

# **Einfluss von Signalbotenstoffen auf das Wachstum und die Differenzierung muriner neuraler Stammzellen**

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Jennifer Mag Wellen**  
aus Essen

Düsseldorf, Januar 2011

Angefertigt am Institut für Neurologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. Sebastian Jander  
Koreferent: Frau Prof. Dr. Christine Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2011

Die Promotionszeit ist erfahrungsgemäß langwierig und stressig. Aber durch nette Menschen, die einen Wissenschaftler in dieser Zeit begleiten, wird sie zu einem fast angenehmen Abenteuer!

# Danke

**Prof. Dr. Sebastian Jander**

Sie haben sich freundlicherweise für die Begutachtung meiner Dissertation zur Verfügung gestellt.

**Prof. Dr. Christine Rose**

Für Ihre Begutachtung meiner Dissertation und einen persönlichen Rat Ihrerseits, den ich mir sehr zu Herzen genommen habe.

**Prof. Dr. Jürgen K. Mai**

Sie haben mich erst zur Arbeit inspiriert und mir dafür die ganze Zeit über den Rücken freigehalten, obwohl das Thema CD15 eindeutig zu kurz kam.

**PD Dr. Marcel Dihnè**

Für deine kompetente, wissenschaftliche Betreuung im Stammzellbereich, die Chance promovieren zu können und die Korrektur meiner Arbeit.

**Christine Holland**

Ohne dich hätte ich noch öfter viel länger im Labor pipettieren müssen.

**Sebastian Illes**

Du hast mir deine Zellen anvertraut und mir oft wertvolle Tipps gegeben.

**Ralf Fassbender**

Du hast mich regelmäßig aus den tiefsten Tiefen wieder herausgeholt und mich aufgebaut.

**Sonja Dittmer, Nadine Henke und Stefanie Liedtke**

Mädels ich liebe euch und was lange währt wird endlich gut!

**Janine Walter**

Du wirst meine Arbeit thematisch fortsetzen und meine Ergebnisse ergänzen.

**Gabriele und Jürgen Owinski**

Liebe Ellis, danke für eure finanzielle und seelische Unterstützung.

**Oliver Braukmann**

Schatz, ich liebe dich und hoffe das Drama hat jetzt endlich ein Ende.

**Liara Julietta Sophia Braukmann**

Danke, dass du so ein unkompliziertes Kind bist. Mama hat dich lieb.

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Stammzellen, der heilige Gral der Biomedizin.....	1
1.1.1 Embryonale Stammzellen.....	2
1.1.2 Fetale Progenitor-Zellen.....	4
1.1.2.1 Fetale Progenitor-Zellen des zentralen Nervensystems .....	4
1.1.2.1 A Fetale neurale Progenitor-Zellen <i>in vivo</i> .....	4
1.1.2.1 B Fetale neurale Progenitor-Zellen <i>in vitro</i> .....	5
1.1.2.1 C Kultivierung fetaler neuraler Progenitor-Zellen <i>in vitro</i> ...8	8
1.1.3 Adulte Progenitor-Zellen.....	10
1.1.3.1 A Adulte neurale Progenitor-Zellen <i>in vivo</i> .....	10
1.1.3.1 B Adulte neurale Progenitor-Zellen <i>in vitro</i> .....	16
1.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	16
1.1.5 Einsatz neuraler Progenitor-Zellen <i>in vivo</i> .....	18
1.2 Signalbotenstoffe.....	20
1.2.1 Beschreibung und Einteilung der Zytokine.....	20
1.2.1 A Die Lymphokine.....	20
1.2.1 B Tumor-Nekrose Faktoren.....	20
1.2.1 C Koloniestimulierende Faktoren.....	20
1.2.1 D Transformierende Wachstumsfaktoren.....	20
1.2.2 IFN-induzierte Signaltransduktion.....	22
1.2.2 A Typ I Interferone.....	22
1.2.2 B Typ II Interferone.....	23
1.2.2 C Typ III Interferone.....	23
1.2.3 TNF-induzierte Signaltransduktion.....	25
1.2.4 Einsatz verschiedener Interferonen in der therapeutischen Behandlung.....	27
1.2.4 A Interferon- $\beta$ Therapie bei Multipler Sklerose.....	27
1.2.4 B Interferon- $\alpha$ Therapie bei Hepatitis B und C.....	28
1.2.4 C Interferon Therapie bei Krebs.....	28
1.3 Pathologie, Ätiologie und Diagnose der Multiplen Sklerose.....	30
<b>2. Aufgabenstellung und Zielsetzung</b>	<b>33</b>

---

<b>3. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
3.1 Verwendete Materialien.....	34
3.1.1 Chemikalien.....	34
3.1.2 Lösungen und Puffer.....	35
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.4 Geräte.....	36
3.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....	37
3.1.6 Antikörper.....	41
3.1.6. A Primärantikörper.....	41
3.1.6. B Sekundärantikörper.....	41
3.1.7 Kits.....	41
3.1.8 Programme.....	42
3.1.9 Primer.....	42
3.1.9. A RT-PCR Primer.....	42
3.1.9. B Q-PCR Primer.....	43
3.1.10 Versuchstiere.....	43
3.2. Angewandte Methoden.....	44
3.2.1 Präparation der murinen neuralen Stammzellen.....	44
3.2.2 Kultivieren und Passagieren der neuralen Stammzellen.....	44
3.2.3 Einfrieren von neuralen Stammzellen.....	45
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	45
3.2.5 Beschichtung der Zellkulturschalen und Glasplättchen.....	46
3.2.6 Behandlungsschema neuraler Stammzellen für die Experimente.....	46
3.2.7 MTT-Test.....	48
3.2.8 Zytotoxizitäts-Test.....	48
3.2.9 Immunzytochemie.....	49
3.2.10 RNA-Isolation aus Stammzellen.....	50
3.2.11 Umschreiben von messengerRNA in copyDNA.....	50
3.2.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	51
3.2.12. A Reverse Transkriptase-PCR.....	51
3.2.12. B Quantitative PCR (qPCR).....	52
3.2.13 Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.2.14 Klonieren der qPCR Produkte.....	54
3.2.14 A Ligation von Vektor und PCR-Produkt.....	54

3.2.14 B Transformation von chemokompetenten Bakterien durch Hitzeschock.....	54
3.2.14 C Aussähen der transformierten Bakterien.....	55
3.2.14 D Präparation der Plasmid-DNA.....	55
3.2.14 E Identifizierung positiver Kolonien.....	56
3.2.15 Statistische Auswertung.....	56
3.2.15 A MTT-Test.....	56
3.2.15 B Zytotoxizitäts-Test.....	56
3.2.15 C qPCR.....	56
3.2.15 D Längenbestimmung der Zellfortsätze .....	57
3.2.15 E Bestimmung der Zellanzahl.....	57
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>58</b>
4.1 Markerexpression undifferenzierter und differenzierter neuraler Stammzellen .....	58
4.2 Neurale Stammzellen exprimieren Zytokin-Rezeptoren .....	60
4.3 Signalbotenstoffe beeinflussen die Populationsgröße neuraler Stammzellen.....	62
4.4 IFN- $\gamma$ wirkt zytotoxisch auf neurale Stammzellen.....	65
4.5 Zytokine verändern die Genexpression neuraler Stammzellen.....	69
4.6 Morphologische Veränderungen neuraler Stammzellen durch Zytokine.....	72
4.6.1 IFN- $\beta$ beeinflusst die neuronale Differenzierung von neuralen Progenitor-Zellen.....	73
4.6.2 TNF- $\alpha$ beeinflusst weder die neuronale noch die gliale Differenzierung.....	77
4.6.3 IFN- $\gamma$ induziert die simultane Expression von GFAP und $\beta$ -tubulin III bei murinen neuralen Stammzellen .....	78
4.6.3.A IFN- $\gamma$ induziert GFAP und $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen bei ESC abgeleiteten neuralen Stammzellkulturen.....	82
4.6.3B Die durch IFN- $\gamma$ induzierten GFAP und $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen zeigen überwiegend astrozytäre Morphologie.....	85

<b>5. Diskussion</b>	<b>87</b>
5.1 Neurale Stammzellen exprimieren neuronale und gliale Marker	87
5.1.1 Undifferenzierte neuronale Stammzellen exprimieren Pax6, RC2 und Nestin	87
5.1.2 Differenzierte neuronale Stammzellen exprimieren PDGFR $\alpha$ , GFAP, $\beta$ -tubulin III und Map2	88
5.2 Fehlende Expression von TNF- $\alpha$ RII auf neuronalen Stammzellen	89
5.3 Einfluss der Zytokine auf die Populationsgröße und Zytotoxizität neuraler Stammzellen	91
5.3.1 Interferone hemmen die Proliferation und sind zytotoxisch	92
5.3.2 TNF- $\alpha$ zeigt sich sowohl neuroprotektiv als auch zytotoxisch	93
5.4 Veränderte Differenzierung von neuronalen Stammzellen unter dem Einfluss von Zytokinen	95
5.4.1 Genexpression Interferon behandelter Stammzellen	95
5.4.2 Genexpression TNF- $\alpha$ behandelter Stammzellen	96
5.5 Morphologische Veränderungen durch Zytokine	96
5.5.1 IFN- $\beta$ inhibiert die neuronale Reifung von neuronalen Stammzellen	97
5.5.2 TNF- $\alpha$ hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Stammzellen	98
5.5.3 IFN- $\gamma$ induziert nicht die neuronale Differenzierung, sondern die Bildung von GFAP und $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen	99
5.6 Asterons: mobilisierte Stammzellen für den Reparatur- und Selbstheilungs-Prozess des ZNS oder dysregulierte Zellen?	102
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>7. Summary</b>	<b>109</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AAF	Alpha aktivierter Faktor
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of variance</i> )
AP	Apoptotischer Signalweg (engl. <i>apoptotic pathway</i> )
AP	ausplattiert
B	Borat (Salz der Borsäure)
BCMA	B-Zell Reifungsantigen (engl. <i>B-cell maturation antigen</i> )
bFGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (engl. <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
BMP	Morphogenetisches Knochenprotein (engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BO	Bulbus olfactorius
Boehr. Ing.	Boehringer Ingelheim
bp	Basenpaare (engl. <i>basepairs</i> )
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
Btubb	β-tubulin
bzw.	beziehungsweise
CD	Oberflächen-Differenzierungsantigene (engl., <i>Cluster of Differentiation</i> )
cDNA	Abschrift der DNA (engl. <i>copy DNA</i> )
Cpn	Chlamydia pneumoniae
CT	Schwellenwert-Zyklus (engl. <i>Threshold Cycle</i> )
Cy3	Indocarbocyanin 3
d	Tage
DAB	Diaminobenzidin
Dcx	Doublecortin
Dapi	4,6-diaminido-2-phenylindole, dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure (engl. <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
dNTP	Deoxyribonukleotid triphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E	Entwicklungsstadium/Embryonalstadium
E.coli	Escherischia coli
EAE	Experimentell allergische Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus

<b>EDAR</b>	Ectodysplasin Rezeptor
<b>EDTA</b>	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>engl. epidermal growth factor</i> )
<b>ENK</b>	Enkephalin
<b>EP</b>	evozierte Potentiale
<b>ES</b>	Embryonale Stammzellen
<b>et al.</b>	und andere ( <i>lat. et alii</i> )
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>ETOH</b>	Ethanol
<b>F</b>	Vorwärts ( <i>engl. forward</i> )
<b>FADD</b>	FAS assoziierte Todesdomäne ( <i>engl. FAS-associated death domain</i> )
<b>FCS</b>	Foetales Kälberserum
<b>FGF-2 (synonym bFGF)</b>	fibroblast growth factor-2
<b>FITC</b>	Fluorescein-isothiocyanat
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminobuttersäure
<b>GAF</b>	Gamma aktivierter Faktor
<b>GAS</b>	Gamma aktivierter Promotor ( <i>engl. gamma activated sites</i> )
<b>G-CSF</b>	Granulozyten stimulierender Faktor ( <i>engl. granulocyte colony stimulating factor</i> )
<b>GD</b>	Gyrus dentatus
<b>GE</b>	Ganglionische Eminenz
<b>GFAP</b>	gliäres fibrilläres azides Protein
<b>GLAST</b>	Glutamat Transporter
<b>GM-CSF</b>	Granulocyten and Makrophagen stimulierender Faktor ( <i>engl. granulocyte and macrophage colony stimulating factor</i> )
<b>GS</b>	Glutamin Synthase
<b>gt</b>	Ziege ( <i>engl. Goat</i> )
<b>h</b>	Stunde
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HLA</b>	Humanes Leukozyten Antigen ( <i>engl. human Leukocyte antigen</i> )
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ifnar1</b>	Interferon alpha/beta Rezeptor 1
<b>Ifnar2</b>	Interferon alpha/beta Rezeptor 2
<b>Ifngr1</b>	Interferon gamma Rezeptor 1
<b>Ifngr2</b>	Interferon gamma Rezeptor 2
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Interferon beta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgG</b>	Immunglobulin Gamma
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iPS</b>	Induzierte pluripotente Stammzellen
<b>IRF</b>	Interferon Regulationsfaktor ( <i>engl. interferon regulatory factor</i> )

<b>ISGF</b>	Interferon stimulierter Genfaktor ( <i>engl. interferon stimulated gene factor</i> )
<b>ISRE</b>	Interferon stimuliertes Regulationselement ( <i>engl. interferon stimulated regulatory element</i> )
<b>Jak</b>	Janus Kinase
<b>JNK</b>	Jun N-terminale Kinase
<b>KLF4</b>	Krüpel-like factor 4
<b>LeX</b>	Lewis X Antigen
<b>IGE</b>	Laterale Ganglionische Eminenz
<b>Lsg</b>	Lösung
<b>M</b>	Molar
<b>MAG</b>	Myelin assoziiertes Glykoprotein
<b>Map2a-c</b>	Microtubulin assoziiertes protein 2a-c
<b>MBP</b>	Myelin basisches Protein
<b>MCAO</b>	Okklusion der Arteria cerebri media ( <i>engl. medial cerebral artery occlusion</i> )
<b>M-CSF</b>	Makrophagen stimulierender Faktor ( <i>eng. macrophage colony stimulating factor</i> )
<b>mg</b>	Milligramm
<b>mGE</b>	Mediale Ganglionische Eminenz
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MOG</b>	Myelinoligodendrozyten Glykoprotein
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonucleinsäure
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>ms</b>	Maus ( <i>engl. mouse</i> )
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>MxA</b>	Myxovirus Protein A
<b>NAb</b>	Neutralisierende Antikörper ( <i>engl. neutralising antibodies</i> )
<b>NeuN</b>	Neuronaler Nukleus ( <i>engl. Neuronal nuclei</i> )
<b>NEP</b>	Neuroepitheliale Progenitor-Zelle
<b>NFA</b>	Neurosphären formierendes Verfahren ( <i>engl. neurosphere forming assay</i> )
<b>NF</b>	Neurofilament
<b>NF-κB</b>	Nuklearer Faktor kappa B
<b>NG2</b>	Chondroitinsulfat Proteoglycan 2
<b>NGF</b>	Neuroprotektiver Wachstumsfaktor ( <i>engl. nerve growth factor</i> )
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NPC</b>	Neurale Progenitor-Zelle ( <i>engl. neural progenitor cell</i> )
<b>NSC</b>	Neurale Stammzelle ( <i>engl. neural stem cell</i> )
<b>NSE</b>	Neuron spezifische Enolase

