ auf das Array aufgetragen wurde, wurde die Kategorie „laterale Ventrikel“ ausgewählt und das resultierende Co-Zitat-Netzwerk extrahiert (Abbildung 13). Das Netzwerk zeigt 9 Knotenpunkte, darunter wichtige Transkriptionsfaktoren wie Ascl1, Tp53 und Fos sowie die Gene Ccne1, Fgfr1, Nes und Grin1. Darüber hinaus scheint auch dem Neurogenesemarker Dcx sowie dem Oligodendrozytenmarker Mbp eine Rolle als Hauptmediator der differentiellen Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung zuzukommen, da beide, in direkter oder indirekter Weise, mit allen regulierten Transkripten des Netzwerks verbunden sind.

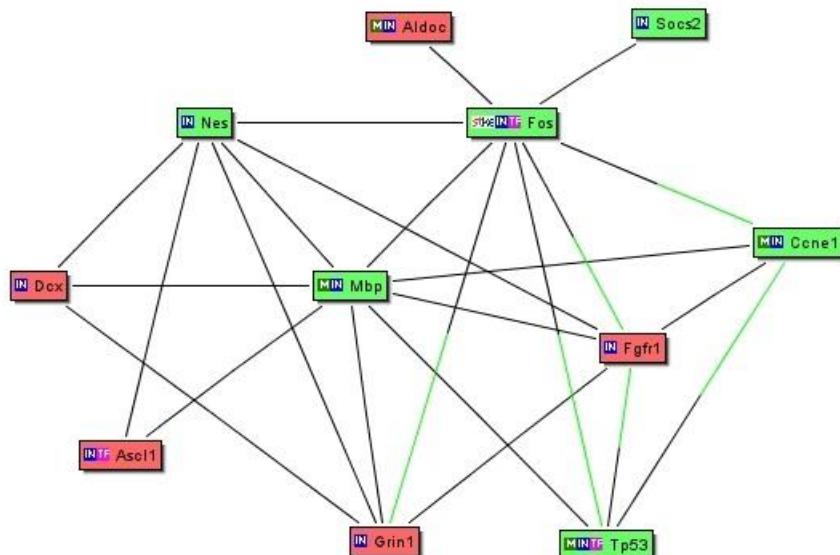


Abbildung 13: Mit der Bibliosphere Software extrahiertes Netzwerk der Kategorie „laterale Ventrikel“, bestehend aus 11 Genen, von denen nach TGF-beta1-Behandlung 6 hochreguliert und 5 reprimiert sind. Hochregulierte Gene sind rot hinterlegt, in der Expression reprimierte Gene grün. Als wichtige Transkriptionsfaktoren innerhalb der Inputgene wurden Ascl1, Tp53 und Fos identifiziert; wichtige Mediatoren der differentiellen Genexpression nach TGF-beta1-Exposition waren darüber hinaus Dcx und Mbp. TF=Transkriptionsfaktor, IN=Input-Gen, M=Genprodukt ist Teil eines metabolischen Pathways, ST=Genprodukt ist Teil eines Genomatix-Signaltransduktionspathways. Schwarz-grüne Linien kennzeichnen die Präsenz von Transkriptionsfaktor-Bindemotiven im potentiellen Ziel-Promoter. Schwarze Linien markieren dagegen Verbindungen ohne fachkundig kuratierte Annotationen.

Des Weiteren wurde der GO-Filter „Biological Process“ eingesetzt, um regulatorische Co-Zitat-Netzwerke zu etablieren. Das erstellte Netzwerk in Abbildung 14 zeigt den Einfluss der TGF-beta1-Behandlung auf die differentielle Expression von Transkripten im Bereich der „Neurogenese“. Das extrahierte Netzwerk weist wichtige Knotenpunkte bei Id3, Ascl1, Dpysl3, Mbp und Dcx auf. Der Hauptmediator ist jedoch der Stammzellmarker Nes, der in den Arraydaten eine verminderte Expression nach TGF-beta1-Behandlung erkennen ließ. Auffallend ist,

dass insgesamt 7 Transkripte, darunter 5 hochregulierte und 2 reprimierte, von Nes direkt oder indirekt beeinflusst werden können oder Nes beeinflussen.

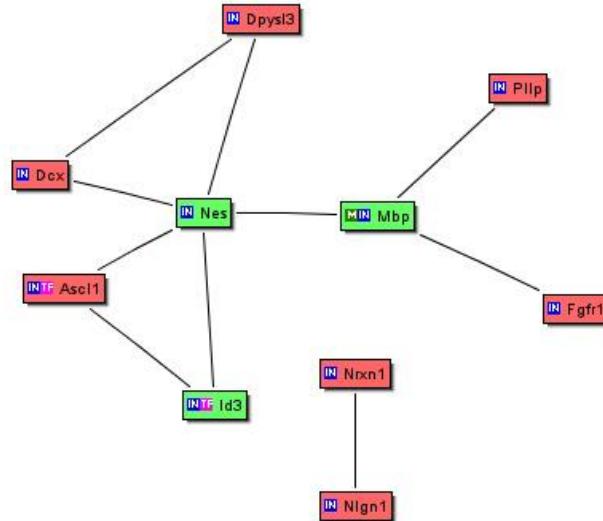


Abbildung 14: Mit der Bibliosphere Software extrahiertes Netzwerk der Kategorie „Neurogenese“, bestehend aus 10 Genen, von denen nach TGF-beta1-Behandlung 7 hochreguliert und 3抑制iert sind. Hochregulierte Gene sind rot hinterlegt, in der Expression reprimierte Gene grün. Wichtige Mediatoren der differentiellen Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung waren wiederum Dcx und Mbp, wobei Nes eine Rolle als Hauptmediator zukam. TF=Transkriptionsfaktor, IN=Input-Gen, M=Genprodukt ist Teil eines metabolischen Pathways. Schwarze Linien markieren Verbindungen ohne fachkundig kuratierte Annotationen.

Das generierte Netzwerk in Abbildung 15 zeigt die differentiell exprimierten Transkripte, die durch die Behandlung mit TGF-beta1 Einfluss auf die „Zelldifferenzierung“ nehmen.

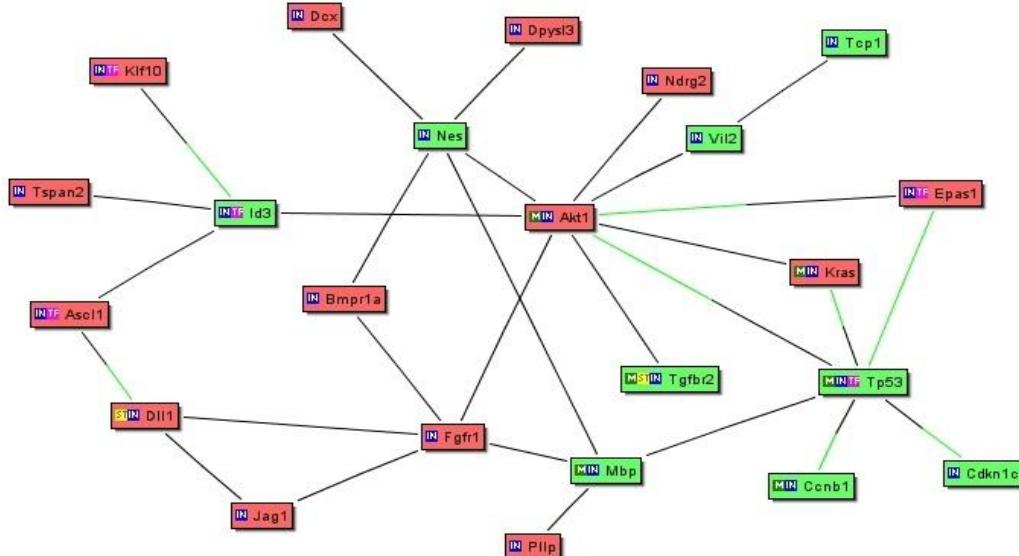


Abbildung 15: Mit BiblioSphere extrahiertes Netzwerk der Kategorie „Zelldifferenzierung“, bestehend aus 23 Genen, von denen nach TGF-beta1-Behandlung 14 hochreguliert und 9抑制iert sind. Hochregulierte Gene sind rot hinterlegt, in der Expression reprimierte Gene grün. TF=Transkriptionsfaktor, IN=Input-Gen, M=Genprodukt ist Teil eines metabolischen Pathways, ST=Genprodukt ist Teil eines Genomatix-Signaltransduktionspathways. Schwarz-grüne Linien kennzeichnen die Präsenz von Transkriptionsfaktor-Bindemotiven im potentiellen Ziel-Promoter. Schwarze Linien markieren dagegen Verbindungen ohne fachkundig kuratierte Annotationen.

Wichtige Knotenpunkte innerhalb des Genclusters sind hier die Transkriptionsfaktoren Id3, Ascl1 und Epas1 sowie die Gene Dll1, Jag1, Bmpr1a, und Kras. Prominente Hauptmediato-

ren scheinen darüber hinaus der Transkriptionsfaktor Tp53, Akt1, Fgfr1, Mbp und Nes zu sein. So zeigt jedes der im Netzwerk enthaltenen, regulierten Transkripte eine direkte oder indirekte Verknüpfung zu den genannten Mediatoren, was darauf hindeutet, dass die genannten Gene und Transkriptionsfaktoren als wichtige Schlüsselregulatoren der veränderten Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung zu sehen sind.

3.1.6. Verifizierung der differentiellen Genexpression ausgewählter Kandidatengene nach TGF-beta1-Behandlung

Zur Validierung der Daten aus der Genexpressionsanalyse wurde eine Realtime-PCR-Quantifizierung durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt 19 Kandidatengene, darunter 14 hoch- und 5 runterregulierte, ausgewählt. Für jeden Ansatz wurden Triplets erstellt, d. h. für jedes Gen wurde dreimal dieselbe Reaktion durchgeführt und die erhaltenen Quantitäten gemittelt. Zur relativen Quantifizierung der RNA-Expressionslevel wurden die Expressionswerte des jeweiligen Targetgens der kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen auf das Referenzgen G6PDH bezogen (relative Kopienzahl Targetgen/relative Kopienzahl Referenzgen). Die n-fache Expression der TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Fold change) wurde durch die Bildung des Quotienten aus den beiden ermittelten Werten berechnet (Tabelle 19). Auf diese Weise konnte die erhöhte Genexpression nach TGF-beta1-Behandlung für 13 von 14 untersuchten Genen, mit Ausnahme von Bmpr1a ($p=0.051$), bestätigt werden (Abbildung 16).

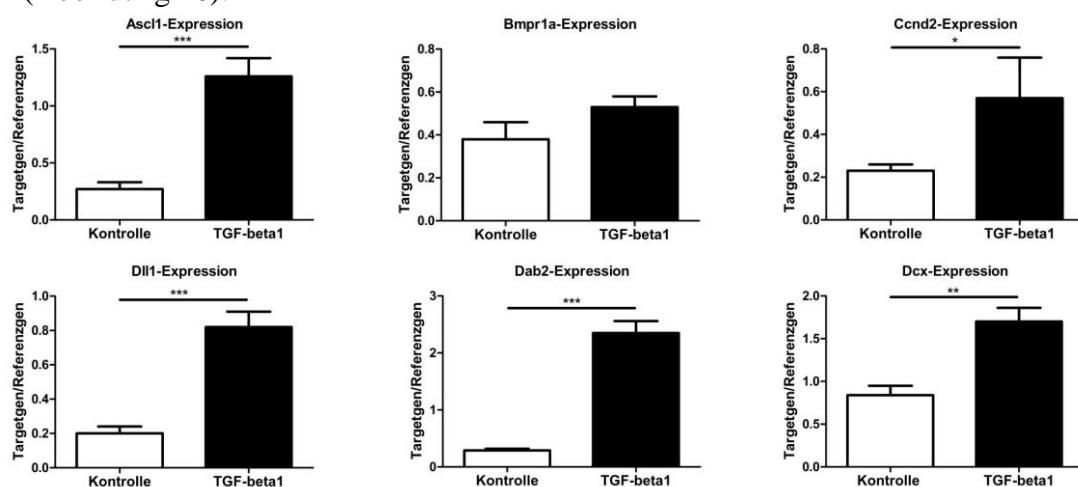


Abbildung 16: Verifizierung der DNA-Array-Daten durch Realtime-PCR-Quantifizierung. Nachweis der erhöhten mRNA-Expression nach TGF-beta1-Behandlung durch genspezifische PCR für Achaete-scute complex homolog-like 1 (Ascl1), Cyclin D2 (Ccnd2), Delta-like 1 (Dll1), Disabled homolog 2 (Dab2) und Doublecortin (Dcx). Die im Array gezeigte signifikant erhöhte Expression der Bone morphogenetic protein receptor type 1a (Bmpr1a)-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. aNSZ wurden für 7 Tage in Anwesenheit von TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) kultiviert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und mittels Realtime-PCR die Expression verschiedener Gene quantifiziert. Es sind die Mittelwerte aus $n=3 \pm SD$ dargestellt. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

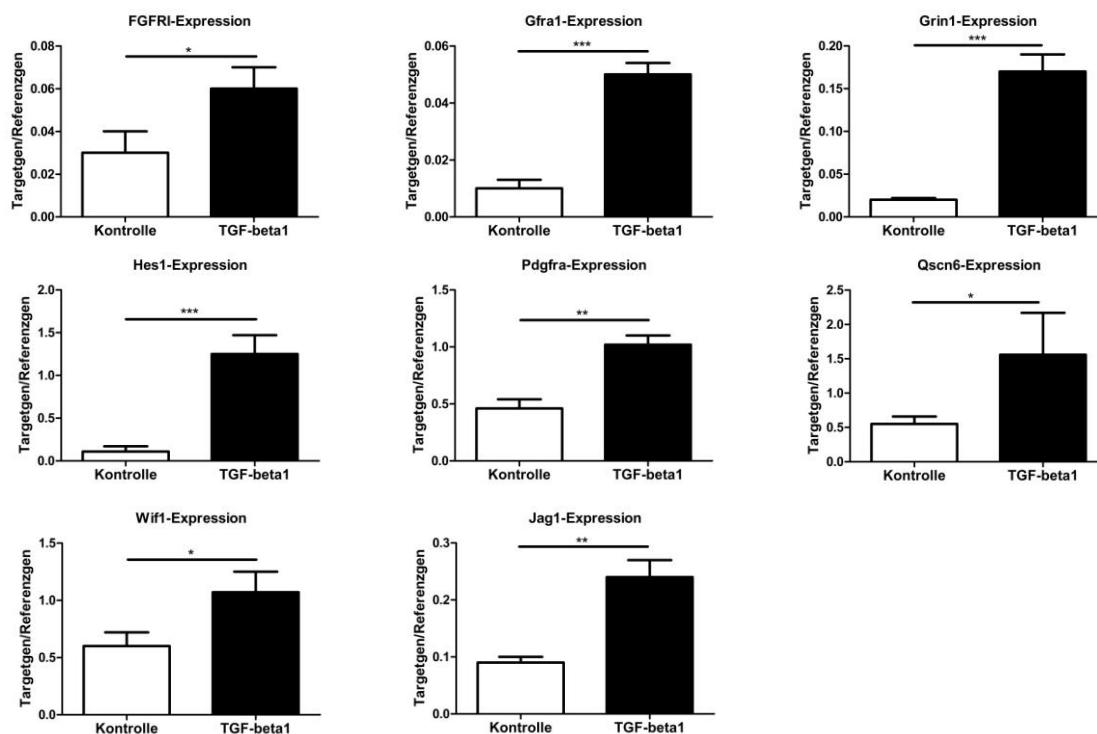


Abbildung 16 (Fortsetzung): Verifizierung der DNA-Array-Daten durch Realtime-PCR-Quantifizierung. Nachweis der erhöhten mRNA-Expression nach TGF-beta1-Behandlung durch genspezifische PCR für Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFRI), Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 (Gfra1), Glutamate receptor ionotropic NMDA 1 (Grin1), Hairy and enhancer of split1 (Hes1), Platelet derived growth factor receptor alpha (Pdgfra), Quiescin Q6 (Qscn6), Wnt inhibitory factor 1 (Wif1) und Jagged 1 (Jag1). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Die erniedrigte Expression nach TGF-beta1-Behandlung konnte nur für 2 der 5 untersuchten Gene, TGFRII und Cdkn1c, validiert werden (Abbildung 17). Dennoch wiesen auch die übrigen Gene, Nes (p=0.092), Mbp (p=0.057) und Ccnb1 (p=0.084) tendenziell eine reduzierte Expression nach TGF-beta1-Behandlung auf.

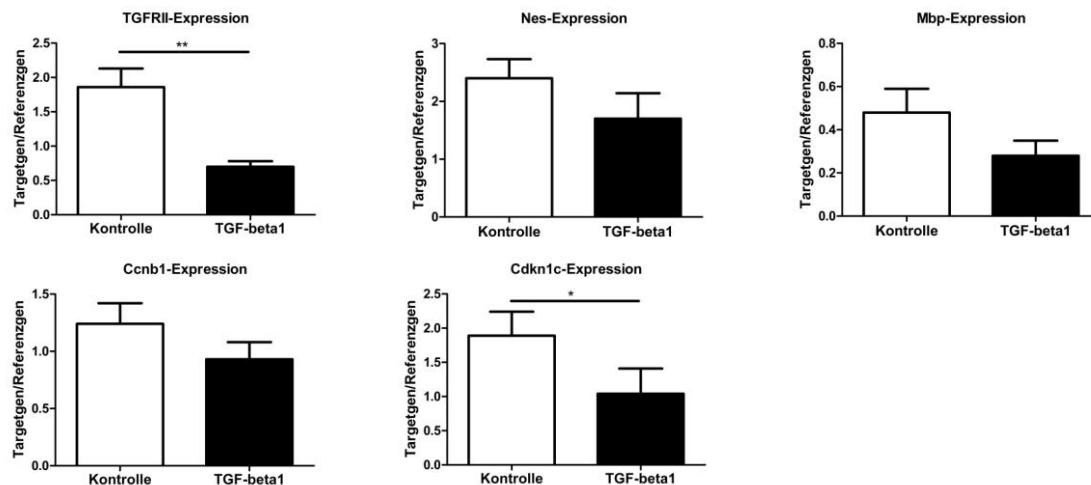


Abbildung 17: Verifizierung der DNA-Array-Daten durch Realtime-PCR-Quantifizierung. Nachweis der erniedrigten mRNA-Expression nach TGF-beta1-Behandlung durch genspezifische PCR für Transforming Growth Factor Receptor II (TGFRII) und Cyclin-dependent kinase inhibitor 1c (Cdkn1c/p57). Die im Array gezeigte signifikant erniedrigte Expression von Nestin (Nes), Myelin basic protein (Mbp) und Cyclin B1 (Ccnb1) konnte nicht nachgewiesen werden. aNSZ wurden während der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit TGF-beta1 oder HCl/BSA behandelt, bevor mittels Realtime-PCR die Expression verschiedener Gene quantifiziert wurde. Es sind die Mittelwerte aus n=3 ± SD dargestellt. *p<0.05; **p<0.01

Zum direkten Vergleich wurden in der folgenden Tabelle 19 die Fold change Werte der DNA-Array-Analyse denen der Realtime-PCR-Quantifizierung gegenübergestellt. Für den Großteil der validierten Gene zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der DNA-Array-Analyse mit den Ergebnissen der quantitativen PCR, was im Allgemeinen auf eine hohe Zuverlässigkeit der DNA-Array-Analyse schließen lässt. Lediglich vier Gene wiesen in der Realtime-Quantifizierung deutlich höhere Fold change Werte auf als in der DNA-Array-Analyse, darunter Ascl1, Hes1, Grin1 und Gfra1. Dies könnte möglicherweise auf Sättigungs- bzw. Background-Effekte bei Hybridisierungen zurückzuführen sein.

		Fold change (TGF-beta1 versus Kontrolle)	
Name des Gens	Gensymbol	DNA-Array-Analyse	Realtime-PCR
Cyclin B1	Ccnb1	-1,47	-1,33
Bone morphogenetic protein receptor type 1a	Bmpr1a	1,94	1,39
Nestin	Nes	-1,78	-1,41
Doublecortin	Dcx	1,69	2,03
Myelin basic protein	Mbp	-1,76	-1,75
Cyclin D2	Ccnd2	2,65	2,51
Jagged1	Jag1	2,39	2,79
Disabled homolog 2	Dab2	9,79	8,17
Delta-like 1	Dll1	5,22	4,07
Quiescin Q6	Qscn6	3,54	2,85
Platelet derived growth factor receptor alpha	Pdgfra	1,96	2,22
Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR1	1,78	1,83
Transforming growth factor beta receptor II	TGFRII	-1,93	-2,67
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	Cdkn1c	-1,93	-1,82
Wnt inhibitory factor 1	Wif1	1,41	1,78
Achaete-scute complex homolog-like 1	Ascl1	1,71	4,60
Hairy and enhancer of split 1	Hes1	3,00	5,01
Glutamate receptor ionotropic NMDA 1	Grin1	1,63	9,88
Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1	Gfra1	1,62	5,10

Tabelle 19: Vergleichende Übersicht über die Fold change Werte (TGF-beta1 versus Kontrolle) der DNA-Array-Analyse und der Realtime-PCR. Mit Ausnahme der grau hinterlegten Gene zeigten die Ergebnisse beider Experimente eine gute Korrelation. aNSZ wurden während der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA behandelt. Danach wurde die Expressionsänderung mittels DNA-Array-Analyse oder Realtime-PCR bestimmt.

3.1.7. Untersuchung der Genexpression von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ im zeitlichen Verlauf

Neben der Validierung der Array-Daten wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen im zeitlichen Verlauf durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 2h, 24h, 4d, 7d oder 10d den jeweiligen Bedingungen ausgesetzt und im Anschluss die Expressionsprofile des Neurogenesemarkers Dcx, des glialen, Vorläuferzell-induzierenden Notch-Liganden Jag1 und des TGF-beta1-Rezeptor-AdAPTERmoleküls Dab2, dem eine besondere Bedeutung bei der Einbindung der TGF-beta-Rezeptoren in den Smad-Pathway zukommt, mittels Realtime-PCR bestimmt. Abbildung 18 zeigt die Expression

von Dcx im zeitlichen Verlauf. Auffallend ist hier der konsistente Trend in Richtung einer erhöhten Dcx-Expression nach TGF-beta1-Behandlung im Verlauf einer 2-stündigen bis 10-tägigen Kultivierung. Diese erwies sich nach 7 und 10 Tagen als signifikant.

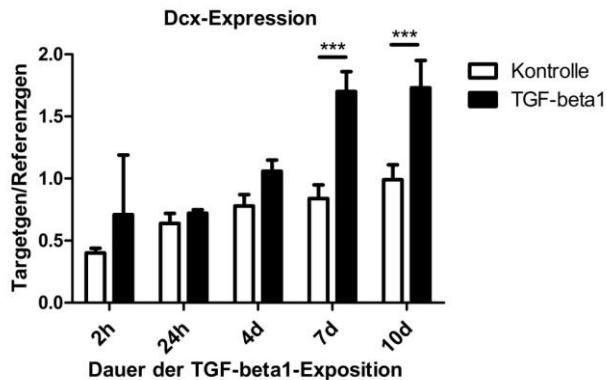


Abbildung 18: Dcx-Expression von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen bei unterschiedlicher Expositionszeit (2h, 24h, 4d, 7d, 10d). Nach 7d bzw. 10d der Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 war die Expression von Dcx gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. n=3; ***p<0.001

Die Expression des Adaptermoleküls Dab2 war dagegen, im Vergleich zur Kontrolle, schon nach 24 h signifikant erhöht und stieg mit zunehmender Expositionszeit noch weiter an.

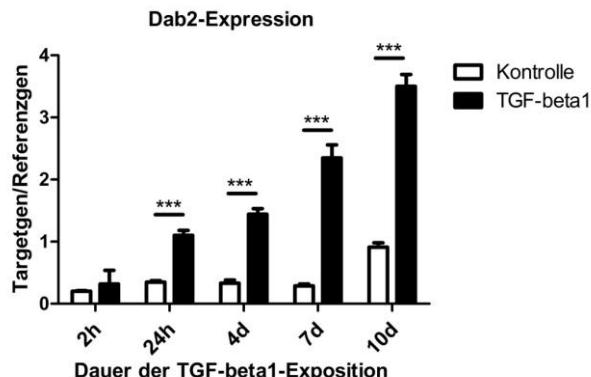


Abbildung 19: Dab2-Expression von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen bei unterschiedlicher Expositionszeit (2h, 24h, 4d, 7d, 10d). Nach 24h, 4d, 7d und 10d der Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 war die Expression von Dab2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. n=3; ***p<0.001

Ebenso zeigte sich die Expression von Jag1 bereits nach 24h signifikant erhöht, während nach 2-stündiger TGF-beta1-Exposition noch kein Effekt zu beobachten war.

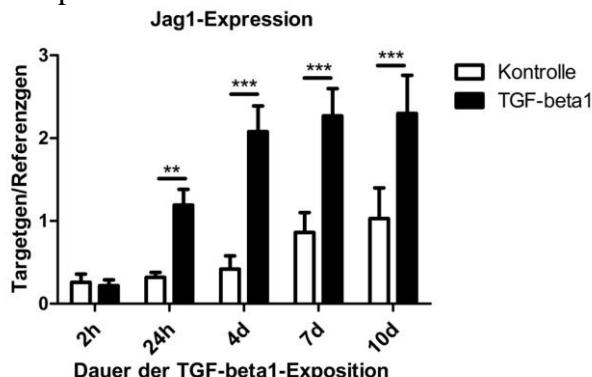


Abbildung 20: Jag1-Expression von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen bei unterschiedlicher Expositionszeit (2h, 24h, 4d, 7d, 10d). Nach 24h, 4d, 7d und 10d der Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 war die Expression von Jag1, verglichen mit der Kontrolle, signifikant erhöht. n=3; **p<0.01; ***p<0.001

3.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Expression der TGF-beta1-Rezeptoren

Zur Untersuchung der Expression der für die TGF-beta1-Signalübertragung relevanten Rezeptoren in kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen aus der SVZ der Ratte wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt (Abbildung 21). Der TGF-beta1-Binderezeptor, TGFRII, und der TGFRI waren in beiden Kulturen exprimiert. Dagegen war Acvrl1 (ALK1), ein alternativer Typ-I TGF-beta-Rezeptor in adulten neuralen Vorläuferzellen, nur in den Kontroll-Kulturen nachweisbar. Die Aktivierung des ALK1-Signalwegs resultiert in der Aktivierung der NF-kappaB-Signalkaskade und führt in der Folge zu einem gesteigerten Überleben von Neuronen unter neurotoxischen Stressbedingungen (König *et al.*, 2005).

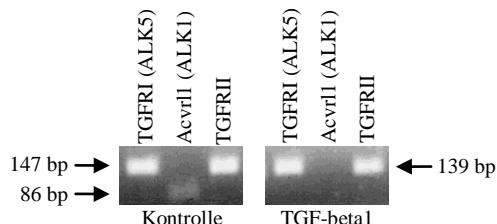


Abbildung 21: RT-PCR-Analyse der Expression von TGF-beta1-Rezeptor-mRNA in kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen aus der SVZ der Ratte. aNSZ wurden im Verlauf der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) stimuliert. TGFRI- und TGFRII-mRNA wurde sowohl in kontroll- als auch in den TGF-beta1-behandelten Kulturen detektiert. Die Expression des alternativen Typ-I TGF-beta-Rezeptors Acvrl1 konnte dagegen nur in der Kontroll-Kultur nachgewiesen werden.

Die im Anschluss durchgeführte quantitative Analyse der TGF-beta1-Rezeptorexpression mittels Realtime-PCR bestätigte die reduzierte Expression des Acvrl1-Rezeptors nach TGF-beta1-Behandlung. Ebenso zeigte sich eine signifikant erniedrigte TGFRII-Expression nach der Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1, während die TGFRI-Expression unverändert blieb (Abbildung 22).

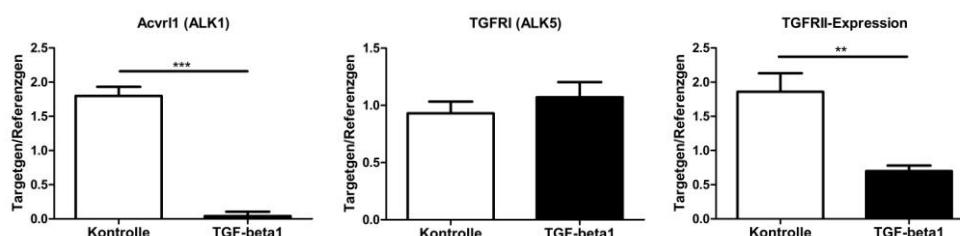


Abbildung 22: Analyse der TGF-beta1-Rezeptorexpression durch quantitative PCR. aNSZ wurden im Verlauf der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) stimuliert. Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression wurden die Expressionswerte der kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen der Targetgene jeweils auf das Referenzgen G6PDH bezogen (relative Kopienzahl Targetgen/relative Kopienzahl Referenzgen). Der alternative Typ-I TGF-beta1-Rezeptor Acvrl1 und der TGFRII wiesen nach TGF-beta1-Behandlung eine signifikant erniedrigte Expression auf. Die TGFRI-Expression zeigte sich dagegen unbeeinflusst von der TGF-beta1-Behandlung. Es sind die Mittelwerte aus $n=3 \pm SD$ dargestellt. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

3.3. Der Einfluss von TGF-beta1 auf das Zellschicksal aNSZ

3.3.1. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Proliferation aNSZ

Ein wichtiger Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war ein Befund aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ludwig Aigner, der eine verminderte Proliferation aNSZ unter Einfluss von TGF-beta1 anhand eines BrdU-ELISAs nachwies (Wachs *et al.*, 2006). Da diese Beobachtung eine essentielle Grundlage dieser Dissertation darstellt, sollte sie zu Beginn mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Dazu wurden 5×10^4 Zellen/ml in 12-Well-Platten ausgesät und an Tag 1, 4 und 7 mit jeweils 10 ng/ml TGF-beta1 behandelt. Im Anschluss wurde an Tag 8 die metabolische Aktivität lebender Zellen mithilfe des Tetrazoliumsalzes MTT spektrophotometrisch gemessen. Mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen reduzieren das gelbliche MTT zu violetten Formazanderivaten, wobei die Farbintensität proportional zur Zahl der vitalen Zellen ist. Da ruhende Zellen metabolisch weniger aktiv sind als proliferierende, weisen diese dementsprechend eine geringere Farbintensität auf. Eine Erniedrigung der Zellzahl resultiert nämlich in einer reduzierten Menge an Formazanderivaten und folglich in einer verminderten Absorption. Abbildung 23 A gibt die gemessene Absorption von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen wieder. Ersichtlich ist, dass TGF-beta1 den Anteil an proliferierenden Zellen in aNSZ-Kulturen deutlich verringert. In Übereinstimmung konnte zudem eine wesentliche Reduktion in Bezug auf die Sphäregröße unter dem Einfluss von TGF-beta1 festgestellt werden (Abbildung 23 B).

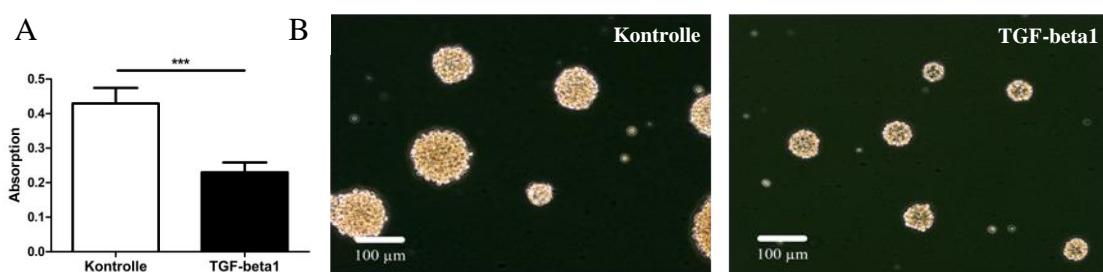


Abbildung 23: TGF-beta1 beeinflusst die Proliferation aNSZ. aNSZ aus der SVZ der Ratte wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät und für 8 Tage kultiviert. An Tag 1, 4 und 7 erfolgte jeweils die Stimulation mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA. An Tag 8 wurde die Proliferation der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. A) Ergebnisse des MTT-Assays. Die TGF-beta1-behandelten Zellen wiesen eine deutlich verminderte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle auf. Es sind die Mittelwerte aus $n=3 \pm SD$ dargestellt. *** $p<0.001$ B) Phasenkontrastaufnahmen von Sphères einer kontroll-behandelten Kultur (links) und nach Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 (rechts) in 100-facher Vergrößerung. TGF-beta1-behandelte Sphäroide waren deutlich kleiner, die Anzahl der Sphères blieb jedoch unverändert. Messbalken = 100 µm.

3.3.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Differenzierung aNSZ

3.3.2.i. Differentielle Expression von Markergenen für die Differenzierung in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung

Mit der im vorangehenden Kapitel beschriebenen DNA-Array-Genexpressionsanalyse konnte eine umfangreiche, differentielle Regulation einer Vielzahl von Genen nach TGF-beta1-Behandlung unter Proliferationsbedingungen gefunden werden. In der folgenden Tabelle 20 sind die detektierten Expressionsänderungen der bedeutendsten Markergene in aNSZ-Kulturen, die auf dem Array vertreten waren, in einer Übersicht zusammengefasst. Die DNA-Microarray-Ergebnisse zeigten keine Expressionsänderung hinsichtlich der Marker für reife Astrozyten und Neurone, GFAP und Tubb3, während der neurale Stammzellmarker Nestin vermindert exprimiert war. Interessanterweise war der Marker für neuronale Vorläuferzellen, Dcx, unter Proliferationsbedingungen verstärkt exprimiert, wohingegen der Oligodendrozytenmarker Mbp eine erniedrigte Expression aufwies.

Name des Gens	Gensymbol	Zelltyp	Expressionsänderung (TGF-beta1 versus Kontrolle)
Doublecortin	Dcx	neuronale Vorläuferzellen	erhöhte Expression
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Astrozyten	keine Veränderung
Tubulin, beta 3	Tubb3	Neurone	keine Veränderung
Myelin basic protein	Mbp	Oligodendrozyten	erniedrigte Expression
Nestin	Nes	neurale Stammzellen	erniedrigte Expression

Tabelle 20: Übersicht über die durch TGF-beta1 initiierte Expressionsänderung wichtiger Markergene in aNSZ-Kulturen. aNSZ aus der SVZ der Ratte wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät und für 8 Tage kultiviert. An Tag 1, 4 und 7 erfolgte jeweils die Stimulation mit 10 ng/ml TGF-beta1. An Tag 8 wurde die RNA isoliert und im Anschluss die Expressionsprofile mittels DNA-Array-Analyse bestimmt. Der Differenzierungsmarker Dcx zeigte eine erhöhte Expression nach TGF-beta1-Behandlung, Mbp war vermindert exprimiert.

Von besonderer Wichtigkeit im Rahmen dieser Arbeit war die unter Proliferationsbedingungen beobachtete, TGF-beta1-induzierte Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Dcx. Deswegen wurde dieser Befund im Anschluss im Detail analysiert.

3.3.2.ii. Nachweis einer erhöhten Dcx-Proteinexpression nach TGF-beta1-Behandlung

Um die Relevanz der unterschiedlichen Dcx-mRNA-Expression nach TGF-beta1-Behandlung auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Westernblot-Analysen sowie Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Dcx zur Markierung der neuronal determinierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden dissozierte Zellen in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml in Kulturflaschen (Westernblot) oder in Well-Platten auf einer Poly-L-Ornithin/Laminin-Matrix (Immunfärbungen) ausgesät. Innerhalb der nächsten 8 Tage erfolgte

eine dreimalige Applikation (Tag 1, 4, 7) von 10 ng/ml TGF-beta1; als Kontrolle dienten Zellen, die über den gleichen Zeitraum 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA erhielten. Im Anschluss wurden die Zellen der Westernblot-Analyse zugeführt oder aber einer immunzytochemischen Untersuchung unterzogen. Es konnte eine deutlich erhöhte Dcx-Proteinexpression nach TGF-beta1-Behandlung, verglichen mit der Kontrolle, nachgewiesen werden (Abbildung 24).

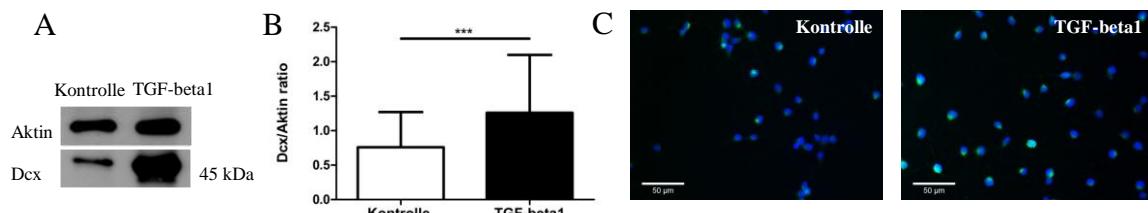


Abbildung 24: Erhöhte Dcx-Proteinexpression nach TGF-beta1-Behandlung. Die Zellen wurden 8 Tage in Anwesenheit von TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) inkubiert. A) Dcx- und Aktin-Westernblots von Proteinen, die aus kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen extrahiert wurden. B) Ergebnis der densitometrischen Analyse der Blots. Es ist jeweils das Verhältnis Dcx/Aktin der mittleren Grau-Werte von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen mit der zugehörigen Standardabweichung gezeigt. n=3; ***p<0.001 C) Dcx-Immunfluoreszenzfärbungen von kontroll- (links) und TGF-beta1-behandelten Zellen (rechts) in 40-facher Vergrößerung. Immundetektion von Dcx (grün); die Kernauffärbung wurde mit DAPI durchgeführt (blau). Messbalken = 50 µm.

3.4. Die funktionelle Rolle von TGF-beta1

3.4.1. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften TGF-beta1-behandelter Zellen unter Proliferationsbedingungen

Um aNSZ unter Proliferationsbedingungen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften zu charakterisieren, wurden die Zellen zunächst in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in Kulturflaschen ausgesät und während der 8-tägigen Kultivierung dreimal (Tag 1, 4, 7) mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt. Im Anschluss wurden sie dissoziert und auf Poly-L-Ornithin-Laminin-beschichteten 24-Well-Platten in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen in 500 µl NB-B27-all-Medium pro Well ausgesät. Im Verlauf der nächsten drei Tage wurden die Zellen jeweils elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen. Für die mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführten Ganzzell-Ableitungen wurde initial eine Spannung von -80 mV angelegt. Dann wurden die Zellen insgesamt 18 verschiedenen Spannungen von je 50 ms Dauer mit einer Amplitudendifferenz von je 10 mV ausgesetzt und die korrespondierenden Ströme gemessen. Mit den ersten 9 Schritten wurden die Zellen bis auf ein Potential von +10 mV depolarisiert, anschließend folgten 9 hyperpolarisierende Schritte bis zu einem Spannungswert von -170 mV. Zellen, die unter Kontrollbedingungen gewachsen waren, wiesen ausschließlich Auswärtsströme auf, die nicht in-

aktivierten. Diese Ströme waren spannungsabhängig und zeigten kinetische Charakteristika von verzögerten Auswärts-Gleichrichter-Kaliumkanälen. In keiner der vermessenen Kontrollzellen ($n=112$) konnte ein Natriumeinstrom detektiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen alle TGF-beta1-behandelten Zellen ($n=50$) einen transienten Einwärtsstrom, gefolgt von einem nicht inaktivierenden Auswärtsstrom, als Antwort auf die depolarisierenden Spannungsschritte auf. Der transiente Einwärtsstrom konnte durch die Anwendung von 10 nM TTX reversibel geblockt werden ($n=70$), was ihn als TTX-sensitiven Natriumkanal auswies.

Die „Stromklemme-Konfiguration“ wurde dazu verwendet, die Potentialänderungen der Zellen nach einer Strominjektion (0.1-1.0 nA) zu verfolgen und dadurch die Erregbarkeit der Zellen zu überprüfen. Keine der Kontrollzellen war in der Lage, durch eine Strominjektion Aktionspotentiale zu generieren. Dagegen war nach TGF-beta1-Behandlung die Auslösung von Aktionspotentialen in 84 % der vermessenen Zellen möglich. Ein repräsentatives Aktionspotential einer TGF-beta1-behandelten Zelle ist in Abbildung 25 gezeigt.

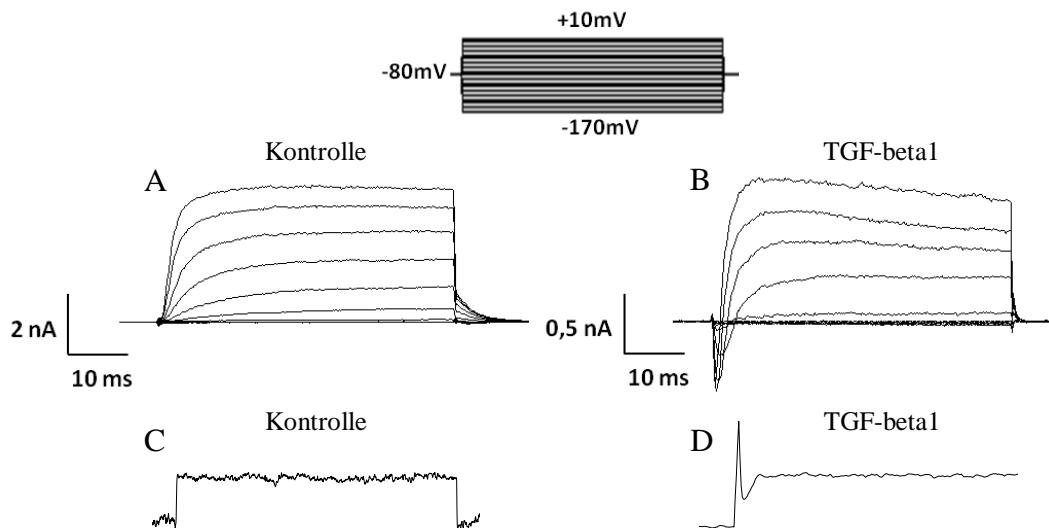


Abbildung 25: Elektrophysiologische Eigenschaften von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ bei der Kultivierung unter Proliferationsbedingungen. aNSZ aus der SVZ wurden während der 8-tägigen Kultivierung dreimal mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder entsprechenden Volumina an 4 mM HCl/BSA mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt. Im Anschluss wurden sie unter Anwendung der Patch-Clamp- und Current-Clamp-Technik vermessen. Die Vermessung wurde von Sabrina Kraus durchgeführt. A) Aufgezeichnete, repräsentative Stromspur einer aNSZ-Kultur unter Kontrollbedingungen. Die Zellen zeigten nicht inaktivierende Auswärtsströme; in keiner der vermessenen Zellen konnten Natriumeinströme detektiert werden. B) TGF-beta1-behandelte Zellen wiesen spannungsgesteuerte Natriumkanäle auf, gefolgt von nicht inaktivierenden Auswärtsströmen. Die transienten Einwärtsströme konnten vollständig durch 10 nM TTX geblockt werden, was ihre Identität als TTX-sensitive Natriumströme bestätigt. C) Kontrollzellen, die sich durch fehlende Natriumkanäle auszeichneten, waren elektrisch nicht reizbar; depolarisierende Stromimpulse konnten keine Aktionspotentiale auslösen. D) Repräsentative Aufzeichnung eines Aktionspotentials. TGF-beta1-behandelte Zellen waren in der Lage, während der Depolarisation Aktionspotentiale abzufeuern. Das Aktionspotential wurde durch depolarisierende Strominjektion von 1 nA für 1s ausgelöst und im „Stromklemme-Modus“ aufgezeichnet.

3.4.2. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften TGF-beta1-behandelter Zellen unter Differenzierungsbedingungen

Zur Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften differenzierter Zellen wurden aNSZ unter Proliferationsbedingungen auf beschichteten 24-Well-Platten ($2,5 \times 10^4$ Zellen in 500 µl Medium pro Well) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen einem Medienwechsel auf Differenzierungsmedium (NB-B27-not-all-Medium mit 5 % v/v FCS) unterzogen. Einige Stunden später erfolgte die erste Stimulation mit TGF-beta1 (Tag 1). Weitere Zugaben wurden an Tag 4 und 7 durchgeführt, bevor die Zellen an den Tagen 8 bis 10 vermessen wurden. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Zellen dabei im Bereich von -170 mV bis +10 mV hyper- bzw. depolarisiert und die korrespondierenden Ströme detektiert. Insgesamt wurden 18 verschiedene Spannungen mit einer Amplitudendifferenz von 10 mV und einer Dauer von 50 ms angelegt. Kontrollzellen (n=27) zeigten ausschließlich verzögerte Auswärts-Gleichrichter-Kaliumströme, wohingegen keine Natriumeinströme nachweisbar waren. Analog dazu wiesen die TGF-beta1-behandelten Zellen (n=25) ebenfalls keine Natriumströme auf; wiederum waren nur auswärtsgerichtete Kaliumströme detektierbar (Abbildung 26). Um dennoch zu überprüfen, ob die Zellen, die unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden, in der Lage sind, Aktionspotentiale auszulösen, wurden sie zusätzlich in der „Stromklemme-Konfiguration“ untersucht. Weder kontroll- noch TGF-beta1-behandelten Zellen war es möglich, durch Strominjektion Aktionspotentiale zu generieren.

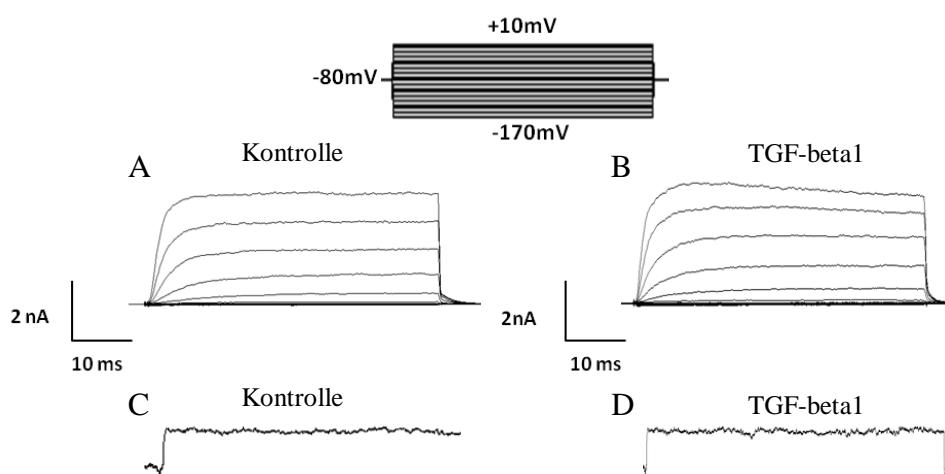


Abbildung 26: Elektrophysiologische Eigenschaften von kontroll- und TGF-beta1-behandelten aNSZ bei der Kultivierung unter Differenzierungsbedingungen. Die Vermessung wurde von Sabrina Kraus durchgeführt. A) Charakteristisches Stromprofil kontroll-behandelter aNSZ. Die Zellen zeigten ausschließlich nicht inaktivierende Kaliumauswärtsströme; dagegen konnten keine Natriumeinströme detektiert werden. B) Stromprofil TGF-beta1-behandelter aNSZ. Die Zellen wiesen unterschiedliche (nicht inaktivierende und schnell inaktivierende), auswärtsgerichtete Kaliumkanäle auf. Natriumströme konnten nicht detektiert werden. C) Kontrollzellen waren elektrisch nicht reizbar, sodass depolarisierende Stromimpulse keine Aktionspotentiale auslösen konnten. D) Auch TGF-beta1-behandelte Zellen waren nicht in der Lage, Aktionspotentiale abzufeuern.

3.5. Nachweis der neuroprotektiven Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ

Um die vielfach postulierte, neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 an aNSZ-Kulturen NMR-spektroskopisch zu überprüfen, wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in Kulturflaschen ausgesät und für 7 Tage in Anwesenheit von TGF-beta1 kultiviert (Stimulationen mit 10 ng/ml TGF-beta1 erfolgten an Tag 1, 4 und 7). Im Anschluss wurden die Proben vermessen und die erhaltenen NMR-Spektren hinsichtlich der Signalintensität des spezifischen Lipid-Signals bei 1.28 ppm, welches unter wachstumsarrest-fördernden Bedingungen oder Apoptose nachgewiesen werden kann (Ramm *et al.*, 2009), ausgewertet. In Abbildung 27 A sind drei repräsentative Spektren von kontroll- und TGF-beta1-behandelten Zellen dargestellt. Während die Kontrollen (rote Linien) durchwegs hohe 1.28-ppm-Peak-Signalintensitäten aufwiesen, waren die zelltod-spezifischen Peaks in TGF-beta1-stimulierten Zellen (schwarze Linien) nahezu nicht vorhanden. Für die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde eine Normalisierung auf die Zelldichte durchgeführt. Dazu wurde der Quotient aus der Signalintensität des Fettsäuremethylenpeaks bei 1.28 ppm ($\text{CH}_2_{\text{Lipid}}$) und der des makromolekularen Methyl-Multipletts zwischen 1.05 und 0.80 ppm (CH_3_{MM}) für kontroll- und TGF-beta1-behandelte Zellen gebildet. Der besseren Vergleichbarkeit halber wurde der Quotient der Kontrolle gleich 1 gesetzt. Die Quantifizierung des 1.28-ppm-Peaks ergab eine deutlich erniedrigte Lipid-Signalintensität der TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 27 B), was die neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ beweist.