<b>Oct3/4</b>	Octamer 4
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>Olig2</b>	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 ( <i>engl. oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i> )
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>OPZ/OPC</b>	Oligodendrozyten Progenitor-Zelle ( <i>engl. oligodendrocyte progenitor cell</i> )
<b>P</b>	Passage
<b>p21</b>	Protein 21
<b>p53</b>	Protein 53
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl. phosphat buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Endothelial sezernierter Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>engl. platelet derived growth factor Receptor alpha</i> )
<b>PDGF<math>\alpha</math></b>	Endothelial sezernierter Wachstumsfaktor ( <i>engl. Platelet derived growth factor alpha</i> )
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>ph</b>	Potentio Hydrogenii
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PLO</b>	Poly-L-ornithin
<b>PLP</b>	Proteolipid Protein
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>PSA-NCAM</b>	Neurales Zelladhäsionsmolekül ( <i>engl. polysialated Neural Cell Adhesion Molecule</i> )
<b>Q</b>	Quantitativ
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
<b>R</b>	Rückwärts ( <i>engl. Reverse</i> )
<b>rb</b>	Kaninchen ( <i>engl. rabbit</i> )
<b>RG</b>	Radiale Gliazelle
<b>RIP</b>	Rezeptor interagierendes Protein
<b>RMS</b>	Rostraler Migrationsweg ( <i>engl. Rostral migratory stream</i> )
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro min ( <i>engl. rounds per minute</i> )
<b>rRNA</b>	Ribosomale RNA
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
<b>S.O.C.</b>	Natrium-Chlorid Medium ( <i>engl. sodium chlorid medium</i> )
<b>SGZ</b>	Subgranuläre Zone
<b>Sh2</b>	Sulphydryl Bindungsstelle der Gruppe 2
<b>Shh</b>	Sonic Signalmolekül ( <i>engl. sonic hedgehoc</i> )

<b>SKP</b>	Hautstammzellen ( <i>engl. skin derived precursors</i> )
<b>SP</b>	Substanz P
<b>sog.</b>	So genannt
<b>Sox2</b>	sex-determining region box 2
<b>Stat</b>	Signalübermittelnde Transkriptionsfaktoren ( <i>engl. signal transducers and activators of transcription</i> )
<b>STD</b>	Standardabweichung
<b>SVZ</b>	Subventrikuläre Zone
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA Puffer
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TGF</b>	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>engl. transforming growth factor</i> )
<b>TN-C</b>	Tenascin C
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TNF-R</b>	TNF Rezeptor
<b>Tnfrs1a</b>	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie 1a
<b>Tnfrs1b</b>	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie 1b
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor alpha
<b>TRADD</b>	TNFR assoziierte Todesdomäne ( <i>engl. TNFR-associated death domain</i> )
<b>TRAF</b>	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
<b>Trail</b>	TNF ähnlicher Apoptose induzierender Ligand Rezeptor ( <i>engl., TNF-related apoptosis inducing ligand receptor</i> )
<b>TRAMP</b>	TNF-ähnlicher Rezeptor gekoppeltes Apoptose vermittelndes Protein ( <i>engl., TNF-like receptor apoptosis mediating protein</i> )
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Tyk</b>	Tyrosin Kinase
<b>ü.N.</b>	Über Nacht
<b>UE</b>	Untereinheit
<b>VF</b>	Verdünnungsfaktor
<b>VIM</b>	Vimentin
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Bezeichnung</b>	<b>Thema</b>	<b>Seite</b>
<b>Abb.1</b>	Morphologie der Blastozyste	-2-
<b>Abb.2</b>	Herkunft der ES Zellen	-3-
<b>Abb.3</b>	Neurosphären (NFA) in der Zellkultur	-6-
<b>Abb.4</b>	Neurogenese im Hippocampus	-11-
<b>Abb.5</b>	Rostral Migratory Stream	-12-
<b>Abb.6a</b>	Zytoarchitektur der humanen SVZ	-15-
<b>Abb.6b</b>	Zytoarchitektur der Nagetier SVZ	-16-
<b>Abb.7</b>	Jak/Stat Signaltransduktion durch Interferon	-24-
<b>Abb.8</b>	Signaltransduktion durch TNF- $\alpha\beta$	-26-
<b>Abb.9</b>	Charakterisierung neuraler Stammzellen aus der Ganglionischen Eminenz	-59-
<b>Abb.10</b>	Nachweis der Genexpression von Zytokin Rezeptoren	-60-
<b>Abb.11</b>	Immunzytochemischer Nachweis der TNF- $\alpha\beta$ Rezeptoren	-61-
<b>Abb.12</b>	Proliferationshemmung neuraler Stammzellen durch Zytokine	-64-
<b>Abb.13</b>	Zellfortsätze bei behandelten neuralen Stammzellen gefärbt mit $\beta$ -tubulin	-73-
<b>Abb.14</b>	Zellfortsätze bei behandelten neuralen Stammzellen gefärbt mit Map2a-c	-74-
<b>Abb.15</b>	Differenzierung von NeuN positiven Zellen unter Zytokin Einfluss	-75-
<b>Abb.16</b>	Gliale Differenzierung neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von Zytokinen	-76-
<b>Abb.17</b>	Immunzytochemische Doppelfärbung mit $\beta$ -tubulin und GFAP neuraler Stammzellen	-78-
<b>Abb.18</b>	GFAP und $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen induziert durch IFN- $\gamma$	-79-
<b>Abb.19</b>	GFAP und $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen induziert durch IFN- $\gamma$ nach 7d Differenzierung	-81-
<b>Abb.20</b>	ESC abgeleitete neurale doppelt positive Stammzellen	-83-
<b>Abb.21</b>	Morphologische Veränderung junger Stammzellen	-85-
<b>Abb.22</b>	Morphologische Veränderung älterer Stammzellen	-85-
<b>Abb.23</b>	Verschiedene Morphologien der GFAP $\beta$ -tubulin doppelt positiven Stammzellen	-86-

**III. Tabellenverzeichnis**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Thema</b>	<b>Seite</b>
<b>Tab.1</b>	Positiv und Negativ-Regulierende Faktoren der Neurogenese	-13-
<b>Tab.2</b>	Die wichtigsten Zytokine im Überblick	-21-
<b>Tab.3</b>	Einsatz von Interferonen bei Krebserkrankungen	-29-
<b>Tab.4</b>	Therapeutische Interferone und ihre Indikation	-29-
<b>Tab.5</b>	Syntheseprotokoll der cDNA	-51-
<b>Tab.6</b>	Amplifikationsprotokoll der RT-PCR	-52-
<b>Tab.7</b>	Amplifikationsprotokoll der qPCR	-53-

## IV. Diagrammverzeichnis

Bezeichnung	Thema	Seite
Diagramm 1a	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN- $\beta$ (24h)	-63-
Diagramm 1b	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN- $\beta$ (48h)	-63-
Diagramm 1c	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ (24h)	-63-
Diagramm 1d	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ (48h)	-63-
Diagramm 1e	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ (24h)	-63-
Diagramm 1f	Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ (48h)	-63-
Diagramm 2a	Zytotoxische Wirkung von IFN- $\beta$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (24h)	-67-
Diagramm 2b	Zytotoxische Wirkung von IFN- $\beta$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (48h)	-67-
Diagramm 2c	Zytotoxische Wirkung von IFN- $\gamma$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (24h)	-67-
Diagramm 2d	Zytotoxische Wirkung von IFN- $\gamma$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (48h)	-67-
Diagramm 2e	Zytotoxische Wirkung von TNF- $\alpha$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (24h)	-67-
Diagramm 2f	Zytotoxische Wirkung von TNF- $\alpha$ auf undifferenzierte neurale Stammzellen (48h)	-67-
Diagramm 2g	Zytotoxische Wirkung von Tunicamycin auf undifferenzierte neurale Stammzellen (24 und 48h)	-68-
Diagramm 3a	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\beta$ (24h undifferenziert)	-71-
Diagramm 3b	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\beta$ (7d differenziert)	-71-
Diagramm 3c	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ (24h undifferenziert)	-71-
Diagramm 3d	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ (7d differenziert)	-71-
Diagramm 3e	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ (24h undifferenziert)	-71-
Diagramm 3f	Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ (7d differenziert)	-71-
Diagramm 4	Länge der Zellfortsätze IFN- $\beta$ behandelter Stammzellen (7d differenziert)	-75-
Diagramm 5	Anzahl NeuN positiver Zellen bei IFN- $\beta$ behandelten Stammzellen (7d differenziert)	-75-
Diagramm 6	Auszählung der GFAP und $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen nach 24h (24h undifferenziert)	-80-

<b>Diagramm 7</b>	Genexpression ESC abgeleiteter neuraler Stammzellen kultiviert nach Conti et al., 2005 unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ (24h undifferenziert)	-84-
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

## 1. Einleitung

### 1. 1 Stammzellen, der heilige Gral der Biomedizin

Mit Entdeckung der Stammzellen offenbarte sich ein hochinteressantes Forschungsgebiet, von dem sich Wissenschaftler erhofften, Organe regenerieren und Krankheiten heilen zu können. Mittlerweile sind viele verschiedene Arten von Stamm- und Progenitor-Zellen entdeckt und diese genauer untersucht worden. Die Entwicklung der medizinischen Stammzelltherapie ist insbesondere in den letzten zehn Jahren schnell voran gegangen und wird bereits bei einigen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt.

Eine naive Zelle, welche die Fähigkeit besitzt sich selbst zu erneuern (Proliferieren) und in verschiedene andere Zelltypen auszureifen (Differenzierung) wird im Allgemeinen als Stammzelle bezeichnet. Bereits die befruchtete Eizelle (Zygote) stellt eine totipotente/omnipotente Stammzelle dar, aus der ein komplett neuer menschlicher Organismus und die extraembryonalen Gewebe für die Versorgung des Embryos entstehen können. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen, *engl embryonic stem cell*) sind nur noch pluripotent, d.h. sie können alle drei Keimblätter der Embryonalentwicklung bilden, alle Zellen der Keimbahn aber keine extraembryonalen Anteile. Multipotente Stammzellen, wie zum Beispiel die adulten Stammzellen, differenzieren unter physiologischen Bedingungen nur zu Zellen aus, die dem Gewebe aus denen sie ursprünglich entfernt wurden, angehören. Allerdings können sie aufgrund ihrer hohen genetischen Flexibilität in einer neuen Umgebung auch andere Zelltypen entwickeln. Blut-Stammzellen aus der Nabelschnur Ko-kultiviert mit neonatalen Ratten-Kardiomyozyten können zu Kardiomyozyten ähnlichen Zellen differenzieren (Gopinath et al., 2010).

In der Literatur werden neben den Stammzellen auch Progenitor-Zellen beschrieben, die häufig auch als determinierte Stammzellen bezeichnet werden. Progenitor-Zellen teilen sich asymmetrisch wiederum in eine Stamm- und eine Progenitor-Zelle, wie z.B. die Neuroepithelzellen in der ZNS-Entwicklung. Bei der symmetrischen Teilung der multipotenten Stammzellen entstehen aus einer Zelle zwei identische Tochterzellen, die im weiteren Verlauf zu Vorläufer- oder auch synonym Precursor-Zellen, differenzieren können. Neurale Stammzellen *in vivo* sind die Typ-B-Astrozyten der SVZ Region (*siehe Kapitel 1.1.3.1 A*). *In vitro* können isolierte fetale neurale Stammzellen durch die adhärente Kultivierung unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF gewonnen werden (*siehe Kapitel 1.1.2.1 B*).

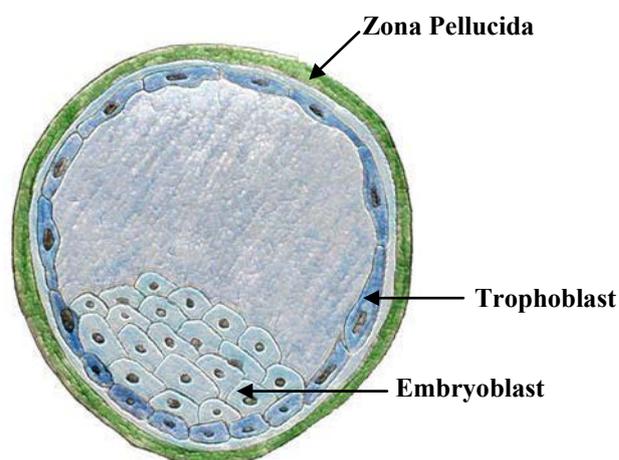
Precursor- oder Vorläufer-Zellen bezeichnen Zellen, die sich symmetrisch teilen aber bereits so weit vordifferenziert sind, dass sie nur noch in einen bestimmten Zelltyp differenzieren

können. Ein Beispiel für Vorläufer-Zellen sind die O2A-Zellen, die glialen Vorläuferzellen der Oligodendrozyten und Typ II Astrozyten, oder die Neuroblasten, die Vorläuferzellen verschiedener Neurone.

Da die Stammzellforschung sich derzeit sehr dynamisch entwickelt, ist die Nomenklatur in der Literatur nicht ganz synchron. Die Bezeichnung „Progenitorzelle“ wird gelegentlich auch synonym für *Stammzelle* verwendet, und wiederum in anderen Publikationen dagegen eng gefasst für die Vorläuferzellen des zum Beispiel blutbildenden Systems.

### 1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen für die Forschung werden aus dem Entwicklungsstadium der Blastozyste gewonnen. Auf dem Weg durch den Eileiter (Tuba uterina) in Richtung Gebärmutter (Uterus) muss die befruchtete Eizelle einige Veränderungen durchlaufen, bevor sie sich als so genannte Blastozyste in der Schleimhaut der Gebärmutter (Endometrium) einnisten kann. Sie teilt sich mehrfach und die Tochterzellen differenzieren in eine äußere Trophoblastenzellschicht und eine innere Zellmasse, dem Embryoblasten. Umgeben sind die Zellen von der Zona pellucida, einer Schutzhülle die kurz vor der Einnistung (Nidation) durch Enzyme zersetzt wird. Aus dem Trophoblasten entstehen in der Embryonalentwicklung Mutterkuchen (Plazenta) und Fruchthöhle (Amnion). Die Zellen des Embryoblasten entwickeln sich zum Embryo weiter (*siehe Abb. 1*) (Ulfig, *Kurzlehrbuch Embryologie*).

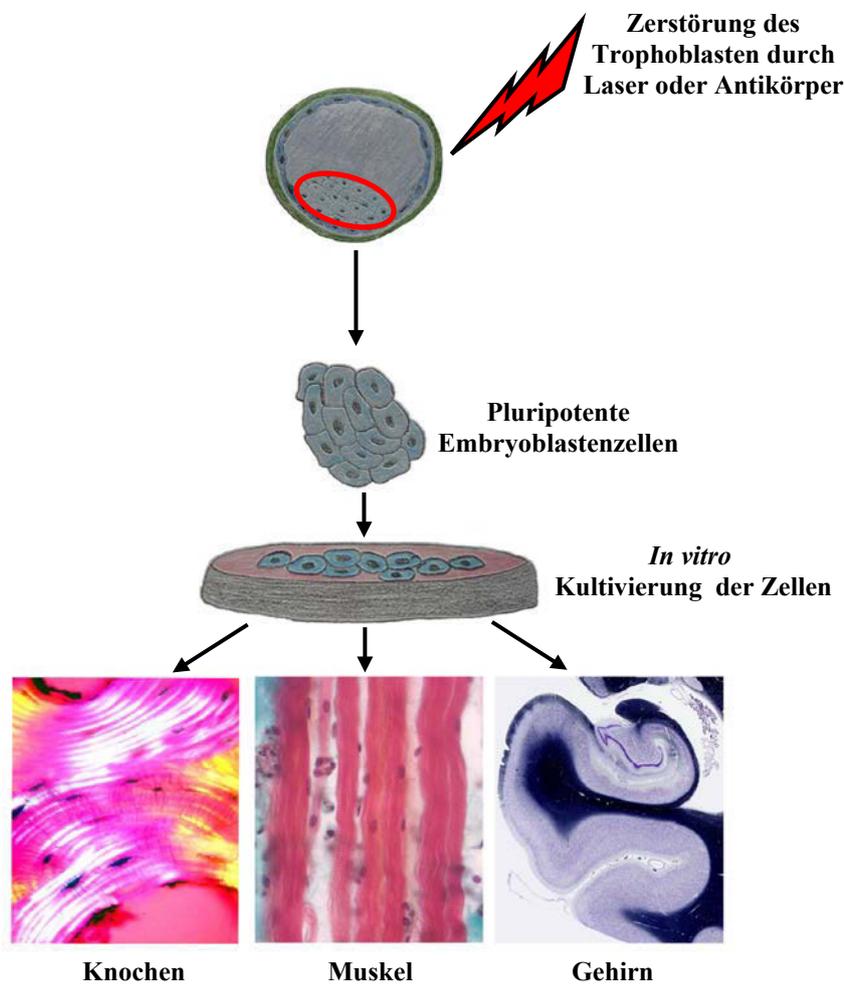


**Abb. 1: Morphologie der Blastozyste**

Der innere Embryoblast wird von den äußeren Trophoblastenzellen umschlossen. Die Zona Pellucida umgibt die ganze Blastozyste und bildet die Eihülle. Vor der Einnistung im Uterus wird die Eihülle durch Enzyme zersetzt. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

Für die Generierung der humanen und murinen embryonalen Stammzellen wird im Stadium der Blastozyste der Trophoblast durch Antikörper oder Laser gezielt zerstört und die

pluripotenten Zellen des Embryoblasten in einem speziellen Nährmedium in Kultur genommen (siehe Abb. 2). Die Verwendung der menschlichen Blastozyste stellt die Stammzellforschung allerdings vor eine ethische Kontroverse. Die Blastozyste wird als früher Embryo bezeichnet und fällt somit als menschliches Wesen unter den Würeschutz des Grundgesetzes (Günther, Hans-Ludwig 2008). Insbesondere die katholische Kirche sieht auch frühe Embryonen als Menschen an, denen die Rechte des Grundgesetzes zustehen. Aus diesem Grund werden oft tierische Stammzell-Modelle verwendet, deren Ergebnisse jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Ebenfalls ist der Einsatz tierischer Stammzellen in der klinischen Anwendung nicht akzeptabel.



**Abb. 2: Herkunft der ES-Zellen**

Im Stadium der Blastozyste wird durch Antikörper/Laser die Schicht des Trophoblasten zerstört und die Zellen des Embryoblasten in Kultur genommen. Durch die Differenzierung mittels spezieller Faktoren können Gewebe wie Knochen, Muskel und Gehirn gewonnen werden. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

Bedingt durch die Pluripotenz der Zellen zeigte sich ein weiteres Problem. Bei Transplantationen entstanden an den Injektionsstellen vereinzelt tumorartige Veränderungen

in Form von Keimzelltumoren (Teratome), die alle drei Anteile der Keimblätter bilden konnten. Dazu zeigte sich eine Ausbildung von diffusen Geweben die Haare, Zähne oder andere Gewebe enthielten (Yanai et al., 1995; Brüstle et al., 1997; Wakitani et al., 2003). Zusätzlich ergaben sich häufig Gewebeunverträglichkeiten ähnlich wie sie bei der Transplantation von Organen auftreten können. Jedes Gewebe ist individualspezifisch und durch verschiedene humane Leukozyten Antigene (HLA-Antigene) charakterisiert, die das Immunsystem für die Erkennung von körpereigenen und körperfremden braucht. Wird ein Transplantat als fremd erkannt, so bekämpft das Immunsystem dieses Gewebe und stößt es ab. Nur durch die medikamentöse Suppression des Immunsystems und eine nahezu identische HLA-Typisierung der Gewebe kann solch eine Reaktion verhindert werden. Dies ist bei Transplantation von Organen oder Knochenmarksspenden ein obligatorischer Prozess. Bei der Transplantation von embryonalen Stammzellen ist die HLA-Typisierung nicht möglich, da die Zellen erst in reiferen Stadien alle HLA-Antigene exprimieren.

### **1.1.2 Fetale Progenitor-Zellen**

Eine mögliche Alternative stellen neben den ES-Zellen die fetalen Progenitor-Zellen dar. Einige Gewebe verfügen über ein Reservoir an multipotenten, gewebsspezifisch vordifferenzierten Progenitor-Zellen. Sie können sich teilen und in weitere Gewebszellen weiterentwickeln. Dies ist insbesondere bei Geweben wichtig, die einer ständigen Erneuerung unterliegen wie z.B. Haut, Darmepithel und Blutzellen. Solche Gewebe können entfernt, die jeweiligen Progenitor-Zellen isoliert und im ausgereiften Stadium wieder transplantiert werden. Insbesondere in den späten Stadien der Embryonalentwicklung können diese multipotenten Progenitor-Zellen leicht isoliert und kultiviert werden.

#### **1.1.2.1 Fetale Progenitor-Zellen des zentralen Nervensystems**

##### **1.1.2.1 A Fetale neurale Progenitor-Zellen *in vivo***

Neurogenese bezeichnet allgemein den Prozess der Nervenzellbildung. Sie beginnt bereits ab dem Zeitpunkt der Neurulation in der Embryonalentwicklung und beinhaltet die Bildung neuer Nervenzellen, sowie die Ausdifferenzierung des peripheren und zentralen Nervensystems.

Während der Neurulation stülpt sich das, aus dem Oberflächenektoderm entstandene, Neuroektoderm u-förmig nach innen ein. Es entstehen dabei die so genannten Neuralwülste, die miteinander verschmelzen, so dass es zur Ausbildung eines Neuralrohres kommt. Das Neuralrohr setzt sich vom Oberflächenektoderm ab und wird später tiefer in den Embryo

verlagert. Aus dem Neuralrohr entsteht in der Entwicklung das zentrale Nervensystem (ZNS). Einige Zellen des Neuralrohres lösen sich aus dem Verband und wandern in die Peripherie aus. Diese Zellen werden auch als Neuralleistenzellen bezeichnet. Sie entwickeln sich zum peripheren Nervensystem, kurz PNS. (Ulfig, *Kurzlehrbuch Embryologie*)

Die Zellen des Neuralrohres werden auch als Neuroepithelzellen (NEP) bezeichnet. Sie bilden zu Beginn der Neurogenese keine Nervenzellen, sind aber Stammzellen im herkömmlichen Sinne, da sie sich zur Proliferation vorerst nur symmetrisch teilen. Neuroepithelzellen exprimieren vor allem den Stammzellmarker Prominin-1 (Oberflächen-Differenzierungsantigen 133, CD133) ein Transmembranprotein und paired-box Gen 6 (Pax-6), das einen Transkriptionsfaktor codiert, welcher wiederum durch das Signalmolekül Sonic hedgehog (Shh) kontrolliert wird (Ericson et al., 1997).

Später setzen asymmetrische Zellteilungen ein, wobei in den frühen Stadien der Neurogenese eine Tochterzelle im Neuroepithel verbleibt, während die andere als primäre Progenitor-Zelle in den zerebralen Cortex wandert, wo sie zu einem Neuron differenziert (Sidman und Rakic, 1973). Zu einem späteren Zeitpunkt (ca. E13-E15 bei der Mausentwicklung) entwickeln sich aus den Neuroepithelzellen morphologisch langgestreckte, sekundäre Progenitor-Zellen, die als radiale Gliazellen (RG) bezeichnet werden. Früher wurden sie lediglich als Stützzellen für die Nervenzellwanderung angesehen. Heutzutage ist aus Markierungsexperimenten bekannt, dass aus ihnen ebenfalls Nervenzellen entstehen können (Malatesta et al., 2000). Radiale Gliazellen exprimieren Marker wie Glutamat Transporter (GLAST), S100 $\beta$ , Glutamin Synthase (GS), Vimentin (VIM), Tenascin-C (TN-C) und in einigen Fällen auch GFAP (Mori 2005). Nach abgeschlossener Neurogenese können die radialen Gliazellen sich zu Astrozyten ausbilden (Voigt, 1989), weshalb sie ursprünglich als gliale Vorläuferzellen betrachtet wurden (Cameron und Rakic, 1991).

#### **1.1.2.1 B Fetale neurale Progenitor-Zellen *in vitro***

Die Ganglionische Eminenz (GE) stellt in der ZNS Entwicklung von Mensch und Maus eine Vorläuferstruktur für später entstehende Strukturen dar. Sie ist eine Ganglienvorwölbung, die sich ca. in der achten Woche an der Innenseite des Vorderhirnbläschens ausbildet. Sie wird in zwei Anteile gegliedert. Aus dem medialen Anteil der GE (mGE) geht das Pallidum hervor. Aus dem lateralen Anteil (LGE) entwickelt sich das Striatum. Im Striatum finden sich mittelgroße dornentragende Projektionsneurone, welche die Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Substanz P (SP) oder Enkephalin (Enk) enthalten. Große

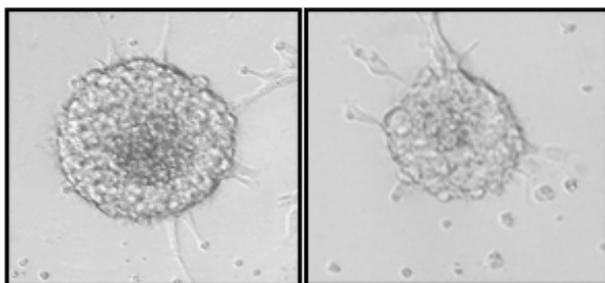
cholinerge Interneurone und mittelgroße Interneurone positiv auf GABA/Parvalbumin oder Somatostatin/Neuropeptid Y sind ebenfalls im Striatum lokalisiert.

Seid ein paar Jahren ist ebenfalls bekannt, dass die GABAergen, corticalen Interneurone aus Vorläuferzellen der GE hervorgehen.

In den späten Stadien der Embryonalentwicklung werden die Progenitor-Zellen aufgrund der Bildung von Globus pallidus und Putamen (gemeinsam das Striatum) an den Rand unter dem Ventrikel nach basal verdrängt, so dass sich die subventrikuläre Zone ausbildet, die über das gesamte Lebensalter eines Menschen erhalten bleibt.

Reynolds und Weiss isolierten 1992 erstmals die neuralen Progenitor-Zellen aus der GE von Mausembryonen (E14). Sie waren in der Lage, diese *in vitro* unter optimalen Bedingungen zu kultivieren (Reynolds et al., 1992; Reynolds und Weiss et al., 1992).

Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *engl. epidermal growth factor*) und basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF, *engl. basic fibroblast growth factor*,) beginnen die isolierten ZNS Zellen aus der GE zu proliferieren und klonale Kugeln zu bilden, die als Neurosphären bezeichnet werden. Kontinuierliches Wachstum durch asymmetrische Teilungen (Gage, 2000) lässt die neuralen Progenitor-Zellen expandieren, bis eine Neurosphäre ca. 100-200µm im Durchmesser groß ist und aus annähernd 10.000 Zellen bestehen kann. Werden die Sphären dissoziiert und wieder rekultiviert, so können große Mengen an Progenitor-Zellen gewonnen werden. Dazu werden sie durch die regelmäßige Behandlung von ausgereiften Primärzellen selektiert. (Bottai et al., 2003) Diese Art der Kultivierung wird als „Neurosphären formierendes Verfahren“ (NFA, *engl. Neurosphere forming Assay*) bezeichnet.