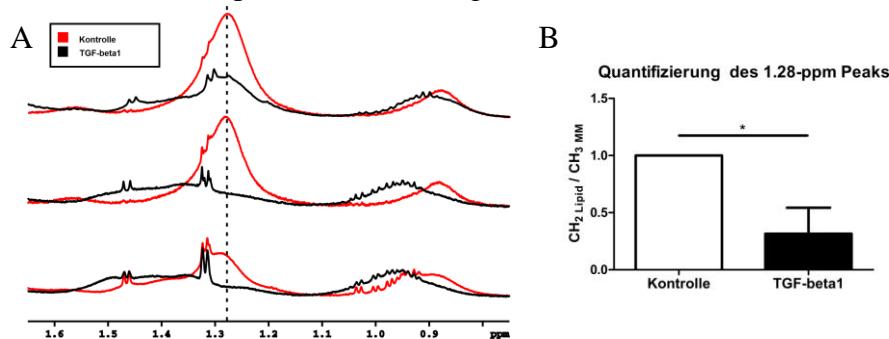


Abbildung 27: Neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ. Die Signalintensität des mit Zelltod assoziierten 1.28-ppm-Biomarkers ist nach TGF-beta1-Behandlung signifikant vermindert. Die Vermessung wurde von Paul Ramm durchgeführt. A) Repräsentative NMR-Spektren aus drei unabhängig durchgeführten Messungen nach 8-tägiger Kultivierung mit und ohne TGF-beta1. B) Quantitative Analyse der 1.28-ppm-Signalintensität. Die Normalisierung des gemessenen 1.28-ppm-Signals auf die Zelldichte wurde durch die Bildung des Quotienten aus der integrierten Signallfläche des 1.28-ppm-Fettsäuremethylenpeaks ($\text{CH}_2_{\text{Lipid}}$) und der des makromolekularen Methyl-Multipletts zwischen 1.05 und 0.80 ppm (CH_3_{MM}) durchgeführt. n=3; *p<0.05

Zur detaillierteren Analyse und Evaluierung dieser Daten wurde nach 7-tägiger Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 zudem ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt, um die Konzen-

tration an LDH, einem Enzym das bei der Zelllyse nekrotischer Zellen freigesetzt wird, zu bestimmen. In klarer Übereinstimmung mit den NMR-Daten konnte in TGF-beta1-behandelten Zellen signifikant weniger LDH und dementsprechend weniger Zelltod als in Kontrollzellen detektiert werden (Abbildung 28 A). Dies deutet darauf hin, dass TGF-beta1 seine nachgewiesene, neuroprotektive Wirkung auf aNSZ dadurch entfaltet, dass es die Zellen vor nekrotischem Zelltod bewahrt. Durch die Durchführung eines Zelltod-ELISAs, bei dem Apoptose und Nekrose separat analysiert wurden, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass TGF-beta1 auch den Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 28 B). Zudem bestätigten diese Experimente den hemmenden Einfluss von TGF-beta1 auf die Nekrose.

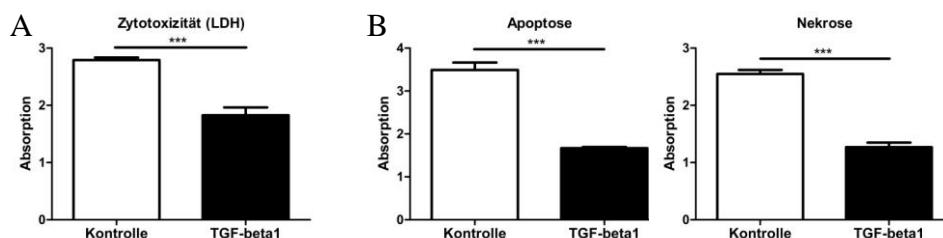


Abbildung 28: Neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ. TGF-beta1 hemmt Apoptose und Nekrose in aNSZ-Kulturen. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 oder HCl/BSA (Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mittels LDH-Assay und Zelltod-ELISA auf Zelltod untersucht. A) Der Zytotoxizitätsassay wies einen verminderten nekrotischen Zelltod nach TGF-beta1-Behandlung nach. B) Der Zelltod-ELISA konnte die Ergebnisse des LDH-Assays bestätigen. Zudem konnte gezeigt werden, dass TGF-beta1 auch den Anteil an apoptotischen Zellen in aNSZ-Kulturen verringert. n=3; ***p<0.001

3.6. Charakterisierung TGF-beta1-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ

3.6.1. Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen weitreichenden Einfluss von TGF-beta1 auf aNSZ-Kulturen, darunter auch eine verminderte Proliferationsrate nach TGF-beta1-Behandlung (vgl. 3.3.1). Da dieser Befund einen Einfluss von TGF-beta1 auf den Zellzyklus vermuten lässt, und in Vorarbeiten bereits belegt werden konnte, dass TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen zu einer Verschiebung des Zellzyklus hin zur G0/G1-Phase führt (Wachs *et al.*, 2006), war ein Ziel der vorliegenden Dissertation diese Verschiebung eingehender zu charakterisieren und zu beschreiben. Zur Charakterisierung der TGF-beta1-induzierten Veränderungen im Zellzyklus aNSZ wurde eine Immunfärbung gegen das Ki67-Antigen in Kombination mit einer DNA-Färbung (PI) durchgeführt und mittels einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse die Zellzyklusverteilung ermittelt. Dazu wurden aNSZ über einen Zeitraum

von sieben Tagen in Anwesenheit von TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen dissoziiert, fixiert und mit einem IgG-Kontroll- bzw. Ki67-Antikörper und PI gefärbt. Das Ki67-Antigen ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2/M) detektierbar, während es in ruhenden Zellen (G0-Phase) nicht nachweisbar ist. Abbildung 29 zeigt die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M der Kontrolle (A) und nach TGF-beta1-Stimulierung (B) anhand zweier beispielhafter, einparametrischer DNA-Histogramme (PI-Färbung). Verglichen mit der Kontrolle bewirkte die Inkubation mit TGF-beta1 eine deutliche Erhöhung der G0/G1-Phase-Fraktion. So mit konnten die Daten aus den Vorarbeiten bestätigt werden.

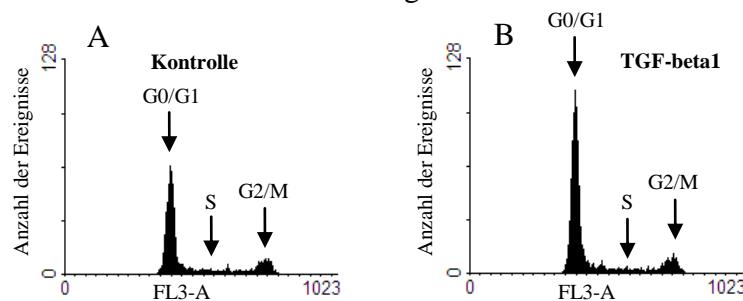


Abbildung 29: Repräsentative einparametrische DNA-Histogramme von PI-gefärbten Zellen einer A) kontroll-behandelten Kultur und B) einer TGF-beta1-behandelten Kultur. aNSZ wurden im Vorfeld für 7 Tage mit TGF-beta1 oder HCl/BSA kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und mittels PI gefärbt. Schließlich wurden die einparametrischen DNA-Histogramme am Durchflusszytometer aufgezeichnet. Der DNA-Gehalt wird anhand der Auftragung der Anzahl der Ereignisse gegen die Signalfäche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) dargestellt. Die G0/G1-Phase-Fraktion der TGF-beta1-behandelten Zellen ist gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht.

Um die genaue Position TGF-beta1-behandelter aNSZ im Zellzyklus zu bestimmen, wurden die am Durchflusszytometer gemessenen Daten mit der Software Win MDI 2.8. im Hinblick auf die Zellzyklusverteilung ausgewertet, indem die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt wurden. In den Abbildungen 30 und 31 sind die wichtigsten, zur Auswertung relevanten Messungen exemplarisch dargestellt. Abbildung 30 zeigt eine repräsentative Immunfärbung gegen Ki67 mit zusätzlicher DNA-Färbung von kontroll-behandelten Zellen. In Teilabbildung A ist in einem zweiparametrischen Dot-Plot die Granularität der Zelle (SSC-H) gegen ihre Größe (FSC-H) aufgetragen. Zelltrümmer und Farbstoffaggregate, die sich durch schwache FSC- und SSC-Signale auszeichnen, wurden bereits von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Es ist nur die Zellpopulation vitaler Zellen dargestellt, die für die weitere Analyse ausgewählt wurde. Um auch Zelldoublets von der Auswertung auszuschließen, wurde in einem weiteren Dot-Plot die Signalfäche der PI-Fluoreszenz (FL3-A, Signalintegral) auf der Ordinate gegen die Signalweite der PI-Fluoreszenz (FL3-W, Signaldauer) auf der Abszisse aufgetragen und die gewünschte Zellpopulation durch die Region R1 markiert (Teilabbildung 30 B). Die darin enthaltenen Zellen wurden dann in

einer zusätzlichen Auftragung der Signalhöhe der Ki67-Fluoreszenz (FL1-H) gegen die Signalfläche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) veranschaulicht (Teilabbildung 30 C). Die Region R2, welche die Ki67-negativen Zellen markiert und Region R3 (G0-Phase-Zellen) beinhaltet, wurde anhand der IgG/PI-Färbung von kontroll-behandelten Zellen festgelegt. Davon ausgehend wurden die Regionen R3 (G0-Phase-Zellen), R4 (G1-Phase-Zellen), R5 (S-Phase-Zellen) und R6 (G2/M-Phase-Zellen) zur Quantifizierung der Ki67-immunreaktiven Zellen definiert und schließlich mittels Win MDI 2.8. die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen berechnet.

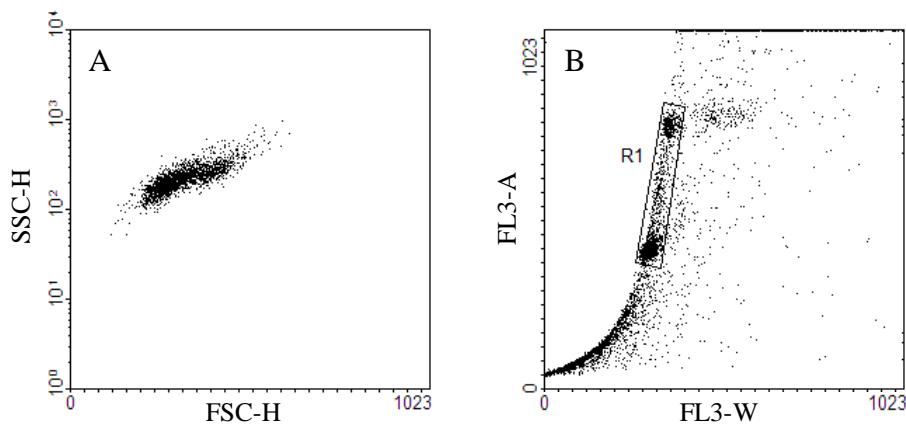


Abbildung 30: Repräsentative Dot-Plots kontroll-behandelter Zellen. aNSZ wurden für 7 Tage mit HCl/BSA kultiviert. Dann wurden sie fixiert und mit einem Antikörper gegen Ki67 und PI gefärbt, bevor sie am FACS vermessen wurden. A: Gating in einem FSC (Größe der Zellen)/SSC (Granularität der Zellen)-Dot-Plot: Es sind nur die Zellen gezeigt, die für die weitere Analyse ausgewählt wurden. B: Die in A ausgewählten Zellen sind in einer Auftragung der Signalfläche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) gegen die Signalweite der PI-Fluoreszenz (FL3-W) abgebildet. Durch die Region R1 werden Zelldoublets von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. C: Auftragung der Signalhöhe der Ki67-Fluoreszenz (FL1-H) gegen die Signalfläche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) der in R1 markierten Zellpopulation. Ki67-immunreaktive Zellen werden den Regionen R4 (G1-Phase), R5 (S-Phase) und R6 (G2/M-Phase) zugeordnet. G0-Phase-Zellen finden sich innerhalb R3.

Abbildung 31 gibt die Verhältnisse in TGF-beta1-behandelten Zellkulturen wieder. Auch hier ist beispielhaft eine Immunfärbung gegen Ki67 mit zusätzlicher DNA-Färbung abgebildet. Die Auswertung erfolgte in analoger Weise zu der Auswertung der kontroll-behandelten Zellen, außer dass die Region R2, welche die Ki67-negativen Zellen markiert und Region R3 (G0-Phase-Zellen) beinhaltet, anhand der IgG/PI-Färbung von TGF-beta1-behandelten Zellen festgelegt wurde. Zur Quantifizierung der Ki67-immunreaktiven Zellen in TGF-beta1-behandelten Kulturen wurden die Regionen R3 (G0-Phase-Zellen), R4 (G1-Phase-Zellen), R5

(S-Phase-Zellen) und R6 (G2/M-Phase-Zellen) definiert und mit Hilfe von Win MDI 2.8. die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen errechnet.

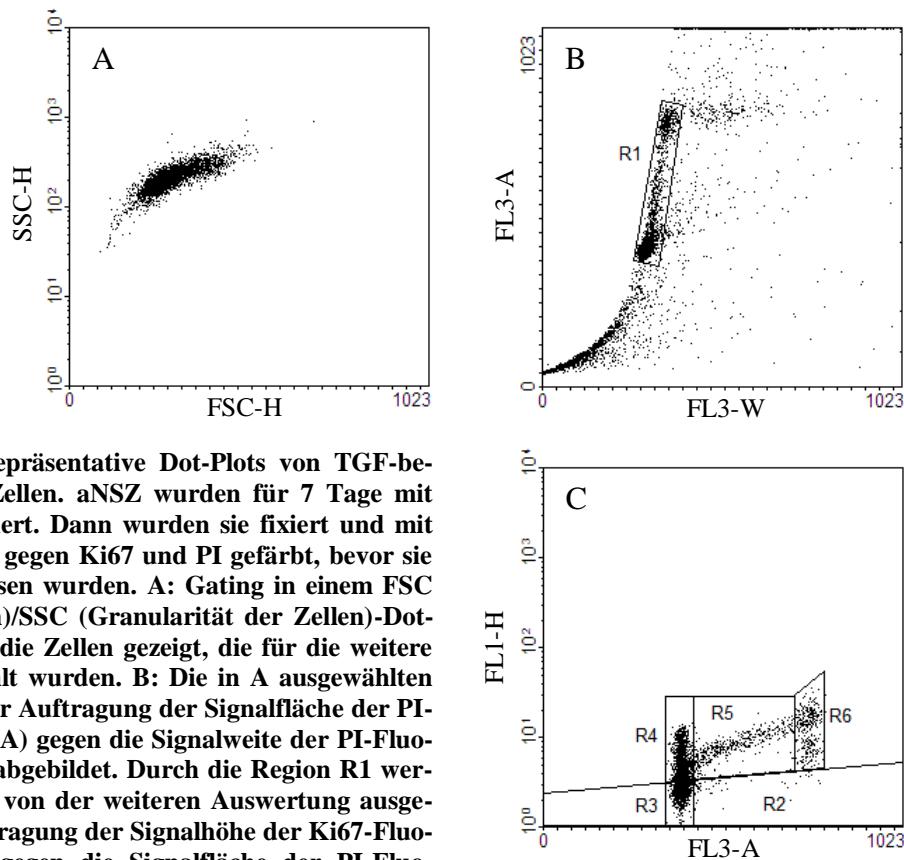


Abbildung 31: Repräsentative Dot-Plots von TGF-beta1-behandelten Zellen. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 kultiviert. Dann wurden sie fixiert und mit einem Antikörper gegen Ki67 und PI gefärbt, bevor sie am FACS vermessen wurden. A: Gating in einem FSC (Größe der Zellen)/SSC (Granularität der Zellen)-Dot-Plot: Es sind nur die Zellen gezeigt, die für die weitere Analyse ausgewählt wurden. B: Die in A ausgewählten Zellen sind in einer Auftragung der Signalfläche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) gegen die Signalweite der PI-Fluoreszenz (FL3-W) abgebildet. Durch die Region R1 werden Zelldoublets von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. C: Auftragung der Signalhöhe der Ki67-Fluoreszenz (FL1-H) gegen die Signalfäche der PI-Fluoreszenz (FL3-A) der in R1 markierten Zellpopulation. Ki-67-immunreaktive Zellen werden den Regionen R4 (G1-Phase), R5 (S-Phase) und R6 (G2/M-Phase) zugeordnet. G0-Phase-Zellen finden sich innerhalb R3.

Die Mittelwerte aus jeweils drei durchgeführten, unabhängigen Messungen für kontroll- und TGF-beta1-behandelte Zellen sind in Abbildung 32 mit der zugehörigen Standardabweichung in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die Quantifizierung der Zellzahlen in den einzelnen Zellzyklusphasen ergab eine signifikante Erniedrigung der S-Phase-Fraktion in TGF-beta1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle von 16,4 % auf 13,2 %. Demgegenüber steht ein nahezu konstanter G2/M-Phase-Anteil (Kontrolle: 7,2 %; TGF-beta1: 5,7 %) und ein ebenfalls nicht signifikant veränderter G1-Phase-Anteil von 48,7 % in kontroll-behandelten Kulturen und 39,2 % nach TGF-beta1-Behandlung. Am stärksten beeinflusst zeigte sich die G0-Phase-Fraktion, die in TGF-beta1-behandelten Zellen signifikant erhöht war. So resultierte die Inkubation mit TGF-beta1 in einem Anstieg der Ki67-defizienten Zellen auf 38,5 %, während nur 24,8 % der Kontrollzellen der quieszenten G0-Phase zugeordnet werden konnten.

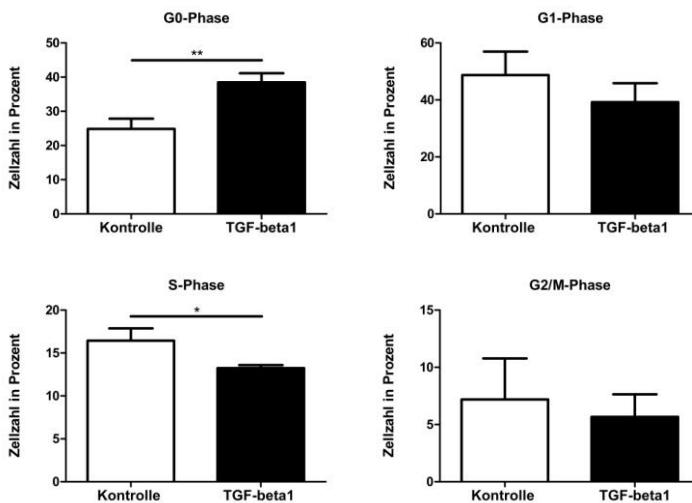


Abbildung 32: Quantifizierung der prozentualen Anteile aNSZ in den verschiedenen Zellzyklusphasen nach 7-tägiger Kultivierung mit und ohne TGF-beta1. Nach TGF-beta1-Behandlung war der Anteil an Ki67-negativen G0-Phase-Zellen signifikant erhöht, während die S-Phase-Fraktion signifikant erniedrigt war. Die berechneten Anteile der Ki67-immunreaktiven Zellen in der G1- und G2/M-Phase ließen keine Unterschiede zwischen kontroll- und TGF-beta1-behandelten Kulturen erkennen. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Messungen mit der Standardabweichung gezeigt. *p<0.05; **p<0.01

Insgesamt waren 72,3 % der Kontrollzellen immunaktiv für den Proliferationsmarker Ki67; in TGF-beta1-behandelten Kulturen konnte nur in 58,1 % der Zellen die Expression von Ki67 nachgewiesen werden. Somit konnte die in Kap. 3.3.1 beschriebene Inhibierung der Zellproliferation durch TGF-beta1, welche anhand eines MTT-Assays nachgewiesen wurde, nochmals bestätigt werden. Diese lässt sich, wie gezeigt wurde, durch eine signifikant verminderte S-Phase-Fraktion erklären, die dadurch zustande kommt, dass aufgrund des Einflusses von TGF-beta1 38,5 % der Zellen den Zellzyklus verlassen und in die quieszente G0-Phase übergehen.

3.6.2. Charakterisierung der molekularen Veränderungen in der Expression von Zellzyklusgenen nach TGF-beta1-Behandlung

Zur allgemeinen Charakterisierung der molekularen Veränderungen in aNSZ-Kulturen in Abhängigkeit von TGF-beta1 wurde eine DNA-Array-Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden aNSZ sieben Tage in Anwesenheit von TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) kultiviert und anschließend die Expressionsänderung einer Vielzahl an Genen untersucht. Auffallend war dabei, dass zahlreiche regulierte Gene dem Bereich des Zellzyklus zugeordnet werden konnten. Diese sind in der folgenden Tabelle 21 als Übersicht zusammengefasst. Besonders hervorzuheben ist die veränderte Expression mehrerer Cycline nach TGF-beta1-Behandlung wie Cyclin D2, Cyclin E, Cyclin G1 und Cyclin B1, welche eine entscheidende Rolle bei der Progression der Zellen im Zellzyklus spielen. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Mehrzahl der regulierten Zellzyklus-assoziierten Gene eine vermin-

derte Expression nach TGF-beta1-Behandlung aufweist, was die proliferationshemmende Wirkung von TGF-beta1 weiter verdeutlicht.

Name des Gens	Regulation
quiescin Q6	↑
cyclin D2	↑
von Hippel-Lindau syndrome homolog	↑
response gene to complement 32	↑
Synaptonemal complex protein 3	↑
calmodulin 1	↑
signal transducer and activator of transcription 1	↑
prothymosin alpha	↓
nuclear distribution gene C homolog (Aspergillus)	↓
nuclear autoantigenic sperm protein	↓
mediator of DNA damage checkpoint 1	↓
tumor protein p53	↓
polo-like kinase 1 (Drosophila)	↓
acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member B	↓
Hexokinase 2	↓
cyclin E	↓
mini chromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae)	↓
karyopherin (importin) alpha 2	↓
chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	↓
cyclin G1	↓
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	↓
apoptosis antagonizing transcription factor	↓
mitogen activated protein kinase 3	↓
guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	↓
cyclin B1	↓
cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	↓
nucleophosmin 1 /// similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38)	↓
myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	↓
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	↓

Tabelle 21: Übersicht über die veränderte Expression Zellzyklus-assozierter Gene nach TGF-beta1-Behandlung. aNSZ wurden für 7 Tage mit TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurden die Expressionsänderungen mittels einer DNA-Array-Analyse untersucht.

3.7. Der Einfluss von TGF-beta1 und BMPs auf die Differenzierung aNSZ unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen

Um den Einfluss von TGF-beta1 bzw. BMP2 und BMP4 auf die Differenzierung aNSZ unter gezielten oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen zu untersuchen, wurden aNSZ aus der SVZ der Ratte in α-MEM mit 10 % FCS ausgesät (Tag 0). Am nächsten Tag erfolgte für einen Teil der Zellen ein Mediumwechsel zu mesenchymal konditioniertem Medium (MSC-CM). Direkt im Anschluss wurde TGF-beta1 oder BMP2 und BMP4 oder TGF-beta1 und BMP2 und BMP4 jeweils in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Ein weiterer Mediumwechsel mit erneuter Zugabe der Faktoren wurde an Tag 5 durchgeführt. An Tag 8 wurden die Zellen einer immunzytochemischen Untersuchung unterzogen. Abbildung

33 zeigt die Immunfluoreszenzfärbungen gegen die Proteine GFAP (Astrozyten) und Mbp (Oligodendrozyten). Teilabbildung A gibt deren Expression bei unterschiedlichen Bedingungen in α -MEM-Kontroll-Medium wieder, Teilabbildung B dokumentiert die Expression unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen in MSC-CM. Die Quantifizierung der Astrozyten in der α -MEM-Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen (Kontrolle, TGF-beta1, BMPs, BMPs + TGF-beta1), wenngleich sich die in der Literatur vielfach beschriebene, fördernde Wirkung der BMPs auf die Differenzierung in Astrozyten (Samanta & Kessler, 2004) etwas abzeichnete (Abbildung 33 C).

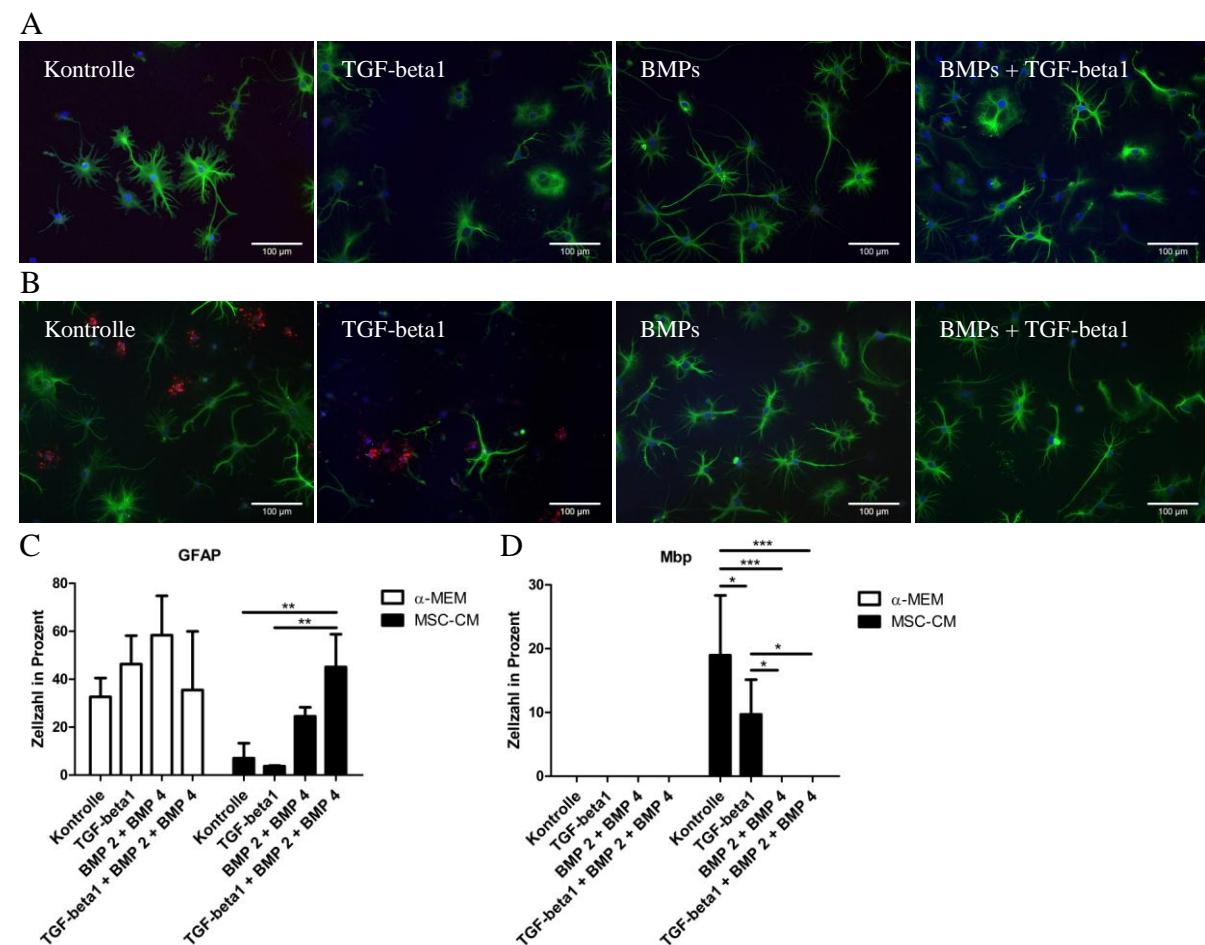


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbungen gegen GFAP (grün) und Mbp (rot). aNSZ wurden für 8 Tage in α -MEM-Kontroll-Medium (A) oder MSC-CM (B) bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und anschließend gefärbt. Die Kernfärbung (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. C) Quantifizierung der GFAP-Expression. Die α -MEM-Kontrollgruppe wies keine wesentlichen Unterschiede auf. Dagegen war die GFAP-Expression in der MSC-CM-Gruppe nach simultaner TGF-beta1- und BMP-Applikation gegenüber der MSC-CM-Kontrolle signifikant erhöht. TGF-beta1 oder BMPs zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung in Astrozyten. D) Quantifizierung der Mbp-Expression. In der α -MEM-Kontrollgruppe wurden keine Mbp-positiven Zellen detektiert. Die Kultivierung in MSC-CM ohne zusätzliche Faktoren förderte die Differenzierung in Oligodendrozyten; diese wurde allerdings durch TGF-beta1 oder/und BMPs signifikant reduziert. Messbalken = 100 µm. n=3; *p<0.05; **p<0.01; p***<0.001

Unter dem Einfluss von MSC-CM zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen. Zwar nahm TGF-beta1, in klarer Übereinstimmung mit den Ergeb-

nissen der DNA-Array-Analyse (vgl. 3.3.2.), keinen Einfluss auf die GFAP-Expression. Allerdings war der Anteil an GFAP-exprimierenden Astrozyten nach der gemeinsamen Applikation von TGF-beta1 und BMPs gegenüber der MSC-CM-Kontrolle signifikant erhöht, während BMPs alleine die GFAP-Expression nicht wesentlich anhoben. Letzteres könnte möglicherweise auf die bereits in der Literatur beschriebene, inhibierende Wirkung von MSC-CM auf die Differenzierung in Astrozyten (Rivera *et al.*, 2006) zurückzuführen sein, die im Rahmen dieses Versuchs auch verifiziert werden konnte (vgl. α -MEM-Kontrolle mit MSC-CM-Kontrolle). Offensichtlich dominiert dieser Effekt über die astrozytäre Wirkung der BMPs. Die Analyse der Mbp-Expression ergab keine Mbp-positiven Zellen in allen Bedingungen der α -MEM-Kontrollgruppe (Abbildung 33 D). Der prozentuale Anteil der Mbp-exprimierenden Oligodendrozyten in der MSC-CM-Kontrolle war gegenüber der α -MEM-Kontrolle jedoch signifikant erhöht, was den bereits beschriebenen Einfluss von MSC-CM auf die oligodendrogliale Differenzierung belegt (Rivera *et al.*, 2006). Nach TGF-beta1-Behandlung fand sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der DNA-Array-Analyse (vgl. 3.3.2.) dieser Dissertation, eine signifikant reduzierte Anzahl an Mbp-exprimierenden Zellen. Die Kultivierung in Anwesenheit von BMPs bzw. BMPs und TGF-beta1 führte darüber hinaus sogar zu einer totalen Inhibition der Oligodendrogenese.

In Abbildung 34 sind die Immunfluoreszenzfärbungen gegen A2B5 (gliale Vorläuferzellen) und GFAP gezeigt. Teilabbildung A veranschaulicht die Expression in α -MEM-Kontroll-Medium bei den verschiedenen Bedingungen. Teilabbildung B dokumentiert die Expression unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen.

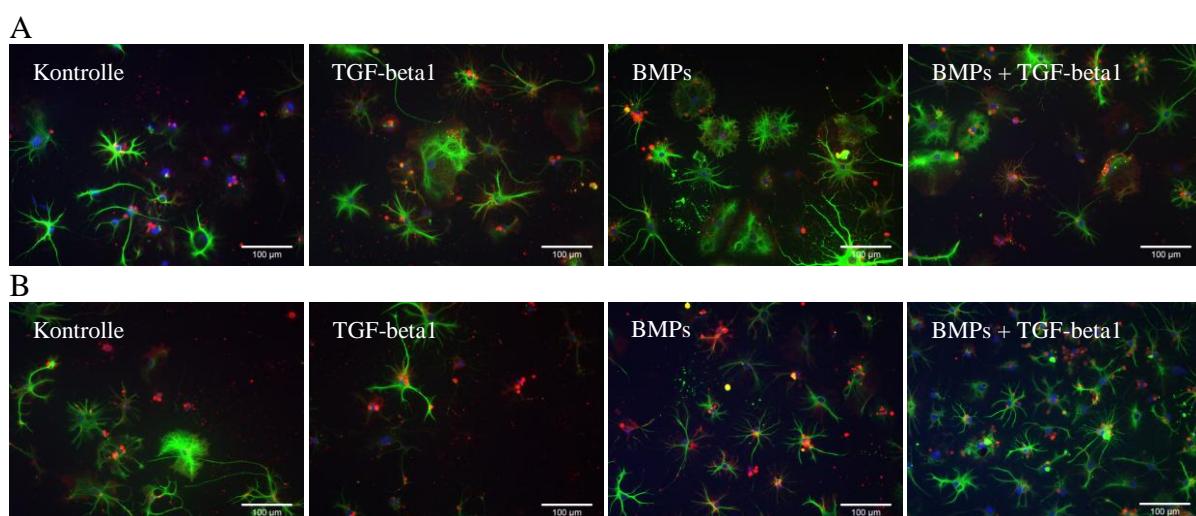


Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbungen gegen A2B5 (rot) und GFAP (grün). aNSZ wurden für 8 Tage in α -MEM-Kontroll-Medium (A) oder MSC-CM (B) bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und anschließend gefärbt. Die Kernfärbung (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Messbalken = 100 µm.

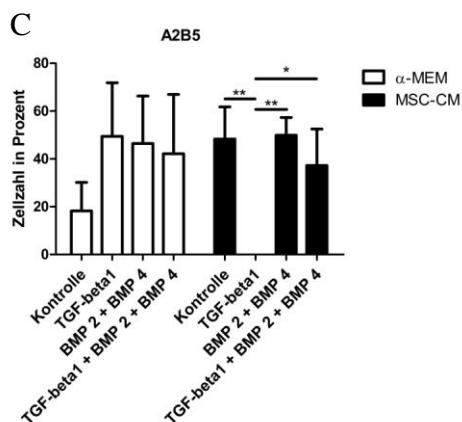


Abbildung 34 (Fortsetzung): Immunfluoreszenzfärbungen gegen A2B5 (rot) und GFAP (grün). C) Quantifizierung der A2B5-Expression. Innerhalb der α -MEM-Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl an glialen Vorläuferzellen. Die Kultivierung in MSC-CM in Anwesenheit von TGF-beta1 führte allerdings zu einer drastischen Reduktion der A2B5-positiven glialen Vorläuferzellen. BMPs und BMPs in Kombination mit TGF-beta1 hatten dagegen keinen Einfluss auf die gliale Differenzierung. n=3; *p<0.05; **p<0.01

Der Vergleich der A2B5-Expression innerhalb der α -MEM-Kontrollgruppe ergab, wie auch bei der Analyse der GFAP- und Mbp-Expression, keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 34 C). Auch die Anzahl der glialen Vorläuferzellen in der MSC-CM-Kontrolle bewegte sich auf einem ähnlichen Niveau. Interessanterweise führte die Kultivierung in MSC-CM mit TGF-beta1 aber zu einem vollständigen Verlust der A2B5-positiven glialen Vorläuferzellen, während weder BMPs noch BMPs in Kombination mit TGF-beta1 die A2B5-Expression gegenüber der MSC-CM-Kontrolle signifikant beeinflussten.

In Abbildung 35 sind Immunfärbcungen gegen den Neuronmarker Map2ab dargestellt. Teilabbildung A gibt die Expression in α -MEM-Kontroll-Medium bei verschiedenen Bedingungen wieder. Teilabbildung B zeigt die Expression unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen in MSC-CM.

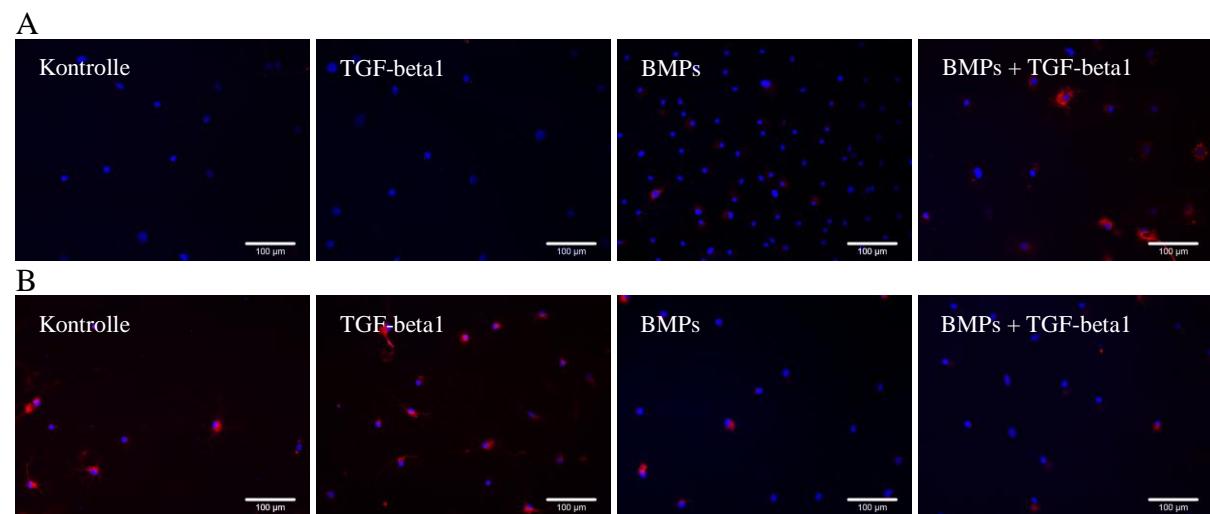


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbungen gegen Map2ab (rot). aNSZ wurden für 8 Tage in α -MEM-Kontroll-Medium (A) oder MSC-CM (B) bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und anschließend gefärbt. Die Kernfärbung (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Messbalken = 100 μ m.

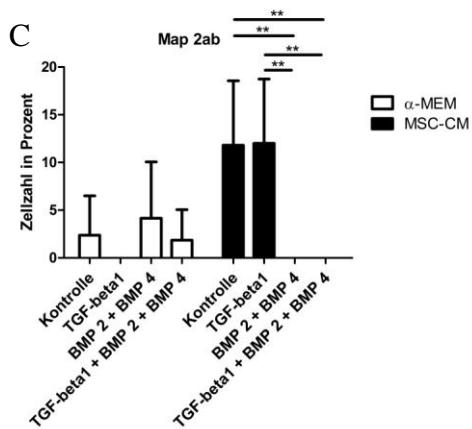


Abbildung 35 (Fortsetzung): Immunfluoreszenzfärbungen gegen Map2ab (rot). C) Quantifizierung der Map2ab-Expression. Die α -MEM-Kontrollgruppe wies keine signifikanten Unterschiede auf. In der MSC-CM-Gruppe konnten Map2ab-positive Zellen nur in der Kontrolle und nach TGF-beta1-Behandlung detektiert werden. Durch die Anwendung von BMPs und BMPs in Kombination mit TGF-beta1 wurde die Bildung von Neuronen vollständig inhibiert. n=3; **p<0.01

Die im Allgemeinen sehr geringe Map2ab-Expression war innerhalb der α -MEM-Kontrollgruppe relativ konstant (Abbildung 35 C). In der MSC-CM-Gruppe konnten Map2ab-positive Neurone lediglich in der Kontrolle und nach TGF-beta1-Behandlung detektiert werden. Die Anwendung von BMPs führte dagegen zu einer totalen Inhibierung der neuronalen Differenzierung. Darüber hinaus wurde beim Vergleich der Kontrollen der α -MEM- und MSC-CM-behandelten Kulturen deutlich, dass die Kultivierung aNSZ in MSC-CM die Differenzierung in Neurone nicht wesentlich beeinflusst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anwendung von TGF-beta1 oder BMPs die Differenzierung aNSZ in Astrozyten und Oligodendrozyten unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen, jeweils verglichen mit der Kontrolle, in ähnlicher Weise beeinflusst. Anders verhält es sich für die A2B5-Expression. Während TGF-beta1 die A2B5-Expression in MSC-CM vollständig inhibiert, zeigt sich diese nach BMP-Behandlung unverändert. In Bezug auf die Map2ab-Expression verhält es sich gerade umgekehrt; so inhibieren BMPs die Map2ab-Expression, wohingegen TGF-beta1 keinen Einfluss darauf nimmt.

4. Ergebnis II: Der Einfluss von TGF-beta1 auf eine neu generierte aNSZ-Kultur (P0)

Da gerade zu Beginn einer aNSZ-Kultur die Kultivierungsdauer bis zum 1. Passagieren starken Schwankungen unterliegt, die eine gemeinsame Auswertung mehrerer Experimente erschweren, ist in der Folge ein Experiment aus insgesamt 3 durchgeföhrten Experimenten exemplarisch dargestellt. Der Vergleich der kontroll- und TGF-beta1-behandelten Kulturen hinsichtlich der Sphäreanzahl und -größe, der Expansion und des Phänotyps der Zellen in den Kulturen lieferte jedoch in allen drei Experimenten sehr konstante Ergebnisse.

4.1. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Größe und Anzahl der Spheres sowie den Phänotyp einer neu generierten aNSZ-Kultur

Um den Einfluss von TGF-beta1 auf eine neu generierte aNSZ-Kultur zu untersuchen, wurden aNSZ aus der SVZ der Ratte präpariert und von Beginn der Kultur an zweimal wöchentlich, jeweils an festgelegten Tagen, mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt. Im Verlauf der Kultivierung wurden nach 6, 12 und 19 Tagen Phasenkontrastaufnahmen erstellt, und so die Entwicklung der Kulturen zum Vergleich dokumentiert (Abbildung 36).

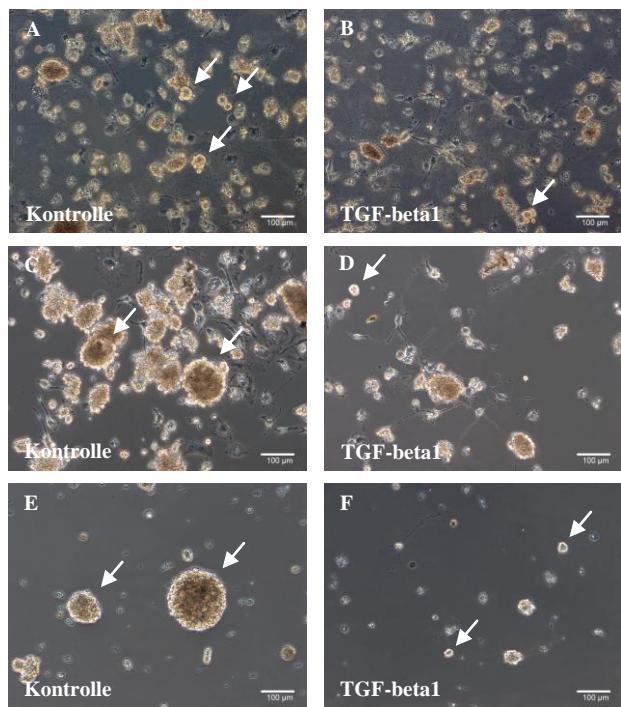


Abbildung 36: Phasenkontrastaufnahmen von kontroll- (A, C, E) und TGF-beta1-behandelten (B, D, F) aNSZ-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. aNSZ wurden von Beginn der Kultur an zweimal wöchentlich mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) stimuliert. Die Spheres sind durch Pfeile gekennzeichnet. A) und B) Nach 6 Tagen der Kultivierung waren bereits deutlich mehr proliferierende Spheres in der kontroll-behandelten Kultur vorhanden. C) und D) Nach insgesamt 12 Tagen zeigten die Spheres zudem bereits deutliche Größenunterschiede. Während in TGF-beta1-behandelten Kulturen nur vereinzelt Spheres von geringer Größe anzutreffen waren, wiesen die Kontrollzellen deutlich mehr und bei Weitem größere Spheres auf. E) und F) Nach 19 Tagen in Kultur zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei die Größenunterschiede immer deutlicher wurden. B) D) F) TGF-beta1-behandelte Kulturen wiesen durchwegs adhärente Zellen mit teils neuron-artiger Morphologie auf. Messbalken = 100 µm.

Nach 6 Tagen in Kultur waren in den kontroll-behandelten Zellen bereits einige Spheres vorhanden. In den TGF-beta1-behandelten Kulturen konnten dagegen wesentlich weniger Spheres, die zudem kleiner waren, aufgefunden werden. Im Gegensatz zur Kontrolle wiesen diese Kulturen jedoch deutlich mehr adhärente Zellen mit teils neuron-artiger Morphologie auf (Abbildung 36 A und B). Nach 12-tägiger Kultivierung zeigten die Kontroll-Kulturen schön geformte, große Spheres, während die TGF-beta1-behandelten Zellen nur vereinzelt Spheres hervorbrachten. Diese wiesen außerdem beträchtliche Größenunterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf; so waren die Spheres nur unwesentlich größer als nach 6 Tagen in Kultur. Ferner waren auch nach 12 Tagen in der TGF-beta1-behandelten Kultur sehr viel mehr adhärente Einzelzellen mit ausgeprägten Fortsätzen und neuronalem Phänotyp detektierbar. Die wenigen adhärenten Zellen der Kontrolle ließen dagegen eher Charakteristika von Fibroblasten oder Mikroglia erkennen (Abbildung 36 C und D). Nachdem die Zellen nach 12 Tagen in Kultur zum ersten Mal passagiert (P0 nach P1) und im Anschluss für weitere 7 Tage kultiviert worden waren, bildeten die kontroll-behandelten Zellen viele schöne, große Spheres. Die TGF-beta1-behandelte Kultur schien sich zwar langsam zu etablieren, da die Anzahl der generierten Spheres etwas zunahm. Allerdings war sowohl die Anzahl sowie die Größe der Spheres gegenüber der Kontrolle immer noch deutlich limitiert. Auch konnten wiederum adhärente Zellen mit neuron-artiger Struktur aufgefunden werden (Abbildung 36 E und F).

Nach insgesamt 19 Tagen in Kultur wurde die Anzahl der Spheres in beiden Kulturen unter dem Mikroskop ermittelt. Während die Kontroll-Kultur 132 Spheres enthielt, konnten in der TGF-beta1-behandelten Kultur nur 99 Spheres gezählt werden.

4.2. Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Expansion einer neu generierten aNSZ-Kultur

Zur Beurteilung der Expansion einer neu generierten, mit TGF-beta1 behandelten aNSZ-Kultur, wurden aNSZ aus der SVZ der Ratte präpariert, und im Anschluss gleichmäßig auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt. Von Beginn der Kulturen an wurden diese zweimal wöchentlich, jeweils an festgelegten Tagen, entweder mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder mit 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt. Bereits beim 1. Passagieren (P0 nach P1) nach 12 Tagen in Kultur waren deutliche Unterschiede zwischen beiden Ansätzen in Bezug auf die Anzahl der Zellen erkennbar. Während die kontroll-behandelte Kultur am Ende von P0 10,5 x

10^5 Zellen enthielt, waren in der TGF-beta1-behandelten Kultur nur $6,5 \times 10^5$ Zellen vorhanden (Abbildung 37).

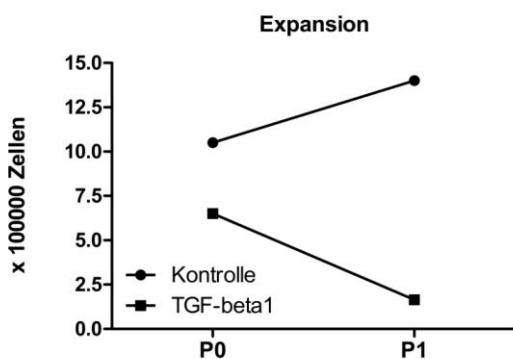


Abbildung 37: Exemplarische Veranschaulichung der Expansion einer neu generierten aNSZ-Kultur mit und ohne TGF-beta1-Behandlung. Neu generierte aNSZ-Kulturen (P0) aus der SVZ der Ratte wurden von Beginn der Kultur an, jeweils an 2 festgelegten Tagen der Woche, mit 10 ng/ml TGF-beta1 oder 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA (Kontrolle) behandelt und für 12 Tage kultiviert (P0). Anschließend wurden sie passagiert und in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in T25-Kulturflaschen ausgesät (P1). Dargestellt sind die ermittelten Zellzahlen am Ende von P0 und P1. Während die kontroll-behandelte Kultur stark expandierte, nahm die Zellzahl der TGF-beta1-behandelten Kultur drastisch ab.

Um die Kulturen besser vergleichen zu können, wurden im weiteren Verlauf nach jedem Passagieren gleiche Zellzahlen ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro T25-Kulturflasche) für kontroll- und TGF-beta1-behandelte Kulturen ausgesät. Beim 2. Passagieren der Zellen (P1 nach P2) nach insgesamt 22 Tagen in Kultur waren von den ursprünglich ausgesäten $2,5 \times 10^5$ P1-Zellen in der TGF-beta1-behandelten Kultur nur noch $1,65 \times 10^5$ Zellen auffindbar, das heißt, TGF-beta1 inhibierte die Expansion der aNSZ. Dies ist vermutlich zum einen auf eine verminderte Proliferation nach TGF-beta1-Behandlung, wie sie auch bei etablierten Kulturen nachweisbar ist (vgl. Kap. 3.3.1), zurückzuführen. Möglicherweise führt TGF-beta1 hier darüber hinaus, anders als in bereits etablierten Kulturen (vgl. Kap. 3.5.), auch zum Zelltod. Dies würde zumindest die deutlich unter der Ausgangszellzahl liegende Zellzahl am Ende der P1 erklären. In der Kontroll-Kultur waren dagegen 14×10^5 Zellen nachweisbar, was einem annähernd 6-fachen Anstieg der Zellzahl während 10 Tagen entspricht. Nach insgesamt 33 Tagen in Kultur wurden die Kulturen ein drittes Mal passagiert. Zu diesem Zeitpunkt waren von den TGF-beta1-behandelten Zellen nur noch so wenige Zellen vorhanden, dass sie nicht mehr sinnvoll ausgezählt werden konnten. Daher wurden alle noch vorhandenen Zellen direkt wieder ausgesät. Nach weiteren 4 Tagen der Kultivierung enthielt die TGF-beta1-behandelte Kultur überwiegend Zellschrott, während die kontroll-behandelten Zellen weiter proliferierten und expandierten.