**Abb. 3: Neurosphären (NFA) in der Zellkultur**  
Klonales Wachstum neuraler Stammzellen führt unter Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF zur Ausbildung einer Neurosphäre. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

Neurosphären sind reich an Extrazellulärmatrix (ECM, *engl. extra cellular matrix*) und Adhäsionsproteinen. Diese Bestandteile und einige Wachstumsfaktoren können von den Neurosphären zum Teil selbst gebildet werden (Lobo et al., 2003). Sie dienen vor allem dem Wachstum, der Kommunikation und dem Zusammenhalt der Zellen. Generell ist die dreidimensionale Anordnung innerhalb der Sphäre eine ideale Nische für die Zellen. Im

Gegensatz zu einer zweidimensionalen Kultur auf beschichteten Platten, scheint die Neurosphäre die physiologische Umgebung innerhalb des ZNS besser zu imitieren. Für experimentelle Fragestellungen sind die dreidimensionalen Kugeln dagegen eher ungeeignet. Zum einen sind die Zellen innerhalb der Sphäre sehr heterogen und nicht synchronisiert, denn nur ca. 2-3% der Zellen sind reine neurale, sich symmetrisch teilende, Stammzellen (Reynolds et al., 2005). Die restlichen 97-98% einer Neurosphäre bestehen aus sich asymmetrisch teilenden Progenitor-Zellen und symmetrisch teilenden, bereits vordifferenzierten Vorläuferzellen. Zum anderen können große Zellaggregate schlecht differenziert und untersucht werden. Aus diesem Grund werden die dissoziierten Sphären auf beschichtete Kulturschalen übertragen, wo sie durch das Anhaften (Adhärenz) an der Beschichtung als Einzelzellschicht (*engl. Monolayer*) unter dem Einfluss von EGF und FGF weiter proliferieren. Unter bestimmten Bedingungen können diese Kulturen eine hohe Synchronität der Zellen sowie Multipotenz aufweisen und eine Population reiner neuraler Stammzellen darstellen. Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl Neurosphären, als auch Einzelzellschicht-Kulturen verwendet. Für Fragestellungen zur veränderten Genexpression von neuronalen Stammzellen induziert durch Zytokine, wurden ausschließlich adhärenz, neurale Stammzellen verwendet. Da in dieser Arbeit der überwiegende Teil der Versuche mit Einzelzellschicht-Kulturen durchgeführt wurde, wurde innerhalb dieser Arbeit die Bezeichnung der neuronalen Stammzelle bevorzugt.

Durch den Entzug der Wachstumsfaktoren differenzieren die Zellen nach ein paar Tagen zu Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten aus (Doetsch et al., 1999; Johansson et al., 1999; Gage et al., 2000b). Quantitative Studien an adulten neuronalen Progenitor-Zellen aus Nagetieren haben ein ungefähres Differenzierungsverhältnis von 25 (Astrozyten) zu 5 (Neurone) zu 1 (Oligodendrozyten) gezeigt (Johe et al., 1996; Gage et al., 2000a+b; Gritti, 2002). Allerdings spielt hierbei das Stadium der Entwicklung, aus dem die Zellen entnommen wurden, eine große Rolle. Während der Embryonalentwicklung sind Schwankungen im Phänotyp-Profil der Progenitor-Zellen zu sehen. Progenitor-Zellen sind bereits bei der Bildung des Neuralrohres zu finden (Tropepe et al., 1999). Werden die Zellen aus frühen Stadien wie E10 und E12 entnommen, enthalten die Kulturen meist nur Vorläufer-Zellen, die später als Double-Cortin (Dcx) positive Neuroblasten zu Projektionsneuronen ausdifferenzieren. Späte Stadien, wie E17, enthalten neben den multipotenten Progenitor-Zellen und Neuroblasten auch die Vorläuferzellen der glialen Linie (Abramova et al., 2005). Generell ist im Verlauf der Embryonalentwicklung ein Übergang von einer früh einsetzenden

Neurogenese zur späten Gliogenese zu sehen. In der Neurogenese sind vor allem die Expressionen der Marker Dcx,  $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ -tubulin), Polysialinsäure-Zelladhäsionsmolekül (PSA-NCAM), Mikrotubulin assoziiertes Protein 2 (Map2) und Pax-6 zu sehen. Die Gliazellentwicklung hält postnatal an und zeigt vor allem die Marker gliäres fibrilläres azides Protein (GFAP), Serum Protein 100 (S100 $\beta$ ), Oberflächenantigen 4 (O4), endothelial sezernierter Wachstumsfaktor Rezeptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) und Chondroitinsulfat proteoglycan 2 (NG2). Neben den unterschiedlichen Phänotyp-Profilen ist auch ein Rückgang der Stammzellanzahlen zu verzeichnen. Bei der Maus reduzieren sich die Stammzellzahlen von 50% in der Wand des Neuralrohres am Embryonaltag 8,5 bis hin zu weniger als 1% in der SVZ postnatal (Temple, 2001). Parallel zu den Studien an Nagetieren sind 1999 die humanen Progenitor-Zellen der SVZ-Region und subgranulären Zone des Hippocampus entdeckt und isoliert worden (Kukekov et al., 1999; Arsenijevic et al., 2001; Wachs et al., 2003; Nunes et al., 2003; Wennersten et al., 2004).

#### **1.1.2.1 C Kultivierung fetaler neuraler Progenitor-Zellen *in vitro***

Aufgrund der Kenntnis der mannigfaltigen Phänotyp-Profile entwickelten sich in verschiedenen Arbeitsgruppen über die Jahre hinweg abweichende Präparations- und Zellkulturprotokolle. Eine Therapie mit Vorläuferzellen, die anschließend in der richtigen Umgebung *in vivo* ausdifferenzieren scheint ebenfalls möglich und kann die Symptome der Erkrankung durchaus abmildern. Beispiel: Junge fetale dopaminerge Neurone, transplantiert in das Striatum von Parkinson Patienten, verbesserte die Symptomatik der Erkrankung bei einigen Patienten über einen längeren Zeitraum (Kordower et al., 1995; Piccini et al., 1999).

Neurale Vorläufer-Zellen, isoliert aus dem murinen Mes- oder Telencephalon im embryonalen Entwicklungsstadium 10 (E10), teilen sich symmetrisch und differenzieren in Neurosphären-Kulturen unter dem Einfluss von bFGF zu neuronalen Vorläuferzellen. Ein Nachteil dieser Kultur ist, dass ein Studium der glialen Zellen hier schwieriger ist, da diese Kultur vorwiegend aus neuronale Vorläuferzellen besteht (Drago et al., 1991). Auch bei der Zellpräparation aus dem Hippocampus der Ratte, E16 bis adult, entwickeln sich unter dem Wachstumsfaktor bFGF vermehrt Neuroblasten aus. Diese Art der Kultur ist für eine überwiegende Studie an Nervenzellen oder deren experimentelle Transplantationen geeignet (Ray und Gage 1994).

Präparationen von Ratten-Zellen aus dem Stadium E12 –E18 in Wachstumsfaktorfreiem Medium und einer Koexistenz-Kultur (Ko-Kultur) mit Astrozyten entwickeln dagegen multipotente Progenitor-Zellen. Der Vorteil ist hier eine recht einfache Präparation. Ein

Nachteil kann sich allerdings aus der Astrozyten Ko-Kultur entwickeln, da bei solchen Bedingungen oft astrozytäre Kontaminationen in den Experimenten entstehen können.

Eine Präparation der Zellen aus dem Stadium E14 der GE (auch als striatale Präparation bezeichnet) entwickelt unter den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF in Neurosphären-Kulturen multipotente Progenitor-Zellen die in Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen ausdifferenzieren können (Reynolds et al., 1992). Die Bedingungen sind recht unkompliziert: Es gibt keine Kontaminationen mit Zellen von Ko-Kulturen und in den Experimenten werden alle Typen von Vorläufer-Zellen erfasst. Ein Nachteil ist der Einsatz von zwei mitogenen Wachstumsfaktoren, die nachweislich einen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen haben können (Pollard et al., 2006; Ligon et al., 2007). Alle Zellen einer frisch präparierten GE-Kultur exprimieren unter dem Einfluss von EGF und bFGF den Stammzellmarker Nestin, einem intermediären Filament, welches auch in neuroepithelialen Zellen während der Embryonalentwicklung zu finden ist. Werden den Zellen die Wachstumsfaktoren entzogen, geht die Expression von Nestin zurück und macht anderen Markern wie Neuron-spezifischer Enolase (NSE), GFAP,  $\beta$ -tubulin und PDGFR $\alpha$  platz. Eine Expression von GABA, Substance P und Methionin-Enkephalin in Verbindung mit Neurofilament 200 (NF200) zeigt eine Differenzierung der Neuroblasten in charakteristische, striatale Neurone. GFAP und S100 $\beta$  werden von astrozytären Zellen, NG2, O4 und MBP von oligodendrozytären Zellen exprimiert. Eine Kultur neuraler Progenitor-Zellen aus der GE kann nicht dauerhaft kultiviert werden, da die charakteristischen Stamm- und Progenitor-Zelleigenschaften mit der Zeit verloren gehen. Aus diesem Grund werden die Experimente solcher Progenitor-Zellen zwischen Passage 1 und 6 durchgeführt, da nach dieser Passagezahl immer mehr Zellen mit einer spontanen Ausdifferenzierung beginnen.

In einer Publikation aus dem Jahre 2005 wurde eine Kultivierung von Progenitor-Zellen des Vorderhirns der Maus aus dem E14 Stadium auf Gelatine beschichteten Kulturschalen in NSA-Medium, versetzt mit N2-Zusatz, unter dem Einfluss von EGF und bFGF beschrieben. Eine Langzeitkultivierung der Progenitor-Zellen über den Zeitraum von 40 Passagen zeigte keine vorzeitige Ausdifferenzierung der Progenitor-Zellen (Conti et al., 2005). Dies wurde durch immunzytochemische Färbungen mit Markern wie Nestin und RC2 nachgewiesen. Durch den Entzug der Wachstumsfaktoren differenzierten auch diese Zellen in  $\beta$ -tubulin und GFAP positive reife Zellen.

Eigene Versuche die Progenitor-Zellen mit dem Protokoll nach Conti zu kultivieren, sind fehlgeschlagen. In dieser Publikation wurde der Effekt beschrieben, dass die Progenitor-Zellen ohne Beschichtung direkt wieder in die Neurosphärenbildung übergehen. Die

Progenitor-Zellen aus der GE zeigten keine Anhaftung an den Gelatine beschichteten Kulturschalen, so dass eine Kultivierung in diesem Falle nicht möglich war.

### 1.1.3 Adulte Progenitor-Zellen

Postnatale adulte Progenitor-Zellen sind wie die fetalen gewebspezifisch vordifferenziert und multipotent. In den letzten Jahren wurden adulte Progenitor-Zellen aus vielen verschiedenen tierischen Geweben isoliert und in Kultur genommen. Knochenmark, Skelettmuskulatur, Darm, Leber, Epidermis und Retina sind Gewebe mit hoher Regenerationsrate, deren Stammzellen für den Ersatz von apoptotischen Zellen vorgesehen sind (Hall et al., 1989; Potten et al., 1990; Morrison et al., 1999; Tropepe et al., 2000). Einige Studien konnten zeigen, dass Progenitor-Zellen aus der Haut von Nager und Mensch (SKP, *engl. Skin derived Precursor*) auch neurale Progenitor-Zellen bilden, welche wiederum in Glia und Neurone differenzieren (Toma et al., 2001; Fernandes et al., 2004; Toma et al., 2005). Dies könnte eine Möglichkeit sein, aus einem leicht zu entnehmenden Stückchen Haut Progenitor-Zellen zu isolieren und diese für einen Notfall einzulagern. *In vitro* vermehrt und differenziert wären die Zellen eine Art körpereigene Zellreserve, die im Krankheitsfall aktiviert werden kann. Einige Firmen bieten diesen Service bereits an (z.B. Nanorepro AG in Zusammenarbeit mit der Universität Marburg). Die Isolierung der SKP ist aber bei älteren Menschen oft problematisch (Fernandes et al., 2004; Fernandes et al., 2008; Joannides et al., 2004) und auch die Differenzierung zu neuronalen Progenitor-Zellen ist nicht immer reproduzierbar. Dies hemmt vorerst die uneingeschränkte Verwendung der SKP in der therapeutischen Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen und spricht eher für einen Einsatz gewebspezifischer Progenitor-Zellen.

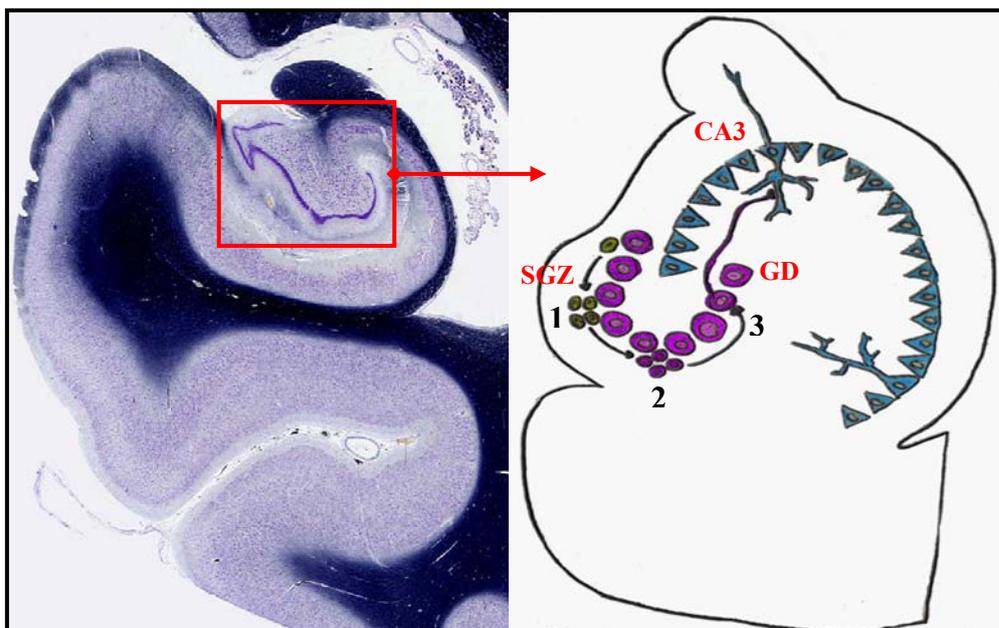
#### 1.1.3.1 A Adulte neurale Progenitor-Zellen *in vivo*

Über Jahrzehnte existierte die Theorie, dass Nervenzellen (Neurone) ausschließlich während der Embryonalentwicklung entstehen und deren Verlust nach der Geburt nicht zu ersetzen ist. Einige Studien der 60er Jahre berichteten erstmalig über die postnatale Entstehung von neuen Neuronen (Neurogenese) im Hippocampus (Altman et al., 1965). Der heutige Stand der neurobiologischen Forschung bestätigt die Kenntnis über die Bildung von neuen Nervenzellen hauptsächlich in zwei Kompartementen des postnatalen adulten Gehirns: in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (GD) und der subventrikulären Zone (SVZ).

Neu gebildeten Neurone der subgranulären Zone migrieren in die darüber liegende Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, wo sie axonale Projektionen ausbilden, die in die CA3

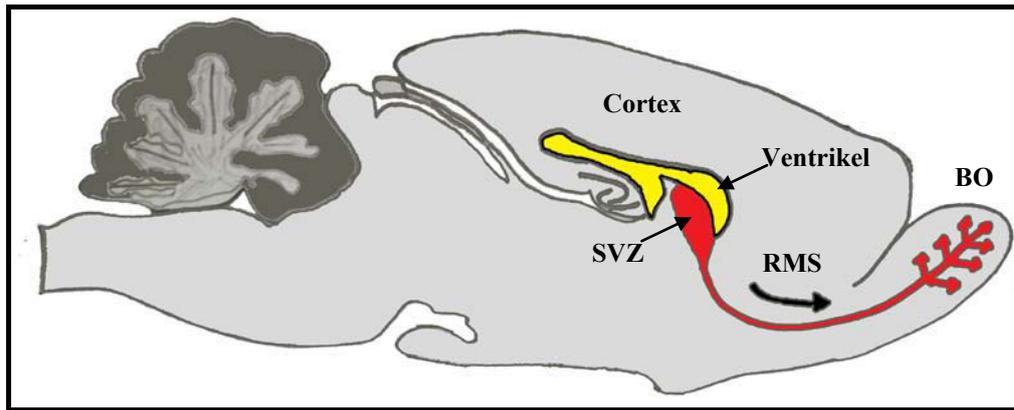
Region des Hippocampus reichen (Kaplan et al., 1977; Markakis und G age, 1999). Nervenzellvorläufer der Subventrikulären Zone von Nagern und Primaten wandern in Ketten über einen tangential angelegten Weg, den so genannten rostralen Migrationsweg (*engl. rostral migratory stream RMS*) in den Bulbus olfactorius (BO) und differenzieren dort zu GABAergen und glutamergen Interneuronen (Lois et al., und Alvarez-Buylla, 1993; Kornack und Rakic, 2001; Pencea et al., 2001) (*siehe Abb. 4 und 5*). Erstaunlicherweise ist dieser Mechanismus der Wanderung über den Rostral Migratory Stream nicht beim Menschen zu sehen (Sanai et al., 2004).

Striatum, Cortex und Rückenmark sollen weitere Regionen im zentralen Nervensystem sein, die ebenfalls geringfügig postnatale Neurogenese aufweisen können, wobei diese Erkenntnisse eher umstritten sind (Palmer et al., 1995; Palmer et al., 1999; Yamamoto et al., 2001).



**Abb. 4: Neurogenese im Hippocampus**

Die C-Zellen aus der subgranulären Zone (SGZ) proliferieren (1), differenzieren (2) und integrieren sich (3) in die Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (GD). Die Fortsätze der neu ausgebildeten Neurone wachsen in die CA3-Region des Hippocampus und bilden eine Verknüpfung. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.



**Abb. 5: Rostral Migratory Stream**

Entstandene Neuroblasten wandern aus der subventrikulären Zone (SVZ) tangential in Ketten über den Rostral Migratory Stream (RMS) in den Bulbus olfaktorius, wo sie zu Interneuronen differenzieren und sich in das umliegende Gewebe integrieren. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

Heutzutage ist bekannt, dass die Neurogenese durch die Stimulierung von neuronalen Progenitor-Zellen ausgelöst wird, die durch viele verschiedene Faktoren mehr oder weniger stark beeinflusst werden können. Stress und Alkoholkonsum inhibieren die Bildung von neuen Nervenzellen im GD (Nixon et al., 2002; Tanapat et al., 1998), komplizierte Lernprozesse, physische Aktivität und auch mitogene Wachstumsfaktoren können die Bildung von neuen Nervenzellen im GD dagegen anregen (Gould et al., 1999; van Praag et al., 1999).

Einige Hormone wie Prolaktin und Oestrogen stimulieren die Produktion von neuronalen Progenitorzellen in der SVZ Region. Im Gegensatz dazu können Neurotransmitter wie Noradrenalin oder Dopamin die Neubildung von Nervenzellen und neuronalen Progenitorzellen in der SVZ-Region und im GD hemmen.

Einige Neurologische Erkrankungen haben zusätzlich einen Einfluss auf die Bildung von Progenitor-Zellen: Ischämie, Depressionen und Chorea Huntington bewirken eine vermehrte Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in der SVZ-Region und dem GD. Bei Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wird die Bildung von Progenitor-Zellen stark gehemmt.

In der folgenden Tabelle (*siehe Tab.1*) sind einige Ursachen aufgelistet, welche die Neurogenese beeinflussen:

Neurogenesefaktor	Wirkung	Referenz
Transmitter	Glutamat (-) Norepinephrin (-) Dopamin (-)	Cameron et al., 1995 Kulkarni et al., 2002 Höglinger et al., 2004
Hormone	Prolactin (+) Östrogen (+) Progesteron (+)	Shingo et al., 2003 Tanapat et al., 1999 Lenington et al., 2003
Alter	(-)	Kuhn et al., 1996
Stress	(-)	Gould et al., 1997 Pham et al., 2003
Drogen	Antidepressiva (+) Antipsychotica (+) Antipsychotica (-)	Malberg et al., 2000 Wang et al., 2004 Backhouse et al., 1982
Alkohol	(-)	Nixon et al., 2002
Lernen/Physische Aktivität	(+)	Van Praag et al., 1999 Gould et al., 1999
Erkrankungen	Epilepsie (+)  Ischämie (+)  Morbus Parkinson (-) Morbus Parkinson (+) Morbus Alzheimer (-)  Chorea Huntigton (+)	Parent JM, 2002 Auvergne et al., 2002 Jin et al., 2001 Jin et al., 2003 Höglinger et al., 2004 Zhao et al., 2003 Haughey et al., 2002a Haughey et al., 2002b Curtis et al., 2003

**Tab. 1: Positiv- und Negativ-Regulierende Faktoren der Neurogenese**

Einige Faktoren können die Bildung von neuen Nervenzellen beeinflussen. Hier ist eine Übersicht verschiedenster Faktoren und deren Wirkung dargestellt. (-) Neurogenese wird gehemmt; (+) Neurogenese wird angeregt. Tabelle erstellt von Jennifer Wellen modifiziert nach Taupin, 2005.

Mehr als die Hälfte der neu entstandenen Nervenzellen gehen meist durch den programmierten Zelltod (Apoptose) wieder zugrunde (Morshead und van der Kooy, 1992). Neurone, die vollständig ausdifferenzieren und in das vorbestehende neuronale Netzwerk integriert werden, sind dagegen über Jahre hinweg ein stabiler Bestandteil des Gewebes. Sie sind in der Lage, wichtige Funktionen von den generierten Zellen zu übernehmen und vollständig zu ersetzen (Dayer et al., 2003).

Mit dem Wissen über die Fähigkeit des Gehirns neue Nervenzellen generieren zu können entwickelte sich die Theorie der neuralen Progenitor-Zelle, die postnatal im adulten Gehirn persistiert und geschädigtes Gewebe in einem Selbstheilungsprozess erneuern soll. Hauptaugenmerk der Forschung lag auf der SVZ-Region des ZNS als mögliche Nische für neurale Progenitor-Zellen.

Neurogenese und die Proliferation von subventrikulären Zellen konnten anhand von anatomisch-histologischen Untersuchungen verschiedenster Arten wie Nagetiere, Primaten, Hunden und dem Menschen beobachtet werden (Blakemore, 1969; Lewis, 1968; Blakemore und Jolly, 1972; Gould et al., 1999; Kornack and Rakic et al., 2001; Sanai et al., 2004).

Retrovirale und Nukleosid-Markierungsexperimente in Nagern haben gezeigt, dass sich drei teilende Zell-Populationen in der SVZ-Region befinden.

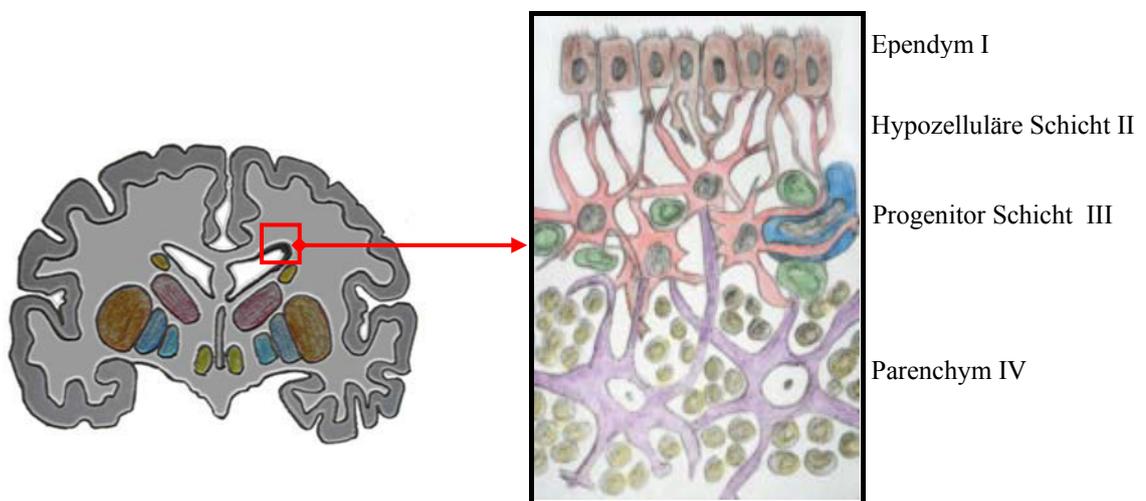
Die Typ-B-Zelle ist eine sich langsam teilende (innerhalb von 15d) neurale Stammzelle, welche durch asymmetrische Teilung eine weitere Typ-B Zelle und eine sich schnell teilende (innerhalb von 12h) Typ-C oder multipotente Progenitor-Zelle mit limitierter Zyklenzahl generiert (Morshead et al., 1994; Morshead et al., 1998; Doetsch 1999a). Typ B-Zellen sind positiv für den Gliamarker GFAP (Doetsch et al., 2002a). Sie werden auch als SVZ-Astrozyten Stammzellen bezeichnet und weisen einen ähnlichen morphologischen Aufbau wie klassische Astrozyten auf (Laywell et al., 2000; Imura et al., 2003). Diese Erkenntnis veränderte die bis dahin existierende Annahme, dass es sich bei Astrozyten generell um ausdifferenzierte Gliazellen handelt, die keine multipotenten Eigenschaften annehmen können. Allerdings gibt es einen funktionellen Unterschied der Astrozyten im Hippocampus und der SVZ gegenüber Astrozyten anderer Regionen. Die Typ-B Astrozyten aus der SVZ-Region sind in der Lage neurale Progenitor-Zellen zur Proliferation anzuregen, einen neuronalen Differenzierungsweg einzuschlagen und auszureifen. Folglich nehmen die Typ-B Astrozyten der SVZ-Region eine besondere Stellung innerhalb der Gruppe der Gliazellen ein. Multipotente Typ-C Zellen zeigen keine Expression von GFAP. Stattdessen sind diese Progenitor-Zellen NG2 (Aguirre et al., 2004) und Lewis X (synonym CD15, Capela und Temple, 2002) positiv.

Typ-A Neuroblasten sind die Vorstufe neuer Nervenzellen und exprimieren die jungen Neuronenmarker Dcx, PSA-NCAM und  $\beta$ -tubulin. Sie entwickeln sich aus den Typ-C Zellen und wandern über den RMS in den Bulbus olfactorius (Lim et al., 2007; Doetsch, 2003). Alle drei Zelltypen sind zusätzlich positiv auf den Stammzellmarker Nestin (Doetsch et al., 1997).

Die SVZ-Region bildet während der Entwicklung neben den Nervenzellen auch Oligodendrozyten Vorläufer Zellen (OPC, *engl. oligodendrocyte precursor cell*) (Levison et al., 1993). Diese gehen ebenfalls aus den Typ-B Zellen hervor, die aber zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung zusätzlich den Transkriptionsfaktor Olig2 exprimieren. Anschließend wandern die Vorläufer in das Corpus Callosum, Striatum und die Fornix, wo sie zu NG2 positiven Oligodendrozyten ausreifen (Menn et al., 2006).

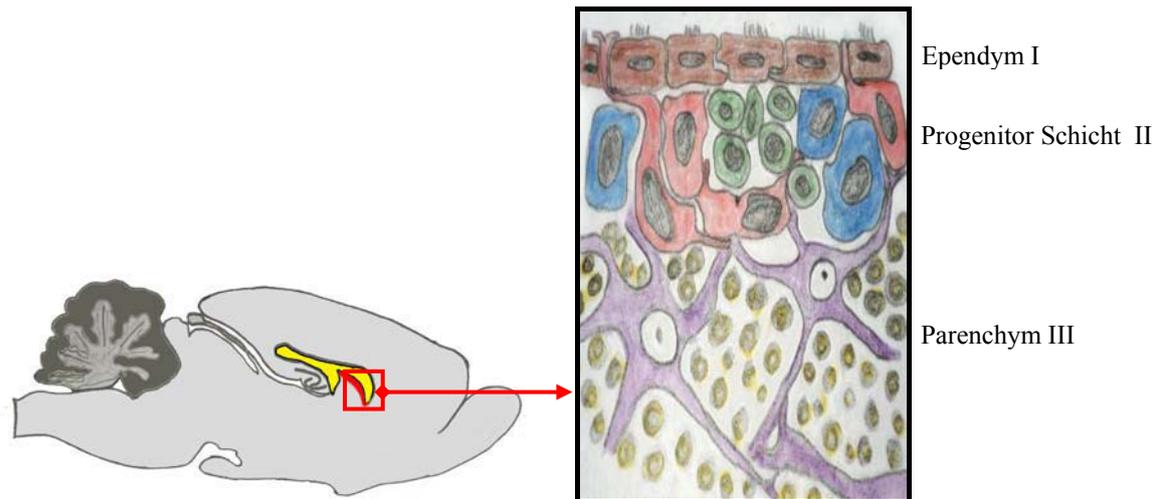
Die Verteilung der drei Zelltypen (A-, B-, und C-Zelle) innerhalb der SVZ-Region ist sehr spezifisch und durch Studien am Nager, sowie am Mensch genau charakterisiert worden (Doetsch et al., 1997; Quinones-Hinojosa et al., 2006). Schicht I besteht aus einer ependymalen Zellschicht, die Typ-E Zellen genannt werden. In der darunterliegenden hypozellulären Schicht II sind beim Menschen kaum Zellkörper zu finden. Stattdessen wird

diese Schicht hauptsächlich durch Zellfortsätze der Ependymzellen und SVZ-Astrozyten gebildet. Nagetiere haben im Gegensatz zum Menschen keine hypozelluläre Schicht. Typ-A Neuroblasten und Typ-B Astrozyten sitzen vorwiegend in der Schicht III. Die B-Zellen umschließen die Neuroblasten und halten sie dadurch vom darunterliegenden Parenchym getrennt. Einige der Astrozyten senden Zellfortsätze in die hypozelluläre Schicht und kontaktieren mit den Ependymzellen und dem lateralen Ventrikel. Zwischen den Typ-B Astrozyten sitzen verteilt die Progenitor-C Zellen und generieren kontinuierlich Neuroblasten. Eine schematische Darstellung der Zytoarchitektur der SVZ-Region von Mensch und Nager ist unter der folgenden Abbildung zu sehen (*siehe Abb. 6a+b*).