5. Ergebnis III: Der Einfluss von BrdU auf eine aNSZ-Kultur

5.1. Der Einfluss von BrdU auf die Proliferation aNSZ

Um die Funktion von BrdU bei der Regulation der Proliferation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen zu bestimmen, wurden aNSZ-Kulturen, die aus der SVZ der Ratte generiert wurden, verwendet. Diese Kulturen wachsen als Spheres, die aus undifferenzierten, neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, und, zu einem geringeren Anteil, aus bereits determinierten Vorläuferzellen bestehen (Wachs *et al.*, 2006). Die Zugabe von BrdU in verschiedenen Konzentrationen von 1,0 µM bis 20,0 µM für 48 h verringerte die Expansionsrate der aNSZ-Kulturen signifikant auf etwa 60 % der Expansionsrate, die unter Kontrollbedingungen beobachtet wurde. Der maximale Effekt war dabei bereits bei einer Konzentration von 1,0 µM BrdU ersichtlich. 0,2 µM BrdU hatte hingegen keinen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation der aNSZ. Die Ergebnisse des durchgeföhrten MTS-Assays sind in Abbildung 38 gezeigt.

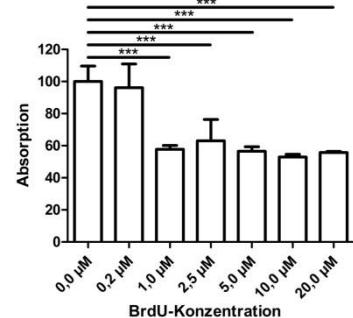


Abbildung 38: BrdU inhibiert die Proliferation von aNSZ *in vitro*. aNSZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 µM, 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM oder 20,0 µM zugesetzt. Kontrollzellen erhielten zum Zeitpunkt der Zugabe von BrdU entsprechende Volumina an DPBS. Nach weiteren 48 h in Kultur zeigte der MTS-Assay eine verminderte Proliferation der Kulturen, die mit BrdU-Konzentrationen zwischen 1,0 µM und 20,0 µM behandelt wurden, an. n=4; ***p<0,001

5.2. Charakterisierung BrdU-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ

Da sich eine verminderte Proliferation aNSZ in einem veränderten Zellzyklus widerspiegeln sollte, wurde eine FACS-basierte Zellzyklusanalyse mit PI durchgeführt, um die beobachteten, inhibitorischen Einflüsse von BrdU auf aNSZ zu validieren. Dazu wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen BrdU-Konzentrationen zwischen 0,2 µM und 20,0 µM BrdU behandelt und schließlich die Zellzyklusprofile mit denjenigen von Kontrollzellen verglichen. Die Analyse des DNA-Gehalts indizierte eine BrdU-induzierte Verschiebung von der

G2/M- und S-Phase in Richtung der G0/G1-Phase (Abbildung 39). Erwartungsgemäß wurde eine statistisch signifikante Reduktion der Zellen in der S-Phase von 13 % (Kontrolle) auf ungefähr 8 % beobachtet, wenn BrdU in Konzentrationen über 0,2 µM eingesetzt wurde (Abbildung 39 B). Wieder wurde der maximale Effekt schon bei einer Konzentration von 1,0 µM BrdU erreicht, während die Anwendung von 0,2 µM BrdU keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der Zellen in der S-Phase hatte. Die FACS-Analyse wies weiter einen signifikanten Anstieg der G0/G1-Phase-Zellen von 63 % (Kontrolle) auf etwa 76 % (Abbildung 39 A) und eine signifikante Abnahme der G2/M-Phase-Zellen von 23 % (Kontrolle) auf 15 % (Abbildung 39 C) bei allen untersuchten BrdU-Konzentrationen (0,2 µM-20,0 µM) nach. Diese Ergebnisse belegen, dass die BrdU-Exposition zu einer ausgeprägten Veränderung in der Zellzyklusverteilung führt.

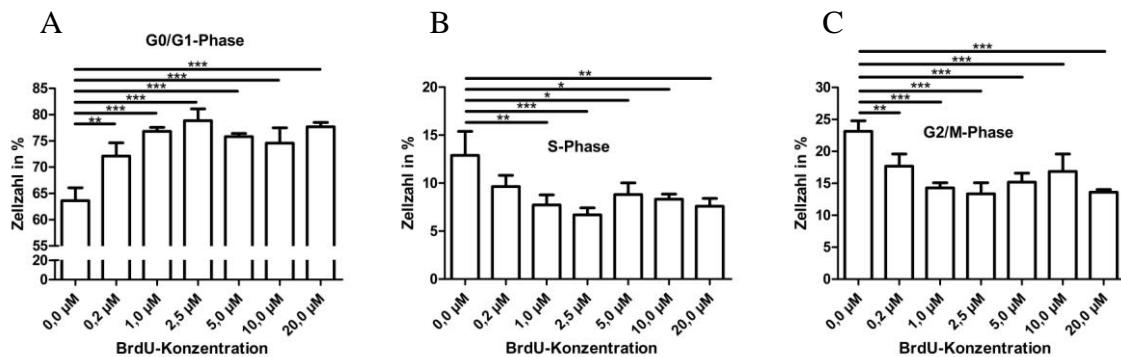


Abbildung 39: BrdU beeinflusst die Zellzyklusverteilung in aNSZ-Kulturen. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 µM, 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM oder 20,0 µM zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde eine DNA-Färbung mittels PI durchgeführt. Dann wurden die DNA-Histogramme am Durchflusszytometer gemessen, und die Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mit der Software Win MDI 2.8. quantifiziert. A) G0/G1-Phase. B) S-Phase. C) G2/M-Phase. Es sind jeweils die Mittelwerte aus $n=3 \pm$ Standardabweichung dargestellt. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass DC potentiellen BrdU-induzierten Störungen des Nukleotidstoffwechsels entgegenwirkt (Kaufman & Davidson, 1978; Davidson & Kaufman, 1979). Deshalb wurden die oben beschriebenen Experimente wiederholt, wobei DC in jeweils der halbäquimolaren Konzentration von BrdU in das Medium zugesetzt wurde. Die FACS-Analyse belegte eine signifikante Abnahme der S-Phase-Zellen von 19 % (Kontrolle) auf etwa 9 % (Abbildung 40 B) und einen ebenfalls signifikanten Anstieg der G0/G1-Phase-Zellen (Abbildung 40 A) von 60 % (Kontrolle) auf nähерungsweise 75 % bei allen untersuchten BrdU/DC-Konzentrationen (0,2 µM BrdU/0,1 µM DC-20,0 µM BrdU/10,0 µM DC). Im Gegensatz zu den BrdU-behandelten Zellen ohne DC, welche im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion der G2/M-Phase-Zellen zeigten (Abbildung 39 C), blieb die Anzahl der G2/M-Phase-Zellen nach der Inkubation mit BrdU und DC unverändert bei ca.

16 % (Abbildung 40 C). Beim Vergleich der BrdU- mit den BrdU/DC-behandelten Kulturen konnten dennoch keine signifikanten Verbesserungen in Bezug auf die Veränderung in der Zellzyklusverteilung nach BrdU-Behandlung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass DC nicht imstande war, die BrdU-induzierten Effekte zu minimieren.

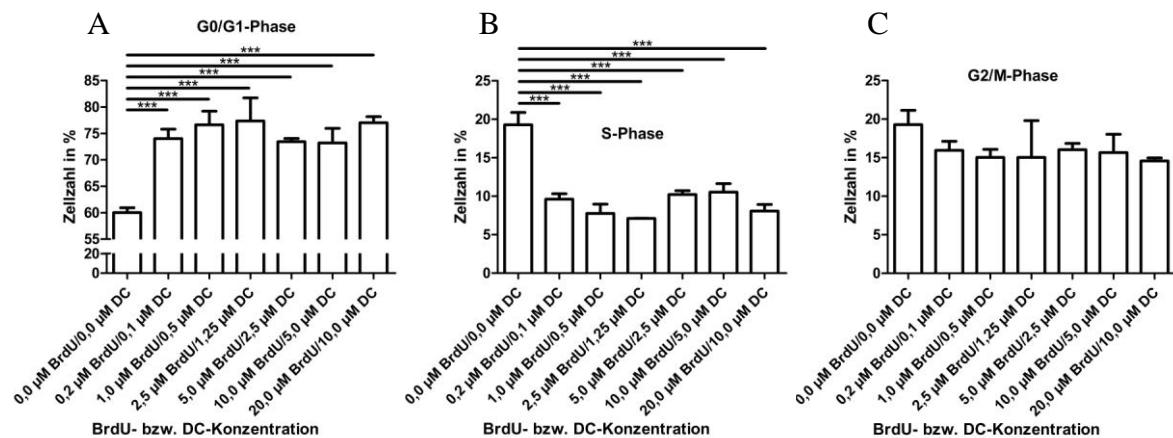


Abbildung 40: Die Inkubation mit DC führt nicht zur Beseitigung der BrdU-induzierten Effekte auf die aNSZ-Proliferation. aNSZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurden dem Kulturmedium BrdU und DC in einer Endkonzentration von 0,2 µM BrdU/0,1 µM DC, 1,0 µM BrdU/0,5 µM DC, 2,5 µM BrdU/1,25 µM DC, 5,0 µM BrdU/2,5 µM DC, 10,0 µM BrdU/5,0 µM DC oder 20,0 µM BrdU/10,0 µM DC zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde eine DNA-Färbung mittels PI durchgeführt. Dann wurden die DNA-Histogramme am Durchflusszytometer gemessen, und die Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mit der Software Win MDI 2.8. quantifiziert. A) G0/G1-Phase. B) S-Phase. C) G2/M-Phase. Es sind jeweils die Mittelwerte aus $n=3 \pm$ Standardabweichung dargestellt. ***p<0,001

5.3. Der Einfluss von BrdU auf den Zelltod in aNSZ-Kulturen

Um festzustellen, ob die Anwendung von BrdU Zelltod in aNSZ-Kulturen induziert, wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen BrdU-Konzentrationen von 0,2 µM bis 20,0 µM behandelt. Die anschließend durchgeführten LDH-Assays zeigten, dass eine Konzentration von nur 1,0 µM BrdU die Menge an LDH signifikant von 15 % (Kontrolle) auf etwa 25 % ansteigen ließ (Abbildung 41 A), während eine BrdU-Konzentration von 0,2 µM keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod hatte. Überraschenderweise war die Menge an LDH in den mit 2,5 µM und 5,0 µM BrdU behandelten Gruppen gegenüber der mit 1,0 µM BrdU behandelten Gruppe signifikant auf 23 % bzw. 24 % reduziert. Nichtsdestotrotz führten höhere Konzentrationen von 10,0 µM und 20,0 µM BrdU, im Vergleich zu den mit 2,5 µM und 5,0 µM BrdU behandelten Zellen, zu einem signifikant erhöhten Maß an Zelltod (27 % bzw. 26 %). Dies lässt auf einen dosisabhängigen Effekt von BrdU auf den Zelltod aNSZ schließen.

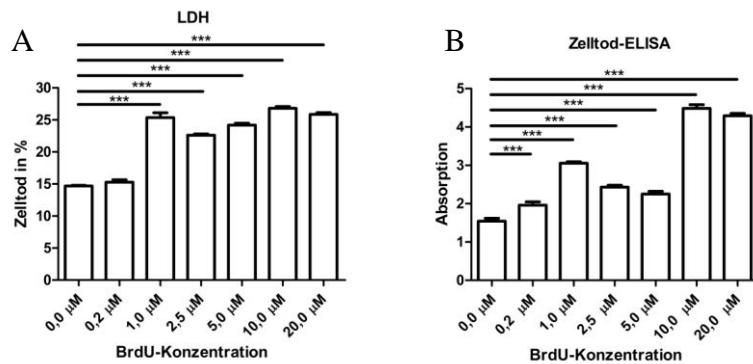


Abbildung 41: Die Inkubation mit BrdU verursacht Zelltod in aNSZ-Kulturen. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 μM , 1,0 μM , 2,5 μM , 5,0 μM , 10,0 μM oder 20,0 μM zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde A) ein LDH-Assay und B) ein Zelltod-ELISA durchgeführt. Beide wiesen einen dosisabhängigen Einfluss von BrdU auf den Zelltod in aNSZ-Kulturen nach. n=3; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Um die Beobachtung, dass BrdU Zelltod in aNSZ induziert, zu verifizieren, wurde darüber hinaus ein Zelltod-ELISA zum Nachweis von nekrotischem Zelltod durchgeführt. Wie in Abbildung 41 B veranschaulicht, wiesen unbehandelte Kulturen einen Absorptionswert von 1,5 auf (dieser Wert korreliert mit der Anzahl an Mono- und Oligonukleosomen, die von nekrotischen Zellen in den Zellkulturerstand freigesetzt werden). Während der LDH-Assay bei einer Konzentration von 0,2 μM BrdU keinen Effekt nachwies, ließ der Zelltod-ELISA erkennen, dass das Ausmaß an Nekrose hier bereits signifikant erhöht war. Darüber hinaus ließ die Zugabe von 1,0 μM BrdU die Quantität der Nekrose auf eine Absorption von 3,0 anwachsen. Bei der Anwendung höherer BrdU-Konzentrationen wie 2,5 μM und 5,0 μM war der Absorptionswert, im Vergleich zu den mit 1,0 μM BrdU behandelten Zellen, wie beim LDH-Assay, signifikant reduziert (Werte 2,4 und 2,2). Konzentrationen von 10,0 μM und 20,0 μM BrdU resultierten, verglichen mit der mit 2,5 μM und 5,0 μM behandelten Gruppe und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des LDH-Assays, in einem erhöhten Maß an Zelltod (Werte 4,4 und 4,3). Zusammenfassend bestätigen diese Experimente, dass die BrdU-Exposition zu einem Anstieg der nekrotischen Zellen in aNSZ-Kulturen führt.

5.4. Der Einfluss von BrdU auf die Adhäsion von aNSZ

Bei der Durchführung der vorherigen Experimente fiel auf, dass einige Neurosphäroiden während der 48-stündigen Inkubationsperiode mit BrdU adhärent wurden. Allerdings war der beobachtete Effekt abhängig von der verwendeten BrdU-Konzentration. Eine niedrige Konzentration von 0,2 μM BrdU hatte keinen Einfluss auf die Spheres, wohingegen einige wenige Spheres, die mit 1,0 μM BrdU behandelt worden waren, adhärent wurden. Im Gegen-

satz dazu führten Konzentrationen zwischen 2,5 μM und 20,0 μM BrdU zur Adhärenz bei nahe aller Neurosphäroiden in der Kultur (Abbildung 42).

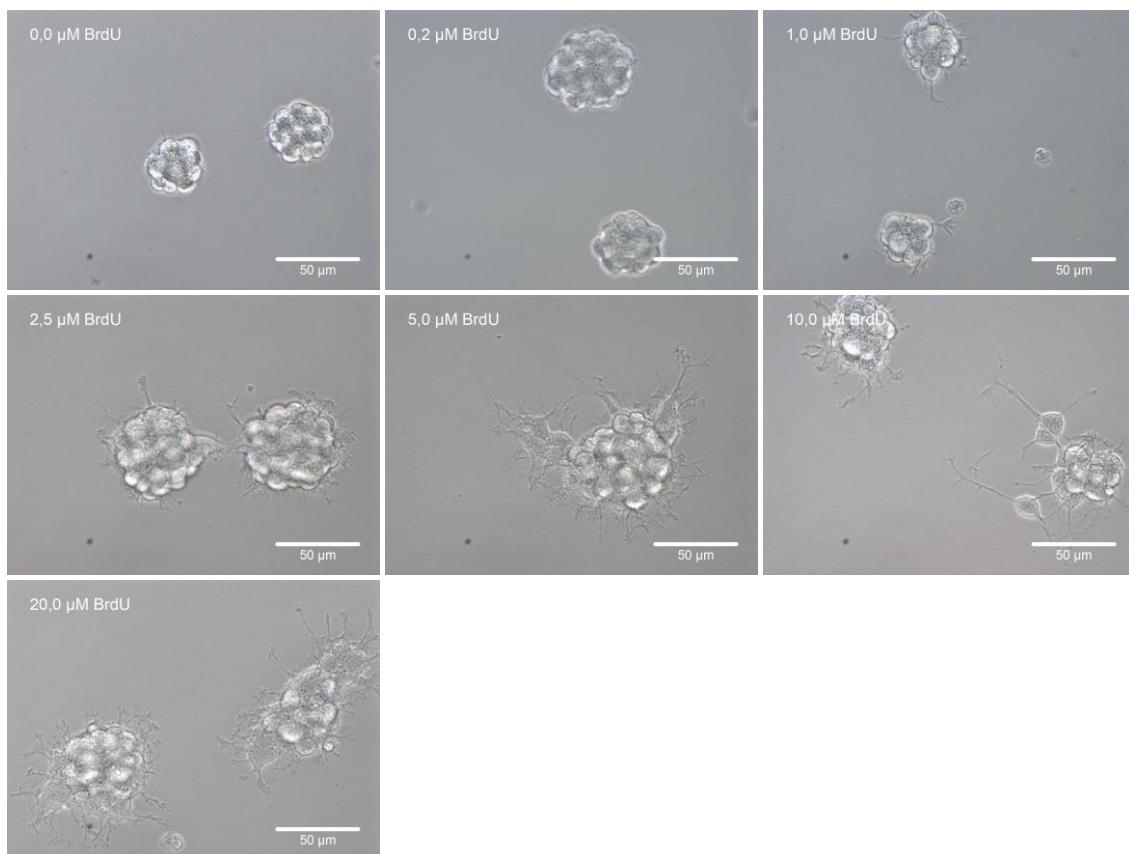


Abbildung 42: BrdU-Konzentrationen über 1,0 μM initiieren die Adhäsion von Neurosphäroiden. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 μM , 1,0 μM , 2,5 μM , 5,0 μM , 10,0 μM oder 20,0 μM zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurden in 40-facher Vergrößerung Phasenkontrastaufnahmen der Spheres erstellt. Messbalken = 50 μm .

Um diese Beobachtungen zu validieren, wurde ein MTT-Assay, der die Aktivität lebender Zellen über die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität misst, herangezogen. Der Assay wurde separat mit dem Zellkulturüberstand, der die freischwimmenden Spheres enthielt, sowie mit den adhärenten Zellen am Boden der Zellkulturplatte von kontroll- und BrdU-behandelten Zellen durchgeführt. Schließlich wurde die Absorption mithilfe eines 96-Well-Platten-Lesegeräts gemessen. Während die Behandlung mit 0,2 μM und 1,0 μM BrdU gegenüber den Kontrollzellen keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der Neurosphäroiden erkennen ließ, führte die Anwendung von BrdU in Konzentrationen von 2,5 μM bis 20,0 μM zu einem signifikanten Anstieg der Zahl adhärenter Zellen (Abbildung 43 A). Umgekehrt war die Anzahl der freischwimmenden Spheres im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert, wenn BrdU in Konzentrationen von 2,5 μM bis 20,0 μM zugesetzt wurde (Abbildung 43 B). Da es innerhalb dieser Konzentrationen keine Unterschiede im Hinblick auf die Adhärenz der Neurosphäroiden sowie die Anzahl der freischwimmenden Spheres im Überstand gab, waren die

durch BrdU verursachten Effekte in diesem Konzentrationsbereich dosisunabhängig. Eine Dosisabhängigkeit, die sich auf die Anzahl der freischwimmenden Spheres im Überstand auswirkte, zeigte sich dagegen im Bereich zwischen 1,0 μM und 2,5 μM BrdU. So wiesen zwar bereits Zellen, die mit 1,0 μM BrdU behandelt wurden, eine signifikant geringere Zahl an freischwimmenden Spheres im Überstand im Vergleich zur Kontrolle auf. Dieser Effekt war allerdings in den mit 2,5 μM BrdU behandelten Zellen noch deutlicher ausgeprägt, sodass sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konzentrationen ergab. Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass BrdU in Konzentrationen von 2,5 μM bis 20,0 μM die Adhäsion von Neurosphäroiden induziert.

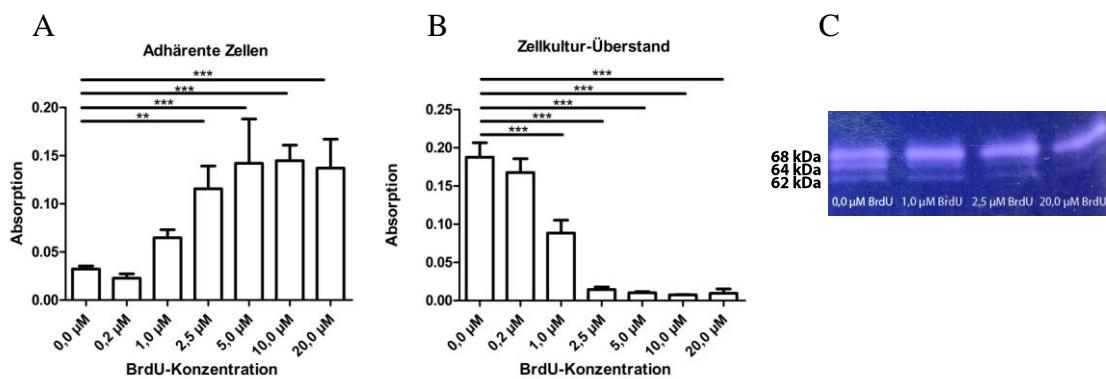


Abbildung 43: BrdU-Konzentrationen über 1,0 μM initiieren die Adhäsion von Neurosphäroiden. Ein reduziertes Maß an aktivem MMP-2 ist mutmaßlich für die Induktion der Adhärenz verantwortlich. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 μM , 1,0 μM , 2,5 μM , 5,0 μM , 10,0 μM oder 20,0 μM zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde ein MTT-Assay zur Bestimmung der Aktivität lebender Zellen, separat mit den adhärenten Zellen am Boden der Zellkulturplatte (A) und dem Zellkulturnüberstand (B), durchgeführt. Zudem wurde eine Gelatine-Zymografie herangezogen, um zu klären, ob MMP-2 an der Adhäsion der Neurosphäroiden beteiligt ist. C) Gelatine-Zymografie von MMP-2. Die Vermessung wurde von Christine Lehner durchgeführt. n=3; **p<0,01; ***p<0,001

Um mögliche Faktoren zu identifizieren, die in die Adhäsion der Neurosphäroiden nach BrdU-Behandlung involviert sind, wurde der Fokus auf Proteine der Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Familie gelegt. MMPs sind für ihre degradierende Wirkung auf extrazelluläre Matrix-Proteine bei regulären physiologischen Abläufen bekannt. Des Weiteren wird ihnen eine bedeutende Rolle im Hinblick auf die Proliferation, Migration (Adhäsion/Dispersion), Differenzierung und Apoptose von Zellen nachgesagt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Matrix-Metalloproteininasen an der Induktion der Adhärenz BrdU-behandelter Neurosphäroiden teilhaben könnten. Um diese Spekulationen zu untermauern, wurde die Gelatine-Zymografie zur Analyse der Zelllysate kontroll- und BrdU-behandelter Zellen in Bezug auf die Anwesenheit von gelatinolytisch aktivem Proenzym, der Aktivierungzwischenstufe und reifen Formen des Enzmals angewendet. Es wurden zwei der Schlüsseleffektoren der extrazellulären Matrix-Umgestaltung, nämlich MMP-2 und MMP-9,

analysiert. In kontroll- und 1,0 µM BrdU-behandelten Kulturen waren alle funktionsfähigen Formen des MMP-2-Enzyms, die bis dato beschrieben wurden (aktives MMP-2 mit einer Größe von 62 kDa, pro-MMP-2 mit ungefähr 68 kDa und die Aktivierungszwischenstufe mit 64 kDa), nachweisbar, wobei die Kontrolle die höchste Gelatinase-Aktivität aufwies (Abbildung 43 C). Zellen, die mit 2,5 µM BrdU behandelt wurden, verfügten ebenso über ein hohes Ausmaß an pro-MMP-2, wohingegen nur eine sehr geringe Menge an aktivem MMP-2 detektiert wurde. Dies deutet auf eine verringerte Migration, bedingt durch weniger aktives MMP-2, zugunsten verstärkter Adhärenz hin. In Übereinstimmung mit niedrigeren BrdU-Konzentrationen zeichneten sich die mit 20,0 µM BrdU behandelten Kulturen ebenfalls durch eine hohe Menge an pro-MMP-2 aus. Allerdings war die Doppelbande, die die aktiven Formen des MMP-2-Enzyms repräsentiert, in dieser Gruppe nicht vorhanden. Was MMP-9 anbelangt, wurde weder in den Zelllysaten von Kontrollzellen noch in denen BrdU-behandelter Zellen Enzym detektiert. Zusammengefasst implizieren diese Beobachtungen, dass ein reduziertes Maß an aktivem MMP-2 die Adhäsion BrdU-behandelter Neurosphäroiden bewirkt.

Um den Ablauf des Adhärierens zu visualisieren, wurde zusätzlich ein Zeitraffer-Video-Mikroskopie-Experiment durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 2,5 µM BrdU versetzt, und im Verlauf der nächsten 48 h, jeweils nach einem Intervall von 10 min, Aufnahmen erstellt. Der Zeitraffer-Film veranschaulichte, dass die Spheres 19 h nach der initialen BrdU-Behandlung anfingen, sich am Boden der Zellkulturflasche anzuheften und Verzweigungen auszubilden.

5.5. Der Einfluss von BrdU auf die Differenzierung aNSZ

Da BrdU häufig angewendet wird, um proliferierende Zellen zu markieren, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zudem die möglichen Effekte verschiedener BrdU-Konzentrationen zwischen 0,2 µM und 20,0 µM auf die Differenzierung aNSZ untersucht werden. Um zu beurteilen, ob aNSZ nach der Behandlung mit BrdU ihre ursprüngliche Fähigkeit zur Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten verlieren, wurde die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) eingesetzt und so das Ausmaß an Dcx-positiven, neuronalen Vorläuferzellen, GFAP-positiven Astrozyten und Mbp-positiven Oligodendrozyten bestimmt (Abbildung 44).

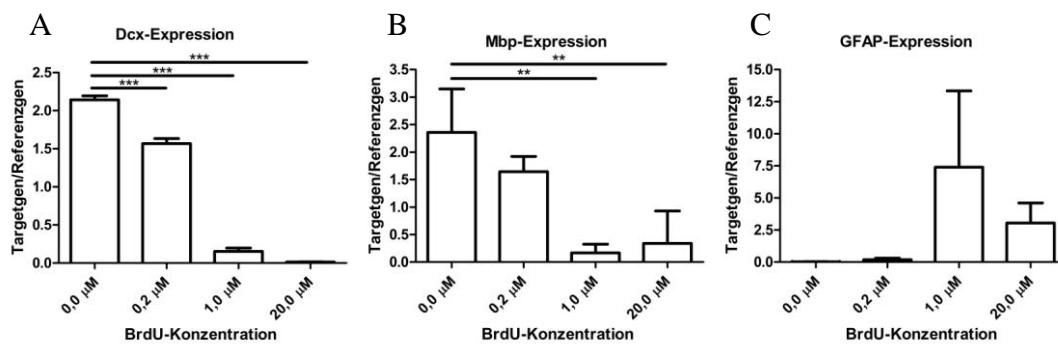


Abbildung 44: Die Kultivierung aNSZ mit BrdU beeinflusst den Phänotyp aNSZ. aNSZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 μ M, 1,0 μ M oder 20,0 μ M zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde ein Medienwechsel zu A) neuronalen, B) oligodendroglialen und C) astroglialen Differenzierungsbedingungen durchgeführt. Nach weiteren 7 Tagen wurde RNA isoliert und die Expression von A) Dcx (neuronale Vorläuferzellen), B) Mbp (Oligodendrozyten) und C) GFAP (Astrozyten) quantitativ ermittelt. Es sind die Mittelwerte aus $n=3 \pm SD$ dargestellt. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Nach 7-tägiger Inkubation unter neuronalen Differenzierungsbedingungen wurde durch die vorangegangene Anwendung von 0,2 μ M BrdU eine in hohem Maße signifikante Erniedrigung der relativen Dcx-mRNA-Expression von näherungsweise 2,1 (Kontrolle) auf 1,6 (0,2 μ M BrdU) induziert, was einer Abnahme der mRNA um das 1,3-fache entspricht (Abbildung 44 A). Zellen, die mit 1,0 μ M BrdU behandelt wurden, wiesen eine relative mRNA-Expression von 0,2 auf, die im Vergleich zu der mit 0,2 μ M BrdU behandelten Gruppe signifikant um das 8-fache reduziert war. In der mit 20,0 μ M BrdU behandelten Gruppe wurde dagegen eine gegen Null gehende Dcx-Expression detektiert. Diese Daten weisen auf einen dosisabhängigen Effekt von BrdU auf die Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Dcx im Konzentrationsbereich zwischen 0,0 μ M und 1,0 μ M BrdU hin. Eine höhere BrdU-Konzentration von 20,0 μ M verursachte keinen zusätzlichen, inhibitorischen Effekt, da die Abnahme der Dcx-mRNA, verglichen mit der mit 1,0 μ M BrdU behandelten Gruppe, nicht signifikant war. Zellen, welche für 7 Tage oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen ausgesetzt waren, zeigten einen signifikanten Abfall der Mbp-mRNA-Expression von 2,4 (Kontrolle) auf 0,2 in der mit 1,0 μ M BrdU behandelten Gruppe und 0,3 in der mit 20,0 μ M BrdU behandelten Gruppe (Abbildung 44 B). Im Unterschied dazu hatte die Anwendung von 0,2 μ M BrdU, verglichen mit der Kontrolle, keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Mbp. In den qRT-PCR-Analysen im Anschluss an die astroglialen Differenzierungsbedingungen war eine Tendenz in Richtung einer erhöhten Expression von GFAP-mRNA erkennbar, wenn BrdU in Konzentrationen von 1,0 μ M und 20,0 μ M eingesetzt wurde (Abbildung 44 C). Diese Beobachtung war allerdings nicht statistisch signifikant. Insgesamt deuten diese Daten auf eine veränderte Expression der Marker für neuronale Vorläuferzellen sowie reife Oligodendrozyten nach BrdU-Behandlung hin, wie anhand der Dcx- und Mbp-Expression ge-

zeigt wurde. Dies lässt auf einen abweichenden Verlauf der Zelldifferenzierung schließen, wenn aNSZ dem Thymidinanalogen BrdU ausgesetzt sind.

Um zu verifizieren, dass BrdU-behandelte aNSZ dennoch immer noch imstande sind, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu generieren, wurden aNSZ nach 7-tägiger Inkubation unter neuronalen, astrogialen oder oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen zusätzlich gegen die Differenzierungsmarker Map2ab (reife Neurone), GFAP (Astrozyten) und GalC (Oligodendrozyten) gefärbt. In Kontrollzellen und in der mit 0,2 µM BrdU behandelten Gruppe wurden hauptsächlich Oligodendrozyten und Astrozyten nachgewiesen. Dagegen war die Ausprägung der Map2ab-Expression, welche den neuronalen Phänotyp kennzeichnet, sehr gering. Interessanterweise konnten sowohl Map2ab- als auch GFAP-exprimierende Zellen in der mit 20,0 µM BrdU behandelten Gruppe detektiert werden (Abbildung 45). Zusammengefasst bestätigten die Immunfluoreszenzfärbungen, dass Zellen, die in Gegenwart von BrdU kultiviert werden, ihre multipotente Kapazität bewahren, wenngleich sich der Einbau von BrdU in die DNA auf den Phänotyp aNSZ-Kulturen auswirkt (vgl. Abbildung 44).

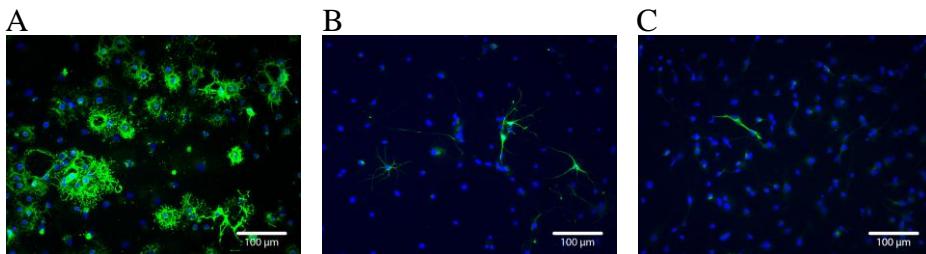


Abbildung 45: Die Kultivierung aNSZ mit 20,0 µM BrdU beeinträchtigt nicht deren Multipotenz. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von 0,2 µM oder 20,0 µM zugesetzt. Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation wurde ein Medienwechsel zu A) oligodendroglialen, B) astrogialen und C) neuronalen Differenzierungsbedingungen durchgeführt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen gegen A) GalC (Oligodendrozyten, grün), B) GFAP (Astrozyten, grün) und C) Map2ab (Neurone, grün) erstellt. Die Kernfärbung (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Messbalken = 100 µm.

5.6. Der Einfluss von BrdU auf die endogene Proliferation aNSZ *in vivo*

Um die Wirkung von BrdU auf die endogene Proliferation aNSZ *in vivo* zu untersuchen, wurden Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneale Injektionen von 50 mg/kg oder 200 mg/kg BrdU, gelöst in NaCl-Lösung, oder nur NaCl-Lösung als Kontrolle verabreicht. 48 h später wurden die Tiere intrakardial perfundiert. Die Zellproliferation wurde durch Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen im GD des HC analysiert (Abbildung 46 A). Nach der Injektion von BrdU wurde keine nennenswerte Reduktion der Zahl

PCNA-positiver Zellen im GD im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet, weder bei den mit 50 mg/kg BrdU noch bei den mit 200 mg/kg BrdU behandelten Tieren (Abbildung 46 B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Anwendung von BrdU *in vivo* in Dosierungen wie sie üblicherweise in Neurogenese-Studien eingesetzt werden, zumindest in der akuten Situation, nicht mit der Zellproliferation interferiert.

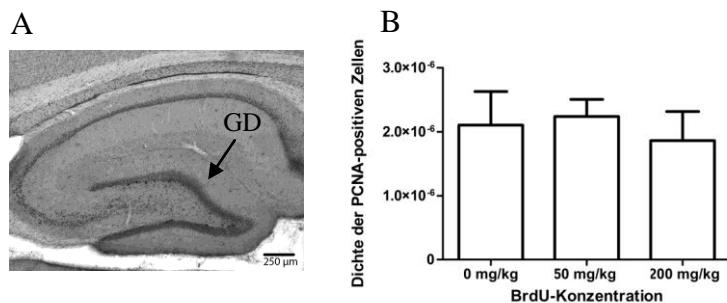


Abbildung 46: Die Markierung aNSZ mit BrdU wirkt sich nicht auf deren endogene Proliferation *in vivo* aus. 15 Fischer-344-Ratten wurden zufällig in Gruppen mit jeweils 5 Tieren eingeteilt. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden den Tieren intraperitoneale BrdU-Injektionen (50 mg/kg BrdU oder 200 mg/kg BrdU), gelöst in NaCl-Lösung, oder NaCl-Lösung als Kontrolle verabreicht. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Tiere perfundiert und die erstellten Gewebeschnitte der immunhistochemischen Untersuchung mittels einer chromogenen PCNA-Färbung unterzogen. A) PCNA-Färbung im HC. Messbalken = 250 µm. B) Die Quantifizierung der PCNA-Färbung im GD des HC ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne BrdU-Behandlung (jeweils n=5).

5.7. Der Einfluss einer BrdU-Markierung auf die Proliferation aNSZ nach der Transplantation ins intakte Tier

Die Markierung aNSZ mit BrdU im Vorfeld einer Transplantation wird häufig angewendet, um die Zellen hinterher *in vivo* verfolgen zu können. Zur Klärung der Frage, ob die Vorbehandlung mit BrdU die Proliferation der aNSZ nach der Transplantation beeinflusst, wurden aNSZ für 48 h mit 0,2 µM, 1,0 µM oder 2,5 µM BrdU kultiviert, bevor sie in das intakte Rückenmark adulter weiblicher Fischer-344-Ratten transplantiert wurden. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Versuchstiere transkardial perfundiert und Gewebeschnitte erstellt. Im Anschluss wurde zur Beurteilung der Proliferation der transplantierten Zellen eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU und PCNA durchgeführt. Zudem wurde eine BrdU-Färbung (DAB) eingesetzt, um die Anzahl der BrdU-markierten Zellen zu analysieren. Die Färbung ließ einen schwachen, aber nicht signifikanten, Anstieg der Zahl BrdU-positiver Zellen in den mit 1,0 µM bzw. 2,5 µM BrdU behandelten Gruppen gegenüber der mit 0,2 µM BrdU behandelten Gruppe erkennen (Abbildung 47 A).

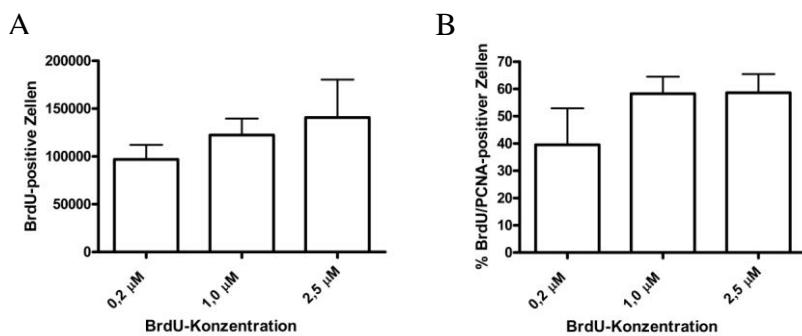


Abbildung 47: Nachweis BrdU-markierter aNSZ *in vivo* nach der Transplantation ins intakte Rückenmark. Auf den ersten Blick scheint die steigende BrdU-Konzentration die Proliferation der aNSZ, anders als *in vitro*, nicht nachhaltig zu beeinflussen. Möglicherweise wurde die Zahl BrdU-positiver Zellen in der mit 0,2 μM BrdU behandelten Gruppe aber aufgrund einer Verdünnung der BrdU-Konzentration infolge der kontinuierlichen Proliferation BrdU-markierter Zellen nach der Transplantation unterschätzt. aNSZ wurden für 48 h mit verschiedenen BrdU-Konzentrationen behandelt, bevor sie in das intakte Rückenmark adulter Ratten transplantiert wurden (0,2 μM: n=6; 1,0 μM: n=5; 2,5 μM n=6). Nach weiteren 4 Tagen wurden die Versuchstiere perfundiert und die Gewebschnitte gegen BrdU bzw. BrdU/PCNA gefärbt. A) Quantifizierung der BrdU-Färbung (DAB). B) Quantifizierung der BrdU/PCNA-Färbung.

Diese Resultate standen im deutlichen Gegensatz zu den *in-vitro*-Daten. Demnach scheint es so, als ob die mit der BrdU-Applikation assoziierten Nebenwirkungen *in vitro* stärker ausgeprägt sind als *in vivo*, zumindest innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Zellen, die durch die Markierung mit BrdU geschädigt wurden, während der Transplantation starben und demzufolge nicht mehr länger nachweisbar waren. Andererseits könnte die kontinuierliche Proliferation der BrdU-markierten Zellen nach der Transplantation auch zu einer Verdünnung der BrdU-Konzentration in der Niedrig-Dosis-Gruppe geführt haben. Diese Annahme impliziert, dass möglicherweise nur ein Teil der Zellen, die mit 0,2 μM BrdU markiert wurden, detektiert wurde, was wiederum zu einer Unterschätzung der Zahl BrdU-positiver Zellen in der mit 0,2 μM BrdU behandelten Gruppe geführt haben könnte. In der Tat wiesen die Immunfluoreszenzfärbungen einen Trend in Richtung eines höheren prozentualen Anteils an PCNA/BrdU-doppelt-positiven Zellen auf, nachdem die Zellen mit 1,0 μM und 2,5 μM BrdU behandelt wurden (Abbildung 47 B).

Um diese Hypothese zu evaluieren, wurde eine FACS-Analyse zur Bestimmung der Intensität der BrdU-Färbung in aNSZ-Kulturen durchgeführt, die mit 0,2 μM oder 1,0 μM BrdU behandelt worden waren. Wie in Abbildung 48 dargestellt, war die Intensität der BrdU-Färbung in der mit 0,2 μM BrdU behandelten Gruppe deutlich schwächer als in den mit 1,0 μM BrdU behandelten Kulturen. Dies deutet darauf hin, dass die Zahl BrdU-positiver Zellen in der Niedrig-Dosis-Gruppe tatsächlich unterschätzt wurde. Demzufolge könnte ein potentiell höherer Anteil an Zelltod in den mit 1,0 μM und 2,5 μM BrdU behandelten Gruppen, bezogen auf die Niedrig-Dosis-Gruppe, durch die scheinbar niedrigere Zahl BrdU-positiver Zellen in

der mit $0,2 \mu\text{M}$ BrdU markierten Gruppe verdeckt werden. Das bedeutet, dass eine Markierung mit $0,2 \mu\text{M}$ BrdU keinesfalls ausreicht, um transplantierte Zellen *in vivo* zu verfolgen. Vielmehr führt diese sogar unweigerlich zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse.

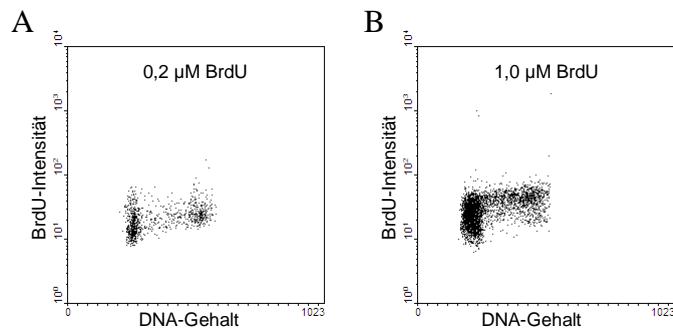


Abbildung 48: Die Intensität der BrdU-Färbung nach der Inkubation mit A) $0,2 \mu\text{M}$ BrdU ist deutlich schwächer als nach der Inkubation mit B) $1,0 \mu\text{M}$ BrdU. Daher ist anzunehmen, dass die Zahl BrdU-positiver Zellen in der Niedrig-Dosis-Gruppe tatsächlich unterschätzt wurde. aNSZ aus der SVZ wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 4 Tagen wurde dem Kulturmedium BrdU in einer Endkonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ oder $1,0 \mu\text{M}$ zugesetzt. Im Anschluss an eine 20-minütige Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen BrdU und PI gefärbt, bevor sie durchflusszytometrisch analysiert wurden. Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots der Färbung gegen BrdU und PI.

6. Ergebnis IV: Der Einfluss von BrdU auf TGF-beta1-Expression und Smad2-Phosphorylierung in aNSZ-Kulturen

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den Experimenten mit TGF-beta1- und BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen zeichneten sich einige Parallelen ab. So wurde deutlich, dass sowohl in TGF-beta1- als auch in BrdU-behandelten Kulturen 1) die Proliferation erniedrigt, 2) die Zellzyklusverteilung verändert (Erhöhung des G0/G1-Phase-Anteils bei gleichzeitiger Abnahme des S-Phase-Anteils) sowie 3) die Differenzierung beeinträchtigt war (Abnahme der Mbp-Expression). Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass TGF-beta1 ursächlich für die hervorgerufenen Effekte in BrdU-behandelten Kulturen sein könnte. Um der Frage nachzugehen, ob die einheitlichen Resultate möglicherweise auf eine BrdU-induzierte Expression von TGF-beta1 zurückzuführen sind, wurde zunächst eine relative Quantifizierung der TGF-beta1-mRNA in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen durchgeführt.

6.1. Der Nachweis einer erhöhten TGF-beta1-Expression in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen

6.1.1. Erhöhte Expression von TGF-beta1-mRNA nach BrdU-Behandlung

Die Realtime-PCR-Quantifizierung zur Analyse der relativen TGF-beta1-mRNA-Expression im Anschluss an eine 48-stündige Inkubation mit 2,5 µM BrdU ergab eine 5,2-fach erhöhte TGF-beta1-Expression in der BrdU-behandelten Kultur im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 49).

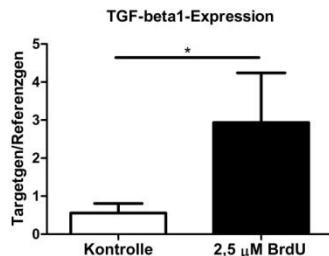


Abbildung 49: Nachweis der erhöhten TGF-beta1-mRNA-Expression nach Kultivierung mit 2,5 µM BrdU. aNSZ wurden für 48 h mit 2,5 µM BrdU inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert und die relative Expression von TGF-beta1, bezogen auf das Referenzgen G6PDH, mittels Realtime-PCR bestimmt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus n=3 ± Standardabweichung dargestellt. *p<0,05

6.1.2. Erhöhte Expression von TGF-beta1-Protein nach BrdU-Behandlung

Um die Expression von TGF-beta1-Protein in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen zu untersuchen, wurde ein TGF-beta1-ELISA durchgeführt. Dieser belegte eine signifikant erhöhte Expression von TGF-beta1-Protein nach 48-stündiger Inkubation mit 2,5 µM BrdU (Abbildung 50). Ein signifikanter Anstieg der TGF-beta1-Konzentration wurde allerdings be-

reits auch bei der Kultivierung mit 1,0 μ M BrdU beobachtet. Dies lässt vermuten, dass der in Abschnitt 5.1. gezeigte Rückgang der Proliferation nach 48-stündiger Inkubation mit 1,0 μ M BrdU sehr wahrscheinlich durch die erhöhte Konzentration an TGF-beta1 induziert wird, da beide Effekte hier zusammenfallen.

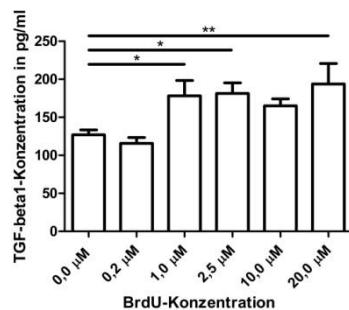


Abbildung 50: Nachweis der erhöhten TGF-beta1-Protein-Expression nach Kultivierung mit BrdU. aNSZ wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml ausgesät (Tag 0) und ab Tag 2 für 48 h mit unterschiedlichen BrdU-Konzentrationen kultiviert. Im Anschluss wurde ein TGF-beta1-ELISA zur Bestimmung der Konzentration an TGF-beta1-Protein durchgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus $n=3 \pm$ Standardabweichung dargestellt.* $p<0.05$; ** $p<0.01$

6.2. Der Nachweis der TGF-beta1-Signaltransduktion in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen

Zum Nachweis der TGF-beta1-Signaltransduktion in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen wurde die Phosphorylierung von Smad2, einem zytoplasmatischen Protein, das bei der TGF-beta1-Signalübertragung mit dem aktivierte Typ-I-Rezeptor interagiert, untersucht. Dazu wurden die Kulturen zunächst für 48 h mit 2,5 μ M BrdU oder 10 ng/ml TGF-beta1 (als Positiv-Kontrolle für Smad2-Phosphorylierung) behandelt, bevor die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen phospho-Smad2 (pSmad2) gefärbt wurden. Die qualitative Analyse bestätigte eine Zunahme der Smad2-Phosphorylierung nach BrdU-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 51).

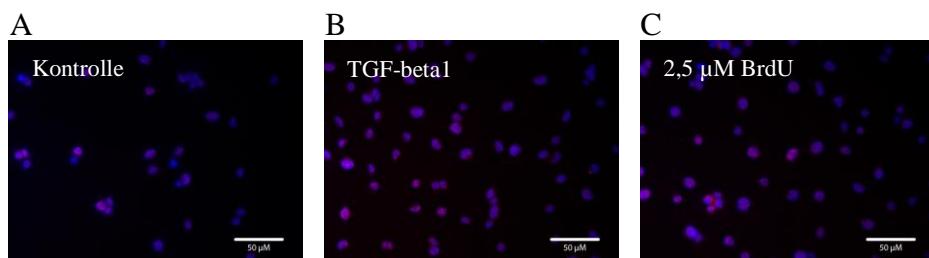


Abbildung 51: Nachweis der Smad2-Phosphorylierung in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen. aNSZ wurden im Vorfeld für 48 h mit (A) DPBS (Kontrolle), (B) 10 ng/ml TGF-beta1 oder (C) 2,5 μ M BrdU kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen pSmad2 (rot) gefärbt. Die Kernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt (blau). Messbalken = 50 μ m.

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde durch das primäre Ziel bestimmt, die molekularen und zellulären Mechanismen der Kontrolle aNSZ durch TGF-beta1 eingehend zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit sollte eine detaillierte Auswertung der durchgeführten DNA-Array-Genexpressionsanalyse TGF-beta1-behandelter aNSZ erfolgen. Ausgehend von präliminären Daten dieser Analyse, die auf eine Induktion des neuronalen Phänotyps durch TGF-beta1 hindeuteten, sollte der Einfluss von TGF-beta1 auf das Zellschicksal aNSZ im Detail analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere die Hypothese, wonach TGF-beta1 aNSZ von einem neuralen Stammzellphänotyp (Verlust von Nestin) hin zu einem neuronalen Vorläuferzellphänotyp (erhöhte Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Dcx) führt, ausführlich getestet werden. Darüber hinaus sollte ein weiterer Fokus der Arbeit auf die Charakterisierung TGF-beta1-induzierter Veränderungen im Zellzyklus von aNSZ gerichtet werden; hier galt es speziell auch die molekularen Veränderungen hinsichtlich der Expression von Zellzykluskandidatengenen und -faktoren durch TGF-beta1 nachzuweisen. Schließlich sollte eine mögliche, funktionelle Rolle des Wachstumsfaktors spezifiziert, seine neuroprotektive Wirkung an aNSZ-Kulturen überprüft und sein potentieller Einfluss auf Zelltod evaluiert werden. Die folgende Diskussion beschäftigt sich nun auf der Grundlage der im Rahmen dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse und mit Blick auf den bisherigen Stand der Wissenschaft mit

- den TGF-beta1-induzierten Veränderungen im Zellzyklus aNSZ (Kap. 7.1)
- der Modulation der adulten Neurogenese durch TGF-beta1 *in vitro* (Kap. 7.2)
- der neuroprotektiven Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ (Kap. 7.3).