**Abb. 6a: Zytoarchitektur der humanen SVZ**

Schicht I wird durch die Ependymzellen gebildet. In der hypozellulären Schicht sind Fortsätze von Ependymzellen und Astrozyten zu sehen. Typ-B (rot), Typ-C (blau) und Neuroblasten (grün) sitzen in der Schicht III. Das darunter liegende parenchymatöse Gewebe besteht vorwiegend aus Nervenzellen und Myelinscheiden. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.



**Abb. 6b: Zytoarchitektur der Nagetier SVZ**

Der Aufbau von Mensch und Nagetier SVZ-Region ist sehr ähnlich. (siehe Abbildung 4a) Bei Nagetieren ist lediglich keine hypozelluläre Schicht ausgebildet. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

### 1.1.3.1. B Adulte neurale Progenitor-Zellen *in vitro*

Ausgangsmaterial für die Studien an adulten humanen Progenitor-Zellen waren bislang meist Gewebebiopsien des ZNS adulter Menschen. Die Proben wurden nach dem Tod des Patienten aus dem subventrikulären Bereich gewonnen und in Kultur genommen. Dies würde natürlich einen therapeutischen Einsatz der humanen adulten Stammzellen stark einschränken. Mittlerweile sind auch neurochirurgische Gewebe-Biopsien aus der humanen SVZ-Region oder dem Cortex etabliert, die in der Zellkultur Neurosphären bilden. Die Zellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der asymmetrischen Zellteilung und Differenzierung *in vitro* (Moe et al., 2005; Gonzalez-Martinez et al., 2007). Wird dem Patienten eine kleine Biopsie aus der SVZ-Region des ZNS entnommen, so kann diese aufbereitet und ohne Gewebeunverträglichkeit oder Gefahr einer Teratombildung wieder appliziert werden. Dies eröffnet zwar eine völlig neue Möglichkeit für den Einsatz von neuronalen Progenitor-Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen, allerdings ist die Gewinnung des Zellmaterials für die Kultur mit einem Risiko behaftet, da es bei solchen Eingriffen zu Komplikationen wie Hirnblutungen oder Entzündungen kommen kann. Eine Gewinnung von Progenitor-Zellen aus besser zugänglichen Geweben die neural differenziert und dann transplantiert werden können, wäre eine wesentlich bessere Alternative.

### 1.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Die Reprogrammierung von Fibroblasten in ein pluripotentes Stammzell-Stadium stellt derzeit die aussichtsreichste Anwendung von Stammzellen in der regenerativen Medizin dar.

Im Jahre 2006 beschrieb die Arbeitsgruppe Takahashi und Yamanaka erstmals die Reprogrammierung von Maus embryonalen Fibroblasten in ein pluripotentes Stammzellstadium (Takahashi und Yamanaka, 2006).

Die Zellen werden induzierte pluripotente Stammzellen genannt (iPS), da ihre Funktionalität vergleichbar ist mit der von ES-Zellen. Reprogrammiert werden die Fibroblasten durch retrovirale Transfektion mit vier verschiedenen Genen. Octamer-4 (Oct3/4) ist ein Transkriptionsfaktor der für Selbsterneuerung und Differenzierung von Zellen in negativer und positiver Weise verantwortlich ist. Mit sex-determining region box-2 (Sox2) zusammen, einem Transkriptionsfaktor der bei Herab-Regulation zur Differenzierung von Progenitor-Zellen führt (Ivanova et al., 2006), regulieren diese beiden Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl von Genen. (Boyer et al., 2005, Chew et al., 2005, Kuroda et al., 2005, Tokuzawa et al., 2003) Der Transkriptionsfaktor c-myc reguliert Wachstum und Differenzierung. Dazu greift c-myc spezifisch in den Zellzyklus ein, aktiviert verschiedene Gene der Signaltransduktion (Cartwright et al., 2005) und kann Protein 53 (p53) abhängige Apoptose induzieren (Rowland et al., 2005). Krümel-like factor 4 (KLF4) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Tumorsuppression über die Aktivierung von Protein 21 (p21) induziert und ebenso als Onkogen über p53 die Proliferation fördern kann (Rowland et al., 2005). Im Vergleich der iPS mit den ES-Zellen konnte eins völlig klar festgestellt werden. Die iPS Zellen sind nicht identisch mit den ES-Zellen. Sie weisen eine erhöhte Azetylierung von Histon H3 auf, eine erniedrigte Dimethylierung von Histon-3-lysine-9 und auch die Gene Dnmt3a und LIF Rezeptor wird in den in ES-Zellen wesentlich stärker exprimiert.

Die Funktionalität der iPS Zellen wurde durch die Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse überprüft. Induzierte Stammzellen bilden gleichermaßen wie die ES-Zellen Teratome, mit allen Anteilen der drei Keimblätter, was deren Pluripotenz belegt.

Obwohl die genetische Reprogrammierung mit Hilfe von Retroviren durchgeführt wird, und dies zur Zeit eine Anwendung am Patienten ausschließt, sind die iPS Zellen zur Zeit die aussichtsreichsten Stammzellen für die regenerative Medizin, da sie das Potential der ES-Zellen besitzen, aber die Gewebeunverträglichkeiten durch autologe Transplantationen in Zukunft umgangen werden kann. Nach neuesten Publikationen konnten die iPS Zellen in funktionelle neurale Progenitor-Zellen differenziert werden, die sich nach der Transplantation in fetale Ratten in funktionelle Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten umwandeln (Wernig et al 2008c). Das Potential der iPS Zellen ist zurzeit nur Ansatzweise zu erahnen und die folgenden Publikationen werden Aufschluss darüber geben, ob die Anwendung der Zellen Probleme birgt oder eine wirkliche Alternative darstellt.

### 1.1.5 Einsatz neuraler Progenitor-Zellen *in vivo*

Bei vielen Erkrankungen des ZNS werden bestimmte Areale zerstört und führen zu folgeschweren Symptomen. Medikamentöse Therapien können oftmals Symptome lindern nicht aber die weitere Degeneration des Parenchyms aufhalten. Ziel der Stammzelltherapie ist es, die zugrunde gegangenen Zellen oder das zerstörte Gewebe zu ersetzen. Bei Parkinson-Patienten steht die Transplantation reifer dopaminergener Neurone oder Neuroblasten die zu dopaminergen Nervenzellen differenzieren können, im Vordergrund. Erste erfolgreiche Transplantations-Studien haben gezeigt, dass neurale Stammzellen *in vitro* vermehrt und in Progenitor-Zellen differenziert werden konnten. Nach der Transplantation war ein Teil der Zellen in der Lage zu überleben und die dopaminergen Neurone weitestgehend zu ersetzen (Horner et al., 2000; Vescovi 1999). Auch die intrastriatale Transplantation von undifferenzierten adulten neuralen Progenitor-Zellen in ein Parkinson Tiermodell hat gezeigt, dass Progenitor-Zellen zu dopaminergen Nervenzellen differenzierten und sich die Symptomatik der Tiere erheblich verbesserte (Yang et al., 2002; Lundberg et al., 1997). Junge dopaminerge Neurone aus fetalem Gewebe des ZNS transplantiert in das Striatum von Parkinson Patienten, verbesserte die Symptomatik über einen Zeitraum von zehn Jahren (Kordower et al., 1995; Piccini et al., 1999). Einige Patienten waren sogar in der Lage, auf eine medikamentöse Therapie mit L-Dopa zu verzichten und ein unabhängiges Leben zu führen. Andere Patienten wiederum zeigten keine wesentliche Verbesserung (Freed et al., 2004; Olanow 2002; Olanow et al., 2003) oder sogar eine Verschlimmerung bis hin zum Tod (Hagell et al., 2001).

Transplantation reifer, myelinisierender Oligodendrozyten bzw. Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen bei Menschen die an Multipler Sklerose (MS) leiden, stellt eine mögliche Anwendung neben den herkömmlichen medikamentösen Therapien wie Interferon- $\beta$  dar.

Bei der immunologischen und neurodegenerativen Erkrankung Multiple Sklerose gibt es neben den entzündlichen Prozessen eine Art reparative Abwehr des Organismus. MRT Studien an der demyelinisierenden experimentell allergischen Enzephalomyelitis (EAE) der Maus zeigten eine Neubildung von Markscheiden (Remyelinisierung) mit unterschiedlich starken Effekten bei den einzelnen Tieren. Die remyelinisierten Bereiche sind in der Magnetresonanztomographie (MRT) zu sehen und werden von den Neuropathologen als „Shadow-Plaques“ bezeichnet. Sie zeigen zwar dünnere Myelinscheiden mit wesentlich kürzeren Internodien, aber eine eingeschränkte Isolationsfähigkeit der Axone (Patrikios et al., 2006; Perier & Grégoire 1965). Aus unbekanntem Gründen stoppt der Prozess der Remyelinisierung vor allem während fortgeschrittener Stadien der MS (Brück et al., 2003).

Die Remyelinisierung bei den EAE Mäusen scheint die reaktive Form der Selbstregeneration des ZNS darzustellen, wird aber durch derzeit noch unbekannte Faktoren gehemmt. Möglicherweise wird die Bildung neuer Myelinscheiden durch das Mikromilieu der vorherrschenden Entzündungsreaktion negativ beeinflusst oder aber die Menge an endogenen Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen ist zu gering für eine vollständige Remyelinisierung von beschädigten Nervenfasern. Eine Unterstützung der limitierten Selbstregeneration des erkrankten Gewebes durch die Transplantation von exogen vordifferenzierten Progenitor-Zellen wäre demnach eine alternative Behandlungsmethode. Nach dem Auftreten eines akuten Schubes wird eine lange Kette von Reaktionen in Gang gesetzt, die als körpereigene Immunabwehr bezeichnet werden kann. Zellen im umliegenden Gewebe produzieren Signalbotenstoffe (Zytokine) wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , und IFN- $\gamma$  die zahlreiche Zellen des Immunsystems anlocken. Dies sind vorwiegend Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten, welche wiederum Botenstoffe sezernieren. Sie rekrutieren noch weitere artgleiche Zellen, um Schädigungen am Endothel zu reparieren oder eingedrungene Keime zu phagozytieren. Somit entstehen hohe Konzentrationen an Zytokinen im verletzten und entzündeten Gewebe, die sich auch auf Stamm- und Progenitor-Zellen auswirken, sowie die Selbstregeneration des Gewebes beeinflussen können.

Signalbotenstoffe dienen der Kommunikation der Immunzellen untereinander, haben aber auch einen Einfluss auf andere Zellen. So können die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF das Überleben der Progenitor-Zellen vermitteln (Gage et al., 2000a), während neurotrophische Faktoren wie PDGF $\alpha$  (Forsberg-Nilsson et al., 1998) und ZNS sezernierter neurotrophischer Wachstumsfaktor (BDNF, *engl. brain derived neurotrophic factor*) (Pencea et al., 2001; Cheng et al., 2003) Migration und Differenzierung beeinflussen.

In den letzten Jahren haben viele Studien gezeigt, dass gerade inflammatorische Zytokine eine starke Wirkung auf Progenitor-Zellen haben, wobei die Aussage der Daten sich sehr kontrovers darstellt. IFN- $\gamma$  werden sowohl Neurogenese induzierende Eigenschaften (Wong et al., 2004; Lee et al., 2006), als auch degenerierende Wirkung bei neuropathologischen Prozessen zugeschrieben. (Kim et al., 2002) TNF- $\alpha$  kann das Überleben von Nervenzellen induzieren (Clark und Lutsep, 2001), neuroprotektiv wirken (Cheng et al., 1994), aber auch neuronalen Zelltod vermitteln. (Downen et al., 1999)

Da bei einigen Erkrankungen Zytokine vom Körper freigesetzt oder diese als therapeutische Behandlung appliziert werden, ist die Kenntnis über den Einfluss von Zytokinen auf endogene wie exogen transplantierte Stamm- und Progenitor-Zellen sehr wichtig.

## 1.2 Signalbotenstoffe (Zytokine)

### 1.2.1 Beschreibung und Einteilung der Zytokine

Zytokine sind meist kleine kurzlebige Glykoproteine, die im Organismus als Signalbotenstoffe agieren. Sie dienen einerseits als Regulationsfaktoren indem sie Stärke, Dauer und Art einer Immunantwort aktivieren, andererseits können sie auch andere Körperzellen in Wachstum und Differenzierung beeinflussen. Produziert werden die Zytokine hauptsächlich von den Zellen des Immunsystems. Zytokine ähneln den Hormonen, da sie in recht geringen Konzentrationen über eine hochspezifische Bindung an Rezeptoren auf Zellen einwirken können.

Es existieren verschiedene Untergruppen der Zytokine:

**1.2.1 A Die Lymphokine** sind Proteine die von Lymphozyten produziert werden und der Kommunikation der Lymphozyten untereinander dienen. Lymphokine können sich auch auf einige andere Zellen auswirken. Zu den Lymphokinen gehören die **Interleukine (IL)**, Glykoproteine, die von einigen Leukozyten produziert werden und die Kommunikation der Leukozyten untereinander steuern. Zu den wichtigen Interleukinen zählen IL-1, IL-2 und IL-4 und vor allem die **Interferone (IFN)**. Sie stellen eine Gruppe von Proteinen mit antiviraler und tumorsuppressiver Wirkung dar. Die wichtigsten Interferone sind Interferon- $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . IFN- $\beta$  wird in der Neurologie zur Schubprophylaxe eingesetzt.

**1.2.1 B Tumor-Nekrose Faktoren (TNF)** sind Proteine die eine Apoptose von Tumorzellen induzieren und somit krebsartige Veränderungen bekämpfen können. Sie können auch als chemotaktische Moleküle für neutrophile Granulozyten und Monozyten fungieren. Es gibt zwei Arten von Tumor Nekrose Faktoren: TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ . Mittlerweile sind viele verschiedene Liganden der TNF/TNF-Rezeptor Superfamilie identifiziert worden, deren Funktionen sich nicht nur auf die Apoptose beschränken und verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren können.

**1.2.1 C Koloniestimulierende Faktoren (CSF, engl. Colony stimulating factor):** bezeichnet eine Zytokingruppe, die auch als Wachstumsfaktoren eingestuft werden. Sie stimulieren die Proliferation von verschiedenen weißen Blutzellen im Knochenmark. Die wichtigsten CSF sind der Granulozyten stimulierender Faktor (G-CSF, engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), der Makrophagen stimulierende Faktor und der Granulozyten-Makrophagen stimulierende Faktor (M-CSF, engl. *Macrophage-Colony stimulating factor*; GM-CSF, engl. *Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating factor*).

**1.2.1 D Transformierender Wachstumsfaktoren (TGF, engl transforming growth factor)** sind Proteine die insbesondere in der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielen. Sie

wirken sich auf Wachstum und Differenzierung von Zellen oder Geweben aus. Zu den Faktoren zählen TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und die Morphogenetischen Knochenproteine (BMP, *engl. Bone morphogenetic proteins*). Die BMP verhindern einen vorzeitigen Beginn der Neurulation während der Entwicklung.

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Zytokine und deren Wirkung aufgeführt.

Zytokin	Produzierende Zellen	Zielzellen	Immunologische Funktion
<b>IL-1</b>	Monozyten Makrophagen T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Granulozyten Epithelzellen Fibroblasten	T-Zellen B-Zellen Monozyten Granulozyten Hepatozyten Knochenzellen	Proinflammatorisch Fieber und Akutphasereaktion Zellaktivierung und Induktion von Effektorfunktionen fördert Hämatopoese
<b>IL-2</b>	T- Zellen	T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Monozyten Granulozyten	T-Zellaktivierung und klonale Expansion Induktion von Apoptose Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen Aktivierung von NK-Zellen und B-Zellen Aktivierung von Monozyten und Granulozyten
<b>IL-4</b>	T-Zellen	B-Zellen T-Zellen NK-Zellen Monozyten Progenitor-Zellen Mastzellen	Aktivierung der B-Zellen Verstärkung der Expression von IgG <sub>1</sub> und IgE Regulation der Expression von CD23 auf Zellen und Monozyten Induktion einer TH2 Antwort Wachstumsfaktor für Mastzellen
<b>IFN-<math>\alpha\beta</math></b>	B-Zellen NK-Zellen Monozyten Makrophagen	Dendritische Zellen NK-Zellen Monozyten	Antivirale Effekte Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität Herabregulation der MHC-Expression
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	T-Zellen NK-Zellen	T-Zellen B-Zellen Monozyten NK Zellen	Zellaktivierung und Differenzierung Hochregulation der MHC-Expression Verstärkung der zytolytischen Aktivität Selektion des AK Isotyps
<b>TNF-<math>\alpha</math> TNF-<math>\beta</math></b>	Monozyten T-Zellen NK-Zellen	Monozyten Granulozyten Gefäßendothel	Proinflammatorisch Antitumoreffekte
<b>GM-CSF G-CSF</b>	Monozyten Makrophagen T-Zellen	Monozyten Makrophagen	Proinflammatorisch Stimulation der Myelopoese und der Zellfunktion myeloischer Zellen Mobilisierung von Stammzellen

**Tab. 2: Die wichtigsten Zytokine im Überblick**

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  sind inflammatorisch sezernierte Zytokine, die einen Einfluss auf neurale Progenitor-Zellen haben. IFN- $\beta$  wird als therapeutisches und immunsuppressives Zytokin bei MS eingesetzt. Tabelle erstellt von Jennifer Wellen.

Bei einer Überreaktion des Immunsystems kann es zu einem Kreislaufschock (Anaphylaxie), ausgelöst durch Ausschüttung großer Mengen an Entzündungsauslösenden Zytokinen

kommen. Sind die Zytokine im Körper nicht im Gleichgewicht so arbeitet das Immunsystem nicht mehr korrekt und es können Autoimmunerkrankungen entstehen.

### 1.2.2 IFN-induzierte Signaltransduktion

Interferone sind Glykoproteine die nur in Wirbeltieren (Vertebraten) zu finden sind (Isaacs und Lindenmann, 1957; Pestka et al., 1987; De Maeyer et al., 1988; Vilcek, 1996). Sie wirken antiviral, tumorsuppressiv und immunmodulatorisch. Alle Interferone reagieren mit typspezifischen Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Zellen zu finden sind. Die Interferon-Rezeptor Interaktion bringt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die als Jak/Stat-Signalweg bezeichnet wird (Schindler et al., 1992; Darnell et al., 1994; Ihle, 1995; Ihle und Kerr, 1995). Die Aktivierung der Signalkaskade des Jak/Stat-Weges (siehe Kapitel 1.2.2.a) kann zur Expression von über 300 verschiedenen Genen führen zu denen Genprodukte wie Enzyme, Transkriptionsfaktoren, oder Hitzeschockproteine (Der et al., 1998) zählen.

#### 1.2.2 A Typ I Interferone

IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  gehören neben IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$  und IFN- $\kappa$  zu den Typ I Interferonen. (Roberts et al., 1998; Langer et al., 2004; Pestka et al., 2004) IFN- $\delta$ , IFN- $\zeta$  und IFN- $\tau$  werden ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt, sind aber nur in Mäusen, Schweinen und Wiederkäuern nachgewiesen worden (Lefevre et al., 1998; Roberts et al., 1999; Oritani et al., 2000). Alle Typ I Interferone reagieren mit einem Rezeptor (R) der aus zwei Untereinheiten (UE) zusammengesetzt wird. Die UE IFN- $\alpha\beta$  RI ist mit ihrer intrazellulären Domäne an die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) gebunden. Tyk2 ist ein Mitglied der Janus-Kinase Familie (Jak). Die Jak sind zytoplasmatische, rezeptorgekoppelte Protein-Tyrosin Kinasen mit vier Mitgliedern Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2. IFN- $\alpha\beta$  RII ist mit der Jak1 intrazellulär verbunden. Bei einer Bindung des Interferons (Ligand) an den Rezeptor phosphorylieren die zwei Kinasen einen Tyrosinrest an der intrazellulären Bindungs-Domäne. Die Phosphotyrosin-Einheit interagiert wiederum mit den Sulfhydryl-Bindungsstellen der Gruppe 2 (SH2) von signalübermittelnden Transkriptionsmolekülen (Stat, *engl. signal transducers and activators of transcription*). Es sind derzeit sieben verschiedene Stat-Moleküle bekannt: Stat 1,2,3,4,5a, 5b und 6. Jedes Stat-Molekül kann von den Kinasen phosphoryliert werden und mit sich selbst oder anderen Bindungspartnern Komplexe bilden.

Signaltransduktionen der Typ I Rezeptoren favorisieren den Signalweg über Stat1/Stat2.

Durch die Interaktion der Phosphotyrosin-Einheit und der SH2-Bindungsstelle werden zytoplasmatische Stat1 und Stat2-Moleküle an die intrazelluläre Bindungsdomäne des

Rezeptors rekrutiert, wo sie durch die Janus-Kinasen phosphoryliert bzw. aktiviert werden. Im Anschluss dissoziieren die aktivierten Stat-Monomere ab und verbinden sich mit einem Interferon Regulationsfaktor (IRF-9, engl. *interferon regulatory factor 9*, synonym p48) zu einem Heterotrimer-Komplex, dem IFN stimuliertem Genfaktor (ISGF-3). ISGF-3 bindet an den Promoter ISRE (ISRE, engl. *IFN stimulated regulatory element*) und induziert die Transkription von verschiedenen Genen. Werden Stat1 und Stat1 am Rezeptor phosphoryliert, so bildet sich ein Homo-Dimer der sogenannte AAF/GAF-Transkriptionsfaktor (alpha aktivierter Faktor/gamma aktivierter Faktor) aus. Dieser bindet an die gamma aktivierte DNA-Bindungsstelle (GAS-Promotor, engl. *gamma activated sites Promotor*) der wiederum die Transkription verschiedenster Gene reguliert (Campbell et al., 2005; Takaoka et al., 2006).

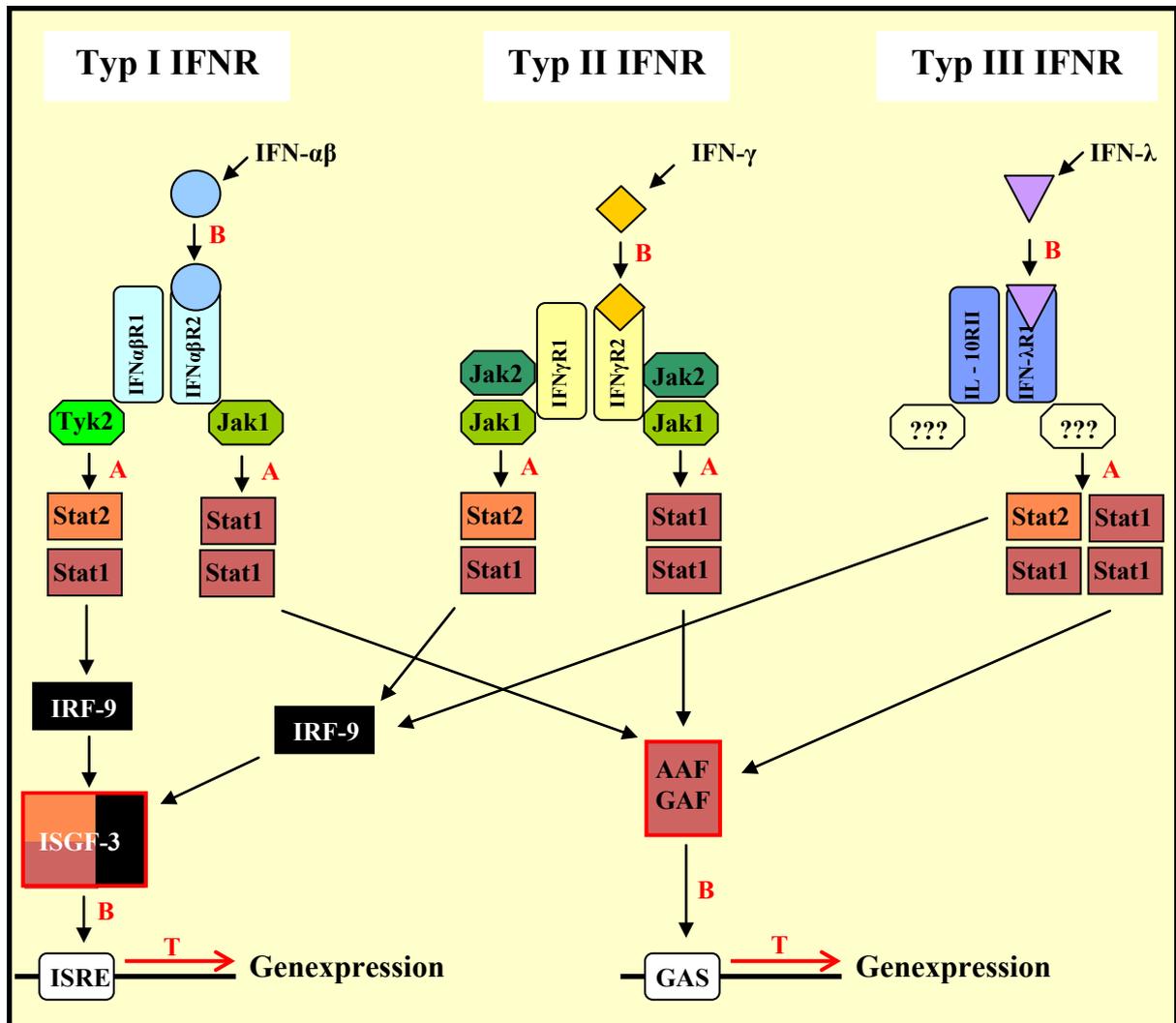
### 1.2.2 B Typ II Interferone

IFN- $\gamma$  ist das einzige Mitglied der Typ II Interferongruppe und ist wichtig bei der Immunantwort gegen virale Erkrankungen. Der Rezeptor für IFN- $\gamma$  ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut die als IFN- $\gamma$  RI und IFN- $\gamma$  RII bezeichnet werden. Die Bindung von IFN- $\gamma$  an den Rezeptor löst wie auch bei den Typ I Interferonen die Jak/Stat Signalkaskade aus und es kommt über die Promotoren ISRE und GAS zu einer Expression von verschiedenen Genen die sich auf MHC-Komplex oder Antigenpräsentierende Zellen auswirken können (Ikeda et al., 2002; Campbell et al., 2005; Takaoka et al., 2006), (siehe Abb. 7).

### 1.2.2 C Typ III Interferone

Die Typ III Interferone sind vor kurzem entdeckt worden (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003; Vilcek et al., 2003). IFN- $\lambda$  hat drei relativ homologe Proteine, die als IFN- $\lambda$ 1 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 2 (IL28B) und IFN- $\lambda$ 3 (IL-29) bezeichnet werden. Wie auch die Typ I Interferone haben die Interferone vom Typ III eine antivirale Funktion, indem sie einige Gene über den Jak/Stat Weg aktivieren, wie bereits für die Typ I beschrieben (siehe oben). Allerdings sind die Typ III Interferone strukturell anders und der spezifische  $\lambda$ -Rezeptor wird aus der Untereinheit IFN- $\lambda$  RI (synonym IL-28R $\alpha$ ) und IL-10 RII gebildet. Die Untereinheit IL-10 RII wird gemeinsam von IL-10, IL-22 und IL-26 genutzt und ist an der intrazellulären Domäne mit Tyk2 verbunden (Kotenko et al., 1996). IFN- $\lambda$  RI hat die Jak-Kinase als Bindungspartner. Wie auch bei den IFN vom Typ I können Stat1 und Stat2 phosphoryliert und Gene durch die Aktivierung von ISRE exprimiert werden. Durch die Bildung eines Stat1/Stat1 Dimer-Komplexes wird, wie auch bei den Interferonen vom Typ II, die

Genexpression durch den GAS-Promotor induziert. Weitere aktivierte Signalkaskaden und welche Kinasen an die Untereinheiten des Rezeptors der Typ III Interferone gebunden sind, ist teilweise noch ungeklärt (Campbell et al., 2005) (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Jak/Stat Signaltransduktion durch Interferon**

Die IFN-Rezeptor vermittelte Aktivierung des Jak/Stat Weges führt zu einer Induktion der beiden Promoter ISRE und GAS, die wiederum zu einer erhöhten Genexpression von über 300 verschiedenen Genen führen.