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit den potentiellen Einflüssen des Thymidinanalogs BrdU, welches standardmäßig zur Markierung sich teilender Zellen eingesetzt wird, auf aNSZ. Ein besonderes Augenmerk der diesbezüglich durchgeführten *in-vitro*-Experimente wurde auf die Zellproliferation und -differenzierung, sowie die Adhärenz und den Zelltod BrdU-behandelter Zellen gelegt. Zusätzlich wurde der Einfluss von BrdU auf die Proliferation und das Überleben aNSZ *in vivo* eingehend untersucht. Ausgehend von den daraus gewonnenen Erkenntnissen setzt sich die nachfolgende Diskussion daher auch mit

- der BrdU-Sensitivität aNSZ und deren möglichen Ursachen (Kap. 7.4) auseinander.

7.1. TGF-beta1-induzierte Veränderungen im Zellzyklus aNSZ

7.1.1. Die Inhibierung der Proliferation durch TGF-beta1

TGF-beta1 wurde erstmals 1981 im Zusammenhang mit seiner Fähigkeit, Nieren- und Fibroblastenzelllinien von Ratten vermehrt zum Wachstum anzuregen, entdeckt (Moses *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981). Einige Zeit später konnte die multifunktionelle Natur des Proteins nachgewiesen werden (Roberts, 1998) und es wurde deutlich, dass die biologische Aktivität von TGF-beta1 keineswegs auf die wachstumsfördernde Wirkung beschränkt ist. Im adulten Organismus ist TGF-beta1 maßgeblich an vielfältigen, zellulären Abläufen beteiligt, und neben der Proliferation, auch in die Differenzierung und die Regulation des Überlebens einer Vielzahl an Zellen involviert. Weiter kommt dem Zytokin eine zentrale Bedeutung bei der Erneuerung von Geweben zu, indem es die Bildung von Proteinen der extrazellulären Matrix stimuliert (Border & Noble, 1997).

Seit den 90er Jahren ist bekannt, dass TGF-beta1 auch im Nervensystem exprimiert wird, wo es ebenfalls vielerlei - teils gegensätzliche - Funktionen erfüllt (Bottner *et al.*, 2000). So wirkt der Wachstumsfaktor einerseits neuroprotektiv, limitiert aber andererseits den endogenen Zellersatz durch die Inhibierung neuraler Stammzellproliferation (Aigner & Bogdahn, 2008). In zahlreichen Tumoren, in denen TGF-beta1 verstärkt exprimiert wird, agiert das Protein als Tumorsuppressor, während es gleichzeitig die Progression der Krebserkrankung auch begünstigen kann (Derynck *et al.*, 2001). Angesichts dieser zahlreichen - teilweise paradoxen und vom zellulären Kontext abhängigen - Wirkweisen scheint es nicht weiter zu verwundern, dass TGF-beta1, entgegen der ursprünglichen Vorstellung einer wachstumsfördernden Wirkung, auch inhibierend in die Proliferation mancher Zellen eingreift (Shipley *et al.*, 1986). So zeigt TGF-beta1 eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Leberzellen, sowie hämatopoietischen, epithelialen und endothelialen Zellen (Coffey *et al.*, 1988; Laiho *et al.*, 1990; Roberts & Sporn, 1990; Akhurst & Derynck, 2001; Tvardik, 2004), während es die Proliferation von Nieren- und Fibroblastenzelllinien und Zellen mesenchymalen Ursprungs anregt (Moses *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981; Battegay *et al.*, 1990). Darüber hinaus entfaltet TGF-beta1 sein anti-proliferatives Potential auch gegenüber neuralen Zellen. Es inhibiert die Proliferation von B104-Neuroblastomzellen und fötalen, kortikalen sowie retinalen Neuronen (Luo & Miller, 1999; Miller & Luo, 2002; Close *et al.*, 2005). Zudem übt der Wachstumsfaktor einen negativen Einfluss auf die Proliferation von Mikroglia, Oligodendroglia und Astrozyten in Kultur aus (Lindholm *et al.*, 1992; McKinnon *et al.*, 1993; Suzumura *et al.*, 1993;

Rich *et al.*, 1999). Erkenntnisse aus der aktuelleren Literatur belegen darüber hinaus eine verminderte Anzahl aktiv proliferierender Zellen in aNSZ-Kulturen aus der SVZ der Ratte nach TGF-beta1-Behandlung (Wachs *et al.*, 2006). Die TGF-beta1-induzierte Inhibierung der Zellteilung von aNSZ konnte durch eigene Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, bestätigt werden (vgl. Kap. 3.3.1.).

7.1.2. Der TGF-beta1-induzierte Zellzyklusarrest in der G0-Phase

Im Allgemeinen geht eine Inhibierung der Proliferation mit einem Zellzyklusarrest einher, der sich in der Folge in einer veränderten Zellzyklusverteilung widerspiegelt. Es gibt jedoch verschiedene Gründe, die zu einem Austritt von Zellen aus dem Zellzyklus führen. Häufig ist der Zellzyklusarrest mit einer terminalen Differenzierung der Zelle oder dem programmierten Zelltod, der Apoptose, assoziiert. Alternativ kann die Zelle den Zellzyklus aber auch nur zeitweilig, z. B. aufgrund eines reduzierten Nährstoffangebotes, verlassen, um vorübergehend in einen quieszenten Zustand, die G0-Phase des Zellzyklus, einzutreten (Sang *et al.*, 2008). Dieser Ruhezustand ist in erster Linie durch jegliches Fehlen von Proliferation sowie eine verminderte Proteinsyntheserate gekennzeichnet (Lajtha, 1963; Pardee, 1974). Darüber hinaus zeigen arretierte Zellen eine erhöhte Resistenz in Bezug auf Temperaturextreme und anderen, umweltbedingten Stress (Murray & Hunt, 1993).

Unabhängig von der Ursache, die letztlich zum Austritt einer Zelle aus dem Zellzyklus führt, sind am Zellzyklusarrest gewöhnlich Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren („cyclin-dependent kinase inhibitors“), sogenannte CDKI, beteiligt. Die Tatsache, dass die transkriptionelle Signatur von quieszenten Zellen nicht durch die ausschließliche, ektopische Expression von CDKI rekapituliert werden kann (Coller *et al.*, 2006), impliziert jedoch, dass Zellzyklusarrest und zelluläre Quieszenz funktionell nicht äquivalent sind (Sang *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur terminalen Differenzierung, zum programmierten Zelltod und zur Seneszenz, die allesamt irreversibel ablaufen (Massague *et al.*, 2000), ist die Quieszenz eine reversible, das heißt, nicht permanente, Form des Zellzyklusarrests. Ruhende Zellen in der Lage, nach tage- oder wochenlangem, manchmal aber auch jahrelangem Verharren in der Quieszenz im Zuge eines Übergangs in die G1-Phase wieder in einen proliferativen Zustand zu konvertieren (Lui & Grandis, 2002).

Die Quieszenz ist ein charakteristisches Merkmal adulter Stammzellen (Berardi *et al.*, 1995; Ponchio *et al.*, 1995; Jordan *et al.*, 1996). Aus Untersuchungen an hämatopoetischen Stammzellen ist bekannt, dass sich unter normalen Bedingungen annähernd 75 % dieser Zellen in der

G0-Phase des Zellzyklus befinden (Cheshier *et al.*, 1999). Wie bereits dargelegt wurde, können quieszente Zellen dazu veranlasst werden, wieder in den Zellzyklus einzutreten. Die Anregung zur Zellteilung und der erneute Eintritt in den Zellzyklus wird durch extrazelluläre Stimuli, z. B. wachstumsregulierende Faktoren wie Zytokine oder aber durch Zell-Interaktionen, ausgelöst. aNSZ-Kulturen, die aus der SVZ der Ratte generiert wurden, können beispielsweise in Anwesenheit des epidermalen Wachstumsfaktors EGF und/oder des Fibroblastenwachstumsfaktors FGF-2 zur Proliferation angeregt werden und generieren infolgedessen Neurosphäroide (Wachs *et al.*, 2003). Ein Gen, welches die Reversibilität der zellulären Quieszenz reguliert, ist Hes1. An quieszenten Fibroblasten wurde beobachtet, dass die erhöhte Expression von Hes1 den irreversiblen Zellzyklusarrest blockiert, indem die frühzeitige Differenzierung der Zellen verhindert wird (Sang *et al.*, 2008).

Es gibt verschiedenartigste Beweggründe, auf deren Basis Zellen dazu angeleitet werden, den Zellzyklus zu verlassen und in einen quieszenten Zustand überzugehen. Manche Zellen werden als Antwort auf den Entzug von Serum oder durch Zell-Zell-Kontakt in die G0-Phase überführt (Sang *et al.*, 2008). Andererseits können aber auch anti-mitogene Signale, wie die Stimulierung mit TGF-beta1, Zellen dazu veranlassen, in den Ruhezustand einzutreten. Ergebnisse, die aus Untersuchungen an der humanen Non-Hodgkins-Lymphom B-Zelllinie DoHH2 erzielt wurden, weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass die Zahl der Zellen in der G0/G1-Phase nach 48-stündiger Behandlung mit TGF-beta1 signifikant ansteigt (Tvrdik, 2004). Erst kürzlich konnte auch ein, durch TGF-beta1 verursachter Zellzyklusarrest in Bauchspeicheldrüsentumoren nachgewiesen werden (Cassar *et al.*, 2010). Weitere Studien belegen darüber hinaus einen TGF-beta1-induzierten Austritt aus dem Zellzyklus im sich entwickelnden zerebralen Cortex (Siegenthaler & Miller, 2005). Vor wenigen Jahren konnte schließlich der Nachweis erbracht werden, dass TGF-beta1 auch aNSZ aus der SVZ in die G0/G1-Phase des Zellzyklus zwingt (Wachs *et al.*, 2006). Aus dieser Studie ging allerdings nicht hervor, ob TGF-beta1-behandelte aNSZ in der G0-Phase akkumulieren oder aber einem verlangsamten Durchgang durch die G1-Phase des Zellzyklus unterliegen. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten *in-vitro*-Versuche an aNSZ-Kulturen konnten erstmals differenzieren, dass TGF-beta1 aNSZ tatsächlich in die G0-Phase treibt, während der Anteil der Zellen in der G1-Phase konstant bleibt (vgl. Kap. 3.6.1.: Ergebnisse der Ki67/PI-FACS-Analyse). Diesen Ergebnisse zufolge begünstigt TGF-beta1 also den Übergang in die Quieszenz und trägt auf diese Weise vermutlich zur Erhaltung des Stammzellpools bei. Ein weiterer Befund, der diese Ergebnisse stützt, kam aus der DNA-Array-Analyse, welche einen

Anstieg der Quiescin Q6 (Qscn6)-Expression nach TGF-beta1-Behandlung enthüllte (vgl. Tabelle 18: Regulation der Zellproliferation). Qscn6 spielt mutmaßlich eine Rolle beim Übergang in die Quieszenz und deren Aufrechterhaltung (Coppock *et al.*, 1993), und könnte demnach einen Beitrag zu dem TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest in G0 leisten. In diesem Kontext scheint darüber hinaus noch ein zusätzliches Resultat der DNA-Array-Analyse bedeutsam: Auch Hes1, welches in die Regulation der Reversibilität zellulärer Quieszenz involviert ist und einem irreversiblen Zellzyklusarrest entgegenwirkt (Sang *et al.*, 2008), war nach der Behandlung mit TGF-beta1 verstärkt exprimiert (vgl. Tabelle 18: Regulation der Zellproliferation).

Trotz vieler neuer Erkenntnisse, die im Zusammenhang mit den möglichen Mechanismen des TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrests in aNSZ-Kulturen stehen (vgl. Folgekap. 7.1.3.), ist immer noch unklar, auf welche Art von Zellen TGF-beta1 Einfluss nimmt, um den beobachteten Zellzyklusarrest herbeizuführen. aNSZ-Kulturen sind ja bekanntlich nicht homogen, sondern bestehen, neben neuralen Stammzellen, zu einem Großteil aus Vorläuferzellen, sogenannten „transit-amplifying fast proliferating progenitor cells“ (Doetsch *et al.*, 2002a). Auf der Basis von Untersuchungen an hämatopoietischen Zellen wurde postuliert, dass TGF-beta1 vornehmlich Stammzellen in einen ruhenden, undifferenzierten Status überführt, während die bereits determinierten Vorläuferzellen als weniger empfänglich für die zytostatischen Effekte erachtet wurden (Ohta *et al.*, 1987; Scandura *et al.*, 2004; Das & Levine, 2008). Aus mehreren Gründen wurde bislang vermutet, dass TGF-beta1 auch in aNSZ-Kulturen, ähnlich wie im hämatopoietischen System, die Population der Stammzellen beeinflusst und in G0/G1 arretiert (Wachs *et al.*, 2006). Für diese Theorie spricht zum einen die Tatsache, dass TGF-beta1 einen lang anhaltenden Einfluss auf aNSZ-Kulturen ausübt. Dieser konnte im Rahmen einer Studie nachgewiesen werden, die demonstrierte, dass der TGF-beta1-induzierte Effekt auf aNSZ zwar reversibel ist; jedoch benötigten aNSZ, die initial für 7 Tage in Gegenwart von TGF-beta1 kultiviert wurden, einen Zeitraum von 8 Wochen, um sich zu regenerieren und normale Wachstumsraten wiederzuerlangen (Wachs *et al.*, 2006). Die Ergebnisse einer klonalen Analyse zur Untersuchung der Selbsterneuerungsfähigkeit von aus Neurosphäroiden abgeleiteten Einzelzellen können das Modell eines TGF-beta1-induzierten Stammzellarrests weiter untermauern. Während Kontrollzellen innerhalb von 3-4 Wochen in der Lage waren, Spheres auszubilden, dauerte es in Anwesenheit von TGF-beta1 2-3 Monate, Spheres ähnlicher Größe zu generieren, wenngleich die Klonierungsraten unter beiden Bedingungen ähnlich waren, das heißt, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung blieb trotz TGF-beta1 erhalten (Wachs *et al.*, 2006).

Ergebnisse, die anlässlich dieser Arbeit erzielt wurden, belegen übereinstimmend, dass aNSZ, die von Beginn der Kultur an mit TGF-beta1 stimuliert wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen ebenfalls sehr viel mehr Zeit beanspruchen, um Spheres mit vergleichbarer Größe herzubringen. Die Tatsache, dass die TGF-beta1-behandelten Zellen nur wenige Passagen überlebten, bevor sie ausgeschöpft waren und schließlich dem Zelltod unterlagen (siehe Kap. 4), lässt jedoch vermuten, dass in diesem Fall die Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen beeinträchtigt war. Insgesamt ist auf der Basis des Gesagten also anzunehmen, dass TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen die Population der Stammzellen beeinflusst. Dennoch kann nicht grundlegend ausgeschlossen werden, dass der Wachstumsfaktor auch Vorläuferzellen tangiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, neben dem Zellzyklusarrest in der G0-Phase, der gemeinhin als reversibel gilt und nicht zwangsläufig in einer irreversiblen, terminalen Differenzierung endet, auch eine Zunahme der neuronalen Determinierung nach TGF-beta1-Behandlung (vgl. Kap. 3.3.2.ii.). Ließe sich diese Induktion des neuronalen Phänotyps tatsächlich auch aufgrund eines G0-Arrests von Stammzellen, gefolgt von deren terminaler Differenzierung erklären, würde das implizieren, dass der Stammzellpool letztlich frühzeitig ausgeschöpft würde, was physiologisch nicht sinnvoll wäre. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass TGF-beta1, neben der Population der Stammzellen, auch Vorläuferzellen in die G0-Phase überführt. Ausschlaggebend hierfür könnten zweierlei Intentionen sein: TGF-beta1 könnte durch einen reversiblen Arrest der Stammzellen zur Erhaltung des Stammzellpools beitragen (wobei die Zellen gegebenenfalls wieder in den Zellzyklus eintreten könnten) und gleichzeitig die terminale Differenzierung der Stammzellen unterbinden. Einhergehend mit einem irreversiblen Arrest der Vorläuferzellen könnte deren terminale Differenzierung eingeleitet werden, ohne auf diese Weise den Stammzellpool zu erschöpfen. Um diese Hypothese zu stützen, bedarf es allerdings noch einer grundlegenden Validierung durch weiterführende Analysen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang insbesondere die Anwendung von Nestin-Promotor-EGFP-Mäusen (Lendahl *et al.*, 1990), um über die transgene Expression von Reporterproteinen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung gezielt neurale Stammzellen aus gemischten Zellkulturen aufzukonzentrieren. Im Anschluss könnte die homogene, im FACS-Gerät angereicherte, Zellpopulation separat mit TGF-beta1 behandelt, und so der Einfluss des Wachstumsfaktors auf neurale Stammzellen im Detail untersucht werden. Darüber hinaus würden sich Vorläuferzell-Kulturen aus DCX-Promotor-DsRed2-Mäusen eignen (Sawamoto *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Rao & Shetty, 2004), um diese im Hinblick auf eine ver-

stärkte neuronale Induktion durch TGF-beta1 zu analysieren. Im Idealfall kämen doppelt transgene Tiere, die sowohl Nestin unter dem EGFP-Promotor als auch DCX unter dem DsRed-Promotor exprimieren, zur Anwendung.

7.1.3. Die Modulierung von Zellzykluskomponenten durch TGF-beta1

TGF-beta1 ist ein wirksames, wachstumsinhibierendes Polypeptid, welches die Proliferation vieler verschiedener Zellen, einschließlich aNSZ, beeinflusst (vgl. Kap. 3.3.1.). Der TGF-beta1-medierte Wachstumsarrest erfolgt gewöhnlich durch eine Blockierung des Übergangs in die S-Phase in der frühen oder späten G1-Phase des Zellzyklus (Howe *et al.*, 1991; Alexandrow & Moses, 1995b; Lee & Bae, 2002). In der frühen G1-Phase wird der Wachstumsarrest über Smad-Proteine mediert, die im Anschluss transkriptionelle Zielgene regulieren. Auf diese Weise unterdrückt TGF-beta1 Myc und Cyclin E-CDK2 und blockiert die Bildung von Prä-Replikationskomplexen (Pietenpol *et al.*, 1990a; Chen *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2010), welche aus einem origin recognition complex (ORC), Initiationsfaktoren wie Cdt1, Cdc6 und minichromosome maintenance (MCM)-Proteinen bestehen und eine bedeutende Rolle beim Übergang in die S-Phase spielen (Bell & Dutta, 2002). In der späten G1-Phase scheint der Mechanismus des TGF-beta1-induzierten Wachstumsarrests dagegen unabhängig von einer transkriptionellen Regulation. Der kurz vor dem Übergang in die S-Phase initiierte Zellzyklusarrest wird durch eine Funktionsbeeinträchtigung der Prä-Replikationskomplexe verursacht und involviert, anders als der Arrest in der frühen G1-Phase, nicht die Suppression von Myc und Cyclin E-CDK2. Vielmehr wird der späte G1-Arrest über pRb mediert; pRb bindet über eine direkte Interaktion mit MCM7 an den MCM-Komplex und TGF-beta1 blockiert schließlich die für den G1/S-Übergang erforderliche Dissoziation des Komplexes (Mukherjee *et al.*, 2010).

In den TGF-beta-induzierten Wachstumsarrest der frühen G1-Phase sind vorwiegend zwei Kategorien anti-proliferativer Genantworten involviert. Allgemein führt zum einen die Inaktivierung von CDKs durch verminderte Expression von Cyclinen und/oder verstärkte Expression von CDKI zum Austritt aus dem Zellzyklus. Andererseits gilt auch die erniedrigte Expression von c-Myc als ein Schlüsselmediator des durch TGF-beta1 verursachten Zellzyklusarrests (Lee & Bae, 2002). Die molekularen Mechanismen, auf deren Grundlage TGF-beta1 seinen inhibierenden Einfluss auf die Zellzyklusprogression entfaltet, sind jedoch zelltyp-spezifisch. Wenngleich schon längere Zeit vermutet wird, dass die wachstumsinhibierende Wirkung TGF-betas im Allgemeinen auch auf seine Fähigkeit zurückgeführt werden kann, die

Hyperphosphorylierung von pRb durch Cyclin-CDK-Komplexe zu unterbinden (wodurch pRb in seiner hypophosphorylierten, wachstumshemmenden Form verbleibt) und so das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus zu blockieren (Laiho *et al.*, 1990; Geng & Weinberg, 1993), waren insbesondere die Veränderungen in der Expression von regulatorischen Zellzyklusproteinen in aNSZ-Kulturen bis dato noch weitgehend unbekannt.

Durch die vorliegende Arbeit konnte im Rahmen der durchgeföhrten DNA-Array-Analyse eine Vielzahl an Zellzyklus-assoziierten Genen identifiziert werden, die nach der TGF-beta1-Behandlung eine veränderte - größtenteils verringerte - Expression aufwiesen (vgl. Kap. 3.6.2.). So war die Expression von Cyclin E, dem eine tragende Rolle beim Übergang von der G1- zur S-Phase zukommt, deutlich vermindert. Cyclin E-CDK2-Komplexe sind, nach der Initiierung der Phosphorylierung von pRb durch Cyclin D-CDK-Komplexe in der Mitte der G1-Phase, maßgeblich an der weiteren Phosphorylierung von pRb beteiligt und ermöglichen auf diese Weise die Progression durch den Zellzyklus (Matsushime *et al.*, 1992; Ewen, 1994; Meyerson & Harlow, 1994). Der störende Einfluss von TGF-beta1 auf die Proliferation aNSZ und der hervorgerufene Zellzyklusarrest in der G0-Phase könnten demnach sehr wahrscheinlich unter anderem über die verminderte Cyclin E-Expression vermittelt werden. Auch in der myeloischen Zelllinie NB4 konnte die Supprimierung des Wachstums, die mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase korreliert, mit einer erniedrigten Cyclin E mRNA-Expression assoziiert werden (Liang *et al.*, 2009).

Darüber hinaus wiesen auch die Cycline B1 und G1 in der DNA-Array-Analyse eine erniedrigte Expression als Folge der TGF-beta1-Behandlung auf (vgl. Kap. 3.6.2.). Während bekannt ist, dass B-Cycline zu Ende der G2-Phase und in der M-Phase die Progression durch den Zellzyklus unterstützen, ist die Funktion von Cyclin G noch nicht endgültig geklärt. Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass Cyclin G im Falle einer DNA-Schädigung durch das Tumorsuppressorgen p53 aktiviert wird (Morgan, 1997). Im Gegensatz zu Cyclin E, B1 und G1 zeigte sich Cyclin D2 nach der TGF-beta1-Behandlung verstärkt exprimiert, was indiziert, dass das Protein kein Effektor der anti-proliferativen Antwort als Folge der TGF-beta1-Behandlung ist. Die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK6, welche während der G1- und S-Phase mit D-, E- und A-Cyclinen in Interaktion treten, ließen dagegen keine veränderte Expression nach TGF-beta1-Behandlung erkennen, was ihre Involvierung in den TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest ebenfalls ausschließt. Darüber hinaus zeigte auch das pRb keine veränderte Expression nach der Behandlung mit TGF-beta1.

TGF-beta1 agiert über mehrere, möglicherweise kompensierende Mechanismen, um das Wachstum von Zellen zu arretieren. Während häufig die Progression von der G1- in die S-Phase unterdrückt wird, indem die mit Cyclin D und E assoziierte Hyperphosphorylierung von pRb verhindert wird, erhöht der Smad-Signalweg gewöhnlich auch die Expression von CDKI (Toyoshima & Hunter, 1994; Datto *et al.*, 1995; Reynisdottir *et al.*, 1995). Für den TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest humaner, hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ist beispielsweise eine erhöhte Expression des Zellzyklusregulators p57 von elementarer Bedeutung. So konnten in Versuchen, in denen siRNA zur Inhibierung von p57 angewendet wurde, die zytostatischen Effekte von TGF-beta1 auf hämatopoetische Zellen unterbunden werden (Scandura *et al.*, 2004). Den weiteren Mitgliedern der Cip/Kip-Familie, p21 und p27, scheint dagegen keine Bedeutung im Hinblick auf die Hemmung der hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellproliferation durch TGF-beta1 zuzukommen (Cheng *et al.*, 2001). In den normalen, das heißt, nicht durch TGF-beta1 verursachten, Zellzyklusarrest hämatopoetischer Zellen sind dagegen sowohl die CDKI p18 und p21 als auch der CDKI p27 involviert. Allerdings scheint die Zellzyklusregulation in diesem Kontext in bemerkenswerter Weise zelltyp-spezifisch zu sein. Experimente mit p27-Knockout-Mäusen konnten nachweisen, dass der Mangel an p27 in einer selektiven Erhöhung der Anzahl an Vorläuferzellen in der SVZ resultiert, während sich der Verlust nicht auf die Zahl der Stammzellen auswirkte (Doetsch *et al.*, 2002b). Ebenso konnte durch eine Reduktion der Menge an p27 mittels eines gezielten Einsatzes von Antisense-Oligonukleotiden, gekoppelt mit TGF-beta-neutralisierenden Antikörpern, der Eintritt hämatopoetischer Vorläuferzellen in den Zellzyklus induziert werden (Dao *et al.*, 1998). Zusammengefasst implizieren diese Ergebnisse, dass p27 in erster Linie den Zellpool der Vorläuferzellen reguliert (Cheng *et al.*, 2000a; Cheng *et al.*, 2001). Die Aktivität von p18 und p21 scheint dagegen auf die Population der Stammzellen begrenzt (Cheng *et al.*, 2000b; Wu *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2004). Humane, quieszente Stammzellen exprimieren in hohem Maße p21, weshalb angenommen wird, dass p21 eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen zukommt. Während höhere Konzentrationen an p21 demnach inhibierend auf die Zellzyklusprogression wirken, scheinen niedrige Konzentrationen an p21 die Bildung aktiver Kinase-Komplexe und damit den Eintritt in den Zellzyklus zu fördern (LaBaer *et al.*, 1997).

In epithelialen Zellen fördert TGF-beta1 den Zellzyklusarrest durch erhöhte Expression der zytostatischen Proteine p21 und p15, während wachstumsstimulierende Proteine, besonders c-Myc und Mitglieder der Id („inhibitors of differentiation“)-Familie, vermindert exprimiert

sind (Scandura *et al.*, 2004). So konnte durch *in-vitro*-Versuche an humanen, epithelialen p21-Knockout-Zelllinien ein wachstumsstimulierender Effekt durch TGF-beta1 nachgewiesen werden (Bachman *et al.*, 2004). Der Befund, dass auch Fibroblasten aus Mäusen mit einer homozygoten Deletion von p27 oder p15 durch TGF-beta1 in ihrem Wachstum inhibiert werden (Nakayama *et al.*, 1996; Latres *et al.*, 2000), legt nahe, dass vermutlich auch hier die Präsenz von p21 eine entscheidende Rolle spielt. Diesbezüglich sind allerdings noch weiterführende Analysen nötig. Bereits nachgewiesen ist dagegen, dass der TGF-beta1-induzierte Ausritt aus dem Zellzyklus im sich entwickelnden zerebralen Cortex durch eine erhöhte Expression von p21 vermittelt wird (Siegenthaler & Miller, 2005). Mehrere Studien konnten darüber hinaus eine Beteiligung von p27 an einer Inhibition der Zellproliferation durch TGF-beta1 zeigen (Elbendary *et al.*, 1994; Bouchard *et al.*, 1997; Kamesaki *et al.*, 1998; Wolfram *et al.*, 2004). So wird der Zellzyklus im humanen Prostataepithelium durch die verstärkte Expression von p15, p21 und p27 in der G1-Phase blockiert (Robson *et al.*, 1999). In der HEC-1A Karzinom-Zelllinie scheint TGF-beta1 seine inhibierende Wirkung unter anderem dadurch zu entfalten, dass es den proteasomalen Abbau von p27 zugunsten eines Zellzyklusarrests verhindert (Lecanda *et al.*, 2009).

Untersuchungen an adulten neuralen Stammzellen aus dem Vorderhirn von p21(-/-)-Mäusen machen deutlich, dass p21 auch in die Regulation neuraler Stammzellen involviert ist und zu deren Quieszenz beiträgt. Vor diesem Hintergrund scheint die Beobachtung, dass p21(-/-)-Mäuse im Alter von 16 Monaten eine deutlich reduzierte Anzahl an Stammzellen aufweisen auf den ersten Blick kontrovers. Jedoch konnte eine Beeinträchtigung der Selbsterneuerungsfähigkeit als Ursache einer verminderten Zahl an Stammzellen in 16 Monate alten Mäusen ausgemacht werden (Kippin *et al.*, 2005). Im Alter zwischen 60-240 d zeigten p21(-/-)-Mäuse dagegen, wie erwartet, aufgrund höherer Proliferationsraten mehr Stammzellen als Wildtyp-Kontroll-Mäuse. Diese Befunde deuten an, dass Stammzellen möglicherweise auf eine definierte Anzahl an Zellteilungen limitiert sind. Eine Expression von p21 in neuralen Stammzellen ist demzufolge vermutlich erforderlich, um die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, und damit den Stammzellpool, lebenslang aufrechtzuerhalten (Kippin *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu den oben dargelegten Studien gibt es für die Beteiligung von CDKI an der Regulation des Zellzyklus aNSZ nach 7-tägiger Stimulation mit TGF-beta1 derzeit keine Anhaltspunkte (vgl. Kap. 3.6.2.). TGF-beta1 wirkte sich weder auf die Expression der CDKI p21 und p27, noch auf die von p15, p18, p19 (p16 war nicht auf den Arrays vertreten) aus. Zwar zeigte sich, ähnlich wie im hämatopoetischen System, die Expression von p57 beeinflusst.

Die Tatsache, dass p57 nach der 7-tägigen Behandlung aNSZ mit TGF-beta1 vermindert exprimiert war, schließt allerdings aus, dass p57 ein Mediator des TGF-beta1-induzierten Wachstumsarrests sein und diesen erklären könnte. Es wäre aber denkbar, dass die verminderte Expression von p57 eine andere Funktion als die im Zusammenhang mit einer Induktion des Wachstumsarrests erfüllt. Eine Studie, die kürzlich veröffentlicht wurde, beschreibt eine reprimierende Wirkung von p57 auf die neuronale Differenzierung in neuralen Stammzellen (Joseph *et al.*, 2009). TGF-beta1 könnte die beobachtete Induktion des neuronalen Phänotyps (vgl. Kap. 3.3.2.) also möglicherweise dadurch hervorrufen, dass es die Expression von p57 negativ reguliert und auf diese Weise die neuronale Differenzierung fördert.

Auf der Grundlage einer Studie an aNSZ, die eine Erhöhung der p21-mRNA 60 min nach TGF-beta1-Stimulierung belegte (Wachs *et al.*, 2006), lässt sich spekulieren, dass die Induktion von CDKI allgemein relativ zeitnah zum auslösenden Stimulus erfolgt, sodass diese möglicherweise zum Zeitpunkt der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Vermessung nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar war. Angesichts des lang anhaltenden Einflusses von TGF-beta1 auf aNSZ (Wachs *et al.*, 2006) wäre aber wahrscheinlich, dass TGF-beta1 seinen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation aNSZ - entweder teilweise oder aber ausschließlich - über andere Mediatoren entfaltet. Aus verschiedenen Beobachtungen wird ersichtlich, dass CDKIs nicht zwangsläufig erforderlich sind, um einen TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest zu forcieren. Ein fehlender Einfluss von TGF-beta1 auf die Expression von CDKI wurde beispielsweise für mehrere epitheliale Zelllinien belegt (Iavarone & Massague, 1997; Nagahara *et al.*, 1999), die durch TGF-beta1 in ihrer Proliferation gehemmt werden. Zudem stützt ein weiterer wichtiger Befund das Modell eines CDKI-unabhängigen Zellzyklusarrests in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung: Selbst p27-, p15- oder p21-defiziente Zellen erweisen sich nämlich als sensitiv gegenüber einem TGF-beta1-induzierten Wachstumsarrest (Nakayama *et al.*, 1996; Iavarone & Massague, 1997; Wolfram *et al.*, 2004).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass neben G1-Phase-Cyclinen, deren assoziierten Kinasen und CDKI auch c-Myc zu den molekularen Zielgenen von TGF-beta1 zählt (Pietenpol *et al.*, 1990a; Geng & Weinberg, 1993). c-Myc ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der Zellwachstum, Proliferation und Apoptose fördert und gleichzeitig die terminale Differenzierung inhibiert (Grandori & Eisenman, 1997; Facchini & Penn, 1998). Durch c-Myc wird eine Vielzahl an Genen reguliert: Während in die Zellzyklusprogression involvierte Gene wie cdc25a, die Cycline A2, B1, E, D2, und CDK4 durch c-Myc positiv reguliert werden, reprimiert der

Transkriptionsfaktor mehrere anti-proliferative Zielgene, darunter p15, p21 und p27 (Gartel & Shchors, 2003; Jung & Hermeking, 2009).

Die Expression von c-Myc ist in proliferierenden Zellen stark ausgeprägt; während terminaler Differenzierung und Zellzyklusarrest ist sie jedoch deutlich vermindert. Die Literatur beschreibt in diesem Zusammenhang die zentrale Rolle einer c-Myc-Suppression beispielsweise bei der Aktivierung der Smad-Signalkaskade beim TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest (Alexandrow *et al.*, 1995a; Feng *et al.*, 2002; Lee & Bae, 2002; Yagi *et al.*, 2002). Dieses Konzept wird durch Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass TGF-beta1-induzierte Effekte durch die ektopische Expression von c-Myc unterbunden werden können (Pietenpol *et al.*, 1990b). Auch *in-vitro*-Versuche mit Überexpression des c-Myc-Onkoproteins in AKR-2B-Fibroblasten, die eine chimäre, durch Östrogen induzierbare Form von c-Myc (mycER) exprimieren, bestätigen, dass c-Myc die wachstumsinhibierende Wirkung von TGF-beta1 blockiert (Alexandrow *et al.*, 1995a). In analoger Weise führt die künstliche Repression der c-Myc-Suppression zu einer Resistenz gegenüber dem anti-proliferativen Potential TGF-betas (Massague *et al.*, 2000).

Ein rapider Abfall der c-Myc-Expression durch TGF-beta1 konnte beispielsweise in Myoblasten (spindelförmige Vorläuferzelle der Skelettmuskelfasern beim Embryo) der Ratte beobachtet werden. Dieser war begleitet von einer verlangsamten Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus, gefolgt von einer Determinierung zur terminalen Differenzierung (Zentella & Massague, 1992). Eine rasche Reduktion der c-Myc-Expression durch TGF-beta1 konnte darüber hinaus auch in Keratinozyten nachgewiesen werden. Die Behandlung von Maus BALB/MK-Keratinozyten mit TGF-beta1 oder Antisense-c-Myc-Oligonukleotiden konnte den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus unterbinden und auf diese Weise das Wachstum der Zellen inhibieren (Pietenpol *et al.*, 1990a).

Die Herabregulierung von c-Myc durch TGF-beta1 scheint notwendig, um in der Folge die TGF-beta1-vermittelte Inaktivierung von G1-Phase-CDKs durch Induktion von CDKI, insbesondere p15 und p21, zu ermöglichen (Hannon & Beach, 1994; Warner *et al.*, 1999; Claassen & Hann, 2000). *In-vitro*-Versuche mit epithelialen Mv1Lu-Zellen aus der Lunge, die konditional humanes c-Myc exprimieren, konnten nachweisen, dass c-Myc die Induktion von p15 (INK4B) und folglich die Inhibition von G1-Phase CDKs verhindert (Warner *et al.*, 1999). Die anti-mitotische Wirkung von TGF-beta1 auf Mv1Lu-Zellen beruht somit, neben der verminderten Expression von c-Myc, auf der Inaktivierung CDK-inhibierender Genantworten.

Die Inhibierung der Zellzyklusprogression von immortalisierten humanen Keratinozyten durch TGF-beta1 ist dagegen durch eine erniedrigte Expression von c-Myc, begleitet von einer positiven Regulierung von p21 charakterisiert. In humanen Keratinozyten mit stabiler Expression von c-Myc kann die TGF-beta1-vermittelte Induktion der p21-Transkription blockiert und auf diese Weise der Zellzyklusarrest unterbunden werden. Darüber hinaus konnte durch die Überexpression von c-Myc in NIH 3T3-Zellen auch die basale Expression von p21 mRNA reprimiert werden (Claassen & Hann, 2000). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Herabregulierung von c-Myc durch TGF-beta1 für die nachfolgende Regulation von CDKI und die Inhibierung des Zellzyklus, entscheidend ist.

Möglicherweise kommt c-Myc auch eine bedeutende Rolle bei der Arretierung des Zellzyklus aNSZ durch TGF-beta1 zu. Die im Rahmen dieser Arbeit nach 7-tägiger Behandlung mit TGF-beta1 durchgeführte DNA-Array-Analyse enthüllte diesbezüglich eine signifikant erniedrigte Expression von Myc, dem Gen, welches für das Protein c-Myc kodiert (vgl. Tabelle 15, Abschnitt 3.1.2.ii.). Myc interagiert direkt mit Smad2 und Smad3, welche beide in entscheidender Weise in die TGF-beta1-Signalübertragung involviert sind, und hemmt dadurch deren wachstumsinhibierende Funktion (Feng *et al.*, 2002). Zwar fehlt bis dato der Nachweis einer verminderten c-Myc-Protein-Expression nach TGF-beta1-Behandlung, jedoch wäre naheliegend, dass der TGF-beta1-induzierte Zellzyklusarrest in aNSZ-Kulturen, neben der reduzierten Expression von Cyclin E, B1 und G1, in erster Linie durch eine verminderte Expression von c-Myc verursacht wird und zwar insofern, dass c-Myc als Schlüsselmediator des TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrests agiert. Dies ist auch aufgrund der Tatsache wahrscheinlich, dass c-Myc gewöhnlich Proliferation und Apoptose begünstigt, während es gleichzeitig die terminale Differenzierung inhibiert (Grandori & Eisenman, 1997; Facchini & Penn, 1998). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind genau diese Effekte nach der Behandlung mit TGF-beta1 invertiert, d. h., man beobachtet eine verminderte Proliferation und Apoptose, während die terminale Differenzierung, zumindest die neuronale, begünstigt wird (eigene Ergebnisse).

Eine Studie konnte belegen, dass aNSZ, die für 7 Tage in Anwesenheit von TGF-beta1 kultiviert werden, erst nach 8 Wochen nachfolgender Kultivierung ohne TGF-beta1 Wachstumsraten aufweisen, die mit denen unbehandelter Zellen vergleichbar sind (Wachs *et al.*, 2006). Falls Myc bzw. c-Myc tatsächlich für die verminderte Proliferation und den Zellzyklusarrest in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung (mit-) verantwortlich ist, könnte dies möglicherweise auch den in der Literatur beschriebenen lang anhaltenden Einfluss von TGF-beta1

auf die Proliferation aNSZ erklären. Ein wesentlicher Aspekt, der diese Theorie untermauert, ist nämlich die Tatsache, dass die Expression von Myc, anders als die der CDKI, auch nach 7-tägiger TGF-beta1-Behandlung noch stark reduziert war (vgl. Tabelle 15, Abschnitt 3.1.2.ii.).

Zusammenfassend identifizieren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse im Hinblick auf die Regulation von Zellzykluskomponenten einen molekularen Mechanismus, der die zytostatischen Effekte von TGF-beta1 auf aNSZ und den resultierenden Wachstumsarrest in der G0-Phase erklären könnte. Es ist anzunehmen, dass TGF-beta1 seinen Einfluss auf aNSZ 1) über die verminderte Expression von Cyclinen, im Besonderen Cyclin E, B1 und G1 und 2) durch die negative Regulation von Myc entfaltet. Um mehr Licht in diese dennoch nur rudimentär verstandenen Prozesse zu bringen, bedarf es sicherlich noch weiterführender Analysen und Validierungen, die letztlich ermöglichen sollen, die Vielfalt der Hinweise zu vernetzen und insbesondere auch die physiologische Relevanz des vorgeschlagenen Kontrollmechanismus zu überprüfen. Weiterhin lässt sich vermuten, dass neben den genannten Faktoren, zusätzliche, bis dato unbekannte Schlüsselregulatoren in den TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest involviert sind. Auch diese gilt es in Zukunft aufzudecken.

7.2. Die Modulation der adulten Neurogenese durch TGF-beta1 *in vitro*

7.2.1. Die Induktion des neuronalen Phänotyps in TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen

Der Prozess der Neurogenese wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert und involviert neben Migration, Determinierung und Zelltod unter anderem Proliferation und Differenzierung. Um terminal zu differenzieren, müssen Zellen zunächst aus dem Zellzyklus austreten und in die G0-Phase übergehen (Yoshikawa, 2000), bevor sie schließlich eine gliale oder neuronale Richtung einschlagen können. Erfolgt die Determinierung der Vorläuferzellen in Richtung eines neuronalen Zellschicksals, so wird schon früh nach der neuronalen Determinierung der Marker Dcx induziert, welcher transient und spezifisch in bis zu 4 Wochen alten neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen exprimiert wird und sich gemäß dieses Expressionsmusters in herausragender Weise zur Detektion adulter Neurogenese eignet (Brown *et al.*, 2003; Couillard-Despres *et al.*, 2005). Die vorliegende Arbeit demonstriert nun erstmals die Modulation der Dcx-Expression und damit der adulten Neurogenese durch den Wachs-

tumsfaktor TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen der SVZ unter Proliferationsbedingungen. Nach der Behandlung dieser Kulturen mit TGF-beta1 über einen Zeitraum von 7 Tagen konnte, neben einem Anstieg der Zellen in der G0-Phase, anhand der durchgeföhrten DNA-Array-Analyse eine erhöhte Dcx-mRNA-Expression nachgewiesen werden, während gleichzeitig eine reduzierte Menge an Mbp-mRNA bei gleichbleibender GFAP-mRNA im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen detektiert wurde. Im Rahmen einer Realtime-PCR-Validierung wurde zudem ein konsistenter Trend in Richtung einer erhöhten Dcx-Expression nach TGF-beta1-Behandlung im Verlauf einer 2-stündigen bis 10-tägigen Kultivierung beobachtet, der sich nach 7 und 10 Tagen als signifikant erwies; parallel wurde eine gesteigerte Dcx-Proteinexpression nach 7-tägiger TGF-beta1-Behandlung unter Proliferationsbedingungen aufgezeigt. Eine ähnliche Wirkung in Bezug auf die Differenzierung in Richtung eines neuronalen Zellschicksals wurde bereits für TGF-beta2 und TGF-beta3 anhand von mesenzephalen Vorläuferzellen der Maus beschrieben (Roussa *et al.*, 2006). Im sich entwickelnden ZNS weiß man dagegen von der Förderung der oligodendroglialen Differenzierung durch TGF-beta1 (Hunter *et al.*, 1993; McKinnon *et al.*, 1993). Die Resultate der DNA-Array-Analyse und der Realtime-PCR-Validierung stehen damit im deutlichen Gegensatz zu diesen Erkenntnissen, da sie, über die Dcx-Induktion hinaus, zudem eine verminderte Mbp-Expression nach TGF-beta1-Behandlung in aNSZ-Kulturen im Vergleich zu Kontroll-Kulturen belegen. Diese bestätigte sich anhand von Färbungen, die nach der Kultivierung aNSZ unter oligodendroglialen Differenzierungsbedingungen durchgeführt wurden, auch auf Proteinebene (vgl. Kap. 3.7.). Darüber hinaus konnte in diesem Zusammenhang die unter Proliferationsbedingungen beobachtete, unveränderte Expression von GFAP nach TGF-beta1-Behandlung verifiziert werden. Eine Zunahme der neuronalen Differenzierung bei gleichbleibender Astrozytenzahl und paralleler Abnahme der oligodendroglialen Population konnten auch Untersuchungen an adulten ZNS-Vorläuferzellen aus Nagetieren belegen, die mit Histon-Deazetylase-Inhibitoren behandelt wurden (Siebzehnrübl, 2007). Durch deren Einsatz konnte im Rahmen der Anwendung eines neuronalen Differenzierungsprotokolls die Menge differenzierender Neurone sogar verfünfacht werden. Interessanterweise fand sich auf molekularer Ebene zudem eine erhöhte Expression von Cyclin D2 (Siebzehnrübl, 2007), ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Dies lässt auf einen gemeinsamen, der Wirkung von TGF-beta1 und Histon-Deazetylase-Inhibitoren zugrunde liegenden Mechanismus schließen. Da die Array-Analyse keine signifikante Veränderung im Hinblick auf die Expression von Histon-Deazetylasen durch TGF-beta1 zeigte,

te, wäre denkbar, dass die Anwendung von Histon-Deazetylase-Inhibitoren zu einer Induktion von TGF-beta1 führt, welches im Anschluss die weiteren Effekte vermittelt.

Die Befunde dieser Promotionsarbeit stehen zudem auch im Einklang mit einer Studie, welche eine neuronale Differenzierung in embryonalen NSZ aus dem ventralen Mesenzephalon der Ratte im Anschluss an einen durch Deferoxamin-vermittelten Zellzyklusaustritt beschreibt (Kim *et al.*, 2006). Die Behandlung mit dem G1/S-Phase-Blocker im Vorfeld an die Kultivierung in Differenzierungsmedium resultierte in einer erhöhten Anzahl βIII-Tubulin-positiver Neurone, begleitet von einer Erhöhung von Map2-mRNA und -Protein zulasten der GFAP-Protein-Expression. Weiter förderte Deferoxamin nach 1-2 Tagen spezifisch die Anhäufung von p27-mRNA, welche nachfolgend eine Akkumulation des Proteins nach sich zog; diese ging mit einer Aktivierung des NeuroD-Promoters und einer Erhöhung der NeuroD-mRNA einher (Kim *et al.*, 2006). Ähnliches konnte eine unabhängige Studie zeigen, die nachwies, dass die Überexpression proneuraler Gene wie NeuroD2, Mash1 oder Neurogenin-1 in embryonalen Maus-Karzinomzellen über die Induktion von p27 und einen Zellzyklusarrest in G1 zur neuronalen Differenzierung führt (Farah *et al.*, 2000). Auch im sich entwickelnden Rückenmark bewirkt die Aktivierung von neurogenen Faktoren und p27 einen Zellzyklusexit sowie die neuronale Differenzierung, ausgelöst durch die Aktivität von TGF-beta1 (Garcia-Campmany & Marti, 2007). Wenngleich die anlässlich dieser Arbeit durchgeführte Array-Analyse keinen Hinweis auf einen Anstieg der p27- und NeuroD-mRNA nach 7-tägiger Kultivierung mit TGF-beta1 ergab, konnte der Transkriptionsfaktor NeuroD im Rahmen der Transpath-Analyse mit dem ArrayAnalyzer Tool dennoch als Schlüsselmolekül ausgemacht werden, welches, ausgehend von den regulierten Genen vom Microarray, durch überdurchschnittlich viele Reaktionen innerhalb der Signalnetzwerke der Transpath-Datenbank erreicht wird, und die Expression einer Vielzahl an Genen reguliert. Vor diesem Hintergrund ist nicht auszuschließen, dass eine veränderte p27- bzw. NeuroD-mRNA-Expression - obwohl möglicherweise kurz nach Beginn der TGF-beta1-Behandlung vorhanden - nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar war.

Eine weiterführende Studie zur oben genannten Studie von Kim *et al.* konnte belegen, dass der beobachtete Anstieg der Neurogeneserate infolge des G1/S-Zellzyklusarrests über einen Anstieg an TGF-beta1-mRNA und -Protein 24 h nach Beginn der Differenzierung mediert wird (Misumi *et al.*, 2008). Der G1/S-Phase-Blocker Deferoxamin induzierte zunächst eine gesteigerte Expression von TGF-beta1, welches im Anschluss die neuronale Differenzierung förderte. Folglich resultierte die Inhibierung des TGF-beta1-Signalweges über den TGFRI-In-

hibitor SB-505124 in einer verminderten, DFO-induzierten Neurogenese, gepaart mit einer erniedrigten p27-Proteinexpression und einer reduzierten Smad3-Translokation in den Nukleus (Misumi *et al.*, 2008). Damit stützen diese Erkenntnisse die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, welche einen Zellzyklusarrest sowie eine Induktion des neuronalen Phänotyps infolge der TGF-beta1-Behandlung belegen, in erheblichem Maße.

Normalerweise bleiben Zellen in einem undifferenzierten Zustand, solange sie proliferativen Stimuli ausgesetzt sind, und leiten die Differenzierung erst ein, sobald die mitogene Stimulation abnimmt. So konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie an aNSZ-Primärkulturen des Gyrus dentatus eine gesteigerte Neurogeneserate nach TGF-beta1-Behandlung unter Differenzierungsbedingungen, das heißt nach Entzug von Wachstumsfaktoren, nachweisen (Battista *et al.*, 2006). Es gibt jedoch Hinweise, wonach die terminale Differenzierung auch durch die aktive Interferenz von Mitogenen mit Wachstumsinhibitoren wie TGF-beta1 induziert werden könnte (Zentella & Massague, 1992). Die besondere Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liegt nun darin, dass diese, neben dem anti-mitogenen Effekt von TGF-beta1 auf aNSZ, erstmals eine Induktion der neuronalen Differenzierung in TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen unter Proliferationsbedingungen belegen. Da der Effekt von TGF-beta1 offenbar über die mitogenen Effekte von EGF und FGF in Kultur dominiert, drängt sich die Vermutung auf, dass TGF-beta1 über eine Inhibition des EGF/FGF-Signalweges agiert, um die Proliferation zu stoppen und die neuronale Differenzierung herbeizuführen. Angesichts dieser Annahme scheint die beobachtete Induktion der FGFR1-Expression nach TGF-beta1-Behandlung (vgl. Kap. 3.2.1.ii.) zunächst kontrovers. Jedoch könnte sie dem Zweck dienen, der Hemmung der EGF/FGF-Signalübertragung durch TGF-beta1 entgegenzuwirken und insofern eine Art negativen Rückkopplungs-Mechanismus darstellen, um die Proliferation der Zellen in Anwesenheit von TGF-beta1 zumindest teilweise aufrechtzuerhalten. TGF-beta1-behandelte Zellen sind ja bekanntlich in ihrer Proliferation eingeschränkt, aber nicht vollständig inhibiert. Die beobachtete Induktion von Cyclin D2 nach TGF-beta1-Behandlung, die im Zusammenhang mit dem TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest zu Beginn ebenfalls rätselhaft erschien, könnte möglicherweise Teil dieses Mechanismus sein und in der Wirkung von FGF begründet liegen, zumal bekannt ist, dass FGF die Expression von Cyclin D2 und die Anzahl proliferativer Teilungen in kortikalen Stammzellen der Maus erhöht (Lukaszewicz *et al.*, 2002).

Die führende Rolle eines TGF-beta1-mediierten anti-proliferativen Signals gegenüber mitogenen Signalen konnte bereits anhand von weiteren Studien aufgezeigt werden. Auch in Zel-

len aus der Neuralleiste dominierte TGF-beta1 über bFGF/Neurotrophin und führte - ähnlich wie in aNSZ-Kulturen - zu einer gesteigerten Neurogeneserate (Zhang *et al.*, 1997). Zudem konnte eine terminale Differenzierung in Anwesenheit von Mitogenen, ausgelöst durch TGF-beta1, anhand von Untersuchungen an Myoblasten der Ratte demonstriert werden (Zentella & Massague, 1992). Diese ging mit einer wachstumsinhibierenden Antwort einher, die zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase führte und von einem rapiden und persistenten Abfall der c-Myc-Expression sowie einem Abfall der Id-Expression begleitet war (Zentella & Massague, 1992). Diese Befunde machen weitere Parallelen zu TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen deutlich, nachdem aNSZ, die in Gegenwart von EGF und FGF kultiviert wurden, ebenso durch TGF-beta1 in ihrem Wachstum inhibiert waren. Darüber hinaus resultierte auch die Behandlung dieser Kulturen mit TGF-beta1 in einem Zellzyklusarrest, welcher mit einem Abfall der c-Myc-Expression einherging. Nicht zuletzt beeinflusste TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen auch die Expression von Id-Proteinen, welche im Allgemeinen die Progression durch den Zellzyklus über die Interaktion mit Zellzykluskomponenten fördern (Ruzinova & Benezra, 2003), in negativer Weise. So enthüllte die DNA-Array-Analyse eine stark erniedrigte Expression von Id3-mRNA nach der Behandlung aNSZ mit TGF-beta1 über einen Zeitraum von 7 Tagen (vgl. Tabelle 15; Kap. 3.1.2.ii.). Angesichts dieser zahlreichen Homologien in Bezug auf die Wirkung TGF-betas auf aNSZ-Kulturen und Myoblasten muss angenommen werden, dass TGF-beta1 die genannten Effekte über einen allgemeingültigen Mechanismus entfaltet.

Extrazelluläre Stimuli wie Mitogene beeinflussen über eine Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) wie z. B. FGFR und PDGFR die Aktivität Mitogen-aktivierter Protein (MAP)-Kinasen. RTKs aktivieren dazu zunächst einen komplexen Mechanismus, der über die Bindung von Ras an die Raf-Kinase initiiert wird und im Anschluss eine Protein-Kinase-Kaskade in Gang setzt. Als Erstes erfolgt die Aktivierung der Map Kinase Kinase Mek über die MAP Kinase Kinase Kinasen c-Raf, c-Mos sowie Mekk mittels Phosphorylierung, bevor schließlich Mek wiederum die MAP Kinase phosphoryliert und aktiv werden lässt. Letztere translokiert in den Nukleus, wo viele Zielgene des MAP Kinase-Signaltransduktionsweges, einschließlich Transkriptionsfaktoren, die über MAP Kinase Phosphorylierungen reguliert sind (z. B. Elk-1, c-Myc, c-Jun, c-Fos, und C/EBP beta), lokalisiert sind (Davis, 1995). Die Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen regulieren auf diese Weise zahlreiche zelluläre Aktivitäten, wie Genexpression, Proliferation, Differenzierung und Zelltod (Pearson *et al.*, 2001). Innerhalb der Upstream-Analyse im Rahmen der Pathway-bezogenen Auswertung der DNA-Array-Analyse

wurde Mek1 (Map2k1) als Schlüsselregulator, der die Expression einer Vielzahl an Genen kontrolliert, identifiziert. Mek1 wird, ausgehend von den Inputgenen, durch überdurchschnittlich viele Reaktionen erreicht, zumal sich die Signalwege vieler Gene, darunter Tp53, PDGFRa, TGFRII, c-Myc sowie Hes1 bei diesem Molekül überschneiden. Somit scheint Mek1 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Genexpression in TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen zuzukommen.

In kortikalen Vorläuferzellen agieren aktivierte PDGF- und FGF-Rezeptoren über den MAP ERK Kinase (Mek)-C/EBP-Signalweg, um die Neurogenese zu steigern (Davis, 1995). Da sich anlässlich der DNA-Array-Analyse eine erhöhte Expression von PDGFR und FGFR nach TGF-beta1-Behandlung, begleitet von einer verminderten Expression von MAPK3 (ERK1) und c-Myc ergab, ist eine Involvierung des Ras/ERK/MAPK-Signalweges in die Vermittelung der TGF-beta1-induzierten zellulären Antworten wahrscheinlich. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch TGF-beta1 wurde zudem bereits in verschiedenen Zellsystemen beobachtet (Massague, 2000). Mehrere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass TGF-beta sowohl Ras wie auch ERK1/2 aktivieren kann (Mulder & Morris, 1992; Hartsough & Mulder, 1995; Frey & Mulder, 1997). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivierung des Ras/ERK/MAPK-Signalweges durch TGF-beta1 eine autokrine Vervielfältigung der TGF-beta1-Expression induzieren kann (Yue & Mulder, 2000). Über die Art, wie TGF-beta1 zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges führt, ist man sich dagegen noch uneinig. Zwar gibt es Hinweise, wonach Smad-Proteine mit Mitogen-aktivierter Kinase interagieren (Seoane *et al.*, 2004); jedoch schlagen verschiedene Studien eher einen direkten, Smad- und transkriptionell/translationell-unabhängigen Mechanismus vor. Dies resultiert einerseits aus der Tatsache, dass der MAPK-Pathway bereits innerhalb von Minuten nach der TGF-beta1-Behandlung aktiviert wird (Massague, 2000). Andererseits stützen aber auch Experimente mit Smad 4-defizienten Zellen und dominant-negativen Smad-Formen die Theorie eines Smad-unabhängigen Mechanismus zur Aktivierung des MAPK-Signalweges durch TGF-beta1 (Engel *et al.*, 1999). Erst kürzlich konnte die durch die RTK/Ras/MAPK-Aktivität induzierte N-terminale Phosphorylierung von p53 als Verbindungsstelle, welche TGF-beta1 und Ras/MAPK-Signale integriert, identifiziert werden (Cordenonsi *et al.*, 2007).

Die neuronale Differenzierung wird durch verschiedene Faktoren streng reguliert (Ohnuma & Harris, 2003). Während zum einen Transkriptionsfaktoren wie Mash1 und trophische Faktoren wie z. B. Neurotrophin-3 Schlüsseldeterminanten der neuronalen Differenzierung sind, beeinflussen auch CDKI, neben ihrer Rolle als Inhibitoren der Zellzyklusprogression, über

einen CDK-unabhängigen Mechanismus die Differenzierung neuraler Zellen (Ohnuma *et al.*, 2001; Cremisi *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2003; Vernon *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007). So konnte dem universellen CDKI p27 eine essentielle Rolle im Hinblick auf die neuronale Differenzierung zugewiesen werden (Levine *et al.*, 2000; Dyer & Cepko, 2001), wenngleich p27 auch für die Differenzierung von Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläufern erforderlich zu sein scheint (Durand & Raff, 2000; Koguchi *et al.*, 2002). Dementsprechend führte die Depletion von p27 im Rahmen einer unabhängigen Studie zu einer Reduktion der neuronalen Differenzierung (Carruthers *et al.*, 2003), während der Verlust der p27-Funktion im Säugergehirn zudem in einer erhöhten proliferativen Kapazität von Oligodendrozyten-Vorläufern resultierte (Casaccia-Bonelli *et al.*, 1999). In embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen, die mit dem Zellzyklusblocker Deferoxamin behandelt wurden, wurde dagegen eine Zunahme der neuronalen Differenzierung aufgrund einer erhöhten p27-Proteinexpression beobachtet; auch führte die Transfektion von Neurosphäroiden mit p27 zu einem Anstieg der Neurogeneserate (Kim *et al.*, 2006). Anlässlich dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass potentiell jede Substanz, welche die Fähigkeit besitzt, einen G1/S-Phase-Arrest zu veranlassen, die neuronale Differenzierung protegieren könnte (Misumi *et al.*, 2008). Wenngleich auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Behandlung aNSZ-Kulturen mit TGF-beta1 einen Zellzyklusarrest induziert und die neuronale Determinierung dieser Zellen fördert, sind diese Hinweise dennoch unzureichend, um das postulierte Modell eindeutig zu belegen. Insofern scheinen zusätzliche Experimente nötig, um letztlich aufzuklären, ob die Aktivierung des Arrest-Pathways tatsächlich die grundlegende Ursache der gesteigerten Neurogeneserate ist.

Dem Anschein nach ist die gesteigerte Neurogeneserate in aNSZ-Kulturen nach 7-tägiger Behandlung mit TGF-beta1, anders als im embryonalen System, unabhängig von einer erhöhten p27-Expression, zumal im Rahmen der DNA-Array-Analyse keine veränderte Expression des CDKI verifiziert werden konnte. Auf der Basis von Untersuchungen, welche eine Induktion von CDKI innerhalb kurzer Zeit nach dem auslösenden Stimulus erkennen ließen, ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine möglicherweise veränderte Expression von p27 und/oder weiteren Zellzyklus-Inhibitoren nach 7 Tagen nicht mehr detektierbar war. Das einzige greifbare Indiz dafür, dass CDKI in die Differenzierung aNSZ involviert sein könnten, lieferte letztlich die veränderte Expression des Zellzyklusinhibitors p57 nach 7-tägiger TGF-beta1-Behandlung (vgl. Tabelle 15; Kap. 3.1.2.ii.). Eine Untersuchung an Zellen aus der Neuralplatte konnte nämlich zeigen, dass die Funktion von p57 benötigt wird, um die Zellteilung zu stoppen und die Differenzierung in Neurone zu begünstigen; darüber hinaus ist die

CDKI-Funktion zudem für die Spezifizierung von Oligodendrozyten von ventralen Rückenmarksvorläufern erforderlich. In diesem Zusammenhang scheint allerdings die Menge an CDKI ein wesentlicher Faktor zu sein, der das Zellschicksal bestimmt. Während hohe Konzentrationen an p57 den Zellzyklusarrest und die neuronale Entwicklung fördern, werden im Verlauf der späten Embryogenese neurale Zellen mit niedrigen p57-Konzentrationen für das oligodendrogliale Schicksal spezifiziert (Park *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu der Studie von Park *et al.* gibt es auch Hinweise, wonach p57 in neuralen Stammzellen als Repressor neuronaler Differenzierung nach Mitogen-Entzug agiert, während es die astrogliale Differenzierung nicht beeinflusst. Der CDKI entfaltet seine inhibierende Wirkung hier durch Interaktion mit pro-neuronalen basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Faktoren wie Mash1 (Ascl1) und NeuroD und reprimiert dadurch die Aktivität der Transkriptionsfaktoren (Joseph *et al.*, 2009). Angesichts der verminderten Expression von p57 und einer erhöhten Expression von Ascl1 auf mRNA-Ebene nach TGF-beta1-Behandlung ist anzunehmen, dass p57 in aNSZ-Kulturen, entgegen seiner allgemein beschriebenen Rolle als Inhibitor der Zellzyklusprogression, eine Rolle bei der Differenzierung in Richtung eines neuronalen Zellschicksals zukommt. In diesem Kontext sind allerdings noch Studien nötig, um 1) aufzuklären, ob die verminderte Expression von p57 tatsächlich für die Induktion eines neuronalen Phänotyps in aNSZ-Kulturen bedeutsam ist (insbesondere sollte auch die Expression von p57 auf Proteinebene untersucht werden) und wenn ja 2) ob die erniedrigte Expression von p57 die neuronale Differenzierung gezielt fördert oder nur erlaubend zulässt und somit neben weiteren, Einfluss nehmenden Faktoren nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Es gibt Hinweise, wonach eine wechselseitige Verbindung zwischen der p57-Expression und dem Notch-Signalweg besteht. Beispielsweise kontrolliert der Notch-Pathway die Größe der Augenlinse, indem er die Expression von p57 reguliert (Jia *et al.*, 2007). Auch konnten Studien am Zebrafisch nachweisen, dass der Notch-Signalweg in negativer Weise Einfluss auf die p57-Expression nimmt (Park *et al.*, 2005). Demzufolge macht der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer verminderten p57-Expression in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung eine Involvierung des Notch-Signalweges wahrscheinlich. Darüber hinaus macht ein weiterer Aspekt deutlich, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges im Zusammenhang mit aNSZ-Kulturen, die mit TGF-beta1 behandelt wurden, bedeutsam sein könnte: Auf der Grundlage von Untersuchungen an epithelialen Zellen konnte nämlich bereits eine Verbindung zwischen dem Notch- und dem TGF-beta-Signalweg nachgewiesen werden, die über eine TGF-beta1-vermittelte Induktion des Notch-Liganden Jagged1 mediert ist (Zavadil

et al., 2004). Die beiden Signalwege sind zudem über eine mögliche direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen den Signal-transduzierenden Elementen beider Pathways, der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) mit dem intrazellulären Signaltransducer Smad3, verflochten (Blokzijl *et al.*, 2003). Anhand einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der die humane NICD ektopisch in epithelialen Mauszellen exprimiert wurde, konnte die zentrale Bedeutung der Notch-Signalübertragung in Bezug auf den TGF-beta1-induzierten Wachstumsarrest epithelialer Zellen demonstriert werden (Niimi *et al.*, 2007). Die Blockierung der endogenen Notch-Signalübertragung durch den Einsatz von γ -Sekretase-Inhibitoren (Brunkan & Goate, 2005) in Anwesenheit von TGF-beta1 machte weiter deutlich, dass endogenes Notch-Signaling sogar essentiell ist, damit TGF-beta1 seine zytostatischen Effekte entfalten kann, zumal der gleichzeitige Einsatz des Blockers und TGF-beta1 zwar zu einer unvollständigen, aber dennoch wesentlichen Wiederherstellung des S-Phase-Eintritts im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit TGF-beta1 behandelt wurden, führte. Darüber hinaus enthielt eine transkriptomale Analyse nach der Blockierung von endogenem Notch-Signaling verschiedene Gene wie p21, deren Regulation durch TGF-beta1 einen aktiven Notch-Pathway erfordert (Niimi *et al.*, 2007). Andererseits belegte eine 2003 veröffentlichte Studie aber eine Blockierung des TGF-beta1-medierten Wachstumsarrests in Epithelzellen der Lunge durch NICD. Die NICD beeinträchtigte diesbezüglich nicht die TGF-beta-Signalübertragung per se, sondern blockierte die Induktion des CDKI p15 durch andauernde, erhöhte Expression von c-Myc in NICD-exprimierenden Zellen (Rao & Kadesch, 2003).

Neben seiner Involvierung in die Zellproliferation (Maillard *et al.*, 2005), gilt Notch gemeinhin als Hauptregulator des Zellschicksals (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Lai, 2004). Der Signalübertragung durch die Jagged1/Notch1-Signalkaskade kommt eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit und des Potentials zur Differenzierung von Stammzellen zu (Morrison *et al.*, 2000; Hitoshi *et al.*, 2002; Lutolf *et al.*, 2002; Nyfeler *et al.*, 2005). Im entwickelnden ZNS bewahrt die Aktivierung der Notch-Signalkaskade den Progenitor-Pool und inhibiert die neuronale und oligodendrogliale Differenzierung, während die Astrogliogenese gefördert wird (Ge *et al.*, 2002). Untersuchungen der retinalen Neurogenese schlagen darüber hinaus, neben der Rolle von Notch1 bei der Differenzierung unreifer Zellpopulationen, eine Involvierung von Notch1 in die Erhaltung des differenzierten Status vor, da die Aktivität von Notch1 in diesem Zusammenhang mit unreifen und terminal differenzierten Zellen assoziiert wird (Ahmad *et al.*, 1995). Sowohl Notch1 als auch Jagged1 sind auch in den adulten, neurogenen Nischen vertreten, wo sie eine wichtige Stellung bei der Er-

haltung des Stammzellpools einnehmen und neuronale Stammzelldifferenzierung kontrollieren (Nyfeler *et al.*, 2005). Auch *in vitro* agiert endogenes Jagged1 durch Notch1, um die Selbsterneuerungsfähigkeit multipotenter neuraler Stammzellen aus der postnatalen SVZ zu stimulieren (Nyfeler *et al.*, 2005). Weiterführende Studien weisen darauf hin, dass Notch, neben der Inhibierung der neuronalen Differenzierung, aktiv die Entwicklung einer glialen Identität fördern könnte (Gaiano *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2000). So konnte in adulten, neuronalen Stammzellen aus dem Hippocampus eine Förderung der astrogialen Differenzierung nachgewiesen werden (Tanigaki *et al.*, 2001). Weiter konnte in verschiedenen Systemen durch die Überexpression einer aktiven Form von Notch die Gliogenese zulasten der Neurogenese erhöht werden (Gaiano & Fishell, 2002). Die Rolle von Notch während der Gliogenese in Vertebraten scheint allerdings nicht uniform zu sein, zumal Notch1 und Jagged1 die oligodendrogliale Differenzierung im optischen Nerv reprimieren (Wang *et al.*, 1998). Ob und inwieweit der Notch-Signalweg im Zusammenhang mit der verminderten Proliferation und der Induktion des neuronalen Phänotyps in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung von Bedeutung ist, bleibt noch endgültig zu klären. Allerdings ergab die Auswertung der DNA-Array-Analyse eine veränderte Expression mehrerer Komponenten des Notch-Signalweges nach 7-tägiger TGF-beta1-Behandlung, was die Theorie einer Involvierung des Notch-Signalweges in die Vermittelung der TGF-beta1-induzierten Effekte weiter untermauert. Wenngleich die Notch-Rezeptoren selbst keine veränderte Expression nach TGF-beta1-Behandlung erkennen ließen, fand sich eine erhöhte Expression der Notch-Liganden Dll1 und Jagged1 nach TGF-beta1-Behandlung. Darüber hinaus waren auch verschiedene Zielgene des Notch-Signalweges, z. B. Hes1 und Ascl1, betroffen, welche ebenfalls eine erhöhte Expression nach TGF-beta1-Behandlung aufwiesen.

Die Notch-Signalkaskade wird über Rezeptoren (Notch 1-4), die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, mediert (Lai, 2004). Nach der Bindung eines, auf einer benachbarten Zelle exprimierten, Transmembranliganden (Delta-like 1, Delta-like 2, Delta-like 3 oder Jagged1, Jagged2) an den Rezeptor erfolgt im Anschluss die proteolytische Spaltung von Notch durch TACE (tumor necrosis factor alpha converting enzyme) und γ -Sekretase. Letztere führt zur Freisetzung der NICD (Notch intracellular domain) von der Membran (Schroeter *et al.*, 1998) und erlaubt deren Translokation in den Nukleus, wo die NICD an den Transkriptionsfaktor CSL bindet, der wiederum die Expression von Targetgenen stimuliert (Lai, 2004). Zu den Zielgenen des Notch-Pathways zählen unter anderem die Hes-Transkriptionsfaktoren, welche einen Aspekt der Notch-Signalübertragung, nämlich die Blockierung der Neurogenese, ver-

mitteln. Der Transkriptionsfaktor Hes1, der zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren gehört, reprimiert die neuronale Differenzierung (Chitnis, 1995) und trägt zur Erhaltung des Stammzellpools bei, indem er die Transkription proneuraler Gene wie Ascl1 (Mash1) durch direkte Bindung an den Ascl1-Promoter oder aber durch die Formierung eines nicht funktionalen Heterodimers mit E47 unterdrückt (Chen *et al.*, 1997; Parks *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 1998; Cau *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2001; Kageyama *et al.*, 2005). Darüber hinaus beeinflusst Hes1 auch die gliale Differenzierung. So führte die Überexpression von Hes1 in glial-determinierten Vorläuferzellen zu einer verminderten Expression von Mbp zugunsten einer erhöhten GFAP-Expression (Wu *et al.*, 2003). Eine vor wenigen Jahren veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass die Aktivierung des TGF-beta-Signalweges die Expression von Hes1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhöht (Blokzijl *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis konnte anlässlich der DNA-Array-Genexpressionsanalyse an aNSZ-Kulturen verifiziert werden. Die ebenfalls beobachtete, erniedrigte Mbp-Expression nach TGF-beta1-Behandlung könnte demnach in Verbindung mit der Induktion von Hes1 stehen.

Neben Hes1 kommt auch einem weiteren Mitglied der bHLH-Protein-Familie eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Differenzierung neuraler Stammzellen (Kageyama *et al.*, 2005) zu: Ascl1. Eine im Jahr 2000 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass die Überexpression von Ascl1 in embryonalen Maus-Zellen ein neuronales Zellschicksal induziert (Farah *et al.*, 2000). Ascl1 zählt somit zu den aktivierenden bHLH-Transkriptionsfaktoren, den sogenannten proneuralen Proteinen. Proneurale bHLH-Transkriptionsfaktoren wie Ascl1 fördern aber nicht nur die Spezifizierung eines neuronalen Zellschicksals, sondern inhibieren darüber hinaus zugleich die frühzeitige, gliale Differenzierung *in vitro* und *in vivo* (Furukawa *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001). Des Weiteren begünstigen sie auch die Expression von Zellzyklusinhibitoren (Bertrand *et al.*, 2002). Wie weiter oben bereits dargelegt, lässt sich nach 7-tägiger Inkubation aNSZ-Kulturen in Anwesenheit von TGF-beta1 eine Zunahme der Ascl1-mRNA-Expression im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen beobachten. Angesichts der Tatsache, dass Hes1 gewöhnlich die Expression von Ascl1 innerhalb derselben Zelle inhibiert, muss aufgrund der parallelen Erhöhung der Ascl1- und Hes1-mRNA (eigene Ergebnisse, siehe Kap. 3.1.3., Tabelle 18) angenommen werden, dass die veränderte mRNA-Expression von Ascl1 und Hes1 verschiedene Zellpopulationen der aNSZ-Kultur betrifft.

Dies ließe sich möglicherweise über einen Mechanismus, ähnlich dem der lateralen Inhibition, welcher im Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg während der Entwicklung nach-

gewiesen wurde, erklären. Die laterale Inhibition beschreibt die interzelluläre Regulation zweier Zellen, wobei die Signal aussendende Zelle die benachbarte Zelle hindert, ein ihr analoges Zellschicksal zu forcieren. Im sich entwickelnden Säugegehirn geht dies folgendermaßen vonstatten: Das proneurale Protein Mash1 interagiert mit dem Promoter des Notch-Liganden Dll1 und induziert dessen Expression. Dll1 aktiviert in der Folge den Notch-Signalweg in benachbarten Zellen (Castro *et al.*, 2006). Dadurch werden in diesen Zellen Hes1 und Hes5 exprimiert, was dazu führt, dass die Zellen negativ für die Expression von proneuralen Genen und Notch-Liganden werden und als Stammzellen verbleiben (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999), weil Hes die Expression proneuraler Gene innerhalb dieser Zellen inhibiert. Die verminderte Expression von Notch-Liganden bewirkt anschließend, dass der Notch-Signalweg in zur verbleibenden Stammzelle benachbarten Zellen nicht angeschaltet wird. Dies resultiert wiederum in einer erhöhten Expression von proneuralen und Notch-Liganden-Genen in der benachbarten Zelle, die schließlich neuronal ausdifferenziert. Auf der Basis dieses Mechanismus lässt sich der Einfluss von TGF-beta1 auf die Neurogenese in aNSZ-Kulturen möglicherweise anhand des folgenden Modells erklären: Durch die Kultivierung aNSZ in Anwesenheit von TGF-beta1 wird initial Ascl1 in Vorläuferzellen induziert. Infolgedessen steigt in diesen Zellen die Expression von Dll1 an, welches in benachbarten, Notch-exprimierenden Zellen den Notch-Signalweg aktiviert und über Hes1 zu einer Hemmung der neuronalen Differenzierung in diesen Zellen führt, sodass sie als Stammzellen verbleiben. Die Signal aussendenden Zellen, in denen ursprünglich Ascl1 induziert wurde, schlagen dagegen einen Weg in Richtung der neuronalen Differenzierung ein, zumal Ascl1 neuronale Gene aktiviert und - unter Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie bFGF - die neuronale Differenzierung fördert (Gangemi, 2004). Ein derartiger Mechanismus scheint insbesondere auch vor dem Hintergrund einer Notch-Expression in Stammzellen aus den neurogenen Regionen des adulten Nagerhirns (Stump *et al.*, 2002) nicht unwahrscheinlich und könnte womöglich die gestiegerte Dcx-Expression/Neurogeneserate nach TGF-beta1-Behandlung erklären. Da diese Überlegungen rein spekulativen Charakters sind, können letztlich aber nur zusätzliche Experimente zeigen, ob die aufgestellte Hypothese von physiologischer Relevanz ist und inwieweit die Signalübertragung durch die Notch-Signalkaskade zur Induktion des neuronalen Phänotyps in TGF-beta1-behandelten aNSZ-Kulturen beiträgt. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wäre sicherlich die Blockierung von Hes1 im Hinblick auf die Möglichkeit, dass sich die Neurogeneserate dadurch noch weiter steigern ließe, von besonderem Interesse.

Dass der Notch-Signalkaskade in jedem Fall eine Bedeutung bei der Vermittelung der TGF-beta1-induzierten Effekte in aNSZ zukommt, wird allerdings schon aufgrund eines weiteren Aspekts klar ersichtlich. Neben der erhöhten Expression von Dll1 wurde im Rahmen der DNA-Array-Expressionsanalyse nämlich auch eine erhöhte Expression von Jagged1 nach TGF-beta1-Behandlung nachgewiesen, die mittels Realtime-PCR bestätigt werden konnte. Jagged1 wird in neurogenen Regionen des adulten ZNS - in der adulten SVZ in direkter Nachbarschaft zu Notch-exprimierenden Zellen - exprimiert (Stump *et al.*, 2002). Untersuchungen an Stammzellen aus der SVZ verweisen auf eine zentrale Rolle von Jagged1 bei der Erhaltung ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit und damit der Stammzellpopulation im postnatalen Gehirn (Nyfeler *et al.*, 2005). Der Funktionsverlust von Jagged1 führte nämlich zu einem Verlust selbstreplizierender, neuraler Stammzellen *in vitro*, während die Applikation von löslichem Jagged1 die Selbsterneuerungsfähigkeit und das neurogene Potential von multipotenten neuralen Stammzellen wiederherstellte (Nyfeler *et al.*, 2005). Die stetige Zunahme der Jagged1-Expression, die im Verlauf von 10d während der TGF-beta1-Behandlung beobachtet wurde (eigene Ergebnisse), könnte demzufolge die unveränderte Selbsterneuerungsfähigkeit in aNSZ-Kulturen der SVZ nach TGF-beta1-Behandlung erklären (Wachs *et al.*, 2006). Allerdings scheint der Befund vor dem Hintergrund einer verminderten Proliferation aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung zunächst nicht plausibel, würde man aufgrund der dargelegten Studien doch vermuten, dass eine erhöhte Jagged1-Expression in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung die Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen und folglich deren Proliferation fördert. Eine mögliche Erklärung diesbezüglich könnte ein fein abgestimmter Mechanismus zwischen der Signalübertragung durch die Jagged1/Notch-Signalkaskade, welche die Erhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit und damit die Proliferation der Stammzellen begünstigt, in Konkurrenz zur Signalübertragung durch die Delta-like 1/Notch-Signalkaskade liefern. Letztere könnte, wie oben beschrieben, im Rahmen eines Mechanismus ähnlich dem der lateralen Inhibition über die Induktion von Hes1 in Notch-exprimierenden Zellen dazu beitragen, dass diese als Stammzellen verbleiben. Da Hes1 bekanntlich die Reversibilität zellulärer Quieszenz reguliert (Sang *et al.*, 2008), steht dessen erhöhte Expression in TGF-beta1-behandelten Kulturen möglicherweise in direktem Zusammenhang mit dem in der FACS-Analyse beobachteten G0-Arrest. Auf der Basis dieser Überlegungen lässt sich vermuten, dass die Signalübertragung mittels Jagged1 oder Delta-like 1 unterschiedliche Zellpopulationen betrifft. Es wäre denkbar, dass Jagged1 die Fähigkeit zur Selbstreplikation in einer Teilpopulation von Stammzellen erhält, während eine weitere Teilpopulation über die Induk-

tion von Dll1 bzw. Hes1 zunächst in G0 überführt wird und folglich nicht proliferiert. Die verminderte Proliferation trotz Jagged1-Induktion nach TGF-beta1-Behandlung ließe sich anhand dieses vorgeschlagenen Modells dadurch erklären, dass der inhibierende Einfluss auf die Proliferation, ausgelöst durch den G0-Arrest, überwiegt, sodass die Zellen mit TGF-beta1 zwar proliferieren, aber im Vergleich zu unbehandelten Zellen in ihrer Proliferation limitiert sind. Vor dem Hintergrund des postulierten Mechanismus, in dem der Einfluss des G0-Arrests über die Effekte von Jagged1 dominiert, ließe sich zudem die verminderte Expression von Nestin nach TGF-beta1-Behandlung (eigene Ergebnisse) erklären, zumal aufgrund des G0-Arrests weniger Nestin-exprimierende Stammzellen generiert würden. Zur eindeutigen Aufklärung der Mechanismen, die letztlich zu der verminderten Proliferation bei gleichzeitig erhöhter Jagged1-Expression führen, sind dennoch zusätzliche Analysen nötig. Interessant wäre beispielsweise die Fragestellung, ob die Blockierung der Jagged1-Expression zu einer weiteren Zunahme des G0-Arrests führen könnte. Um die funktionelle Relevanz der Jagged1-Induktion nach TGF-beta1-Behandlung zu untersuchen, könnte endogenes Jagged1 durch den Einsatz von siRNA dezimiert und anschließend die Zellzyklusverteilung analysiert werden. Zumal der TGF-beta1-induzierte Wachstumsarrest zwar lang anhaltend, aber auch reversibel ist (Wachs *et al.*, 2006), stellt sich weiter die Frage, ob und inwiefern Jagged1 im Hinblick auf den Wiedereintritt in den Zellzyklus eine Rolle spielt.

Die Datenlage bezüglich der Modulation der adulten Neurogenese durch TGF-beta1 *in vivo* erscheint zum Teil noch kontrovers, was in Unterschieden in Bezug auf die jeweilig benutzten Tiermodelle und in unterschiedlichen Analysemethoden begründet sein mag. So konnte eine Studie, in der TGF-beta1 über einen Zeitraum von 7 Tagen über osmotische Minipumpen in den lateralen Ventrikel adulter Ratten infundiert wurde, im Anschluss eine verminderte Neurogeneserate im HC und in der SVZ nachweisen, wenngleich sich ein signifikanter Anstieg der BrdU/NeuN-positiven, reifen Neurone im Bulbus olfactorius fand (Wachs *et al.*, 2006). Erstere Ergebnisse bestätigten sich im Rahmen eines Experiments an transgenen Mäusen, die TGF-beta1 unter dem Promoter des GFAP-Gens spezifisch in Astrozyten überexprimieren, zumal TGF-beta1 die hippocampale Neurogenese dieser Mäuse inhibierte und die Generierung neuer Nervenzellen beinahe vollständig blockierte (Buckwalter *et al.*, 2006). Ergebnisse aus erst kürzlich durchgeföhrten Studien legen dagegen eine Zunahme der Neurogenese *in vivo* nach TGF-beta1-Behandlung nahe. In transgenen Dcx-promo-Luziferase-Mäusen, welche die Glühwürmchen-Luziferase unter der Kontrolle des humanen Dcx-Promoters exprimieren, führte die Anwendung von TGF-beta1 zu einer gesteigerten Dcx-Expression (unver-

öffentlichte Ergebnisse von Finkl R., Couillard-Despres S., und Aigner L.). Ebenso konnte eine unlängst publizierte Studie an Mäusen zeigen, dass die intranasale Administration von TGF-beta1 nach einem Schlaganfall die Zahl Dcx- und NeuN-positiver Zellen in der SVZ erhöht (Ma *et al.*, 2008). Darüber hinaus führte auch die Injektion adenoviraler, TGF-beta1-exprimierender Vektoren in die SVZ adulter Ratten zu einer Steigerung der Neurogenese in der ipsilateralen Hemisphäre (Mathieu *et al.*, 2010). Eine durch TGF-beta1 induzierte, gesteigerte Neurogeneserate *in vivo* konnte zudem bereits für den Gyrus dentatus des HC belegt werden, nachdem in Ratten, in denen chirurgisch die Nebennieren entfernt wurden, eine 10-fach erhöhte TGF-beta1-mRNA-Menge detektiert wurde, welche mit dem Ausmaß der Neurogenese korrelierte (Battista *et al.*, 2006).

7.2.2. Die funktionelle Relevanz der TGF-beta1-vermittelten neuronalen Induktion

Um zu prüfen, inwieweit die in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion des neuronalen Phänotyps (Dcx-Expression) in aNSZ-Kulturen nach TGF-beta1-Behandlung *in vitro* funktionell von Bedeutung ist, wurde mittels elektrophysiologischer Untersuchungen der Reifegrad der Zellen analysiert. Dazu wurden die zu vermessenden Zellen nach folgendem Kriterium ausgewählt: Sie durften keinen Kontakt zu Nachbarzellen aufweisen, sodass gewährleistet war, dass jeweils nur der Besatz an Ionenkanälen und die Stromdichte einer Zelle gemessen wurde. Die auf diese Weise gewonnenen Daten bestätigten die neuronale Determinierung aNSZ infolge der TGF-beta1-Behandlung, zumal jede der vorab in Anwesenheit von TGF-beta1 kultivierten Zellen bei der Vermessung charakteristische, neu auftretende Natriumströme aufwies. Erstaunlicherweise ließ der Großteil dieser Zellen bereits einen reifen neuronalen Charakter erkennen und zeigte dementsprechend im Zuge der Depolarisation infolge einer Strominjektion die Ausbildung eines Aktionspotentials, was die grundlegende Eigenschaft eines funktionsfähigen, reifen Neurons darstellt. Insgesamt waren etwa 84 % der vermessenen TGF-beta1-behandelten Zellen (42 von 50 vermessenen Zellen) in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren, während innerhalb der Kontroll-Kulturen in keiner der 112 vermessenen Zellen weder Natriumströme noch Aktionspotentiale nachweisbar waren. Folglich deuten die Ergebnisse dieser Untersuchungen darauf hin, dass die Inkubation aNSZ mit TGF-beta1 nicht nur eine Induktion des neuronalen Phänotyps (Dcx-Induktion) bewirkt, sondern darüber hinaus auch zur funktionellen Ausreifung (Bildung von Aktionspotentialen) eines Großteils der Zellen beiträgt. In Übereinstimmung mit den Elektrophysiologie-Daten

belegte die DNA-Array-Genexpressionsanalyse eine erhöhte Expression mehrerer mit neuronaler Transmission assoziierter Gene nach TGF-beta1-Behandlung, darunter „sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide“ (*Scn1b*), „amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal“ (*Accn1*), „calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4“ (*Cacng4*), „Ca²⁺-dependent activator protein for secretion“ (*Cadps*), „ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 2 polypeptide“ (*Atp1a2*) sowie „neurexin 1“ (*Nrxn1*) (vgl. Kap. 3.1.2.ii., Tabelle 16). Bei Letzterem handelt es sich um einen Rezeptor, der auf der Zelloberfläche lokalisiert und über die Bindung von Neuroliginen in die effiziente Neurotransmission involviert ist (Reissner *et al.*, 2008). Erwartungsgemäß fand sich daher auch eine verstärkte Expression von Neurologin 1 nach TGF-beta1-Behandlung.

Dass dennoch ca. 16 % der TGF-beta1-behandelten Zellen unreif waren, im Sinne einer nicht vorhandenen Fähigkeit, Aktionspotentiale auszulösen, mag in einer zu geringen Dichte der vorhandenen Natriumkanäle begründet liegen. Tatsächlich zeigten sich nämlich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Dichte der Natriumkanäle zwischen Zellen, denen es möglich war, Aktionspotentiale zu generieren und Zellen, die nicht dazu in der Lage waren. In einer unabhängigen Studie, in der die elektrophysiologischen Eigenschaften von Zellen innerhalb der SVZ anhand von postnatalen Gehirnschnitten der Maus evaluiert wurden, wurde festgestellt, dass neuronale Vorläuferzellen nicht fähig sind, Aktionspotentiale auszulösen, obgleich in etwa 60 % dieser Zellen Natriumströme detektierbar waren (Wang *et al.*, 2003). Auch Vorläuferzellen aus dem vorderen Bereich der SVZ des neonatalen Rattengehirns, welche einen neuronalen Phänotyp aufwiesen, zeigten größtenteils Natriumströme, während aber nur 1 aus 12 Zellen in der Lage war, ein Aktionspotential zu erzeugen (Stewart *et al.*, 1999). Wahrscheinlich handelt es sich bei der Population an unreifen Zellen innerhalb der TGF-beta1-behandelten Kulturen gleichermaßen um neuronale Vorläuferzellen oder aber junge Neurone, welche für gewöhnlich (noch) Dcx exprimieren, während die reiferen Zellen, die bereits fähig sind, Aktionspotentiale hervorzubringen, vermutlich eine Population Dcx-negativer Zellen darstellen. Zumindest konnten auch in adulten, Dcx-exprimierenden Zellen aus der SVZ als Antwort auf depolarisierende Stromimpulse keine Aktionspotentiale generiert werden (Walker *et al.*, 2007). Übereinstimmend mit ihrem unreifen Phänotyp, zeigten diese Zellen zudem nur eine mittlere Dichte der Natriumeinwärtsströme, bei gleichzeitig wenig ausgeprägten Kaliumauswärtsströmen.

Der Befund, dass die Behandlung aNSZ-Kulturen mit TGF-beta1 über die Induktion von Dcx hinaus zu funktionsfähigen Neuronen führt, lässt auf den überaus starken Einfluss von

TGF-beta1 in diesen Kulturen schließen. Dieser wird insbesondere auch vor dem Hintergrund neuester Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deutlich, die zeigen, dass aNSZ-Kulturen der Ratte bereits in Richtung eines oligodendroglialen Schicksals determiniert sind, obwohl sie generell die Fähigkeit besitzen, in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone auszudifferenzieren. So exprimierten die meisten der aus Neurosphäroiden abgeleiteten Zellen dieser Kulturen den glialen Vorläuferzellmarker A2B5 (ca. 75 %) sowie den oligodendroglialen Marker O4, während auch ein relativ hoher Anteil der Zellen (ca. 20 %) den neuronalen Vorläufermarker Dcx exprimierte. Allerdings wiesen selbst diese Zellen fast ausschließlich eine oligodendrogliale Vorläuferzellmorphologie auf und nur ca. 1 % der Zellen zeigte über die Dcx-Expression hinaus auch eine neuronale Morphologie (Manuskript in Vorbereitung: Steffenhagen *et al.*, 2010). TGF-beta1 scheint demnach nicht nur in der Lage, ein neuronales Zellschicksal zulassen der oligodendroglialen Differenzierung zu fördern (erhöhte Dcx-Expression und verminderte Mbp-Expression nach TGF-beta1-Behandlung). Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch TGF-beta1 eine Umprogrammierung des Zellschicksals stattfindet, die zu einer Verschiebung von initial oligodendroglial determinierten Zellen in Richtung eines neuronalen Zelltyps führt. Diese Theorie deckt sich mit Ergebnissen dieser Arbeit, die aus *in-vitro*-Experimenten, in denen aNSZ mit MSC-CM kultiviert wurden, resultieren. MSC-CM entfaltet gewöhnlich einen starken Einfluss auf die Differenzierung aNSZ-Kulturen in Richtung eines oligodendroglialen Zellschicksals (Rivera *et al.*, 2006). Die Behandlung aNSZ mit TGF-beta1 in MSC-CM führte jedoch zu einer vollständigen Inhibierung der A2B5-Expression (gliale Vorläuferzellen) in diesen Kulturen, was indiziert, dass TGF-beta1 in diesem Fall über die Effekte von MSC-CM dominiert. Parallel fand sich zudem eine verminderte Mbp-Expression nach TGF-beta1-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen. Auf der Basis der fehlenden A2B5-Expression lässt sich dieser Befund möglicherweise dadurch erklären, dass nur Zellen, welche die Differenzierung in Oligodendrozyten zum Zeitpunkt der TGF-beta1-Behandlung bereits initiiert hatten, oligodendroglial ausdifferenzieren. Oligodendroglial determinierte Zellen, die ihre endgültige Differenzierung noch nicht eingeleitet hatten, könnten dagegen in Bezug auf ihr Zellschicksal umgelenkt werden. Wenngleich die durchgeföhrten Experimente in MSC-CM keine erhöhte Expression des neuronalen Markers Map2ab in TGF-beta1-behandelten Kulturen, ähnlich der gesteigerten Dcx-Expression in NB-B27-all-Medium, nachweisen konnten, kann eine neuronale Induktion in diesen Kulturen auf Grundlage dieses Ergebnisses nicht vollständig ausgeschlossen werden und bleibt Gegenstand künftiger Untersuchungen. Um die Datenlage zu ergänzen, könnten Färbungen mit einem Anti-

körper gegen Dcx wertvolle Hinweise liefern, zumal seine Expression einerseits mit neuronalen Vorläuferzellen, aber auch mit jungen Neuronen assoziiert wird (Brown *et al.*, 2003; Couillard-Despres *et al.*, 2005; Karl *et al.*, 2005; Couillard-Despres *et al.*, 2006). Dcx und der früh neuronale Marker Map2ab finden sich zwar häufig in jungen Neuronen ko-exprimiert, bevor NeuN, ein Protein, welches ausschließlich von ausgereiften Nervenzellen gebildet wird, induziert wird, wie anhand von Untersuchungen an fötalen, telencephalen Zellkulturen der Maus gezeigt werden konnte (Karl *et al.*, 2005). Postnatal zeigt sich allerdings eine geringere Überlappung beider Marker und Map2ab kennzeichnet grundlegend fortgeschrittenere, neuronale Entwicklungsstufen, sodass eine Induktion dieses reiferen, neuronalen Phänotyps zum Zeitpunkt der durchgeführten immunzytochemischen Analyse nach einer Woche Differenzierung in MSC-CM vermutlich noch nicht manifest war. Dies wäre zumindest angesichts der Tatsache denkbar, dass Dcx *in vivo* annähernd 30 Tage exprimiert wird, bevor es in Folge der neuronalen Reifung abnimmt (Brown *et al.*, 2003).

Erstaunlicherweise erzeugte die Inkubation aNSZ-Kulturen mit TGF-beta1 unter Differenzierungsbedingungen in NB-B27-not-all-Medium mit 5 % v/v FCS keine Zellen, die Charakteristika elektrophysiologisch funktionsfähiger, reifer Neurone aufwiesen. Ähnlich wie Kontrollzellen zeigten TGF-beta1-behandelte Zellen ausschließlich verzögerte Auswärts-Gleichrichter-Kaliumströme, wohingegen keine Natriumeinströme nachweisbar waren (vgl. Kap. 3.4.2.). Dementsprechend war es weder in kontroll- noch in TGF-beta1-behandelten Kulturen möglich, mittels Strominjektion Aktionspotentiale zu generieren. Diese Daten stehen, zumindest was die Ergebnisse der kontroll-behandelten Kulturen betrifft, im Einklang mit Erkenntnissen aus Untersuchungen an neuralen Zellen der SVZ, welche nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren in Anwesenheit von 2 % FCS differenziert wurden, da im Zeitraum zwischen 0-9 Tagen nach dem Ausplätzen nur ein äußerst geringer Anteil von 6 % dieser Zellen in der Lage war, Aktionspotentiale zu erzeugen (Liu *et al.*, 1999). Vergleichbare Untersuchungen an TGF-beta1-behandelten Zellen stehen allerdings derzeit noch aus.

Ähnlich wie die Behandlung aNSZ mit TGF-beta1 nur unter Anwesenheit von EGF und FGF zur Ausbildung funktionsfähiger Neurone führt, beeinflusst TGF-beta1 auch die Differenzierung von Myoblasten unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen in unterschiedlicher Weise. Während der Wachstumsfaktor die Differenzierung in Gegenwart von Mitogenen induziert (Zentella & Massague, 1992), übt er einen inhibierenden Einfluss auf die myogene Differenzierung in mitogen-armen Medium aus (Heino & Massague, 1990). Es wird vermutet, dass der anti-myogene Effekt von TGF-beta1 in mitogen-armer Umgebung im Zu-

sammenhang mit der Existenz eines physiologischen Prozesses steht, der die vorzeitige Differenzierung verhindert, bevor eine ausreichende Gewebemasse akkumuliert wurde (Zentella & Massague, 1992). Ähnliches könnte demzufolge auch für TGF-beta1 der Fall sein.

Zusammengefasst demonstriert die vorliegende Promotionsarbeit über die neuronale Determinierung (Dcx-Expression) aNSZ hinaus erstmals Ergebnisse, welche die funktionelle Relevanz der TGF-beta1-induzierten Dcx-Expression *in vitro* belegen, zumal die behandelten Zellkulturen in elektrophysiologischen Untersuchungen charakteristische Eigenschaften von Nervenzellen erkennen ließen. Dieses dem Wachstumsfaktor innewohnende Potential zur Förderung des neuronalen Phänotyps lässt sich möglicherweise in Zukunft im Rahmen von Transplantationsexperimenten sinnvoll nutzen. Ein derzeit vorherrschendes Problem besteht nämlich darin, dass transplantierte NSZ bevorzugt glial ausdifferenzieren (Nishino *et al.*, 2000). Folglich scheinen sie - zumindest in ihrer ursprünglichen Form - nicht geeignet, um neuronalen Zellverlust, wie er bei neurodegenerativen Erkrankungen auftritt, auszugleichen. Eine vielversprechende Strategie für rekonstruktiven Zellersatz wäre aber die Transplantation von neuralen Zellen, die bereits *in vitro* vordifferenziert wurden. Da TGF-beta1 in der Lage ist, ein neuronales Zellschicksal zu induzieren, wäre ein denkbarer Ansatz im Hinblick auf einen effektiven, neuronalen Zellersatz folgende Vorgehensweise: aNSZ könnten zunächst *in vitro* vermehrt werden bis ausreichend viele Zellen für eine Transplantation erzeugt wurden. Anschließend könnten sie durch eine zeitlich begrenzte Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 neuronal determiniert, mittels FACS-Sortierung selektiert und letztlich in das erkrankte Gehirn transplantiert werden. Da TGF-beta1 nach der 7-tägigen Behandlung *in vitro* sowohl Dcx induzierte als auch zur Ausbildung reifer Neurone in aNSZ-Kulturen führte, wäre es womöglich sinnvoll, den Zeitraum der Inkubation so zu modulieren, dass die Zellen zwar bereits neuronal determiniert werden, andererseits aber noch nicht ausgereift sind, zumal transplantierte Neurone gewöhnlich absterben, anstatt sich in das bestehende Netzwerk zu integrieren. Die Beobachtung, dass die Induktion des neuronalen Phänotyps durch TGF-beta1 auch funktionell von Bedeutung ist, eröffnet also völlig neue Möglichkeiten im Hinblick auf eine zukünftige, gezielte Anwendung im Sinne einer Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen und stellt sicherlich einen ersten, entscheidenden Schritt in diese Richtung dar. Um ein besseres Verständnis hinsichtlich der Mechanismen, welche die neuronale Differenzierung in aNSZ regulieren, zu erlangen, bedarf es allerdings noch einer Reihe an weiterführenden Experimenten, bevor diese Erkenntnisse letztlich im Rahmen präklinischer Studien angewandt werden können. Ein erster möglicher Schritt, um die *in-vitro*-Befunde einer kli-

nischen Relevanz näherzubringen, wäre die Untersuchung des Einflusses von TGF-beta1 auf die Differenzierung aNSZ in organotypischen Schnittkulturen aus Nagergehirnen, da diese der physiologischen Situation weitaus stärker angenähert sind als *in-vitro*-Kulturen, sowie die Transplantation neuronal vordeterminierter Zellen in Versuchstiere. Da sich bislang die meisten Transplantationsexperimente auf die Untersuchung des Überlebens der transplantierten Zellen beschränkten, sollte in diesen Studien insbesondere die Fähigkeit der Zellen, sich in das bestehende Milieu zu integrieren und funktionell auszureifen im Vordergrund des Interesses stehen. Ließe sich die Situation *in vitro* in ähnlicher Weise auf die Situation *in vivo* übertragen, sollten schließlich auch humane Zellkulturen zur Analyse herangezogen werden. Das dadurch erlangte Verständnis sollte dazu beitragen, die Kontrollmechanismen neuraler Stammzelldifferenzierung weiter zu entschlüsseln, da dies die grundlegende Voraussetzung für eine künftige klinische Anwendung darstellt.

7.3. Die neuroprotektive Wirkung von TGF-beta1 auf aNSZ

Schließlich wurde die Frage adressiert, ob und inwieweit TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen über die Induktion des neuronalen Phänotyps hinaus zusätzlich eine Rolle als neuroprotektiver Faktor zukommt und zwar im Sinne einer Intervention, welche zu einer intrazellulären Veränderung in der Balance zwischen Überlebens- und Todessignalen zugunsten des Überlebens führt. Die NMR-spektroskopische Analyse aNSZ im Hinblick auf die Intensität des Lipid-Signals bei 1.28 ppm ergab eine deutlich verminderte Apoptoserate in TGF-beta1-behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollen und bestätigte damit frühere Ergebnisse, die die inhibierende Wirkung von TGF-beta1 auf die Apoptose aNSZ der SVZ anhand eines Zelltod-ELISAs nachwiesen (Wachs *et al.*, 2006). Die genannte Studie ließ allerdings die Untersuchung des Einflusses von TGF-beta1 auf nekrotischen Zelltod vermissen; dieser konnte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit anhand von LDH-Assays und Zelltod-ELISAs eindeutig belegt werden, zumal diese übereinstimmend auf eine verminderte Nekroserate in TGF-beta1-behandelten Kulturen verwiesen.

Obwohl diese Resultate vordergründig darauf hindeuten, dass TGF-beta1 in aNSZ-Kulturen sowohl Dcx induziert als auch protektiv wirkt, lässt sich auf der Grundlage der durchgeföhrten Untersuchungen nicht ausschließen, dass die verstärkte Expression von Dcx eine Folge der neuroprotektiven Wirkung TGF-betas ist. Möglicherweise kommt die (nur scheinbare) Induktion des neuronalen Phänotyps dadurch zustande, dass in Gegenwart von TGF-beta1 aufgrund einer verminderten Apoptose mehr - bereits vorhandene - neuronal determinierte Vor-

läuferzellen überleben. Ausgehend von diesen Überlegungen ergibt sich die Notwendigkeit, weitere Analysen zur Aufklärung des zugrunde liegenden Sachverhalts durchzuführen. Hierzu eigneten sich beispielsweise Immunfluoreszenzfärbungen an aNSZ, die im Vorfeld der Kultivierung in Anwesenheit von TGF-beta1 mit BrdU markiert und im Anschluss gegen Dcx gefärbt wurden.

Generell konnte die neuroprotektive Wirkung TGF-betas sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits vielfach belegt werden. So bewahrt TGF-beta Neurone nachweislich vor Hypoxie/Ischämie, exzitotoxischen Schädigungen sowie vor dem schädigenden Einfluss von Neurotoxinen (Krieglstein *et al.*, 1995; Henrich-Noack *et al.*, 1996; Boche *et al.*, 2003). Auch zeigten Mäuse, denen TGF-beta1 nach einem Schlaganfall intranasal verabreicht wurde, verglichen mit Kontrolltieren weniger TUNEL-positive Zellen im ipsilateralen Striatum, bei gleichzeitig reduziertem Infarktvolumen (Ma *et al.*, 2008). Auf der Basis der positiven Effekte auf das Überleben von Zellen im Anschluss an Verletzungen des zentralen Nervensystems (Zhu *et al.*, 2002) wird die in diesem Zusammenhang rasch auftretende erhöhte Expression von TGF-beta1 im ZNS (Wiessner *et al.*, 1993) mit einem endogenen Protektionsmechanismus assoziiert (Krieglstein *et al.*, 1995). Demgemäß führte die Deletion von TGF-beta1 in neonatalen TGF-beta1(-/-)-Mäusen zu einem starken Anstieg degenerierender Neurone, wodurch sich die Gehirne dieser Tiere durch vermehrt apoptotische Neurone auszeichneten (Brionne *et al.*, 2003). Der neuroprotektive Effekt von endogenem TGF-beta1 wurde bereits auch anhand von kultivierten, embryonalen Neuronen nachgewiesen. So konnten Experimente an Motoneuronen der Ratte, die in geringer Dichte auf Astrozyten-Monolayern aus dem Cortex kultiviert wurden, eine 2-fache Zunahme des Überlebens nach 9-11 Tagen in Kultur bei subnanomolaren Konzentrationen von TGF-beta1 (40-500 pM) belegen. Dieser Effekt auf das Überleben wurde einem TGF-beta1-induzierten Anstieg der Cholinazetyltransferase (ChAT)-Aktivität zugeschrieben (Martinou *et al.*, 1990). Dementsprechend beeinflusste das Fehlen von TGF-beta1 das Überleben primärer Neurone in Kultur in stark negativer Weise (Brionne *et al.*, 2003).

Es gibt zahlreiche Hinweise, wonach TGF-beta1 seine protektive Wirkung nicht nur eigenständig, sondern auch in Kombination mit weiteren Faktoren entfalten kann. Ein derartiger Effekt wurde beispielsweise an Kulturen mesenzephaler, dopaminerger Neurone beschrieben, in denen TGF-beta in Kooperation mit Shh (Sonic hedgehog) und FGF8 die Zahl apoptotischer Zellen reduzierte. Zudem förderte TGF-beta das Überleben dopaminerger Neurone *in vivo*, sodass die Neutralisation von TGF-beta in einer verminderten Zahl dieser Neurone re-

sultierte (Roussa *et al.*, 2004). Auch in Verbindung mit neurotrophen Faktoren trägt TGF-beta in entscheidendem Maße zum Überleben von Neuronen bei. So konnte an einer Vielzahl kultivierter Neurone, unter anderem an sensorischen und dopaminergen Neuronen des ZNS, gezeigt werden, dass GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) nur dann neuroprotektiv aktiv wird, sobald es durch den Kofaktor TGF-beta ergänzt wird (Krieglstein *et al.*, 1998b). Weiter scheint TGF-beta auch in das Überleben peripherer Neurone involviert. Wenngleich keine der TGF-beta-Isoformen beta1, beta2, oder beta3 an sich einen trophischen, das Überleben fördernden Effekt auf kultivierte, ziliare Ganglien-Neurone entfaltete, beeinflusste der Wachstumsfaktor das über CNTF (ciliary neurotrophic factor) oder FGF-2 medierte Überleben dieser Neurone in positiver Weise (Krieglstein *et al.*, 1998a).

Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine neuronale Ca^{2+} -Überlastung verantwortlich für das Absterben von hippocampalen Neuronen in Ratten bei Schlaganfall und Epilepsie ist. Der neuroprotektive Effekt von TGF-beta1 wird, neben weiteren Einflüssen des Wachstumsfaktors, unter anderem auf seine Fähigkeit, die Ca^{2+} -Homöostase zu stabilisieren, zurückgeführt. Weiterhin kann die Behandlung mit TGF-beta1 zu einem starken Anstieg der neuronalen Bcl2-Expression, einem anti-apoptotischen Mitglied der Bcl2-Proteinfamilie, führen, und trägt außerdem zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials bei (Prehn *et al.*, 1994). Dementsprechend beschreibt die Literatur ein verminderteres Maß an Bcl2-Protein nach der Antikörper-vermittelten Neutralisation von endogenem TGF-beta1 in der Maus, welche in apoptotischem Zelltod kortikaler Neurone resultierte (Tomoda *et al.*, 1996). Neuere Erkenntnisse, die anhand von primären, hippocampalen Kulturen der Ratte gewonnen wurden, weisen darauf hin, dass TGF-beta seine neuroprotektiven Effekte zudem über die Fähigkeit, die Aktivierung von Caspase-3 zu inhibieren, vermittelt. Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml TGF-beta1 waren nämlich ausreichend, um die Staurosporin-induzierte Apoptose von Neuronen in diesen Kulturen, welche von einer Aktivierung der Caspase-3 begleitet war, effektiv zu vermindern (Zhu *et al.*, 2001). Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine identische Konzentration von 10 ng/ml TGF-beta1 zum Einsatz kam, konnte anlässlich der DNA-Array-Analyse weder eine signifikant veränderte Expression von Caspase-3- noch Bcl2-mRNA nachgewiesen werden, über die sich die neuroprotektive Wirkung TGF-betas auf aNSZ-Kulturen potentiell erklären ließe. Zwar führte einer der beiden Arrays eine verminderte Expression von Caspase-3 innerhalb TGF-beta1-behandelter Kulturen an; dieses Ergebnis konnte allerdings durch den zweiten Array nicht bestätigt werden, was das Resultat letztlich nicht glaubhaft erscheinen ließ. Ebenso gab es keine Hinweise darauf, dass TGF-beta1 in

aNSZ-Kulturen, ähnlich wie in Osteoklasten, Socs3 (suppressor of cytokine signaling 3) oder LIF (leukemia inhibitory factor) induziert, um die Apoptose zu unterdrücken (Ruan *et al.*, 2010), zumal beide keine veränderte Expression nach TGF-beta1-Behandlung zeigten. Insofern muss davon ausgegangen werden, dass neben den genannten Einflüssen noch zusätzliche Faktoren zur protektiven Wirkung TGF-betas beitragen können, welche insbesondere auch in aNSZ relevant sein könnten. Grundlegend ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass die TGF-beta1-induzierte Synthese von Neurotrophinen (Buchman *et al.*, 1994) in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung ist, zumal die Array-Analyse weder eine veränderte Expression von NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) noch von NT (Neurotrophin)-3, -4 und -5 in TGF-beta1-behandelten Kulturen ergab. Möglicherweise ist aber eine Regulation von Myc maßgeblich in die Entfaltung der neuroprotektiven Effekte TGF-betas auf aNSZ involviert. Wenngleich bislang keine detaillierten Studien zur Rolle von Myc in diesem Kontext vorliegen, legen doch Untersuchungen an Darmkrebszellen nahe, dass der Transkriptionsfaktor diesbezüglich bedeutsam seine könnte. Die genannte Studie konnte nämlich zeigen, dass Myc die Expression von p21 supprimiert und in der Folge das Ergebnis einer p53-abhängigen Antwort auf DNA-Schaden in Richtung Zelltod beeinflusst, anstatt alternativ die Zytostase zu fördern (Seoane *et al.*, 2002). Angesichts dieser Resultate lässt sich vermuten, dass der Befund einer erniedrigten Expression von c-Myc bei unveränderter p21-Expression in TGF-beta1-behandelten Kulturen im Zusammenhang mit der gleichzeitig beobachteten, protektiven Wirkung TGF-betas sowie dem TGF-beta1-induzierten Zellzyklusarrest in G0 steht (eigene Ergebnisse). Dem Anschein nach sind auch die neuroprotektive Wirkung TGF-betas sowie seine Fähigkeit, den Zellzyklus aNSZ in der G0-Phase zu arretieren nicht unabhängig voneinander zu sehen. Der Einsatz von G1/S-Phase-Blockern wie Deferoxamin in PC12-Zellen war nämlich in der Lage, den Zelltod in diesen Kulturen zu unterdrücken (Farinelli & Greene, 1996), während im Gegensatz dazu Zellzyklusblocker, welche den Zellzyklus in der S-, G2- oder M-Phase blockierten, Zelltod nicht verhindern konnten (Farinelli & Greene, 1996; Park *et al.*, 1997). Auch die verminderte Expression des Zellzyklusinhibitors p57 in TGF-beta1-behandelten aNSZ könnte eine Funktion bei der Entfaltung TGF-beta1-induzierter, neuroprotektiver Effekte in aNSZ-Kulturen erfüllen. Dies scheint insbesondere vor dem Hintergrund einer Förderung des Zelltods durch die Expression von p57, welche in HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) nachgewiesen wurde, vorstellbar. Aus den erwähnten Untersuchungen ging hervor, dass die über p57 vermittelte Sensibilisierung von HeLa-Zellen für die Staurosporin-induzierte Apoptose intrinsi-

sche, apoptotische Pathways initiiert, die zunächst zu einem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials durch Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran führen, gefolgt von einer Freisetzung von Cytochrom-C ins Cytosol, und schließlich der Aktivierung von Caspase-3 und -9 (Vlachos *et al.*, 2007). Vermutlich ist auch die verminderte Expression von p53 in TGF-beta1-behandelten Zellen an der reduzierten Apoptose in diesen Kulturen beteiligt, da die Induktion von p53 durch pro-apoptotische Stimuli die Expression pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie steuert (Hofseth *et al.*, 2004). Zusätzliche Substanz kann dieser Theorie aufgrund der Tatsache verliehen werden, dass sich TGF-beta der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie p53, die über Smad-Proteine ko-reguliert sind, bedient, um seine pro-apoptotischen Effekte zu vermitteln (Zhang *et al.*, 2006).

Obwohl die neuroprotektive Wirkung TGF-betas ein vieldokumentiertes Phänomen darstellt und es viele Hinweise darauf gibt, welche Moleküle in die Vermittelung der neuroprotektiven Effekte TGF-betas involviert sein könnten, sind die tatsächlich beteiligten Signalwege und biochemischen Mechanismen, die diesen Effekt mediieren, immer noch schlecht verstanden. Es wurde allerdings deutlich, dass TGF-beta nicht ausschließlich über die Aktivierung der Smad-Signalkaskade agiert, um seine neuroprotektiven Effekte zu übermitteln. Gingery *et al.* (2008) konnten belegen, dass, zumindest für die TGF-beta-medierte Unterstützung des Überlebens von Osteoklasten, sowohl das Beschreiten Smad-abhängiger als auch Kinase-abhängiger Signalwege erforderlich ist. Um Makrophagen vor der Apoptose zu bewahren, bedient sich TGF-beta1 des MAPK/ERK-Pathways und entfaltet auf diese Weise seine protektive Wirkung (Chin *et al.*, 1999). Ebenso erforderte die Vermittelung des anti-apoptotischen Effekts durch TGF-beta1 in hippocampalen Zellen, in denen mittels Staurosporin Apoptose induziert wurde, die Aktivierung der MAPK Erk1/2 und dessen „downstream target“ Rsk1 (Ribosomal S6 Kinase 1), welches in der Folge Bad (Bcl2 antagonist of cell death), ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, durch Phosphorylierung inaktivierte. Dies resultierte, neben einem Anstieg der Bad-Phosphorylierung, in einer Inhibierung der Staurosporin-induzierten Zunahme der Bad-Expression durch TGF-beta1 (Zhu *et al.*, 2002). Dass TGF-beta1 die Expression und das Verhältnis von pro-apoptotischen (Bad) und anti-apoptotischen Proteinen (Bcl-2, Bcl-x1) der Bcl-2-Familie reguliert, um eine Umgebung zu schaffen, die das Überleben von Zellen begünstigt, wurde bereits auch im Rahmen einer weiteren Studie postuliert (Dhandapani & Brann, 2003). Übereinstimmend wiesen Prehn *et al.* (1994) nach, dass die Neuroprotektion durch TGF-beta1 die Hochregulierung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl2 und Bcl-x1 involviert (Tamatani *et al.*, 1999). Dennoch ergaben sich durch

die DNA-Array-Genexpressionsanalyse aNSZ-Kulturen keine Anhaltspunkte, die auf eine Beteiligung der MAPK-Signalkaskade hinsichtlich der neuroprotektiven Wirkung TGF-betas in aNSZ hindeuteten, zumal diese, abgesehen von der verminderten Expression von ERK1 (Mapk3) nach TGF-beta1-Behandlung, keine Veränderung in der Expression von pro- oder anti-apoptotischen Genen wie Bad oder Bcl2 erkennen ließ. Da das Ausmaß der Aktivierung des MAPK-ERK-Signalweges in direkter Weise mit der TGFRII-Expression zu korrelieren scheint (Rojas *et al.*, 2009) und die Expression von TGFRII in TGF-beta1-behandelten Kulturen vermindert war (eigene Ergebnisse), scheint dieser Befund durchaus plausibel. Folglich ist anzunehmen, dass der neuroprotektive Effekt TGF-betas auf aNSZ primär über einen anderen Signalweg mediert wird. Neuere Studien legen diesbezüglich die Involvierung des NF-kappaB-Signalweges nahe. So konnte die Arbeitsgruppe um Zhu *et al.* (2004) den Nachweis erbringen, dass TGF-beta1 1) den Transkriptionsfaktor NF-kappaB in Neuronen aktiviert und 2) die Aktivierung von NF-kappaB erforderlich für die durch TGF-beta1 hervorgerufene Neuroprotektion ist. Eine unabhängige Studie bestätigte, dass TGF-beta1 in der Lage ist, zweierlei Pathways in Neuronen zu aktivieren, einerseits den gewöhnlichen Smad2/3-Pathway sowie den Smad1/5-Pathway. Beide werden über unterschiedliche Typ-I-Rezeptoren vermittelt; während der Smad2/3-Signalweg durch ALK5 aktiviert wird, wird der Smad1/5-Pathway über den alternativen Typ-I-Rezeptor ALK1 mediert. Die Aktivierung des Smad1/5-Signalweges initiiert in der Folge Signalkaskaden, die in einer Aktivierung des anti-apoptotischen NF-kappaB-Pathways resultieren, was zu erhöhtem Überleben unter neurotoxischen Stressbedingungen führt (König *et al.*, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte die Inhibierung von NF-kappaB durch Smad7 in epithelialen Zellen zu einem Anstieg der Apoptose (Lallemand *et al.*, 2001). Angesichts dieser Resultate stellt sich die Frage, ob die Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges womöglich auch im Zusammenhang mit dem neuroprotektiven Effekt TGF-betas auf aNSZ-Kulturen steht. Dies ist zumindest nicht auszuschließen, zumal die Ergebnisse dieser Arbeit die Expression von ALK1 in aNSZ-Kulturen aus der SVZ der Ratte belegen. Dennoch ist dieser Befund nicht ausreichend, um die Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges im Rahmen neuroprotektiver Effekte in aNSZ-Kulturen zu bestätigen, sodass zusätzliche Experimente dringend erforderlich scheinen.

Trotz der vielfältigen Hinweise in Richtung einer neuroprotektiven Wirkung durch TGF-beta1 ist die Rolle von TGF-beta1 nicht uniform. Vielmehr scheint der Einfluss von TGF-beta1 generell abhängig vom untersuchten Zelltyp, der Art des eingesetzten Stimulus, und nicht zuletzt auch von den allgemeinen, experimentellen Bedingungen. Letzteres wurde insbesonde-

re durch *in-vitro*-Experimente an zerebellaren Neuronen deutlich, deren Apoptose durch TGF-beta1 gefördert wurde, wenn sie in Medium mit physiologischen, niedrigen K⁺-Konzentrationen (5 mM K⁺) kultiviert wurden; dagegen führten hohe Kalium-Konzentrationen (25 mM K⁺) zu einem gesteigerten Überleben dieser Neurone (de Luca *et al.*, 1996). Ebenso wurde im Zusammenhang mit humanen B-Zellen und B-Lymphom-Zelllinien (Chaouchi *et al.*, 1995) sowie kultivierten Hepatozyten (Oberhammer *et al.*, 1992) eine Induktion der Apoptose durch TGF-beta1 nachgewiesen. Weiter bestätigte sich ein verminderter Überleben neugebildeter Zellen im HC aufgrund einer Aktivierung der TGF-beta1-Signalübertragung auch anhand eines transgenen Ratten-Tiermodells der Huntingtonschen Krankheit (Kandasamy *et al.*, 2010).

Auf welche Art TGF-beta1 seine gegenteiligen Effekte vermittelt, die dazu führen, dass es einerseits Apoptose fördert, während es andererseits neuroprotektiv wirkt, ist noch weitgehend unbekannt. Nachgewiesen ist aber bereits, dass Smad7, ein TGF-beta Typ-I-Rezeptor-Antagonist, dabei eine bedeutende Rolle einnimmt, zumal es, abhängig vom jeweiligen Kontext, entweder als Effektor TGF-beta1-induzierten Zelltods fungieren, oder aber Zellen vor der Apoptose bewahren kann (Ishisaki *et al.*, 1998; Lallemand *et al.*, 2001). Neueste Studien deuten darauf hin, dass darüber hinaus das Ausmaß der Expression von TGF-beta-Rezeptoren, insbesondere TGFRII, die Spezifität der Signalweg-Aktivierung reguliert. So scheint sowohl die TGF-beta-induzierte Apoptose als auch die Induktion von p21 abhängig von einer relativ hohen TGFRII-Expression zu sein (Rojas *et al.*, 2009). Folglich könnte die im Rahmen der NMR-spektroskopischen Analyse beobachtete und mittels Zelltod-ELISA bestätigte, vermindernde Apoptose sowie die, im Vergleich zu Kontroll-Kulturen, konstante p21-Expression in TGF-beta1-behandelten aNSZ im Zusammenhang mit der erniedrigten Typ-II-Rezeptor-Expression in diesen Kulturen stehen.

Entscheidend im Hinblick auf eine Apoptose-inhibierende oder Apoptose-induzierende Antwort als Folge einer Behandlung mit TGF-beta scheint des Weiteren auch die Konzentration des Wachstumsfaktors zu sein. In multipotenten Vorläuferzellen aus der Neuralleiste bewirkten vergleichsweise hohe Konzentrationen an TGF-beta1 in erster Linie Apoptose, wohingegen geringfügig niedrigere Dosierungen die Neurogenese begünstigten (Hagedorn *et al.*, 2000). Eine Analyse Deferoxamin-behandelter Kulturen aus embryonalen Zellen des ventralen Ratten-Mesenzephalons ergab dagegen, dass der durch Deferoxamin verursachte, über TGF-beta1-medierte Zellzyklusarrest in diesen Kulturen keinen Einfluss auf die Zahl TUNEL-positiver Zellen sowie das Ausmaß der Caspase-3-Expression hatte. Die gemessene

Konzentration von TGF-beta1-Protein lag allerdings nur bei 214.3 pg/ml (Misumi *et al.*, 2008), war also im Vergleich zu der standardmäßig eingesetzten Konzentration von 10 ng/ml eher gering zu bewerten.

Die erzielten Befunde dieser Arbeit belegen die neuroprotektive Wirkung TGF-betas auf aNSZ. Allerdings wurde der Begriff „neuroprotektiv“ im Hinblick auf seine Wirkweise zunächst sehr vereinfacht und weitläufig dahingehend definiert, dass die Anwendung eines neuroprotektiven Faktors zu einem verminderten Zelltod zugunsten eines verstärkten Überlebens führt. Dabei wurde der Aspekt, ob TGF-beta1, entsprechend einer begrenzteren Definition, ausschließlich protektiv auf Neurone wirkt (anstatt die gesamte Kultur zu beeinflussen), bewusst ausgeklammert, und zwar aufgrund der Tatsache, dass aNSZ-Kulturen überwiegend aus oligodendroglialen Vorläuferzellen und nur zu einem äußerst geringen Anteil aus bereits ausdifferenzierten Zellen bestehen (Manuskript in Vorbereitung: Steffenhagen *et al.*, 2010). Zudem war der Einfluss von TGF-beta auf die Apoptose (und Nekrose) in TGF-beta1-behandelten Kulturen sehr ausgeprägt (eigene Ergebnisse), was nahelegt, dass sich TGF-beta1 nicht nur positiv auf das Überleben von Neuronen, sondern vielmehr auch auf das von Stamm- und Vorläuferzellen in diesen Kulturen auswirkt. Eine genaue Untersuchung der protektiven Wirkung TGF-betas unter Berücksichtigung der verschiedenen Zellpopulationen in aNSZ-Kulturen könnte nicht nur diesbezüglich Aufklärung leisten, sondern darüber hinaus helfen, zu einem umfassenderen Verständnis der vermutlich vielschichtigen Prozesse, welche letztlich in die neuroprotektive Wirkung TGF-betas auf aNSZ involviert sind, zu gelangen und weiter auch das Zusammenspiel der beteiligten Faktoren zu ergründen.

7.4. Die BrdU-Sensitivität aNSZ und deren mögliche Ursache

7.4.1. Der negative Einfluss von BrdU auf aNSZ-Kulturen

BrdU ist ein chemisches Basenanalagon in Form eines halogenierten Desoxyuridins, welches während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird (Nowakowski *et al.*, 1989). Aufgrund dieser Eigenschaft basieren zahlreiche Studien zur Untersuchung der Zellproliferation auf der Markierung sich teilender Zellen mit diesem mitogenen Marker (Taupin, 2007). Die Möglichkeit, BrdU mit verschiedensten phänotypischen Markern wie Dcx, β III-Tubulin, GFAP oder GalC zu kombinieren, und die relativ einfache, immunhistochemische Nachweisbarkeit mithilfe spezifischer Antikörper *in vitro* und *in vivo* machen seine Einsatzmöglichkeiten darüber hinaus äußerst vielseitig, so-

dass sich seine Anwendung, angefangen von der Determinierung des Entstehungszeitpunktes endogener Zellen, bis hin zur Verfolgung des Schicksals neugenerierter Zellen erstreckt (Corotto *et al.*, 1993; Seki & Arai, 1993). Ferner eignet sich die Markierung von Zellen mit BrdU im Vorfeld von Transplantationsstudien in herausragender Weise, um beispielsweise transplantierte Stamm- und Vorläuferzellen nachfolgend identifizieren und deren Schicksal *in vivo* verfolgen zu können.

Die Markierung mit BrdU war für vielerlei Entdeckungen entscheidend, so auch für den ersten, grundlegenden Nachweis, dass Neurogenese im adulten, humanen Gehirn stattfindet (Eriksson *et al.*, 1998), wie anhand von Untersuchungen an postmortem-Gewebe von Patienten, die therapiebedingt mit BrdU behandelt worden waren, gezeigt werden konnte. Heutzutage ist der Einsatz von BrdU aus der aktuellen Forschung nicht mehr wegzudenken und stellt die am häufigsten angewandte Technik dar, um - in Kombination mit zusätzlichen Markern - neugebildete Nervenzellen zu identifizieren (Taupin, 2007) und die Regulation der Neurogenese unter verschiedensten Bedingungen zu analysieren. Aufgrund von zahlreichen Erkenntnissen, die die heutige Wissenschaft dem Einsatz von BrdU verdankt und frühen Studien zu folge, die zunächst annehmen ließen, dass sich eine Thymidin-Substitution durch BrdU *in vivo* nicht toxisch auf die Nachkommen auswirke, zumal keine Veränderungen bezüglich Wurfgröße, neonatalem Gewicht oder typische, teratologische Zeichen wie offenkundige neurologische Dysfunktionen ersichtlich waren (Miller & Nowakowski, 1988), wurden die möglichen, negativen Folgen einer BrdU-Markierung lange Zeit übergangen und deren experimentellen Überprüfung wurde nur wenig Beachtung geschenkt. Dennoch gab es schon relativ früh auch Hinweise, die auf die Toxizität BrdUs während embryonaler und neonataler Entwicklung hindeuteten (Garner, 1974; Agnish & Kochhar, 1976; Pollard *et al.*, 1976; Barasch & Bressler, 1977). So konnten Studien, entgegen derjenigen von Miller *et al.*, eindeutig nachweisen, dass BrdU-Injektionen in das Muttertier während einer Schwangerschaft zu Fehlbildungen bei den Nachkommen führen. Seit die Untersuchung BrdU-induzierter Effekte neuerdings langsam in den Mittelpunkt des Interesses von Forschern verschiedenster Fachrichtungen rückt, häufen sich die Hinweise, wonach die Markierung mit BrdU einen nicht unerheblichen Einfluss auf vielerlei Zellsysteme ausübt. Eine Beeinträchtigung der proliferativen Aktivität durch BrdU konnte bereits für Fibroblasten der Maus und humane, diploide Fibroblasten, lymphoblastoide Zelllinien sowie periphere Blut-Lymphozyten nachgewiesen werden (Poot *et al.*, 1994). In der neueren Literatur finden sich zudem Angaben über die BrdU-Sensitivität von Brust- und Blasenkrebszelllinien (Diermeier *et al.*, 2004). Trotz seines allgegen-

wärtigen Gebrauchs in der neuralen Stammzellforschung, im Besonderen zur Untersuchung der adulten Neurogenese und deren Regulation, wurden die möglichen Auswirkungen einer BrdU-Markierung auf die zelluläre Funktion multipotenter, neuraler Stamm- und Vorläuferzellen bis dato nicht systematisch untersucht, sodass man über die BrdU-Sensitivität aNSZ derzeit vergleichsweise wenig weiß. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer BrdU-Exposition auf das Verhalten aNSZ eingehend untersucht, wobei sich die eingesetzten BrdU-Konzentrationen über einen Bereich von 0,2-20,0 µM erstreckten. Im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine Reihe an schädlichen Einflüssen - unter anderem auf die Proliferation aNSZ - als Folge der Inkorporation von BrdU in die DNA. Um BrdU auf eine zytotoxische Wirkung auf aNSZ hin zu überprüfen, war zunächst die Proliferation aNSZ, die für 48 h mit BrdU kultiviert worden waren, analysiert worden. Die Präsenz von 0,2 µM BrdU im Nährmedium zeigte keinen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation aNSZ. Überraschenderweise resultierte aber bereits die Inkubation mit 1,0 µM BrdU *in vitro* in einer signifikant reduzierten Proliferation aNSZ im Vergleich zu Kontrollen. Die Tatsache, dass höhere Konzentrationen bis einschließlich 20,0 µM BrdU diesen Effekt nicht weiter verstärkten, suggeriert, dass wahrscheinlich schon bei 1,0 µM eine Sättigung durch BrdU erreicht war. Allerdings bleibt aufgrund der durchgeführten Untersuchungen unklar, welche Zellpopulation der aNSZ-Kultur infolge der BrdU-Exposition in ihrer Proliferation limitiert wird. Wenngleich angesichts der starken Hemmung der Proliferation ab 1,0 µM anzunehmen ist, dass BrdU hauptsächlich die Population der neuralen Stammzellen beeinflusst, sollte die Klärung dieser Frage unbedingt Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die gewonnenen Daten stehen darüber hinaus zweifelsohne im Einklang mit Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur, die einen tiefgreifenden und anhaltenden, anti-proliferativen Effekt durch BrdU auf kultivierte, neurale Stamm- und Vorläuferzellen der Maus beschreiben (Ross *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu der *in-vitro*-Situation ergab die Analyse der endogenen Proliferation BrdU-markierter aNSZ *in vivo* keine nennenswerte Reduktion der Zahl PCNA-positiver Zellen im GD des HC im Vergleich zu Kontrollen (siehe Abschnitt 5.6.), was darauf schließen lässt, dass die Anwendung von BrdU *in vivo* in Dosierungen von 50 mg/kg oder 200 mg/kg (wie sie üblicherweise in Neurogenese-Studien eingesetzt werden) - zumindest in der akuten Situation - nicht mit der Zellproliferation interferiert. Ebenso gab es keinen Hinweis auf eine veränderte Proliferation BrdU-markierter aNSZ, die ins intakte Rückenmark von Ratten transplantiert wurden, wenngleich die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU und PCNA

einen schwachen, aber nicht signifikanten Anstieg der Zahl BrdU/PCNA-positiver Zellen in den mit 1,0 µM bzw. 2,5 µM BrdU behandelten Gruppen gegenüber der mit 0,2 µM BrdU behandelten Gruppe erkennen ließ (siehe Kapitel 5.7.). Obwohl die vorgestellten Daten demnach bei den gegebenen Bedingungen keinen schädigenden Einfluss von BrdU auf die Proliferation aNSZ *in vivo* belegen, können allein auf der Grundlage dieser Untersuchungen Effekte auf die Proliferation, die sich als Folge einer länger andauernden BrdU-Behandlung ergeben könnten, nicht ausgeschlossen werden.

Die voneinander abweichenden Effekte *in vitro* und *in vivo* erschienen zunächst stark kontrovers. Allerdings ergab eine unabhängige Studie, in der der Einfluss von BrdU auf die Zellproliferation im GD adulter Ratten in Konzentrationen von 40-480 mg/kg untersucht wurde, vergleichbare Resultate, die einen fehlenden Einfluss von BrdU auf die Zellproliferation *in vivo* belegten (Hancock *et al.*, 2009). Ebenso erwiesen sich BrdU-Applikationen in Dosierungen von 50 mg/kg über einen Zeitraum von bis zu 12 aufeinanderfolgenden Tagen sowie Dosierungen bis zu 300 mg/kg in adulten Ratten als nicht einflussreich, zumal keine physiologischen Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust oder Verhaltensauffälligkeiten bei den Tieren sowie keine offensichtlichen, toxischen Effekte auf sich teilende Zellen im GD (Cameron & McKay, 2001; Cooper-Kuhn & Kuhn, 2002) erkennbar waren. Entgegen dieser Beobachtungen gibt es jedoch auch Hinweise, wonach bereits eine kurze BrdU-Kur *in vivo* das proliferative Potential nachfolgend isolierter, Neurosphere-bildender Zellen aus der subependymalen Zone reduziert (Ross *et al.*, 2008).

Weshalb sich die Kurzzeit-Behandlung mit BrdU *in vitro* negativ auf die Zellproliferation auswirkt, während eine vergleichbare Behandlung *in vivo* keinen schwerwiegenden Einfluss zu haben scheint, ist angesichts mangelnder Studien noch nicht ausreichend erforscht. Möglicherweise liegt der Unterschied jedoch darin begründet, dass die Verfügbarkeit von BrdU *in vivo* aufgrund einer raschen Verstoffwechselung relativ begrenzt ist. Es wird angenommen, dass BrdU nach systemischer Injektion im adulten Gehirn nur für näherungsweise 2h zur Markierung von Zellen zur Verfügung steht, bevor die extrazelluläre Konzentration an BrdU erwiesenermaßen drastisch abnimmt (Packard *et al.*, 1973; Hayes & Nowakowski, 2000). Unter der Annahme, dass die S-Phase des Zellzyklus 8h beansprucht und BrdU nur für 2h im Blutstrom zirkuliert (Phuphanich & Levin, 1985) werden darüber hinaus nur ca. 40 % aller sich teilenden Zellen mit einer einzelnen BrdU-Injektion markiert (Kuhn & Cooper-Kuhn, 2007). Zusätzlich erreicht nur ein Bruchteil der eingesetzten Dosis nach systemischer Administration überhaupt erst das Gehirn, sodass die lokale Konzentration des Thymidinanalogs

sicher niedriger einzuschätzen ist als diejenige Konzentration, die ursprünglich appliziert wurde (Taupin, 2007). Des Weiteren wird BrdU nicht stabil in die DNA integriert, sondern möglicherweise im Anschluss an die Inkorporation, initiiert durch eine Dehalogenierung, gefolgt von dem Herausschneiden des Uracil-Rests aus der DNA durch das Uracil-Glycosylase-Reparatur-System, wieder abgebaut (Hume & Saffhill, 1986). Dagegen sind unter *in-vitro*-Bedingungen die Prozesse, die den BrdU-Metabolismus normalerweise unterstützen, womöglich unterbrochen, sodass eine relativ konstante, extrazelluläre Konzentration an BrdU während des Inkubationszeitraumes besteht. Zusammengefasst führen die geschilderten Sachverhalte vermutlich dazu, dass Zellen, die *in vitro* mit BrdU behandelt werden, letztlich vergleichsweise höheren Konzentrationen ausgesetzt sind als solche *in vivo*.

Auf der Basis der verminderten Proliferation in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen wurde weiter eine Analyse des Zellzyklus durchgeführt, zumal sich eine veränderte Proliferation in einer verschobenen Zellzyklusverteilung, vermutlich in Kombination mit einem Zellzyklusarrest, widerspiegeln sollte. Wie erwartet, wirkte sich die kontinuierliche Applikation von BrdU ins Kulturmedium nachteilig auf die Zellzyklusphasenverteilung aNSZ aus. So fand sich eine signifikant verminderte S- und G₂/M-Phase-Fraktion innerhalb derjenigen Kulturen, die mit 1,0-20,0 µM BrdU behandelt wurden, sowie ein signifikanter Anstieg der G₀-Phase-Fraktion (siehe Abschnitt 5.2.). Da die BrdU-induzierten Effekte nicht, wie in der Literatur beschrieben, durch die Zugabe von DC ins Kulturmedium ausgeglichen werden konnten (Kaufman & Davidson, 1978; Davidson & Kaufman, 1979), ist anzunehmen, dass entweder die eingesetzte DC-Konzentration zu gering war oder aber die induzierten Effekte auf Proliferation und Zellzyklus nicht in erster Linie im Zusammenhang mit einer Störung des Nukleotidstoffwechsels stehen. Alternativ könnte eine Reihe weiterer molekularer Mechanismen dazu beitragen, dass BrdU die Zellproliferation aNSZ stört. Dazu zählen eine direkte DNA-Schädigung sowie veränderte Bindungseigenschaften der DNA gegenüber regulatorischen Proteinen, deren Funktion auf der Wechselwirkung mit der DNA beruht (Poot *et al.*, 1994), infolge konformativer Änderungen der 3-D-DNA-Struktur (Goz, 1977). Der Einbau des großen Brom-Atoms in die DNA beeinflusst aber keineswegs nur die Struktur der DNA und folglich deren Methylierung und transkriptionelle Aktivität (Kuhn & Cooper-Kuhn, 2007); vielmehr scheint die Integration von BrdU in die DNA auch deren Stabilität zu verändern, was die Gefahr von Schwesterchromatid-Austauschen, Mutationen und DNA-Doppelstrangbrüchen erhöht (Taupin, 2007).

Die Daten dieser Arbeit belegen außerdem eine Induktion der Adhärenz in aNSZ-Kulturen durch BrdU. Der beobachtete Effekt scheint jedoch dosisabhängig zu sein: Während die Kul-

turen, die mit 2,5-20,0 μM BrdU behandelt wurden, durchwegs adhärent wurden, zeigten nur einige wenige Spheres, die mit 1,0 μM behandelt wurden, die Tendenz zu adhärieren. Die separate Durchführung eines MTT-Assays mit dem Zellkulturerstand, der die freischwimmenden Neurosphäroiden enthielt, sowie den adhärenten Zellen am Boden der Zellkulturplatte von kontroll- und BrdU-behandelten Zellen, bestätigte die Beobachtungen am Mikroskop und verwies auf einen signifikanten Anstieg der Zahl adhärenter Zellen bei der Anwendung von BrdU in Konzentrationen von 2,5 μM bis 20,0 μM . Soweit bekannt, wurde ein derartiger Einfluss von BrdU bisher weder für aNSZ noch für andere Zellsysteme beschrieben. Dass BrdU die Fähigkeit von Zellen zu adhärieren grundlegend beeinflussen kann, geht jedoch aus einer Studie an Fibroblasten hervor. In diesem Zusammenhang führte die Präsenz von BrdU, entgegen der beschriebenen, adhärenz-fördernden Wirkung in aNSZ-Kulturen, allerdings zu einer herabgesetzten Anheftungseffizienz der Fibroblasten (Berger, 2001). Um die Ursache der BrdU-induzierten Adhärenz in aNSZ-Kulturen zu erforschen, wurde der Fokus auf eine möglicherweise veränderte Expression innerhalb der Protein-Familie der Matrix-Metalloproteininasen (MMPs), im Besonderen MMP-2 und -9, in BrdU-behandelten Kulturen gelegt. MMPs werden durch Säugetierzellen zunächst als Zymogene, das heißt, inaktive Enzymvorstufen sezerniert; ihre Aktivierung führt zum Abbau extrazellulärer Matrix, da sie Kollagene und Proteoglykane proteolytisch abbauen (Strongin *et al.*, 1995). Die durchgeföhrten Experimente zeigten, dass eine verminderte Expression von aktivem MMP-9 nachweislich nicht in die Adhärenz BrdU-behandelter Kulturen involviert war, zumal MMP-9 in aNSZ-Kulturen erst gar nicht detektiert werden konnte. Allerdings bestätigten die erhobenen Befunde eine hohe MMP-2-Gelatinase-Aktivität in kontroll- und 1,0 μM BrdU-behandelten Kulturen, während im Gegensatz dazu Kulturen, die mit 2,5 μM bzw. 20,0 μM BrdU behandelt wurden, nur über ein sehr geringes bzw. ein nicht mehr vorhandenes Maß an aktivem MMP-2 verfügten. MMP-2 konnte demnach eindeutig als der Faktor identifiziert werden, welcher maßgeblich dazu beiträgt, dass kontroll-behandelte Sphäroiden und zum Teil auch die Sphäroiden, die mit 1,0 μM BrdU behandelt wurden, nicht adhärent wurden. Weiter erklärt die verminderte Expression von aktivem MMP-2 bei höheren BrdU-Konzentrationen die zunehmende Ädhärenz innerhalb von Kulturen, die mit 2,5 μM oder 20,0 μM BrdU behandelt wurden.

Die pro-Form von MMP-2 war konträr zu der aktiven Form von MMP-2 über den gesamten, untersuchten Konzentrationsbereich von 0,0 μM bis 20,0 μM BrdU unverändert exprimiert. Dieser Befund legt nahe, dass BrdU nicht die MMP-Expression per se, sondern vielmehr den

Übergang von der pro-Form in die aktive Form beeinflusst. Möglicherweise spielen in diesem Zusammenhang die TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases)-Proteine eine entscheidende Rolle, zumal diese als endogene Hauptregulatoren der MMP-Aktivität gelten (Gomez *et al.*, 1997), welche die Fähigkeit besitzen, MMPs reversibel zu inhibieren (Sternlicht *et al.*, 1999). Vermutlich führt BrdU in Konzentrationen ab 2,5 µM zu einer erhöhten Expression dieser Inhibitoren und hemmt auf diese Weise die Aktivierung der MMPs. Da bekannt ist, dass niedrige bis moderate Mengen an TIMP2 die Aktivierung von MMP-2 an der Zelloberfläche durch einen mehrstufigen Signalweg, an dem unter anderem die C-terminale Domäne von TIMP2 beteiligt ist, fördern, wohingegen höhere Mengen an TIMP2 über dessen N-terminale Domäne die Aktivierung von MMP-2 inhibieren (Strongin *et al.* 1995), sollte im Rahmen weiterführender Experimente die Untersuchung der Expression von TIMP-Proteinen, insbesondere TIMP2, ins Auge gefasst werden.

Schließlich beschreibt die vorliegende Dissertation auch den Einfluss einer 48-stündigen Inkubation mit BrdU auf die Differenzierung aNSZ *in vitro*. Es ließ sich eine reduzierte Expression des neuronalen Vorläuferzellmarkers Dcx und des Oligodendrozytenmarkers Mbp infolge der BrdU-Behandlung nachweisen. In Übereinstimmung mit den gezeigten Daten in Abschnitt 5.5. belegt die Literatur einen negativen Einfluss von BrdU auf die neuronale Differenzierung embryonaler, striataler Vorläuferzellen der Ratte (Caldwell *et al.*, 2005). Allerdings wirkten sich im Rahmen dieser Studie erst Konzentrationen ab 1,0 µM BrdU eindeutig negativ auf die Expression von TuJ1 (β III-Tubulin) in sich entwickelnden Neuronen aus, wogegen die vorliegende Arbeit eine signifikant verminderte Dcx-Expression schon bei einer Konzentration von 0,2 µM BrdU anführt. Des Weiteren wies die genannte Studie keinen Einfluss von BrdU auf die gliale Differenzierung in Astrozyten und Oligodendrozyten im untersuchten Konzentrationsbereich bis einschließlich 10,0 µM BrdU nach. Entgegen dieser Beobachtungen ließen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwar einen signifikanten Einfluss auf die oligodendrogliale Differenzierung ab einer Konzentration von 1,0 µM BrdU erkennen, konnten darüber hinaus allerdings die unveränderte Expression von GFAP in aNSZ-Kulturen, trotz der Anwesenheit von BrdU im Kulturmedium, bestätigen. Worauf diese teils gegensätzlichen Befunde beruhen, ist bislang aufgrund fehlender Untersuchungen noch nicht geklärt. Als Ursache könnte zum einen die unterschiedliche Herkunft der untersuchten Zellen (im Rahmen dieser Dissertation wurden Zellen aus der SVZ verwendet) sowie darauf basierend die Tatsache, dass die hier eingesetzten Zellen einer neurogenen Region entstammen, während striatale Zellen grundlegend als nicht neurogen gelten, in Betracht gezogen werden.

Denkbar wäre auch, dass sich die differierenden Ergebnisse infolge der unterschiedlichen Entwicklungsstufen (adult versus embryonal) der verwendeten Zellen ergeben und dadurch begründen lassen. Möglicherweise spielt zudem die Inkubationsdauer mit BrdU im Vorfeld der Differenzierung, die in der Studie von Caldwell *et al.* 24h, hier jedoch 48h, betrug, eine bedeutende Rolle. In klarem Gegensatz zu den *in-vitro*-Studien beeinträchtigte die Anwendung von BrdU *in vivo* in Konzentrationen von 240 mg/kg und 480 mg/kg die Population unreifer, Dcx-positiver Neurone im HC adulter Ratten offenbar in keiner Weise (Hancock *et al.*, 2009); eine Tatsache, die womöglich in einer raschen Verstoffwechselung von BrdU *in vivo* infolge intakter Prozesse, die den BrdU-Metabolismus unterstützen, begründet liegt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde belegen, dass BrdU-behandelte aNSZ, trotz eines veränderten Phänotyps, ihre grundlegende Fähigkeit zur Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone beibehalten, selbst wenn sie in Anwesenheit von 20,0 µM BrdU kultiviert werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten zuvor bereits anhand von Untersuchungen an neuralen Stamm- und Vorläuferzellen der Maus erzielt werden, die zunächst für 24h einem Puls von 50,0 µM BrdU ausgesetzt waren und im Anschluss dennoch in der Lage waren, in βIII-Tubulin-positive Neurone sowie GFAP-positive Astrozyten auszudifferenzieren (Ross *et al.*, 2008). Des Weiteren bestätigten auch Experimente an striatalen Vorläuferzellen der Ratte, dass eine 24-stündige Inkubation mit 10,0 µM BrdU im Vorfeld einer Differenzierung deren Multipotenz nicht beeinträchtigt (Caldwell *et al.*, 2005). Andererseits ergaben weiterführende Experimente der erstgenannten Studie von Ross *et al.*, in denen die Zellen bereits während der Spherebildung, das heißt, von Beginn der Kultur an, für 7 Tage mit BrdU behandelt wurden, eine starke Beeinträchtigung der terminalen Differenzierung, die letztlich keine typischen βIII-Tubulin- und GFAP-Färbungen mehr erkennen ließ. Gerade dieser Befund unterstreicht die Notwendigkeit, insbesondere den möglichen Einfluss einer länger andauernden Inkubation mit BrdU unbedingt zu bedenken und im voraus, vor der Durchführung der eigentlichen Experimente, sorgfältig abzuklären.

Neben einer veränderten Differenzierung BrdU-behandelter Zellen wurde *in vitro* zudem eine deutliche Zunahme des Zelltods in den Kulturen, die mit 1,0-20,0 µM BrdU behandelt wurden, nachgewiesen (vgl. Kap. 5.3.). Diese Daten decken sich mit Erkenntnissen, die nach einer Applikation von 60-600 mg/kg BrdU *in vivo* gewonnen wurden und auf die Induktion von neuronalem Zelltod während embryonaler und neonataler Entwicklung bei höheren BrdU-Konzentrationen im ZNS verweisen (Bannigan, 1985; Nagao *et al.*, 1998). In ähnlicher Weise zeigten auch *in-vitro*-Experimente von Caldwell *et al.* eine 30%ige Abnahme des

Überlebens von Zellen bei einer BrdU-Konzentration von 10,0 µM, während die Inkubation mit 0,2 µM BrdU keinen Einfluss auf Zelltod zu haben schien und ein Überleben von signifikant mehr Neuronen, als bei höheren Dosierungen nach sich zog (Caldwell *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Augenmerk zunächst allgemein auf die mögliche Induktion von Zelltod durch BrdU gelegt, ungeachtet dessen, welche Zellpopulation innerhalb der untersuchten Kulturen vom Zelltod betroffen war. Im Unterschied dazu verweisen die beiden letztgenannten Studien explizit auf den Zelltod neuronaler Zellen durch BrdU. Da die Ergebnisse dieser Arbeit aber eine, mit zunehmender BrdU-Konzentration verminderte Dcx-Expression in aNSZ-Kulturen belegen, ist nicht auszuschließen, dass diese, alternativ zu einer reduzierten Bildung Dcx-positiver Zellen bei höheren BrdU-Konzentrationen, durch einen ansteigenden Zelltod neuronal determinierter Zellen zustande kommt.

Hinsichtlich der aufgezeigten Induktion von Zelltod stehen die Daten der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Erkenntnissen von Caldwell *et al.* im eindeutigen Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie an neuralen Stamm- und Vorläuferzellkulturen der Maus, die, trotz der 24-stündigen Behandlung mit 50,0 µM BrdU, keine Hinweise auf einen signifikanten Anstieg spontanen Zelltods infolge der BrdU-Behandlung gab. Interessanterweise zeigten die BrdU-behandelten Zellen in diesem Kontext vielmehr eine zunehmende Resistenz gegenüber einer chemisch hervorgerufenen Apoptose. Die Autoren verweisen diesbezüglich auf eine Induktion der Seneszenz innerhalb dieser Kulturen, die zwar zu einem progressiven Abfall der Replikation sich schnell teilender Stamm- und Vorläuferzellen führt, aber keine Apoptose induziert (Ross *et al.*, 2008). Worauf diese grundlegenden Unterschiede zwischen Stamm- und Vorläuferzellen der Ratte und der Maus beruhen, ist derzeit noch nicht verstanden. Denkbar wäre jedoch, dass die spezies-spezifische BrdU-Sensitivität in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellpopulationen adulter neuraler Stamm- und Vorläuferzellen der Ratte im Vergleich zur Maus (Manuskript in Vorbereitung: Steffenhagen *et al.*, 2010) begründet liegt.

Auch über welchen Signalweg die toxische Wirkung BrdUs auf aNSZ mediert wird, wurde bis dato nicht untersucht und bleibt daher in weiteren Experimenten zu klären. Jedoch gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass eine Inhibierung von ERK (Extrazellulär Regulierte Kinase) im Zusammenhang mit der Induktion von Zelltod eine entscheidende Rolle spielt (Xia *et al.*, 1995). Dementsprechend wirkte sich die Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch TGF-beta1 protektiv auf hippocampale Zellen *in vitro* aus (Zhu *et al.*, 2002). Zusätzlich konnten Untersuchungen von Caldwell *et al.* zeigen (2005), dass die Inkubation von Zellen des Striatums, einer der SVZ nahe benachbarten Region, mit 10,0 µM BrdU in einer Abnahme der

ERK-Phosphorylierung und folglich einem Anstieg von Zelltod im Vergleich zu Kontrollzellen resultiert. Dies wirft die Frage auf, ob ähnliche Mechanismen den BrdU-induzierten Zelltod in aNSZ-Kulturen bewirken und ob dieser Zelltod auf eine verminderte Phosphorylierung bzw. eine Inhibierung von ERK bei höheren BrdU-Konzentrationen zurückzuführen ist. Da die mit Zellen aus der SVZ durchgeführte DNA-Array-Analyse, entgegen der Aktivierung von ERK1/2 in hippocampalen Zellkulturen (Zhu *et al.*, 2002), eine verminderte Expression von ERK1 (=Mapk3) nach TGF-beta1-Behandlung ergab (siehe Abschnitt 3.1.2.ii.: Tabelle 15) und im Rahmen weiterer Experimente gezeigt wurde, dass die Behandlung aNSZ mit BrdU die Expression von TGF-beta1 hervorruft (siehe Abschnitt 6), wäre die Involvierung des ERK-Signalweges in den BrdU-vermittelten Zelltod aNSZ zumindest nicht unwahrscheinlich.

Abgesehen von den hier nachgewiesenen, vielfältigen Einflüssen von BrdU auf aNSZ, die bei einer Markierung mit BrdU zur Untersuchung weiterer Parameter dringend berücksichtigt werden müssen, erfordert auch die Interpretation von Daten, die aus Experimenten mit BrdU-behandelten Zellen oder Tieren gewonnen wurden, per se erhöhte Vorsicht. BrdU ist nämlich, wenngleich oft fälschlicherweise angenommen, kein Marker der S-Phase des Zellzyklus. Vielmehr markiert das Thymidinanalagon neu synthetisierte DNA, woraus sich ableiten lässt, dass es nicht nur in proliferierende Zellen, sondern auch in Zellen, deren DNA repariert wird oder solche, die erneut in den Zellzyklus eintreten, eingebaut wird (Taupin, 2007). Ein weiterer Aspekt, der unbedingt Beachtung finden sollte, ist die Tatsache, dass beschädigte oder degenerierende, terminal differenzierte, postmitotische Neurone des adulten Gehirns Zellzyklus-assoziierte Proteine aktivieren und erneut in den Zellzyklus eintreten können, bevor sie letztlich dem Zelltod unterliegen (Katchanov *et al.*, 2001; Herrup & Arendt, 2002). Dies konnte eine Studie an adulten Nagetieren über die Analyse der BrdU-Inkorporation, gepaart mit der Expression von G1/S-Phase-Übergangsmarkern, bestätigen, in der, ausgelöst durch die Kombination einer Hypoxie mit einer Ischämie, Neurone dazu veranlasst wurden, die DNA-Synthese erneut aufzunehmen. Gleichzeitig zeigte die Mehrheit BrdU/NeuN-immunreaktiver Zellen eine positive Antwort auf die TUNEL-Färbung, was ihre apoptotische Natur unter Beweis stellte (Kuan *et al.*, 2004). All dies erschwert die Interpretation von Daten, die aus Experimenten mit BrdU-markierten Zellen oder Geweben gewonnen wurden, zunehmend, sodass beispielsweise zum Nachweis der Neurogenese nach Verletzungen des Gehirns, über den Einsatz von BrdU in Kombination mit neuronalen Markern hinaus, dringend die Anwendung apoptotischer Marker erforderlich scheint, um einer Verfälschung

der Ergebnisse vorzubeugen. Ein noch schwerwiegenderes Problem bezüglich der Verwendung von BrdU stellt sich jedoch beim Einsatz des Nukleotidanalogons zur Markierung von Zellen, die anschließend transplantiert und *in vivo* verfolgt werden sollen. Ein mittlerweile vielfach dokumentiertes Phänomen ist der Befund, dass transplantierte Zellen, die zuvor mit BrdU markiert wurden, bevorzugt absterben, anstatt sich in die neue Umgebung zu integrieren und funktionell auszureifen - eine Tatsache, die unter Umständen wiederum im Zusammenhang mit der oftmals unsachgemäßen und inadäquaten Anwendung von BrdU zur Markierung von Zellen stehen könnte. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie weist zudem darauf hin, dass BrdU aus Zellen des Transplantats in das Genom adulter, neuronaler Zellen des Empfängers transferiert werden könnte (Burns *et al.*, 2006), was in der Folge maßgeblich zu einer Fehlinterpretation der gewonnenen Daten beitragen würde.

Trotz all der genannten negativen Aspekte, die im Zusammenhang mit einer BrdU-Markierung stehen, gibt es derzeit vergleichsweise wenig Alternativen, was die Markierung sich teilender Zellen betrifft. Zwar bietet beispielsweise eine retrovirale Markierung gegenüber denjenigen mit BrdU den Vorteil, dass retrovirale Gene an alle Nachkommen der ursprünglich infizierten Zelle weitergegeben werden, unabhängig davon, wie viele Teilungen diese Zelle durchläuft, während BrdU im Verlauf jedes Zellzyklus weiter verdünnt wird. Der grundlegende Nachteil dieser Methode besteht allerdings in einer möglichen Inaktivierung des Promoters, die demzufolge in einer verminderten oder sogar vollends ausbleibenden Reporter-Gen-Expression resultiert (Kuhn & Cooper-Kuhn, 2007). Endogene Marker wie PCNA und Ki67 eignen sich dagegen zwar in hervorragender Weise zur Untersuchung von Biopsien und humanen Geweben postmortem, wo der Einsatz von BrdU - wenn nicht schon zu Lebzeiten im Rahmen Krebs-therapeutischer Maßnahmen angewandt - nicht vertretbar ist. Insbesondere zum Nachweis der Neurogenese sind sie jedoch ungeeignet, zumal ihre Expression nicht auf neu gebildete Neurone hinweist, sondern lediglich die Proliferation der untersuchten Zellen bestätigt. Ein strenger Nachweis der Neurogenese mithilfe von PCNA oder Ki67 erfordert daher unbedingt die Kombination mit zusätzlichen, phänotypischen Markern wie Dcx (Eisch & Mandyam, 2007).

Die negativen Einflüsse einer BrdU-Markierung sind über einen langen Zeitraum nicht in Publikationen beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen einer Thymidin-Substitution durch BrdU auf verschiedenste Parameter aNSZ-Kulturen der Ratte eingehend untersucht. Zusammengefasst haben die Untersuchungen gezeigt, dass BrdU eine zytotoxische Wirkung auf die verwendeten aNSZ ausübt und sowohl deren

Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung als auch deren Überleben und Adhäsionsverhalten *in vitro* negativ beeinflusst. Diese kritischen und dennoch oftmals unterschätzten bzw. vernachlässigten Aspekte einer BrdU-Markierung unterstreichen die Notwendigkeit, den möglicherweise vorhandenen Einfluss dieses Markers auf das verwendete Modellsystem im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen abzuklären, zumal mit dem Thymidinanalogen ein Fremdstoff in die DNA eingeführt wird, dessen zytostatische und zytotoxische Effekte auf die biologischen Reaktionen des Modellsystems nicht ohne Weiteres grundlegend ausgeschlossen werden können. Dies schließt ein, dass selbst bei nahe verwandten Spezies wie Ratte und Maus nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden kann, dass sich die Ergebnisse bezüglich der BrdU-Sensitivität übertragen lassen; denn nicht einmal innerhalb verschiedener Regionen wie z. B. HC und SVZ derselben Spezies führt die Substitution des Thymidins durch BrdU zwangsweise zu vergleichbaren Befunden. Wird BrdU stattdessen eingesetzt, ohne die damit verbundenen Auswirkungen genau zu kennen, besteht die Gefahr, verfälschte Messergebnisse zu generieren, die letztlich zu einer fehlerhaften Interpretation der gewonnenen Daten infolge der gewählten Detektionsmethode führen. Gerade diese überaus wichtige Tatsache sollte beim Einsatz von BrdU streng berücksichtigt werden.

Insgesamt stellt die Markierung mitotischer Zellen mit BrdU eine adäquate Methode dar, vorausgesetzt man ist sich darüber im Klaren, dass die Anwendung grundsätzlich auch Risiken bergen kann und in jedem Fall gewisse Vorsicht erfordert, sodass der Einsatz von BrdU mit Bedacht erfolgen sollte. Auch wenn die Verwendung von BrdU mangelnden Alternativen zu folge oftmals nicht umgangen werden kann, so sollte zumindest im Vorfeld abgeklärt werden, ob BrdU selbst einen Einfluss auf das jeweilig untersuchte Modellsystem besitzt, sodass dies gegebenenfalls bei der Bewertung der gefundenen Resultate mit einfließen kann. Da die verwendete BrdU-Konzentration im Hinblick auf schädliche Nebenwirkungen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (wie in Abschnitt 5 gezeigt wurde), könnte im Falle einer nachgewiesenen Beeinträchtigung durch BrdU die angemessene Menge an Basenanalogen durch entsprechende Experimente titriert und folglich womöglich reduziert werden, um die Zelltoxizität und dadurch hervorgerufene, experimentelle Artefakte zumindest so gering wie möglich zu halten. Allerdings sollte beachtet werden, dass die verwendete Konzentration ausreicht, um genügend Zellen zu markieren, da auch der Einsatz zu geringer BrdU-Konzentrationen aufgrund einer zu schwachen Intensität der nachfolgenden BrdU-Färbung am Ende die Gefahr einer falschen Interpretation der Ergebnisse birgt. Sind die BrdU-induzierten Effekte jedoch zu stark, sodass sie nicht eindeutig von den eigentlichen Ergebnissen abgegrenzt wer-

den können, bleibt nur die Möglichkeit, nach alternativen Methoden zu forschen, um verlässliche Ergebnisse zu generieren. In jedem Fall sollte nicht selbstverständlich angenommen werden, dass BrdU-markierte Zellen und deren Nachkommen sich in Bezug auf proliferatives Potential, Differenzierung und Zelltod sowie weitere funktionelle Parameter ähnlich wie unbehandelte Zellen verhalten. Möglicherweise erfordert insbesondere die Anwendung von BrdU in Langzeitstudien *in vivo*, in denen BrdU wiederholt und teils in hohen Konzentrationen appliziert wird, erhöhte Vorsicht.

7.4.2. Die BrdU-induzierte TGF-beta1-Expression und -Signalübertragung in aNSZ-Kulturen

Die im vorangehenden Kapitel beschriebenen Beobachtungen im Zusammenhang mit den Auswirkungen einer BrdU-Markierung auf aNSZ ließen einige Parallelen zu den gleichfalls im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Einflüssen von TGF-beta1 auf aNSZ erkennen. So führte die Inkubation aNSZ mit BrdU oder TGF-beta1 zu einer deutlichen Reduktion des proliferativen Potentials in aNSZ-Kulturen. Erwartungsgemäß spiegelte sich dies beiderseits in einer veränderten Zellzyklusverteilung in Form einer erhöhten G0/G1-Phase-Fraktion bei gleichzeitig verminderter S-Phase wider. Zusätzlich fand sich in weiteren Experimenten sowohl in BrdU- als auch in TGF-beta1-behandelten Kulturen ein Einfluss auf die Differenzierung bestätigt, der in einer verminderten oligodendroglialen Differenzierung bei jeweils konstanter astrogialer Differenzierung resultierte, wobei die Multipotenz der aNSZ-Kulturen jedoch grundlegend erhalten blieb. Die erhobenen Befunde warfen die Frage auf, worauf diese gleichartigen Resultate zurückzuführen waren. Einen überaus interessanten Hinweis lieferte in diesem Zusammenhang die relative Quantifizierung der TGF-beta1-mRNA in BrdU-behandelten aNSZ-Kulturen, welche eine erhöhte Expression von TGF-beta1 innerhalb dieser Kulturen ergab. Wenngleich ein derartiger Einfluss von BrdU auf die Expression dieses Zytokins in aNSZ bisher nicht gezeigt wurde, verweist eine erst kürzlich veröffentlichte Studie auf erhöhte Transkriptlevel eines weiteren Mitglieds der TGF-Familie, Inhibin- β A (Aktivin A), in HeLa-Zellen, die BrdU in Kombination mit Distamycin A, einem ebenfalls die vorreife Seneszenz induzierenden Reagenz, ausgesetzt waren (Novakova *et al.*, 2010). Weiterführende Experimente bestätigten zudem eine signifikant erhöhte Expression von TGF-beta1 auf Proteinebene ab einer Konzentration von 1,0 μ M BrdU sowie eine Zunahme der Smad2-Phosphorylierung infolge einer Aktivierung der TGF-beta1-Signaltransduktion in BrdU-behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollen. Dies lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der be-

obachteten Effekte, die durch BrdU hervorgerufen werden, im Zusammenhang mit der Induktion von TGF-beta1 in diesen Kulturen steht. Insbesondere der in Abschnitt 5.1. gezeigte Rückgang der Proliferation nach 48-stündiger Inkubation mit 1,0 µM BrdU scheint sehr wahrscheinlich durch die erhöhte Expression von TGF-beta1 induziert. Diese Schlussfolgerung wird dadurch bekräftigt, dass beide Effekte, die signifikant gesteigerte Expression von TGF-beta1 und die reduzierte Proliferation BrdU-behandelter Kulturen bei dieser Konzentration konvergieren (vgl. Abschnitt 5.1. und 6.1.2.). Um die Beteiligung von TGF-beta1 bei der Übertragung der BrdU-induzierten Effekte zweifelsohne nachzuweisen, sind dennoch weitere Experimente dringend erforderlich, zumal die Zusammenhänge gegenwärtig nicht verstanden sind. Vorstellbar wäre diesbezüglich die Anwendung von ALK-Inhibitoren im Vorfeld der Behandlung aNSZ mit BrdU, mit dem Ziel, die Signalübertragung durch TGF-beta1 innerhalb dieser Kulturen zu hemmen. Ließe sich auf diese Weise die unter Kontrollbedingungen beobachtete, unverfälschte Proliferation aNSZ-Kulturen trotz der Inkubation mit BrdU wieder herstellen, wäre der eindeutige Nachweis erbracht, dass die BrdU-induzierte Inhibierung der Proliferation über TGF-beta1 mediert wird. Letztlich könnten die aus derartigen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse dazu dienen, unerwünschte Nebeneffekte einer BrdU-Markierung, die nachweislich in Verbindung mit der Expression von TGF-beta1 stehen, durch eine Blockierung der TGF-beta1-Signalübertragung gezielt zu umgehen oder zumindest zu minimieren.

8. Anhang

8.1. Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers

Im Folgenden sind die Einstellungen am Durchflusszytometer FACS Calibur für die ein- und zweiparametrischen Messungen gezeigt (vgl. Tabelle 22 und 23).

Kanal	Verstärkerspannung [V]	Modus	Verstärkung [A]	Kompensation
FSC	E-1	lin	7,99	FL1 – 0,1 % FL2
SSC	300	log	1,0	FL2 – 0,0 % FL1
FL1	403	log	1,0	FL2 – 0,0 % FL3
FL2	389	log	1,0	FL3 – 0,0 % FL2
FL3	400	lin	1,0	
FL3-A	---	lin	1,0	
FL3-W	---	lin	3,99	
Schwellenwert	FSC = 80			

Tabelle 22: Geräteparameter für die einparametrischen PI-Messungen sowie die zweiparametrischen Ki67/PI-Messungen am FACS Calibur.

Kanal	Verstärkerspannung [V]	Modus	Verstärkung [A]	Kompensation
FSC	E-1	lin	7,99	FL1 – 0,1 % FL2
SSC	300	log	1,0	FL2 – 0,0 % FL1
FL1	550	log	1,0	FL2 – 0,0 % FL3
FL2	389	log	1,0	FL3 – 0,0 % FL2
FL3	462	lin	1,0	
FL3-A	---	lin	1,0	
FL3-W	---	lin	3,99	
Schwellenwert	FSC = 80			

Tabelle 23: Geräteparameter für die zweiparametrischen BrdU/PI-Messungen am FACS Calibur.

8.2. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro (10^{-6})
°C	Grad Celsius
α -MEM	α -minimal essential medium
A	Adenin
A2B5	Marker für unreife, gliale Vorläuferzellen
ansZ	adulte, neurale Stamm- und Vorläuferzellen
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BO	Bulbus olfactorius
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	complementary DNA, zur mRNA komplementäre DNA
cm ²	Quadratzentimeter

CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat
DC	2'-Desoxycytidin
Dcx	Doublecortin
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DM	Dichroitischer Spiegel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein
FL	Fluoreszenz
FL3-A	Signalfläche, Signalintegral der Fluoreszenz 3
FL3-H	Signalhöhe, Signalintensität der Fluoreszenz 3
FL3-W	Signalweite, Signaldauer der Fluoreszenz 3
FSC	forward scatter light, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
g	Einheit der Erdbeschleunigung
G	Guanin
GalC	Galactosylceramidase
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HC	Hippocampus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-säure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin vom Subtyp gamma
k	kilo
Kap.	Kapitel
l	Liter
lin	linear
log	logarithmisch
M	Maßeinheit der Molarität (mM = 10 ⁻³ M, µM = 10 ⁻⁶ M)
mA	Milli-Ampere
Map2ab	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 ab
Mbp	Myelin Basic Protein
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Einheit der Stoffmenge
mRNA	Messenger-RNA
MSC-CM	mesenchymal konditioniertes Medium

MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
NSZ	neurale Stamm- und Vorläuferzellen
OD _{x nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	Piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PMT	Photomultiplier
ppm	parts per million
pSmad2	phosphoryliertes Smad2
RMS	Rostralmigratorischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
R.T.	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGZ	Subgranulärzone
sog.	sogenannte
SP	Kurzpassfilter
SSC	sideward scatter light, Seitwärtsstreulicht
SUB	Protein-Extraktionspuffer mit SDS, Harnstoff und β-Mercaptoethanol
SVZ	Subventrikulärzone
T	Thymidin
T	Temperatur
T75	75 cm ² Gewebe-Kulturflaschen
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyleniamin
TGF-beta1	Transforming Growth Factor-beta1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-Puffer, pH mit Salzsäure eingestellt
TTX	Tetrodotoxin
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht/Volumen (weight per volume)
w/w	Gewicht/Gewicht (weight per weight)
x	mal
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

Aberg, M. A., N. D. Aberg, H. Hedbäcker, J. Oscarsson and P. S. Eriksson (2000). "Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus." J Neurosci **20**(8): 2896-2903.

Affymetrix (2001). Expression Analysis Technical Manual.

Agnish, N. D. and D. M. Kochhar (1976). "Direct exposure of postimplantation mouse embryos to 5-bromodeoxyuridine in vitro and its effect on subsequent chondrogenesis in the limbs." J Embryol Exp Morphol **36**(3): 623-638.

Ahmad, I., P. Zaouras and S. Artavanis-Tsakonas (1995). "Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells." Mech Dev **53**(1): 73-85.

Aigner, L. and U. Bogdahn (2008). "TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system." Cell Tissue Res **331**(1): 225-241.

Akhurst, R. J. and R. Deryck (2001). "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword." Trends Cell Biol **11**(11): S44-51.

Alexandrow, M. G., M. Kawabata, M. Aakre and H. L. Moses (1995a). "Overexpression of the c-Myc oncprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3239-3243.

Alexandrow, M. G. and H. L. Moses (1995b). "Transforming growth factor beta 1 inhibits mouse keratinocytes late in G1 independent of effects on gene transcription." Cancer Res **55**(17): 3928-3932.

Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" Science **135**: 1127-1128.

Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." Anat Rec **145**: 573-591.

Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." J Comp Neurol **137**(4): 433-457.

Altman, J. and G. D. Das (1965a). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-335.

Altman, J. and G. D. Das (1965b). "Post-natal origin of microneurones in the rat brain." Nature **207**: 953-956.

Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo, J. R. Fike, H. O. Lee, K. Pfeffer, C. Lois, S. J. Morrison and A. Alvarez-Buylla (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." Nature **425**(6961): 968-973.

Andersson, O., A. Stenqvist, A. Attersand and G. von Euler (2001). "Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B." Genomics **78**(3): 178-184.

Aronica, E., E. A. van Vliet, O. A. Mayboroda, D. Troost, F. H. da Silva and J. A. Gorter (2000). "Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy." Eur J Neurosci **12**(7): 2333-2344.

Arsenijevic, Y., J. G. Villemure, J. F. Brunet, J. J. Bloch, N. Deglon, C. Kostic, A. Zurn and P. Aebsicher (2001). "Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain." Exp Neurol **170**(1): 48-62.

Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno and M. E. Fortini (1995). "Notch signaling." Science **268**(5208): 225-232.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.

Arvidsson, A., T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia and O. Lindvall (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." Nat Med **8**(9): 963-970.

Arvidsson, A., Z. Kokaia and O. Lindvall (2001). "N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke." Eur J Neurosci **14**(1): 10-18.

Ata, K. A., F. Lennmyr, K. Funa, Y. Olsson and A. Terent (1999). "Expression of transforming growth factor-beta1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery." Acta Neuropathol (Berl) **97**(5): 447-455.

Bachman, K. E., B. G. Blair, K. Brenner, A. Bardelli, S. Arena, S. Zhou, J. Hicks, A. M. De Marzo, P. Argani and B. H. Park (2004). "p21(WAF1/CIP1) mediates the growth response to TGF-beta in human epithelial cells." Cancer Biol Ther **3**(2): 221-225.

Baghdassarian, D., D. Toru-Delbauffe, J. M. Gavaret and M. Pierre (1993). "Effects of transforming growth factor-beta 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes." Glia **7**(3): 193-202.

Baker, C. A., Z. Y. Lu, I. Zaitsev and L. Manuelidis (1999). "Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease." J Virol **73**(6): 5089-5097.

Bannigan, J. G. (1985). "The effects of 5-bromodeoxyuridine on fusion of the cranial neural folds in the mouse embryo." Teratology **32**(2): 229-239.

Barasch, J. M. and R. S. Bressler (1977). "The effect of 5-bromodeoxyuridine on the postnatal development of the rat testis." J Exp Zool **200**(1): 1-8.

Barnea, A. and F. Nottebohm (1994). "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11217-11221.

Barnea, A. and F. Nottebohm (1996). "Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 714-718.

Bates, S. and K. H. Vousden (1996). "p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis." Curr Opin Genet Dev **6**(1): 12-18.

Battegay, E. J., E. W. Raines, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope and R. Ross (1990). "TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop." Cell **63**(3): 515-524.

Battista, D., C. C. Ferrari, F. H. Gage and F. J. Pitossi (2006). "Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus." Eur J Neurosci **23**(1): 83-93.

Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." Annu Rev Biochem **71**: 333-374.

Bengzon, J., Z. Kokaia, E. Elmer, A. Nanobashvili, M. Kokaia and O. Lindvall (1997). "Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10432-10437.

Berardi, A. C., A. Wang, J. D. Levine, P. Lopez and D. T. Scadden (1995). "Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells." Science **267**(5194): 104-108.

Berger, S. (2001). Untersuchung der Wirkung von Schwerionenstrahlen auf menschliche Hautfibroblasten unter besonderer Berücksichtigung chromosomal Veränderungen.

Bernier, P. J., A. Bedard, J. Vinet, M. Levesque and A. Parent (2002). "Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11464-11469.

Bertrand, N., D. S. Castro and F. Guillemot (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." Nat Rev Neurosci **3**(7): 517-530.

Biebl, M., C. M. Cooper, J. Winkler and H. G. Kuhn (2000). "Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain." Neurosci Lett **291**(1): 17-20.

Bierie, B. and H. L. Moses (2006). "Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." Nat Rev Cancer **6**(7): 506-520.

Bizon, J. L. and M. Gallagher (2003). "Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline." Eur J Neurosci **18**(1): 215-219.

Blankenberg, F. G., R. W. Storrs, L. Naumovski, T. Goralski and D. Spielman (1996). "Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy." Blood **87**(5): 1951-1956.

Blokzijl, A., C. Dahlqvist, E. Reissmann, A. Falk, A. Moliner, U. Lendahl and C. F. Ibanez (2003). "Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3." J Cell Biol **163**(4): 723-728.

Boche, D., C. Cunningham, F. Docagne, H. Scott and V. H. Perry (2006). "TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration." Neurobiol Dis **22**(3): 638-650.

Boche, D., C. Cunningham, J. Gauldie and V. H. Perry (2003). "Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo." J Cereb Blood Flow Metab **23**(10): 1174-1182.

Border, W. A. and N. A. Noble (1997). "TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy." Kidney Int **51**(5): 1388-1396.

Bottner, M., K. Kriegstein and K. Unsicker (2000). "The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." J Neurochem **75**(6): 2227-2240.

Bottner, M., K. Unsicker and C. Suter-Cazzolara (1996). "Expression of TGF-beta type II receptor mRNA in the CNS." Neuroreport **7**(18): 2903-2907.

Bouchard, C., W. H. Friedman and C. Sautes (1997). "Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes." J Immunol **159**(9): 4155-4164.

Brandt, M. D., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, K. Reuter, A. Bick-Sander, W. von der Behrens and G. Kempermann (2003). "Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice." Mol Cell Neurosci **24**(3): 603-613.

Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-1779.

Brionne, T. C., I. Tessier, E. Maslia and T. Wyss-Coray (2003). "Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain." Neuron **40**(6): 1133-1145.

Brown, J. P., S. Couillard-Despres, C. M. Cooper-Kuhn, J. Winkler, L. Aigner and H. G. Kuhn (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." J Comp Neurol **467**(1): 1-10.

Brundin, P., O. Pogarell, P. Hagell, P. Piccini, H. Widner, A. Schrag, A. Kupsch, L. Crabb, P. Odin, B. Gustavii, A. Bjorklund, D. J. Brooks, C. D. Marsden, W. H. Oertel, N. P. Quinn, S. Rehncrona and O. Lindvall (2000). "Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazaroids in Parkinson's disease." Brain **123**(Pt 7): 1380-1390.

Brunkan, A. L. and A. M. Goate (2005). "Presenilin function and gamma-secretase activity." J Neurochem **93**(4): 769-792.

Buchman, V. L., M. Sporn and A. M. Davies (1994). "Role of transforming growth factor-beta isoforms in regulating the expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNA levels in embryonic cutaneous cells at different stages of development." Development **120**(6): 1621-1629.

Buckwalter, M. S., M. Yamane, B. S. Coleman, B. K. Ormerod, J. T. Chin, T. Palmer and T. Wyss-Coray (2006). "Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice." Am J Pathol **169**(1): 154-164.

Burns, T. C., X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Gutierrez-Perez, C. D. Keene, R. Sharda, Z. L. Demorest, Y. Jiang, M. Nelson-Holte, M. Soriano, Y. Nakagawa, M. R. Luquin, J. M. Garcia-Verdugo, F. Prosper, W. C. Low and C. M. Verfaillie (2006). "Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution." Stem Cells **24**(4): 1121-1127.

Bye, N., M. Zieba, N. G. Wreford and N. R. Nichols (2001). "Resistance of the dentate gyrus to induced apoptosis during ageing is associated with increases in transforming growth factor-beta1 messenger RNA." Neuroscience **105**(4): 853-862.

Cajal (1928). Degeneration and Regeneration of the Nervous System. Oxford, Oxford University Press.

Caldwell, M. A., X. He and C. N. Svendsen (2005). "5-Bromo-2'-deoxyuridine is selectively toxic to neuronal precursors in vitro." Eur J Neurosci **22**(11): 2965-2970.

Cameron, H. A. and E. Gould (1994). "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." Neuroscience **61**(2): 203-209.

Cameron, H. A., B. S. McEwen and E. Gould (1995). "Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus." J Neurosci **15**(6): 4687-4692.

Cameron, H. A. and R. D. McKay (1999). "Restoring production of hippocampal neurons in old age." Nat Neurosci **2**: 894-897.

Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." J Comp Neurol **435**(4): 406-417.

Cameron, H. A., P. Tanapat and E. Gould (1998). "Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway." Neuroscience **82**(2): 349-354.

Carlen, M., R. M. Cassidy, H. Brismar, G. A. Smith, L. W. Enquist and J. Frisen (2002). "Functional integration of adult-born neurons." Curr Biol **12**(7): 606-608.

Carpenter, M. K., X. Cui, Z. Y. Hu, J. Jackson, S. Sherman, A. Seiger and L. U. Wahlberg (1999). "In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells." Exp Neurol **158**(2): 265-278.

Carruthers, S., J. Mason and N. Papalopulu (2003). "Depletion of the cell-cycle inhibitor p27(Xic1) impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC(+) progenitor cells in *Xenopus tropicalis*." Mech Dev **120**(5): 607-616.

Casaccia-Bonelli, P., R. J. Hardy, K. K. Teng, J. M. Levine, A. Koff and M. V. Chao (1999). "Loss of p27Kip1 function results in increased proliferative capacity of oligodendrocyte progenitors but unaltered timing of differentiation." Development **126**(18): 4027-4037.

Cassar, L., H. Li, F. X. Jiang and J. P. Liu (2010). "TGF-beta induces telomerase-dependent pancreatic tumor cell cycle arrest." Mol Cell Endocrinol **320**(1-2): 97-105.

Castro, D. S., D. Skowronska-Krawczyk, O. Armant, I. J. Donaldson, C. Parras, C. Hunt, J. A. Critchley, L. Nguyen, A. Gossler, B. Gottgens, J. M. Matter and F. Guillemot (2006). "Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif." Dev Cell **11**(6): 831-844.

Cau, E., G. Gradwohl, S. Casarosa, R. Kageyama and F. Guillemot (2000). "Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium." Development **127**(11): 2323-2332.

Caviness, V. S., Jr., T. Takahashi and R. S. Nowakowski (1995). "Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model." Trends Neurosci **18**(9): 379-383.

Chaouchi, N., L. Arvanitakis, M. T. Auffredou, D. A. Blanchard, A. Vazquez and S. Sharma (1995). "Characterization of transforming growth factor-beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines." Oncogene **11**(8): 1615-1622.

Chen, C. R., Y. Kang, P. M. Siegel and J. Massague (2002). "E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression." Cell **110**(1): 19-32.

Chen, H., A. Thiagalingam, H. Chopra, M. W. Borges, J. N. Feder, B. D. Nelkin, S. B. Baylin and D. W. Ball (1997). "Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5355-5360.

Cheng, T., N. Rodrigues, D. Dombkowski, S. Stier and D. T. Scadden (2000a). "Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1)." Nat Med **6**(11): 1235-1240.

Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes and D. T. Scadden (2000b). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.

Cheng, T., H. Shen, N. Rodrigues, S. Stier and D. T. Scadden (2001). "Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1)." Blood **98**(13): 3643-3649.

Cheshier, S. H., S. J. Morrison, X. Liao and I. L. Weissman (1999). "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3120-3125.

Chin, B. Y., I. Petrache, A. M. Choi and M. E. Choi (1999). "Transforming growth factor beta1 rescues serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages." J Biol Chem **274**(16): 11362-11368.

Chitnis, A. B. (1995). "The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification." Mol Cell Neurosci **6**(6): 311-321.

Claassen, G. F. and S. R. Hann (2000). "A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9498-9503.

Close, J. L., B. Gumuscu and T. A. Reh (2005). "Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF{beta} signaling." Development **132**(13): 3015-3026.

Coe, C. L., M. Kramer, B. Czeh, E. Gould, A. J. Reeves, C. Kirschbaum and E. Fuchs (2003). "Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys." Biol Psychiatry **54**(10): 1025-1034.

Coffey, R. J., Jr., C. C. Bascom, N. J. Sipes, R. Graves-Deal, B. E. Weissman and H. L. Moses (1988). "Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta." Mol Cell Biol **8**(8): 3088-3093.

Coller, H. A., L. Sang and J. M. Roberts (2006). "A new description of cellular quiescence." PLoS Biol **4**(3): e83.

Constam, D. B., J. Philipp, U. V. Malipiero, P. ten Dijke, M. Schachner and A. Fontana (1992). "Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia." J Immunol **148**(5): 1404-1410.

Constam, D. B., P. Schmid, A. Aguzzi, M. Schachner and A. Fontana (1994). "Transient production of TGF-beta 2 by postnatal cerebellar neurons and its effect on neuroblast proliferation." Eur J Neurosci **6**(5): 766-778.

Cooper-Kuhn, C. M. and H. G. Kuhn (2002). "Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain." Brain Res Dev Brain Res **134**(1-2): 13-21.

Coppock, D. L., C. Kopman, S. Scandalis and S. Gilleran (1993). "Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts." Cell Growth Differ **4**(6): 483-493.

Cordenonsi, M., M. Montagner, M. Adorno, L. Zacchigna, G. Martello, A. Mamidi, S. Soligo, S. Dupont and S. Piccolo (2007). "Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation." Science **315**(5813): 840-843.

Corotto, F. S., J. A. Henegar and J. A. Maruniak (1993). "Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain." Neurosci Lett **149**(2): 111-114.

Couillard-Despres, S., J. Winkler, G. Uyanik and L. Aigner (2001). "Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis?" Curr Mol Med **1**(6): 677-688.

Couillard-Despres, S., B. Winner, C. Karl, G. Lindemann, P. Schmid, R. Aigner, J. Laemke, U. Bogdahn, J. Winkler, J. Bischofberger and L. Aigner (2006). "Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain." Eur J Neurosci **24**(6): 1535-1545.

Couillard-Despres, S., B. Winner, S. Schaubbeck, R. Aigner, M. Vroemen, N. Weidner, U. Bogdahn, J. Winkler, H. G. Kuhn and L. Aigner (2005). "Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis." European Journal of Neuroscience **21**: 1-14.

Couillard-Despres, S., C. Wuertinger, M. Kandasamy, M. Caioni, K. Stadler, R. Aigner, U. Bogdahn and L. Aigner (2009). "Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis." Mol Psychiatry.

Cremisi, F., A. Philpott and S. Ohnuma (2003). "Cell cycle and cell fate interactions in neural development." Curr Opin Neurobiol **13**(1): 26-33.

Dao, M. A., N. Taylor and J. A. Nolta (1998). "Reduction in levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip-1) coupled with transforming growth factor beta neutralization induces cell-cycle entry and increases retroviral transduction of primitive human hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13006-13011.

Das, L. and A. D. Levine (2008). "TGF-beta inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T cells in the presence of sustained TCR signal transduction." J Immunol **180**(3): 1490-1498.

Datto, M. B., Y. Li, J. F. Panus, D. J. Howe, Y. Xiong and X. F. Wang (1995). "Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5545-5549.

Davidson, R. L. and E. R. Kaufman (1979). "Resistance to bromodeoxyuridine mutagenesis and toxicity in mammalian cells selected for resistance to hydroxyurea." Somatic Cell Genet **5**(6): 873-885.

Davis, R. J. (1995). "Transcriptional regulation by MAP kinases." Mol Reprod Dev **42**(4): 459-467.

De Groot, C. J., L. Montagne, A. D. Barten, P. Sminia and P. Van Der Valk (1999). "Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures." J Neuropathol Exp Neurol **58**(2): 174-187.

de Luca, A., M. Weller and A. Fontana (1996). "TGF-beta-induced apoptosis of cerebellar granule neurons is prevented by depolarization." J Neurosci **16**(13): 4174-4185.

de Sampaio e Spohr, T. C., R. Martinez, E. F. da Silva, V. M. Neto and F. C. Gomes (2002). "Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1." Eur J Neurosci **16**(11): 2059-2069.

Dennler, S., M. J. Goumans and P. ten Dijke (2002). "Transforming growth factor beta signal transduction." J Leukoc Biol **71**(5): 731-740.

Derynck, R., R. J. Akhurst and A. Balmain (2001). "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression." Nat Genet **29**(2): 117-129.

Derynck, R. and X. H. Feng (1997). "TGF-beta receptor signaling." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F105-150.

Dhandapani, K. M. and D. W. Brann (2003). "Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia." Cell Biochem Biophys **39**(1): 13-22.

Diermeier, S., E. Schmidt-Bruecken, M. Kubbies, L. A. Kunz-Schughart and G. Brockhoff (2004). "Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines." Cell Prolif **37**(2): 195-206.

Doetsch, F. (2003). "A niche for adult neural stem cells." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 543-550.

Doetsch, F. and A. Alvarez-Buylla (1996). "Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14895-14900.

Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell **97**(6): 703-716.

Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." J Neurosci **17**(13): 5046-5061.

Doetsch, F., L. Petreanu, I. Caille, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (2002a). "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells." Neuron **36**(6): 1021-1034.

Doetsch, F., J. M. Verdugo, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, M. V. Chao and P. Casaccia-Bonelli (2002b). "Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis." J Neurosci **22**(6): 2255-2264.

Duman, R. S., S. Nakagawa and J. Malberg (2001). "Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment." Neuropsychopharmacology **25**(6): 836-844.

Dunnett, S. B. and A. Bjorklund (1999). "Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease." Nature **399**(6738 Suppl): A32-39.

Durand, B. and M. Raff (2000). "A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development." Bioessays **22**(1): 64-71.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2001). "Regulating proliferation during retinal development." *Nat Rev Neurosci* **2**(5): 333-342.

Edgar, R., M. Domrachev and A. E. Lash (2002). "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository." *Nucleic Acids Res* **30**(1): 207-210.

Egan, S. E., B. St-Pierre and C. C. Leow (1998). "Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions." *Curr Top Microbiol Immunol* **228**: 273-324.

Eisch, A. J. and C. D. Mandyam (2007). "Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"?" *Curr Pharm Biotechnol* **8**(3): 147-165.

Elbendary, A., A. Berchuck, P. Davis, L. Havrilesky, R. C. Bast, Jr., J. D. Iglehart and J. R. Marks (1994). "Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells." *Cell Growth Differ* **5**(12): 1301-1307.

Endl, E., P. Steinbach, R. Knuchel and F. Hofstadter (1997). "Analysis of cell cycle-related Ki-67 and p120 expression by flow cytometric BrdUrd-Hoechst/7AAD and immunolabeling technique." *Cytometry* **29**(3): 233-241.

Engel, M. E., M. A. McDonnell, B. K. Law and H. L. Moses (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." *J Biol Chem* **274**(52): 37413-37420.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* **4**(11): 1313-1317.

Ewen, M. E. (1994). "The cell cycle and the retinoblastoma protein family." *Cancer Metastasis Rev* **13**(1): 45-66.

Facchini, L. M. and L. Z. Penn (1998). "The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights." *FASEB J* **12**(9): 633-651.

Farah, M. H., J. M. Olson, H. B. Sucic, R. I. Hume, S. J. Tapscott and D. L. Turner (2000). "Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells." *Development* **127**(4): 693-702.

Farinelli, S. E. and L. A. Greene (1996). "Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support." *J Neurosci* **16**(3): 1150-1162.

Farkas, L. M., N. Dunker, E. Roussa, K. Unsicker and K. Kriegstein (2003). "Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo." *J Neurosci* **23**(12): 5178-5186.

Feng, X. H., Y. Y. Liang, M. Liang, W. Zhai and X. Lin (2002). "Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(INK4B)." *Mol Cell* **9**(1): 133-143.

Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, K. Reuter, B. Steiner, L. P. Wang, M. Yamaguchi, H. Kettenmann and G. Kempermann (2003). "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes." Mol Cell Neurosci **23**(3): 373-382.

Flanders, K. C., G. Ludecke, S. Engels, D. S. Cissel, A. B. Roberts, P. Kondaiah, R. Lafyatis, M. B. Sporn and K. Unsicker (1991). "Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system." Development **113**(1): 183-191.

Flanders, K. C., R. F. Ren and C. F. Lippa (1998). "Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease." Prog Neurobiol **54**(1): 71-85.

Francis, F., A. Koulakoff, D. Boucher, P. Chafey, B. Schaar, M. C. Vinet, G. Friocourt, N. McDonnell, O. Reiner, A. Kahn, S. K. McConnell, Y. Berwald-Netter, P. Denoulet and J. Chelly (1999). "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." Neuron **23**(2): 247-256.

Franzen, P., P. ten Dijke, H. Ichijo, H. Yamashita, P. Schulz, C. H. Heldin and K. Miyazono (1993). "Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor." Cell **75**(4): 681-692.

Freed, C. R., P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg and S. Fahn (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **344**(10): 710-719.

Frey, R. S. and K. M. Mulder (1997). "TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells." Cancer Lett **117**(1): 41-50.

Furukawa, T., S. Mukherjee, Z. Z. Bao, E. M. Morrow and C. L. Cepko (2000). "rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells." Neuron **26**(2): 383-394.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.

Gage, F. H., P. W. Coates, T. D. Palmer, H. G. Kuhn, L. J. Fisher, J. O. Suhonen, D. A. Peterson, S. T. Suhr and J. Ray (1995a). "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11879-11883.

Gage, F. H., J. Ray and L. J. Fisher (1995b). "Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS." Annu Rev Neurosci **18**: 159-192.

Gaiano, N. and G. Fishell (2002). "The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates." Annu Rev Neurosci **25**: 471-490.

Gaiano, N., J. S. Nye and G. Fishell (2000). "Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain." Neuron **26**(2): 395-404.

Galter, D., M. Bottner and K. Unsicker (1999). "Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas." *J Neurosci Res* **56**(5): 531-538.

Gangemi, R. M., M. Perera and G. Corte (2004). "Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells." *J Neurochem* **89**(2): 286-306.

Garcia-Campmany, L. and E. Marti (2007). "The TGFbeta intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord." *Development* **134**(1): 65-75.

Garner, W. (1974). "The effect of 5-bromodeoxyuridine on early mouse embryos in vitro." *J Embryol Exp Morphol* **32**(3): 849-855.

Gartel, A. L. and K. Shchors (2003). "Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes." *Exp Cell Res* **283**(1): 17-21.

Ge, W., K. Martinowich, X. Wu, F. He, A. Miyamoto, G. Fan, G. Weinmaster and Y. E. Sun (2002). "Notch signaling promotes astrogliogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation." *J Neurosci Res* **69**(6): 848-860.

Geng, Y. and R. A. Weinberg (1993). "Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10315-10319.

Gingery, A., E. W. Bradley, L. Pederson, M. Ruan, N. J. Horwood and M. J. Oursler (2008). "TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival." *Exp Cell Res* **314**(15): 2725-2738.

Gleeson, J. G., P. T. Lin, L. A. Flanagan and C. A. Walsh (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." *Neuron* **23**(2): 257-271.

Gomes, F. C., O. Sousa Vde and L. Romao (2005). "Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development." *Int J Dev Neurosci* **23**(5): 413-424.

Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji and U. P. Thorgeirsson (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." *Eur J Cell Biol* **74**(2): 111-122.

Gotz, M., E. Hartfuss and P. Malatesta (2002). "Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice." *Brain Res Bull* **57**(6): 777-788.

Gould, E., H. A. Cameron, D. C. Daniels, C. S. Woolley and B. S. McEwen (1992). "Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus." *J Neurosci* **12**(9): 3642-3650.

Gould, E., H. A. Cameron and B. S. McEwen (1994). "Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus." *J Comp Neurol* **340**(4): 551-565.

Gould, E., B. S. McEwen, P. Tanapat and L. A. M. Galea (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation." J Neurosci **17**(7): 2492-2498.

Gould, E., A. J. Reeves, M. Fallah, P. Tanapat, C. G. Gross and E. Fuchs (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5263-5267.

Gould, E., A. J. Reeves, M. S. Graziano and C. G. Gross (1999). "Neurogenesis in the neocortex of adult primates." Science **286**(5439): 548-552.

Gould, E. and P. Tanapat (1999). "Stress and hippocampal neurogenesis." Biol Psychiatry **46**(11): 1472-1479.

Gould, E., P. Tanapat, B. S. McEwen, G. Flugge and E. Fuchs (1998). "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-3171.

Goz, B. (1977). "The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells." Pharmacol Rev **29**(4): 249-272.

Grammas, P. and R. Ovase (2002). "Cerebrovascular transforming growth factor-beta contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain." Am J Pathol **160**(5): 1583-1587.

Grandori, C. and R. N. Eisenman (1997). "Myc target genes." Trends Biochem Sci **22**(5): 177-181.

Gu, W., T. Brannstrom and P. Wester (2000). "Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke." J Cereb Blood Flow Metab **20**(8): 1166-1173.

Hagedorn, L., J. Floris, U. Suter and L. Sommer (2000). "Autonomic neurogenesis and apoptosis are alternative fates of progenitor cell communities induced by TGFbeta." Dev Biol **228**(1): 57-72.

Hakumaki, J. M. and R. A. Kauppinen (2000). "1H NMR visible lipids in the life and death of cells." Trends Biochem Sci **25**(8): 357-362.

Hancock, A., C. Priester, E. Kidder and J. R. Keith (2009). "Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus *in vivo*?" Behav Brain Res **199**(2): 218-221.

Hannon, G. J. and D. Beach (1994). "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." Nature **371**(6494): 257-261.

Hartsough, M. T. and K. M. Mulder (1995). "Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells." J Biol Chem **270**(13): 7117-7124.

Hayes, N. L. and R. S. Nowakowski (2000). "Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase." Dev Neurosci **22**(1-2): 44-55.

Heine, V. M., S. Maslam, J. Zareno, M. Joels and P. J. Lucassen (2004). "Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible." Eur J Neurosci **19**(1): 131-144.

Heino, J. and J. Massague (1990). "Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor beta." J Biol Chem **265**(18): 10181-10184.

Henn, F. A. and B. Vollmayr (2004). "Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon?" Biol Psychiatry **56**(3): 146-150.

Henrich-Noack, P., J. H. Prehn and J. Kriegstein (1996). "TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms." Stroke **27**(9): 1609-1614; discussion 1615.

Herrup, K. and T. Arendt (2002). "Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **4**(3): 243-247.

His, W. (1904). Die Entwicklung des menschlichen Gehirns. Leipzig, Hirzel.

Hitoshi, S., T. Alexson, V. Tropepe, D. Donoviel, A. J. Elia, J. S. Nye, R. A. Conlon, T. W. Mak, A. Bernstein and D. van der Kooy (2002). "Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells." Genes Dev **16**(7): 846-858.

Hocevar, B. A., A. Smine, X. X. Xu and P. H. Howe (2001). "The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway." EMBO J **20**(11): 2789-2801.

Hofseth, L. J., S. P. Hussain and C. C. Harris (2004). "p53: 25 years after its discovery." Trends Pharmacol Sci **25**(4): 177-181.

Horne, M. C., G. L. Goolsby, K. L. Donaldson, D. Tran, M. Neubauer and A. F. Wahl (1996). "Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression." J Biol Chem **271**(11): 6050-6061.

Houi, K., T. Kobayashi, S. Kato, S. Mochio and K. Inoue (2002). "Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neurol Scand **106**(5): 299-301.

Howe, P. H., G. Draetta and E. B. Leof (1991). "Transforming growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest." Mol Cell Biol **11**(3): 1185-1194.

Hsieh, J. and F. H. Gage (2004). "Epigenetic control of neural stem cell fate." Curr Opin Genet Dev **14**(5): 461-469.

Hu, H., H. Tomasiewicz, T. Magnuson and U. Rutishauser (1996). "The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone." Neuron **16**(4): 735-743.

Hume, W. J. and R. Saffhill (1986). "Iodo- and bromodeoxyuridine are excised at different rates from DNA of mouse tongue keratinocytes in vitro." Chem Biol Interact **60**(2): 227-232.

Hunter, K. E., M. B. Sporn and A. M. Davies (1993). "Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes." Glia **7**(3): 203-211.

Iavarone, A. and J. Massague (1997). "Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15." Nature **387**(6631): 417-422.

Ilzecka, J., Z. Stelmasiak and B. Dobosz (2002). "Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis." Cytokine **20**(5): 239-243.

Imamura, T., M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata and K. Miyazono (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily." Nature **389**(6651): 622-626.

Isaacs, K. R., B. J. Anderson, A. A. Alcantara, J. E. Black and W. T. Greenough (1992). "Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning [published erratum appears in J Cereb Blood Flow Metab 1992 May;12(3):533]." J Cereb Blood Flow Metab **12**(1): 110-119.

Ishisaki, A., K. Yamato, A. Nakao, K. Nonaka, M. Ohguchi, P. ten Dijke and T. Nishihara (1998). "Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells." J Biol Chem **273**(38): 24293-24296.

Jia, J., M. Lin, L. Zhang, J. P. York and P. Zhang (2007). "The Notch signaling pathway controls the size of the ocular lens by directly suppressing p57Kip2 expression." Mol Cell Biol **27**(20): 7236-7247.

Jiang, W., Q. Wan, Z. J. Zhang, W. D. Wang, Y. G. Huang, Z. R. Rao and X. Zhang (2003). "Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylenetetrazole in rats." Brain Res **977**(2): 141-148.

Jiang, Y., D. Henderson, M. Blackstad, A. Chen, R. F. Miller and C. M. Verfaillie (2003). "Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11854-11860.

Jin, K., M. Minami, J. Q. Lan, X. O. Mao, S. Batteur, R. P. Simon and D. A. Greenberg (2001). "Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4710-4715.

Jin, K., X. Wang, L. Xie, X. O. Mao, W. Zhu, Y. Wang, J. Shen, Y. Mao, S. Banwait and D. A. Greenberg (2006). "Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13198-13202.

Johansson, C. B., M. Svensson, L. Wallstedt, A. M. Janson and J. Frisen (1999). "Neural stem cells in the adult human brain." Exp Cell Res **253**(2): 733-736.

Johns, L. D., G. Babcock, D. Green, M. Freedman, S. Sriram and R. M. Ransohoff (1992). "Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures." Brain Res **585**(1-2): 229-236.

Jordan, C. T., G. Yamasaki and D. Minamoto (1996). "High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations." Exp Hematol **24**(11): 1347-1355.

Joseph, B., E. R. Andersson, P. Vlachos, E. Sodersten, L. Liu, A. I. Teixeira and O. Hermanson (2009). "p57Kip2 is a repressor of Mash1 activity and neuronal differentiation in neural stem cells." Cell Death Differ **16**(9): 1256-1265.

Joseph, B., A. Wallen-Mackenzie, G. Benoit, T. Murata, E. Joodmardi, S. Okret and T. Perlmann (2003). "p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15619-15624.

Jung, P. and H. Hermeking (2009). "The c-MYC-AP4-p21 cascade." Cell Cycle **8**(7): 982-989.

Kageyama, R., T. Ohtsuka, J. Hatakeyama and R. Ohsawa (2005). "Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation." Exp Cell Res **306**(2): 343-348.

Kamesaki, H., K. Nishizawa, G. Y. Michaud, J. Cossman and T. Kiyono (1998). "TGF-beta 1 induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mRNA and protein in murine B cells." J Immunol **160**(2): 770-777.

Kandasamy, M., S. Couillard-Despres, K. A. Raber, M. Stephan, B. Lehner, B. Winner, Z. Kohl, F. J. Rivera, H. P. Nguyen, O. Riess, U. Bogdahn, J. Winkler, S. von Horsten and L. Aigner (2010). "Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease." J Neuropathol Exp Neurol **69**(7): 717-728.

Kaplan, M. S. and D. H. Bell (1984). "Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus." J Neurosci **4**(6): 1429-1441.

Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-1094.

Karl, C., S. Couillard-Despres, P. Prang, M. Mundig, W. Kilb, T. Brigadski, S. Plotz, W. Mages, H. Luhmann, J. Winkler, U. Bogdahn and L. Aigner (2005). "Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence." Journal of Neurochemistry **92**: 264-282.

Karl, C., S. Couillard-Despres, P. Prang, M. Mundig, W. Kilb, T. Brigadski, S. Plotz, W. Mages, H. Luhmann, J. Winkler, U. Bogdahn and L. Aigner (2005). "Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence." J Neurochem **92**(2): 264-282.

Katchanov, J., C. Harms, K. Gertz, L. Hauck, C. Waeber, L. Hirt, J. Priller, R. von Harsdorf, W. Bruck, H. Hortnagl, U. Dirnagl, P. G. Bhide and M. Endres (2001). "Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death." *J Neurosci* **21**(14): 5045-5053.

Kaufman, E. R. and R. L. Davidson (1978). "Biological and biochemical effects of bromodeoxyuridine and deoxycytidine on Syrian hamster melanoma cells." *Somatic Cell Genet* **4**(5): 587-601.

Kempermann, G. (2006). Adult Neurogenesis-Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. OXFORD University Press.

Kempermann, G., E. P. Brandon and F. H. Gage (1998). "Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus." *Curr Biol* **8**(16): 939-942.

Kempermann, G., D. Gast and F. H. Gage (2002). "Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment." *Ann Neurol* **52**(2): 135-143.

Kempermann, G. and G. Kronenberg (2003). "Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression." *Biol Psychiatry* **54**(5): 499-503.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* **386**(6624): 493-495.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997a). "Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10409-10414.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997b). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* **386**(6624): 493-495.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1998). "Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus." *J Neurosci* **18**(9): 3206-3212.

Kim, H. J., H. Hida, C. G. Jung, Y. Miura and H. Nishino (2006). "Treatment with deferoxamine increases neurons from neural stem/progenitor cells." *Brain Res* **1092**(1): 1-15.

Kippin, T. E., D. J. Martens and D. van der Kooy (2005). "p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity." *Genes Dev* **19**(6): 756-767.

Klempt, N. D., E. Sirimanne, A. J. Gunn, M. Klempt, K. Singh, C. Williams and P. D. Gluckman (1992). "Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **13**(1-2): 93-101.

Koelliker, A. (1896). Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Leipzig, Engelmann.

Koguchi, K., Y. Nakatsuji, K. Nakayama and S. Sakoda (2002). "Modulation of astrocyte proliferation by cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1)." *Glia* **37**(2): 93-104.

König, H. G., D. Kogel, A. Rami and J. H. Prehn (2005). "TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling." *J Cell Biol* **168**(7): 1077-1086.

Kornack, D. R. and P. Rakic (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5768-5773.

Kriegstein, K., L. Farkas and K. Unsicker (1998a). "TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins." *J Neurobiol* **37**(4): 563-572.

Kriegstein, K., L. Farkas and K. Unsicker (1998c). "TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins." *J Neurobiol* **37**(4): 563-572.

Kriegstein, K., P. Henheik, L. Farkas, J. Jaszai, D. Galter, K. Krohn and K. Unsicker (1998b). "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." *J Neurosci* **18**(23): 9822-9834.

Kriegstein, K., B. Reuss, D. Maysinger and K. Unsicker (1998a). "Short communication: transforming growth factor-beta mediates the neurotrophic effect of fibroblast growth factor-2 on midbrain dopaminergic neurons." *Eur J Neurosci* **10**(8): 2746-2750.

Kriegstein, K., M. Rufer, C. Suter-Cazzolara and K. Unsicker (1995). "Neural functions of the transforming growth factors beta." *Int J Dev Neurosci* **13**(3-4): 301-315.

Kriegstein, K., C. Suter-Cazzolara, W. H. Fischer and K. Unsicker (1995). "TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP⁺ toxicity." *EMBO J* **14**(4): 736-742.

Kronenberg, G., K. Reuter, B. Steiner, M. D. Brandt, S. Jessberger, M. Yamaguchi and G. Kempermann (2003). "Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli." *J Comp Neurol* **467**(4): 455-463.

Krull, M., N. Voss, C. Choi, S. Pistor, A. Potapov and E. Wingender (2003). "TRANSPATH: an integrated database on signal transduction and a tool for array analysis." *Nucleic Acids Res* **31**(1): 97-100.

Krupinski, J., P. Kumar, S. Kumar and J. Kaluza (1996). "Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans." *Stroke* **27**(5): 852-857.

Kuan, C. Y., A. J. Schloemer, A. Lu, K. A. Burns, W. L. Weng, M. T. Williams, K. I. Strauss, C. V. Vorhees, R. A. Flavell, R. J. Davis, F. R. Sharp and P. Rakic (2004). "Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain." *J Neurosci* **24**(47): 10763-10772.

Kuhn, H. G. and C. M. Cooper-Kuhn (2007). "Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis." *Curr Pharm Biotechnol* **8**(3): 127-131.

Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson and F. H. Gage (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." *J Neurosci* **16**(6): 2027-2033.

Kuhn, H. G., J. Winkler, G. Kempermann, L. J. Thal and F. H. Gage (1997). "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain." *J Neurosci* **17**(15): 5820-5829.

LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow (1997). "New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors." *Genes Dev* **11**(7): 847-862.

Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." *Development* **131**(5): 965-973.

Laiho, M., J. A. DeCaprio, J. W. Ludlow, D. M. Livingston and J. Massague (1990). "Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation." *Cell* **62**(1): 175-185.

Lajtha, L. G. (1963). "On the Concept of the Cell Cycle." *J Cell Physiol* **62**: SUPPL1:143-145.

Lallemand, F., A. Mazars, C. Prunier, F. Bertrand, M. Kornprost, S. Gallea, S. Roman-Roman, G. Cherqui and A. Atfi (2001). "Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells." *Oncogene* **20**(7): 879-884.

Latres, E., M. Malumbres, R. Sotillo, J. Martin, S. Ortega, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, C. Cordon-Cardo and M. Barbacid (2000). "Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis." *EMBO J* **19**(13): 3496-3506.

Lecanda, J., V. Ganapathy, C. D'Aquino-Ardalan, B. Evans, C. Cadacio, A. Ayala and L. I. Gold (2009). "TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest." *Cell Cycle* **8**(5): 742-756.

Lee, J., W. Duan and M. P. Mattson (2002). "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice." *J Neurochem* **82**(6): 1367-1375.

Lee, K. Y. and S. C. Bae (2002). "TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis." *J Biochem Mol Biol* **35**(1): 47-53.

Lee, M. H., I. Reynisdottir and J. Massague (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." *Genes Dev* **9**(6): 639-649.

Lehrmann, E., R. Kiefer, T. Christensen, K. V. Toyka, J. Zimmer, N. H. Diemer, H. P. Hartung and B. Finsen (1998). "Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats." *Glia* **24**(4): 437-448.

Lemaire, V., M. Koehl, M. Le Moal and D. N. Abrous (2000). "Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11032-11037.

Lendahl, U., L. B. Zimmerman and R. D. McKay (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell **60**(4): 585-595.

Levine, E. M., J. Close, M. Fero, A. Ostrovsky and T. A. Reh (2000). "p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina." Dev Biol **219**(2): 299-314.

Liang, Y., Y. Li, Y. Wang, X. Li, P. P. Wang and B. X. Wang (2009). "[P27(Kip1), cyclin E and endogenous TGF-beta1 changes in apoptosis of NB4 cells induced by As(2)O(3) and/or TGF-beta1 and their significance]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **17**(1): 74-79.

Lim, M. S., S. H. Nam, S. J. Kim, S. Y. Kang, Y. S. Lee and K. S. Kang (2007). "Signaling pathways of the early differentiation of neural stem cells by neurotrophin-3." Biochem Biophys Res Commun **357**(4): 903-909.

Lindholm, D., E. Castren, R. Kiefer, F. Zafra and H. Thoenen (1992). "Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation." J Cell Biol **117**(2): 395-400.

Link, J., M. Soderstrom, T. Olsson, B. Hojeberg, A. Ljungdahl and H. Link (1994). "Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis." Ann Neurol **36**(3): 379-386.

Liu, D., C. Caldji, S. Sharma, P. M. Plotsky and M. J. Meaney (2000). "Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus." J Neuroendocrinol **12**(1): 5-12.

Liu, R. H., D. J. Morassutti, S. R. Whittemore, J. S. Sosnowski and D. S. Magnuson (1999). "Electrophysiological properties of mitogen-expanded adult rat spinal cord and subventricular zone neural precursor cells." Exp Neurol **158**(1): 143-154.

Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2074-2077.

Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science **264**(5162): 1145-1148.

Lui, V. W. and J. R. Grandis (2002). "EGFR-mediated cell cycle regulation." Anticancer Res **22**(1A): 1-11.

Lukaszewicz, A., P. Savatier, V. Cortay, H. Kennedy and C. Dehay (2002). "Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells." J Neurosci **22**(15): 6610-6622.

Luo, J. and M. W. Miller (1999). "Transforming growth factor beta1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol." *J Neurochem* **72**(6): 2286-2293.

Luskin, M. B. (1993). "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone." *Neuron* **11**(1): 173-189.

Lutolf, S., F. Radtke, M. Aguet, U. Suter and V. Taylor (2002). "Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum." *Development* **129**(2): 373-385.

Ma, M., Y. Ma, X. Yi, R. Guo, W. Zhu, X. Fan, G. Xu, W. H. Frey, 2nd and X. Liu (2008). "Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone." *BMC Neurosci* **9**: 117.

Madsen, T. M., A. Treschow, J. Bengzon, T. G. Bolwig, O. Lindvall and A. Tingstrom (2000). "Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy." *Biol Psychiatry* **47**(12): 1043-1049.

Magavi, S. S., B. R. Leavitt and J. D. Macklis (2000). "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice." *Nature* **405**(6789): 951-955.

Maillard, I., T. Fang and W. S. Pear (2005). "Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway." *Annu Rev Immunol* **23**: 945-974.

Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(24): 9104-9110.

Markakis, E. A. and F. H. Gage (1999). "Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles." *J Comp Neurol* **406**: 449-460.

Martinez, G., M. L. Carnazza, C. Di Giacomo, V. Sorrenti and A. Vanella (2001). "Expression of bone morphogenetic protein-6 and transforming growth factor-beta1 in the rat brain after a mild and reversible ischemic damage." *Brain Res* **894**(1): 1-11.

Martinou, J. C., A. Le Van Thai, A. Valette and M. J. Weber (1990). "Transforming growth factor beta 1 is a potent survival factor for rat embryo motoneurons in culture." *Brain Res Dev Brain Res* **52**(1-2): 175-181.

Massague, J. (1990). "The transforming growth factor-beta family." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 597-641.

Massague, J. (1992). "Receptors for the TGF-beta family." *Cell* **69**(7): 1067-1070.

Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.

Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 169-178.

Massague, J., S. W. Blain and R. S. Lo (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." Cell **103**(2): 295-309.

Massague, J., S. W. Blain and R. S. Lo (2000a). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." Cell **103**(2): 295-309.

Massague, J. and Y. G. Chen (2000b). "Controlling TGF-beta signaling." Genes Dev **14**(6): 627-644.

Mathieu, P., A. P. Piantanida and F. Pitossi (2010). "Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis." Neuroimmunomodulation **17**(3): 200-201.

Matsushime, H., M. E. Ewen, D. K. Strom, J. Y. Kato, S. K. Hanks, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1992). "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins." Cell **71**(2): 323-334.

McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.

McKinnon, R. D., G. Piras, J. A. Ida, Jr. and M. Dubois-Dalcq (1993). "A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation." J Cell Biol **121**(6): 1397-1407.

Menezes, J. R., C. M. Smith, K. C. Nelson and M. B. Luskin (1995). "The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain." Mol Cell Neurosci **6**(6): 496-508.

Meyer, G., J. P. Schaaps, L. Moreau and A. M. Goffinet (2000). "Embryonic and early fetal development of the human neocortex." J Neurosci **20**(5): 1858-1868.

Meyerson, M. and E. Harlow (1994). "Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner." Mol Cell Biol **14**(3): 2077-2086.

Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-1782.

Miller, M. W. (2003). "Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol." J Comp Neurol **460**(3): 410-424.

Miller, M. W. and J. Luo (2002). "Effects of ethanol and transforming growth factor beta (TGF beta) on neuronal proliferation and nCAM expression." Alcohol Clin Exp Res **26**(8): 1281-1285.

Miller, M. W. and R. S. Nowakowski (1988). "Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system." Brain Res **457**(1): 44-52.

Misumi, S., T. S. Kim, C. G. Jung, T. Masuda, S. Urakawa, Y. Isobe, F. Furuyama, H. Nishino and H. Hida (2008). "Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor beta1." Eur J Neurosci **28**(6): 1049-1059.

Mittaud, P., G. Labourdette, H. Zingg and D. Guenot-Di Scala (2002). "Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes: involvement of TGF-beta and membrane components." Glia **37**(2): 169-177.

Mizumatsu, S., M. L. Monje, D. R. Morhardt, R. Rola, T. D. Palmer and J. R. Fike (2003). "Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation." Cancer Res **63**(14): 4021-4027.

Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, H. Narabayashi, P. Riederer and T. Nagatsu (1995). "Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease." Neurosci Lett **193**(2): 129-132.

Molleman, A. (2003). Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. Ltd, John Wiley & Sons.

Monje, M. L., S. Mizumatsu, J. R. Fike and T. D. Palmer (2002). "Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction." Nat Med **8**(9): 955-962.

Monje, M. L., H. Toda and T. D. Palmer (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis." Science **302**(5651): 1760-1765.

Montaron, M. F., K. G. Petry, J. J. Rodriguez, M. Marinelli, C. Aurousseau, G. Rougon, M. Le Moal and D. N. Abrous (1999). "Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus." Eur J Neurosci **11**(4): 1479-1485.

Moon, L. D. and J. W. Fawcett (2001). "Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2." Eur J Neurosci **14**(10): 1667-1677.

Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.

Morganti-Kossmann, M. C., T. Kossmann, M. E. Brandes, S. E. Mergenhagen and S. M. Wahl (1992). "Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta." J Neuroimmunol **39**(1-2): 163-173.

Morita, N., T. Takumi and H. Kiyama (1996). "Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration." Brain Res Mol Brain Res **42**(2): 263-271.

Morrison, S. J., S. E. Perez, Z. Qiao, J. M. Verdi, C. Hicks, G. Weinmaster and D. J. Anderson (2000). "Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells." Cell **101**(5): 499-510.

Moses, H. L., E. L. Branum, J. A. Proper and R. A. Robinson (1981). "Transforming growth factor production by chemically transformed cells." Cancer Res **41**(7): 2842-2848.

Mukherjee, P., S. L. Winter and M. G. Alexandrow (2010). "Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 near G1/S is mediated by acute abrogation of prereplication complex activation involving an Rb-MCM interaction." Mol Cell Biol **30**(3): 845-856.

Mulder, K. M. and S. L. Morris (1992). "Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells." J Biol Chem **267**(8): 5029-5031.

Murray, A. and T. Hunt (1993). The Cell Cycle - an introduction. New York, OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Nagahara, H., S. A. Ezhevsky, A. M. Vocero-Akbani, P. Kaldis, M. J. Solomon and S. F. Dowdy (1999). "Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E:cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14961-14966.

Nagao, T., M. Kuwagata and Y. Saito (1998). "Effects of prenatal exposure to 5-fluoro-2'-deoxyuridine on developing central nervous system and reproductive function in male offspring of mice." Teratog Carcinog Mutagen **18**(2): 73-92.

Nakamura, Y., S. Sakakibara, T. Miyata, M. Ogawa, T. Shimazaki, S. Weiss, R. Kageyama and H. Okano (2000). "The bHLH gene hes1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells." J Neurosci **20**(1): 283-293.

Nakao, A., M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J. L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N. E. Heldin, C. H. Heldin and P. ten Dijke (1997a). "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling." Nature **389**(6651): 631-635.

Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C. H. Heldin, K. Miyazono and P. ten Dijke (1997b). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." Embo J **16**(17): 5353-5362.

Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii and D. Y. Loh (1996). "Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors." Cell **85**(5): 707-720.

Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

Nicoletti, F., R. Di Marco, F. Patti, E. Reggio, A. Nicoletti, P. Zacccone, F. Stivala, P. L. Meroni and A. Reggio (1998). "Blood levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon-beta 1b (IFN-beta1b)." Clin Exp Immunol **113**(1): 96-99.

Nieto, M., C. Schuurmans, O. Britz and F. Guillemot (2001). "Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors." Neuron **29**(2): 401-413.

Niimi, H., K. Pardali, M. Vanlandewijck, C. H. Heldin and A. Moustakas (2007). "Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF-beta." J Cell Biol **176**(5): 695-707.

Nilsson, M., E. Perfilieva, U. Johansson, O. Orwar and P. S. Eriksson (1999). "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory." J Neurobiol **39**(4): 569-578.

Nishino, H., H. Hida, N. Takei, M. Kumazaki, K. Nakajima and H. Baba (2000). "Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum." Exp Neurol **164**(1): 209-214.

Novakova, Z., S. Hubackova, M. Kosar, L. Janderova-Rossmeislova, J. Dobrovolna, P. Vasicova, M. Vancurova, Z. Horejsi, P. Hozak, J. Bartek and Z. Hodny (2010). "Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence." Oncogene **29**(2): 273-284.

Nowakowski, R. S., S. B. Lewin and M. W. Miller (1989). "Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population." J Neurocytol **18**(3): 311-318.

Numberger, M. and A. Draguhn (1996). Patch Clamp Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag

Nunes, M. C., N. S. Roy, H. M. Keyoung, R. R. Goodman, G. McKhann, 2nd, L. Jiang, J. Kang, M. Nedergaard and S. A. Goldman (2003). "Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain." Nat Med **9**(4): 439-447.

Nyfeler, Y., R. D. Kirch, N. Mantei, D. P. Leone, F. Radtke, U. Suter and V. Taylor (2005). "Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal." EMBO J **24**(19): 3504-3515.

Oberhammer, F. A., M. Pavelka, S. Sharma, R. Tiefenbacher, A. F. Purchio, W. Bursch and R. Schulte-Hermann (1992). "Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5408-5412.

Ohnuma, S. and W. A. Harris (2003). "Neurogenesis and the cell cycle." Neuron **40**(2): 199-208.

Ohnuma, S., A. Philpott and W. A. Harris (2001). "Cell cycle and cell fate in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **11**(1): 66-73.

Ohta, M., J. S. Greenberger, P. Anklesaria, A. Bassols and J. Massague (1987). "Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells." Nature **329**(6139): 539-541.

Okuyama, N., N. Takagi, T. Kawai, K. Miyake-Takagi and S. Takeo (2004). "Phosphorylation of extracellular-regulating kinase in NMDA receptor antagonist-induced newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus." J Neurochem **88**(3): 717-725.

Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." Annu Rev Neurosci **14**: 453-501.

Packard, D. S., Jr., R. A. Menzies and R. G. Skalko (1973). "Incorportaiton of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse." *Differentiation* **1**(6): 397-404.

Palmer, T. D., E. A. Markakis, A. R. Willhoite, F. Safar and F. H. Gage (1999). "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS." *J Neurosci* **19**(19): 8487-8497.

Palmer, T. D., J. Ray and F. H. Gage (1995). "FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain." *Mol Cell Neurosci* **6**(5): 474-486.

Palmer, T. D., J. Takahashi and F. H. Gage (1997). "The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells." *Mol Cell Neurosci* **8**(6): 389-404.

Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4): 1286-1290.

Parent, J. M., E. Tada, J. R. Fike and D. H. Lowenstein (1999). "Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat." *J Neurosci* **19**(11): 4508-4519.

Parent, J. M., V. V. Valentin and D. H. Lowenstein (2002). "Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway." *J Neurosci* **22**(8): 3174-3188.

Parent, J. M., T. W. Yu, R. T. Leibowitz, D. H. Geschwind, R. S. Sloviter and D. H. Lowenstein (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* **17**(10): 3727-3738.

Park, D. S., E. J. Morris, L. A. Greene and H. M. Geller (1997). "G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis." *J Neurosci* **17**(4): 1256-1270.

Park, H. C., J. Boyce, J. Shin and B. Appel (2005). "Oligodendrocyte specification in zebrafish requires notch-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor function." *J Neurosci* **25**(29): 6836-6844.

Parks, A. L., S. S. Huppert and M. A. Muskavitch (1997). "The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*." *Mech Dev* **63**(1): 61-74.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-183.

Pelton, R. W., B. Saxena, M. Jones, H. L. Moses and L. I. Gold (1991). "Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development." J Cell Biol **115**(4): 1091-1105.

Petrocca, F., R. Visone, M. R. Onelli, M. H. Shah, M. S. Nicoloso, I. de Martino, D. Iliopoulos, E. Pilozzi, C. G. Liu, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L. P. Ruco, G. Baldassarre, C. M. Croce and A. Vecchione (2008). "E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer." Cancer Cell **13**(3): 272-286.

Phuphanich, S. and V. A. Levin (1985). "Bioavailability of bromodeoxyuridine in dogs and toxicity in rats." Cancer Res **45**(5): 2387-2389.

Piccini, P., D. J. Brooks, A. Bjorklund, R. N. Gunn, P. M. Grasby, O. Rimoldi, P. Brundin, P. Hagell, S. Rehncrona, H. Widner and O. Lindvall (1999). "Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient." Nat Neurosci **2**(12): 1137-1140.

Pietenpol, J. A., J. T. Holt, R. W. Stein and H. L. Moses (1990a). "Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3758-3762.

Pietenpol, J. A., R. W. Stein, E. Moran, P. Yaciuk, R. Schlegel, R. M. Lyons, M. R. Pittelkow, K. Munger, P. M. Howley and H. L. Moses (1990b). "TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains." Cell **61**(5): 777-785.

Pines, J. and T. Hunter (1989). "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2." Cell **58**(5): 833-846.

Pollard, D. R., M. M. Baran and R. Bachvarova (1976). "The effect of 5-bromodeoxyuridine on cell division and differentiation of preimplantation mouse embryos." J Embryol Exp Morphol **35**(1): 169-178.

Ponchio, L., E. Conneally and C. Eaves (1995). "Quantitation of the quiescent fraction of long-term culture-initiating cells in normal human blood and marrow and the kinetics of their growth factor-stimulated entry into S-phase in vitro." Blood **86**(9): 3314-3321.

Poot, M., H. Hoehn, M. Kubbies, A. Grossmann, Y. Chen and P. S. Rabinovitch (1994). "Cell-cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoechst 33358-ethidium bromide bivariate flow cytometry." Methods Cell Biol **41**: 327-340.

Poulsen, K. T., M. P. Armanini, R. D. Klein, M. A. Hynes, H. S. Phillips and A. Rosenthal (1994). "TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons." Neuron **13**(5): 1245-1252.

Prehn, J. H., V. P. Bindokas, C. J. Marcuccilli, S. Krajewski, J. C. Reed and R. J. Miller (1994). "Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12599-12603.

Priller, J., A. Flugel, T. Wehner, M. Boentert, C. A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B. A. de Boer, M. Frotscher, G. W. Kreutzberg, D. A. Persons and U. Dirnagl (2001b). "Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment." Nat Med **7**(12): 1356-1361.

Priller, J., D. A. Persons, F. F. Klett, G. Kempermann, G. W. Kreutzberg and U. Dirnagl (2001a). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." J Cell Biol **155**(5): 733-738.

Raber, J., Y. Fan, Y. Matsumori, Z. Liu, P. R. Weinstein, J. R. Fike and J. Liu (2004). "Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits." Ann Neurol **55**(3): 381-389.

Rabinovitch, P. S. (1993). "Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis." Clinical Flow Cytometry **1st ed.**: 157-175.

Ramm, P., S. Couillard-Despres, S. Plotz, F. J. Rivera, M. Krampert, B. Lehner, W. Kremer, U. Bogdahn, H. R. Kalbitzer and L. Aigner (2009). "A nuclear magnetic resonance biomarker for neural progenitor cells: is it all neurogenesis?" Stem Cells **27**(2): 420-423.

Rao, M. S. and A. K. Shetty (2004). "Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus." Eur J Neurosci **19**(2): 234-246.

Rao, P. and T. Kadesch (2003). "The intracellular form of notch blocks transforming growth factor beta-mediated growth arrest in Mv1Lu epithelial cells." Mol Cell Biol **23**(18): 6694-6701.

Ray, J., D. A. Peterson, M. Schinstine and F. H. Gage (1993). "Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3602-3606.

Reissner, C., M. Klose, R. Fairless and M. Missler (2008). "Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15124-15129.

Reynisdottir, I., K. Polyak, A. Iavarone and J. Massague (1995). "Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta." Genes Dev **9**(15): 1831-1845.

Reynolds, B. A., W. Tetzlaff and S. Weiss (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-4574.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.

Rich, J. N., M. Zhang, M. B. Datto, D. D. Bigner and X. F. Wang (1999). "Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines." J Biol Chem **274**(49): 35053-35058.

Rimaniol, A. C., D. Lekieffre, A. Serrano, A. Masson, J. Benavides and F. Zavala (1995). "Biphasic transforming growth factor-beta production flanking the pro-inflammatory cytokine response in cerebral trauma." Neuroreport **7**(1): 133-136.

Rivera, F. J., S. Couillard-Despres, X. Pedre, S. Ploetz, M. Caioni, C. Lois, U. Bogdahn and L. Aigner (2006). "Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells." Stem Cells **24**(10): 2209-2219.

Roberts, A. B. (1998). "Molecular and cell biology of TGF-beta." Miner Electrolyte Metab **24**(2-3): 111-119.

Roberts, A. B., M. A. Anzano, L. C. Lamb, J. M. Smith and M. B. Sporn (1981). "New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5339-5343.

Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1990). The transforming growth factor betas. Peptide growth factors and their receptors. Handbook of experimental pharmacology.

Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1996). "Transformig growth factor- β ." The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair: 275-308.

Robson, C. N., V. Gnanapragasam, R. L. Byrne, A. T. Collins and D. E. Neal (1999). "Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium." J Endocrinol **160**(2): 257-266.

Rojas, A., M. Padidam, D. Cress and W. M. Grady (2009). "TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta." Biochim Biophys Acta **1793**(7): 1165-1173.

Rola, R., S. Otsuka, A. Obenhaus, G. A. Nelson, C. L. Limoli, S. R. VandenBerg and J. R. Fike (2004). "Indicators of hippocampal neurogenesis are altered by 56Fe-particle irradiation in a dose-dependent manner." Radiat Res **162**(4): 442-446.

Ross, H. H., L. H. Levkoff, G. P. Marshall, 2nd, M. Caldeira, D. A. Steindler, B. A. Reynolds and E. D. Laywell (2008). "Bromodeoxyuridine induces senescence in neural stem and progenitor cells." Stem Cells **26**(12): 3218-3227.

Roussa, E., L. M. Farkas and K. Kriegstein (2004). "TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8." Neurobiol Dis **16**(2): 300-310.

Roussa, E. and K. Kriegstein (2004). "Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta." Cell Tissue Res **318**(1): 23-33.

Roussa, E., M. Wiegle, N. Dunker, S. Becker-Katins, O. Oehlke and K. Kriegstein (2006). "Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon." Stem Cells **24**(9): 2120-2129.

Ruan, M., L. Pederson, E. W. Bradley, A. M. Bamberger and M. J. Oursler (2010). "Transforming growth factor-{beta} coordinately induces suppressor of cytokine signaling 3 and leukemia inhibitory factor to suppress osteoclast apoptosis." Endocrinology **151**(4): 1713-1722.

Ruzinova, M. B. and R. Benzeira (2003). "Id proteins in development, cell cycle and cancer." Trends Cell Biol **13**(8): 410-418.

Samanta, J. and J. A. Kessler (2004). "Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation." Development **131**(17): 4131-4142.

Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger and A. Alvarez-Buylla (2004). "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration." Nature **427**(6976): 740-744.

Sang, L., H. A. Coller and J. M. Roberts (2008). "Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1." Science **321**(5892): 1095-1100.

Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-809.

Sawamoto, K., A. Yamamoto, A. Kawaguchi, M. Yamaguchi, K. Mori, S. A. Goldman and H. Okano (2001). "Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters." J Neurosci Res **65**(3): 220-227.

Scandura, J. M., P. Boccuni, J. Massague and S. D. Nimer (2004). "Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15231-15236.

Scharfman, H. E., A. E. Sollas, R. E. Berger, J. H. Goodman and J. P. Pierce (2003). "Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures." Neuroscience **121**(4): 1017-1029.

Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger and R. Kopan (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." Nature **393**(6683): 382-386.

Seki, T. and Y. Arai (1993). "Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat." *J Neurosci* **13**(6): 2351-2358.

Seki, T. and Y. Arai (1995). "Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus." *Neuroreport* **6**(18): 2479-2482.

Seki, T. and Y. Arai (1999). "Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus." *J Comp Neurol* **410**(3): 503-513.

Semple-Rowland, S. L., A. Mahatme, P. G. Popovich, D. A. Green, G. Hassler, Jr., B. T. Stokes and W. J. Streit (1995). "Analysis of TGF-beta 1 gene expression in contused rat spinal cord using quantitative RT-PCR." *J Neurotrauma* **12**(6): 1003-1014.

Seoane, J., H. V. Le and J. Massague (2002). "Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage." *Nature* **419**(6908): 729-734.

Seoane, J., H. V. Le, L. Shen, S. A. Anderson and J. Massague (2004). "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation." *Cell* **117**(2): 211-223.

Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, L. Collado-Morente, B. S. McEwen and A. Alvarez-Buylla (2004). "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus." *J Comp Neurol* **478**(4): 359-378.

Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen and A. Alvarez-Buylla (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." *J Neurosci* **21**(18): 7153-7160.

Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* **113**(6): 685-700.

Shi, Y., Y. F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massague and N. P. Pavletich (1998). "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling." *Cell* **94**(5): 585-594.

Shihabuddin, L. S., J. Ray and F. H. Gage (1997). "FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord." *Exp Neurol* **148**(2): 577-586.

Shipley, G. D., M. R. Pittelkow, J. J. Wille, Jr., R. E. Scott and H. L. Moses (1986). "Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium." *Cancer Res* **46**(4 Pt 2): 2068-2071.

Sidman, R. L. and P. Rakic (1973). "Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review." *Brain Res* **62**(1): 1-35.

Siebzehnrübl, F. (2007). Therapeutic applicability of adult brain stem cells.

Siegenthaler, J. A. and M. W. Miller (2004). "Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol." Cereb Cortex **14**(7): 791-802.

Siegenthaler, J. A. and M. W. Miller (2005). "Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex." J Neurosci **25**(38): 8627-8636.

Smith, C. M. and M. B. Luskin (1998). "Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream." Dev Dyn **213**(2): 220-227.

Snyder, J. S., N. Kee and J. M. Wojtowicz (2001). "Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus." J Neurophysiol **85**(6): 2423-2431.

Souchelnytskyi, S., K. Tamaki, U. Engstrom, C. Wernstedt, P. ten Dijke and C. H. Heldin (1997). "Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **272**(44): 28107-28115.

Sousa Vde, O., J. C. Almeida, C. M. Eller and F. C. Gomes (2006). "Characterization of TGF-beta1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes." In Vitro Cell Dev Biol Anim **42**(7): 171-175.

Sousa Vde, O., L. Romao, V. M. Neto and F. C. Gomes (2004). "Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions." Eur J Neurosci **19**(7): 1721-1730.

Stanfield, B. B. and J. E. Trice (1988). "Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections." Exp Brain Res **72**(2): 399-406.

Steiner, B., G. Kronenberg, S. Jessberger, M. D. Brandt, K. Reuter and G. Kempermann (2004). "Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice." Glia **46**(1): 41-52.

Sternlicht, M. D., A. Lochter, C. J. Sympson, B. Huey, J. P. Rougier, J. W. Gray, D. Pinkel, M. J. Bissell and Z. Werb (1999). "The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis." Cell **98**(2): 137-146.

Stewart, R. R., T. Zigova and M. B. Luskin (1999). "Potassium currents in precursor cells isolated from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain." J Neurophysiol **81**(1): 95-102.

Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-5338.

Stump, G., A. Durrer, A. L. Klein, S. Lutolf, U. Suter and V. Taylor (2002). "Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain." Mech Dev **114**(1-2): 153-159.

Suhonen, J. O., D. A. Peterson, J. Ray and F. H. Gage (1996). "Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo." Nature **383**(6601): 624-627.

Sun, Y., M. Nadal-Vicens, S. Misono, M. Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan and M. E. Greenberg (2001). "Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms." Cell **104**(3): 365-376.

Suzumura, A., M. Sawada, H. Yamamoto and T. Marunouchi (1993). "Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro." J Immunol **151**(4): 2150-2158.

Takagi, Y., K. Nozaki, J. Takahashi, J. Yodoi, M. Ishikawa and N. Hashimoto (1999). "Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice." Brain Res **831**(1-2): 283-287.

Takasawa, K., K. Kitagawa, Y. Yagita, T. Sasaki, S. Tanaka, K. Matsushita, T. Ohstuki, T. Miyata, H. Okano, M. Hori and M. Matsumoto (2002). "Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats." J Cereb Blood Flow Metab **22**(3): 299-307.

Takizawa, T., T. Tada, K. Kitazawa, Y. Tanaka, K. Hongo, M. Kameko and K. I. Uemura (2001). "Inflammatory cytokine cascade released by leukocytes in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage." Neurol Res **23**(7): 724-730.

Tamatani, M., Y. H. Che, H. Matsuzaki, S. Ogawa, H. Okado, S. Miyake, T. Mizuno and M. Tohyama (1999). "Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF κ B activation in primary hippocampal neurons." J Biol Chem **274**(13): 8531-8538.

Tanapat, P., L. A. Galea and E. Gould (1998). "Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus." Int J Dev Neurosci **16**(3-4): 235-239.

Tanapat, P., N. B. Hastings, A. J. Reeves and E. Gould (1999). "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat." J Neurosci **19**(14): 5792-5801.

Tanapat, P., N. B. Hastings, T. A. Rydel, L. A. Galea and E. Gould (2001). "Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism." J Comp Neurol **437**(4): 496-504.

Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka and T. Honjo (2001). "Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate." Neuron **29**(1): 45-55.

Tarkowski, E., R. Issa, M. Sjogren, A. Wallin, K. Blennow, A. Tarkowski and P. Kumar (2002). "Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia." Neurobiol Aging **23**(2): 237-243.

Taupin, P. (2007). "BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation." Brain Res Rev **53**(1): 198-214.

Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." Nature **414**(6859): 112-117.

Tomoda, T., T. Shirasawa, Y. I. Yahagi, K. Ishii, H. Takagi, Y. Furiya, K. I. Arai, H. Mori and M. A. Muramatsu (1996). "Transforming growth factor-beta is a survival factor for neonate cortical neurons: coincident expression of type I receptors in developing cerebral cortices." Dev Biol **179**(1): 79-90.

Toyoshima, H. and T. Hunter (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." Cell **78**(1): 67-74.

Tropepe, V., B. L. Coles, B. J. Chiasson, D. J. Horsford, A. J. Elia, R. R. McInnes and D. van der Kooy (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." Science **287**(5460): 2032-2036.

Tvrdik, D. (2004). "The effect of TGFbeta1 on the expression and phosphorylation of key cell-cycle regulators in malignant B cells." Med Sci Monit **10**(12): BR447-454.

Unsicker, K., K. C. Flanders, D. S. Cissel, R. Lafyatis and M. B. Sporn (1991). "Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system." Neuroscience **44**(3): 613-625.

Unsicker, K. and K. Kriegstein (2002). "TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival." Adv Exp Med Biol **513**: 353-374.

Unsicker, K. and J. Strelau (2000). "Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence." Eur J Biochem **267**(24): 6972-6975.

van der Wal, E. A., F. Gomez-Pinilla and C. W. Cotman (1993). "Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies." Neuroreport **4**(1): 69-72.

van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski and F. H. Gage (1999a). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13427-13431.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (1999b). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." Nature Neurosci **2**(3): 266-270.

Vawter, M. P., O. Dillon-Carter, W. W. Tourtellotte, P. Carvey and W. J. Freed (1996). "TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid." Exp Neurol **142**(2): 313-322.

Vernon, A. E., C. Devine and A. Philpott (2003). "The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in Xenopus." Development **130**(1): 85-92.

Vivien, D., M. Bernaudin, A. Buisson, D. Divoux, E. T. MacKenzie and A. Nouvelot (1998). "Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia." J Neurochem **70**(6): 2296-2304.

Vlachos, P., U. Nyman, N. Hajji and B. Joseph (2007). "The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway." Cell Death Differ **14**(8): 1497-1507.

Wachs, F. P., S. Couillard-Despres, M. Engelhardt, D. Wilhelm, S. Ploetz, M. Vroemen, J. Kaesbauer, G. Uyanik, J. Klucken, C. Karl, J. Tebbing, C. Svendsen, N. Weidner, H. G. Kuhn, J. Winkler and L. Aigner (2003). "High Efficacy of Clonal Growth and Expansion of Adult Neural Stem Cells." Lab Invest **83**(7): 949-962.

Wachs, F. P., B. Winner, S. Couillard-Despres, T. Schiller, R. Aigner, J. Winkler, U. Bogdahn and L. Aigner (2006). "Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis." J Neuropathol Exp Neurol **65**(4): 358-370.

Walker, T. L., T. Yasuda, D. J. Adams and P. F. Bartlett (2007). "The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells." J Neurosci **27**(14): 3734-3742.

Wang, D. D., D. D. Krueger and A. Bordey (2003). "Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ." J Neurophysiol **90**(4): 2291-2302.

Wang, S., A. D. Sdrulla, G. diSibio, G. Bush, D. Nofziger, C. Hicks, G. Weinmaster and B. A. Barres (1998). "Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation." Neuron **21**(1): 63-75.

Warner, B. J., S. W. Blain, J. Seoane and J. Massague (1999). "Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway." Mol Cell Biol **19**(9): 5913-5922.

Wiessner, C., J. Gehrmann, D. Lindholm, R. Topper, G. W. Kreutzberg and K. A. Hossmann (1993). "Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia." Acta Neuropathol (Berl) **86**(5): 439-446.

Wolfraim, L. A., T. M. Walz, Z. James, T. Fernandez and J. J. Letterio (2004). "p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness." J Immunol **173**(5): 3093-3102.

Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura and J. Massague (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature **370**(6488): 341-347.

Wu, W., K. Wong, J. Chen, Z. Jiang, S. Dupuis, J. Y. Wu and Y. Rao (1999). "Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit." Nature **400**(6742): 331-336.

Wu, Y., Y. Liu, E. M. Levine and M. S. Rao (2003). "Hes1 but not Hes5 regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors." Dev Dyn **226**(4): 675-689.

Wyss-Coray, T., L. Feng, E. Masliah, M. D. Ruppe, H. S. Lee, S. M. Toggas, E. M. Rockenstein and L. Mucke (1995). "Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1." Am J Pathol **147**(1): 53-67.

Wyss-Coray, T., C. Lin, D. A. Sanan, L. Mucke and E. Masliah (2000). "Chronic overproduction of transforming growth factor-beta1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration in transgenic mice." Am J Pathol **156**(1): 139-150.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-1331.

Yagi, K., M. Furuhashi, H. Aoki, D. Goto, H. Kuwano, K. Sugamura, K. Miyazono and M. Kato (2002). "c-myc is a downstream target of the Smad pathway." J Biol Chem **277**(1): 854-861.

Yoshikawa, K. (2000). "Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons." Neurosci Res **37**(1): 1-14.

Young, D., P. A. Lawlor, P. Leone, M. Dragunow and M. J. During (1999). "Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective." Nat Med **5**(4): 448-453.

Yuan, Y., H. Shen, D. S. Franklin, D. T. Scadden and T. Cheng (2004). "In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C." Nat Cell Biol **6**(5): 436-442.

Yue, J. and K. M. Mulder (2000). "Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway." J Biol Chem **275**(45): 35656.

Zavadil, J., L. Cermak, N. Soto-Nieves and E. P. Bottinger (2004). "Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition." Embo J **23**(5): 1155-1165.

Zentella, A. and J. Massague (1992). "Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5176-5180.

Zhang, J. M., R. Hoffmann and M. Sieber-Blum (1997). "Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF-beta1." Dev Dyn **208**(3): 375-386.

Zhang, S., M. Ekman, N. Thakur, S. Bu, P. Davoodpour, S. Grimsby, S. Tagami, C. H. Heldin and M. Landstrom (2006). "TGFbeta1-induced activation of ATM and p53 mediates apoptosis in a Smad7-dependent manner." Cell Cycle **5**(23): 2787-2795.

Zhu, Y., B. Ahlemeyer, E. Bauerbach and J. Kriegstein (2001). "TGF-beta1 inhibits caspase-3 activation and neuronal apoptosis in rat hippocampal cultures." Neurochem Int **38**(3): 227-235.

Zhu, Y., C. Culmsee, S. Klumpp and J. Kriegstein (2004). "Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways." Neuroscience **123**(4): 897-906.

Zhu, Y., S. Roth-Eichhorn, N. Braun, C. Culmsee, A. Rami and J. Kriegstein (2000). "The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat." Brain Res **866**(1-2): 286-298.

Zhu, Y., G. Y. Yang, B. Ahlemeyer, L. Pang, X. M. Che, C. Culmsee, S. Klumpp and J. Kriegstein (2002). "Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage." J Neurosci **22**(10): 3898-3909.

Zigova, T., V. Pencea, S. J. Wiegand and M. B. Luskin (1998). "Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb." Mol Cell Neurosci **11**(4): 234-245.

Eigene Publikationen

Aus den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit sind die folgenden Publikationen hervorgegangen:

Ramm, P., S. Couillard-Despres, S. Plotz, F. J. Rivera, M. Krampert, **B. Lehner**, W. Kremer, U. Bogdahn, H. R. Kalbitzer and L. Aigner (2009). "A nuclear magnetic resonance biomarker for neural progenitor cells: is it all neurogenesis?" Stem Cells **27**(2): 420-423.

Wagner, K., S. Couillard-Despres, **B. Lehner**, G. Brockhoff, F. J. Rivera, A. Blume, I. Neumann and L. Aigner (2009). "Prolactin induces MAPK signaling in neural progenitors without alleviating glucocorticoid-induced inhibition of in vitro neurogenesis." Cell Physiol Biochem **24**(5-6): 397-406.

Kandasamy, M., S. Couillard-Despres, K. A. Raber, M. Stephan, **B. Lehner**, B. Winner, Z. Kohl, F. J. Rivera, H. P. Nguyen, O. Riess, U. Bogdahn, J. Winkler, S. von Horsten and L. Aigner (2010). "Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease." J Neuropathol Exp Neurol **69**(7): 717-728.

Steffenhagen, C., S. Kraus, F. X. Dechant, M. Kandasamy, **B. Lehner**, A. M. Poehler, T. Furtner, F. A. Siebzehnrubl, S. Couillard-Despres, O. Strauss, L. Aigner and F. J. Rivera (2011). "Identity, Fate and Potential of Cells Grown as Neurospheres: Species Matters." Stem Cell Rev 2011 Mar 24. [Epub ahead of print]

Lehner, B., B. Sandner, C. Lehner, S. Couillard-Despres, F. J. Rivera, G. Brockhoff, H. C. Bauer, N. Weidner and L. Aigner. "The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival." *Submitted to Cell and Tissue Research.*

Kandasamy, M.^{*}, **B. Lehner**^{*}, O. Strauss, S. Kraus, F. J. Rivera, J. Winkler, U. Bogdahn, U. Ueberham, S. Couillard-Despres and L. Aigner. "TGF-beta signaling in the adult neural stem cell niche: a decision on stem cell quiescence and neuronal differentiation." *In preparation,*
^{*}equal contribution.

Danksagung

Von Herzen danke ich...

- Prof. Dr. rer. nat. Ludwig Aigner für das nötige Vertrauen, mich als Neuling im Bereich der Neurowissenschaften Schritt für Schritt in die Materie einzuarbeiten und die Bereitschaft, mich von seinem reichhaltigen Erfahrungsschatz profitieren zu lassen. Er hat ein großes, neurowissenschaftliches Interesse in mir geweckt, und mich in die wissenschaftliche Arbeits- und Denkweise eingeführt. Seine wertvollen Anregungen, gepaart mit neuen Ideen, und unentbehrlichen, richtungsweisenden Ratschlägen im Rahmen fachlicher Gespräche sowie seine Anleitung in experimentellen Arbeiten waren mir eine große Hilfe und gaben wichtige Impulse, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere, lieber Ludwig, möchte ich dir danken, für dein fortwährendes Interesse an meiner Dissertation nach deinem Fortgang von Regensburg, trotz der räumlichen Distanz. Wohl wissend, dass der Aufbau deines neuen Labors an der PMU Salzburg sehr zeitintensiv war, weiss ich dies umso mehr zu schätzen.
- Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm für seine Offenheit, die Übernahme der Begutachtung sowie die Bereitschaft, diese Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin, zu vertreten.
- Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn für die Möglichkeit, meine Forschungsarbeiten in den Laboren der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg durchführen zu können.
- Dr. rer. nat. Sébastien Couillard-Després für seine konstruktiven Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft und Dr. rer. nat. Francisco Rivera für sein offenes Ohr, die Unterstützung bei allerlei Fragen zur Fluoreszenzmikroskopie sowie seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion.
- Dr. rer. nat. Dietrich Trümbach am Institut für Entwicklungsgenetik des Helmholtz Zentrums München für die hervorragende Unterstützung bei der statistischen Auswertung der DNA-Array-Genexpressionsanalyse. Er war überaus bemüht, mich in die - mir zunächst undurchschaubar erscheinenden - Geheimnisse der Bioinformatik einzuführen und leistete durch seine exzellente Expertise einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Ein riesiges DANKE SCHÖN!!!

- Sabrina Kraus, die unter Anleitung von Prof. Dr. Olaf Strauß die elektrophysiologischen Vermessungen aNSZ-Kulturen am Institut für Experimentelle Ophthalmologie der Universitätsklinik Regensburg durchführte. Sie wurde nicht müde, mir diesbezüglich sämtliche Fragen zu beantworten. HERZLICHEN DANK!
- Paul Ramm am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg für die engagierte Zusammenarbeit in Bezug auf die Erstellung und Auswertung der NMR-Spektren.
- Mag. Dr. Christine Lehner am Institut für Organismische Biologie der Universität Salzburg für die erfolgreiche wissenschaftliche Kooperation im Hinblick auf die Durchführung der Zymografien.
- Dipl.-Biol. Beatrice Sandner, meiner Mitstreiterin auf dem steinigen Weg der Promotion, für die Durchführung der Transplantationsexperimente, zahlreiche wertvolle Diskussionen und gemeinsame Pausen, aber auch so manchen schönen Abend.
- PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg für seine jederzeit offene Tür und die Einführung in die Kunst der Durchflusszytometrie. Er war ein überaus kompetenter Ratgeber, der mir die Anwendungsmöglichkeiten der FACS-Analyse näherbrachte und mir bei zahlreichen, für mich relevanten Fragestellungen weiterhalf.
- Dipl.-Chem. Katrin Stadler, nach Sonja Plötz der Frau im Labor, die auf sämtliche Fragen - ob methodischer oder organisatorischer Art - eine Antwort wusste und der ich schon seit unserer gemeinsamen Studienzeit in tiefer Freundschaft verbunden bin. Du hast so manchen (grauen) Laboralltag versüßt!
- allen übrigen Mitarbeitern des Labors für die angenehme Arbeitsatmosphäre: Mahesh Kandasamy, Katrin Wagner, Carolin Steffenhagen und Kiran Pawar. Nicht zu vergessen auch die ehemaligen Kollegen Jochen Klucken, Sonja Plötz, Robert Aigner und Massimiliano Caioni sowie die Medizindoktoranden.
- meinen Eltern, ohne deren vielfältige Unterstützung diese Arbeit nicht zustandegekommen wäre, und nicht zuletzt meinem Freund Georg, der mir großes Verständnis entgegenbrachte und dessen Rückhalt mir immer sehr viel Kraft gegeben hat.