B = Bindung, A = Aktivierung, T = Transkription Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

### 1.2.3 TNF-induzierte Signaltransduktion

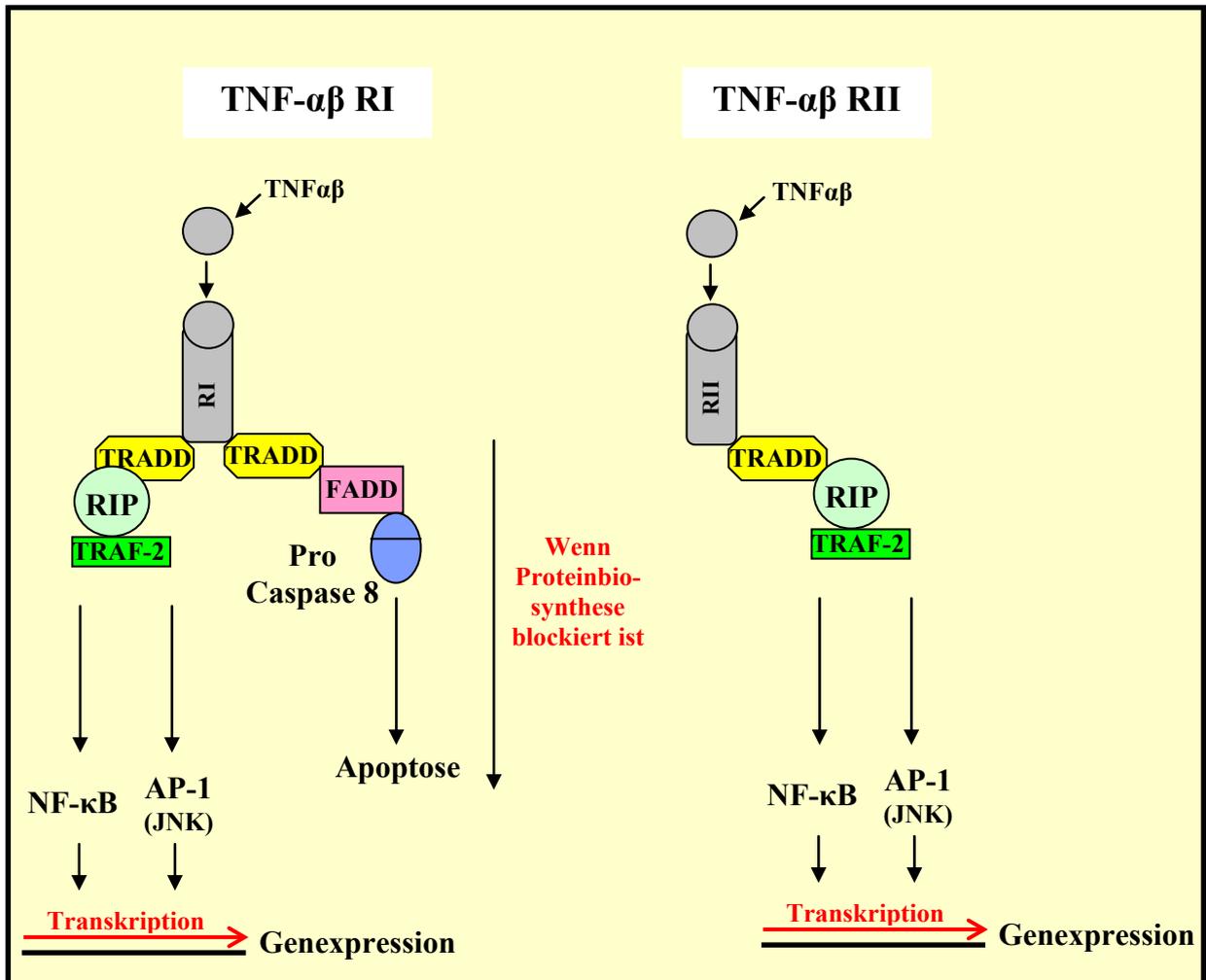
Die Liganden der TNF Superfamilie können über drei Gruppen von Rezeptoren auf Zellen einwirken.

Die erste Rezeptorfamilie trägt eine zytoplasmatische Todesdomäne und führt über deren Aktivierung zur Adaption von weiteren Domänen wie die FAS-assoziierte Todesdomäne (FADD) und die TNF Rezeptor assoziierte Todesdomäne (TRADD) (Chinnaiyan und Dixit, 1996; Kischkel et al., 2000). Im Folgenden wird die Caspase-Kaskade mit anschließender Apoptose induziert. Zu dieser Familie zählen Rezeptoren wie FAS (CD95), TNF- $\alpha$  RI, TNF ähnlicher Apoptose induzierender Ligand-Rezeptor (Trail, *engl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*) 1/2/4 (Trail-R1, Trail-R2, Trail-4), TNF-ähnlicher Rezeptor gekoppeltes Apoptose vermittelndes Protein (TRAMP, *engl. TNF-like receptor apoptosis mediating protein*) und der Ectodysplasin Rezeptor (EDAR).

TNF- $\alpha$  RI vermittelt apoptotische Signale jedoch nur, wenn die Proteinbiosynthese der Zelle blockiert ist. Inflammatorische Gene werden durch TNF- $\alpha$  RI über den nuklearen Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) oder Jun N-terminale Kinase (JNK) induziert (Legler et al., 2003/ Micheau et al., 2003). Rezeptor interagierendes Protein (RIP) bildet einen Komplex mit TRAF-2 und der zytoplasmatischen TRAD Domäne des Rezeptors, die wiederum NF- $\kappa$ B und JNK aktivieren. Zur zweiten Gruppe der Rezeptoren zählen TNF- $\alpha$  RII, CD27, CD30, CD40, Lymphotoxin- $\beta$  Rezeptor, CD134, Transmembranprotein 4-1BB, B-Zell Reifungsantigen (BCMA) und noch einige weitere Mitglieder. Sie tragen einen TNF-R assoziierten Faktor kurz TRAF-Adaptor an ihrer zytoplasmatischen Domäne, der Signaltransduktionswege wie NF- $\kappa$ B, JNK oder Phosphoinositid 3-kinase (PI3K) aktiviert.

Zur Dritten Gruppe der TNF-Rezeptor Superfamilie gehören Mitglieder wie Trail-R3, Decoy Rezeptor 3 (DCR3) und Osteoprotegerin (OPG).

In der folgenden Abbildung (*siehe Abb.8*) ist eine Übersicht der durch TNF vermittelten Signalwege zu sehen:



**Abb. 8: Signaltransduktion durch TNF-αβ**

Die TNF-Rezeptoren vermitteln apoptotische Signale und zusätzlich eine Aktivierung des NF-κB und JNK Weges. Dies kann zu einer Genexpression von vielen verschiedenen inflammatorischen Genen führen und den Zelltod vermitteln. Abbildung erstellt von Jennifer Wellen.

### 1.2.4 Einsatz verschiedener Interferone in der therapeutischen Behandlung

Durch die Produktion inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) während einer Immunantwort werden weitere Immunzellen angelockt. Diese können wiederum das erkrankte oder infizierte Gewebe infiltrieren und die Immunabwehr bilden. Einige Zytokine besitzen immunmodulatorische Wirkung und werden gezielt für die Therapie von Erkrankungen eingesetzt. Vorzugsweise die Gruppe der Interferone werden in der klinischen Anwendung bei Multipler Sklerose, Hepatitis B/C und Krebs erfolgreich verwendet (*siehe Tab. 3*).

#### 1.2.4 A Interferon- $\beta$ Therapie bei Multipler Sklerose

Seit den 90iger Jahren wird Interferon- $\beta$  bei MS als immunmodulatorische Basistherapie eingesetzt. Im Jahr 1993 wurde Interferon- $\beta$ 1b (IFN- $\beta$ 1b) erstmalig als Medikament zur Behandlung der schubförmig-remittierenden Form der Multiplen Sklerose in den USA zugelassen. Das Zulassungsverfahren wurde aufgrund einer durchgeführten multizentrischen Doppelblindstudie gestützt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine subkutane Applikation von IFN- $\beta$ 1b Zahl und Schwere der Schübe reduziert, sowie die kernspintomographisch nachweisbaren Läsionen reduziert. (IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993 und 1995). Im Januar 1996 wurde IFN- $\beta$ 1b auf dem europäischen Markt eingeführt. Dies legte den Grundbaustein für die heutige Therapie mit dem immunmodulatorischen Zytokin IFN- $\beta$ .

Viele Studien haben die genaue Wirkung untersucht und gezeigt, dass mehrere wichtige Wirkungsweisen zu einer Verringerung der Plaques und Schubrate bei Patienten führen:

1. IFN- $\beta$  inhibiert die Proliferation und Zytokinsekretion von autoimmunen T-Zellen (Soilu-Hanninen 1995; van der Meide 1998).
2. IFN- $\beta$  setzt die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke herab und verhindert somit die inflammatorische Infiltration von Immunzellen in das ZNS (Hartung et al., 1996).
3. IFN- $\beta$  induziert Endothelzellen den neuroprotektiven Wachstumsfaktor (NGF, *engl. Nerve growth factor*) zu produzieren (Biernacki et al., 2005).

Über die Bindung von IFN- $\beta$  an den Rezeptor für Typ I-Interferone wird eine Interferon-stimulierte Expression von verschiedenen Gengruppen aktiviert, die in den genannten Wirkungsweisen endet. Die Gene für das antivirale myxovirus Protein A (MxA) oder  $\beta$ -2 Microglobulin, die bei einer IFN- $\beta$  induzierten Immunantwort hoch reguliert werden, dienen in der Klinik als Biomarker für eine erfolgreiche Therapie mit IFN- $\beta$ .

Wie auch bei jeder anderen medikamentösen Therapie gibt es Reaktionen die nicht erwünscht sind. Hautrötungen an der Injektionsstelle, grippeähnliche Symptome (Fieber, Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen) und auch Stimmungsschwankungen bis hin zu Depressionen können als Nebenwirkungen der Interferon- $\beta$  Therapie auftreten. Interferone beeinflussen zusätzlich das Blutbild, was sich an der sinkenden Zahl weißer Blutkörperchen und Blutplättchen zeigen kann. Eine weitere Nebenwirkung der IFN- $\beta$  Therapie ist die mögliche Immunreaktion des Körpers in Form von neutralisierenden Antikörpern (NAb) gegen das therapeutische Interferon. Sie binden an das Molekül und können eine Bindung des Rezeptors und die damit verbundenen Immunantworten verhindern. Die Wirkung von Interferon wird herabgesetzt und führt zu einem verminderten Therapieerfolg (Polman et al., 2003; Bertolotto et al., 2003).

#### **1.2.4 B Interferon- $\alpha$ Therapie bei Hepatitis B und C**

Hepatitis ist eine durch verschiedene Viren, bakterielle und parasitär ausgelöste Leberentzündung, die je nach Verlauf zu schweren Schäden des Organs führen kann. Leberzirrhose oder sogar das Leberzellkarzinom sind Folgeerkrankungen nicht erkannter und unbehandelter Entzündungen. Interferon-Therapien sind durch die antivirale und antiproliferative Wirkung für den Einsatz bei Viruserkrankungen sehr gut geeignet. Interferon- $\alpha$  wird bereits seit mehreren Jahren bei chronischer Hepatitis B und der akuten/chronischen Hepatitis C eingesetzt. Grundlage der Therapie ist vor allem die Hemmung der Virusreplikation, sowie die Aktivierung des Immunsystems durch komplexe Interaktion mit den Zellen der Immunabwehr. Nebenwirkungen sind, wie auch bei der IFN- $\beta$  Therapie, grippeähnliche Symptome, verändertes Blutbild, Stimmungsschwankungen und neutralisierende Antikörper, die einen Therapieerfolg gefährden können.

#### **1.2.4 C Interferon Therapie bei Krebs**

Bei einigen Krebserkrankungen haben sich Interferone ebenfalls bewährt, auch wenn sich die Hoffnungen auf ein universell einsetzbares Medikament nicht erfüllt haben. Zytokine werden bei Krebserkrankungen nicht als einzige Therapieform eingesetzt, sondern ergänzen lediglich andere Verfahren.

<b>Interferon-<math>\alpha</math></b>	Lymphomen Nierenzellkarzinom <i>nach Operationen, um die Gefahr der Metastasierung zu senken</i>
<b>Interferon-<math>\beta</math></b>	Tumore der Nasenhöhlen
<b>Interferon-<math>\gamma</math></b>	bei Weichteilsarkomen <i>in Kombination mit Chemotherapie, eine neue Therapieform, die noch nicht zugelassen ist</i>

**Tab. 3: Einsatz von Interferonen bei Krebserkrankungen**

Interferone bieten bei Tumorerkrankungen mehrere Einsatzmöglichkeiten. Vor allem IFN- $\gamma$  dirigiert natürliche Killerzellen in das entartete Gewebe und aktiviert die Abwehr. Tabelle erstellt von Jennifer Wellen.

Einige Studien zeigen, dass IFN- $\gamma$  die natürlichen Killerzellen (CD8 -T-Zellen) gezielt zum Tumor dirigiert, wo sie Zellen töten, die ihren Identitätsnachweis verloren haben. Dies ist bei virusbefallenen und entarteten Krebszellen der Fall. Im Tumor wird die Bildung eines weiteren Signalmoleküls CXCL10 angeregt. Dies lockt NK-Zellen, die den dazu passenden Rezeptor auf ihrer Oberfläche ausbilden, ins Krebsgewebe. Dieser Effekt lässt sich auch exogen durch direkte Applikation von CXCL10 in das tumoröse Gewebe beeinflussen (Wendel et al., 2008). Zu den Nebenwirkungen zählen wie bei den meisten Interferon-Therapien die grippeähnlichen Symptome, Stimmungsschwankungen, die Beeinträchtigung des Blutbildes und vor allem die neutralisierenden Antikörper. In der nachfolgenden Tabelle (siehe Tab. 4) sind die bekanntesten Interferonpräparate zusammengestellt.

Handelsname/ Hersteller	Wirkstoff	Indikation
Avonex <sup>®</sup> (Biogen)	IFN- $\beta$ 1a	Multiple Sklerose
Betaferon <sup>®</sup> (Bayer Schering)	IFN- $\beta$ 1b	Multiple Sklerose
Extavia <sup>®</sup> (Novartis)	IFN- $\beta$ 1b	Multiple Sklerose
Fiblaferon <sup>®</sup> (Rentschler)	IFN- $\beta$	Allg. Viruserkrankungen
Imukin <sup>®</sup> (Boehr. Ingelheim)	IFN gamma-1b	Chronische Granulomatose
Intron A <sup>®</sup> (Essex Pharma)	IFN- $\alpha$ 2b	Hepatitis B/C
Pegasys <sup>®</sup> (Roche)	pegyliertes IFN- $\alpha$ 2a***	Hepatitis B/C
PegIntron <sup>®</sup> (Essex Pharma)	pegyliertes IFN- $\alpha$ 2b***	Hepatitis C
Rebif <sup>®</sup> (Merck Serono)	IFN- $\beta$ 1a	Multiple Sklerose
Roferon A <sup>®</sup> (Roche)	IFN- $\alpha$ 2a	Karpoi-Sarkom, chronischer Hepatitis C

**Tab. 4: Therapeutische Interferone und ihre Indikation**

\*\*\*pegyliert: Interferon wird mit Polyethylenglykol (PEG) verbunden, somit kommt es zu einer langsameren Freisetzung des Wirkstoffes und einer Verlängerung der Halbwertszeit! Tabelle erstellt von Jennifer Wellen.

### 1.3 Pathologie, Ätiologie und Diagnose der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems und neben der Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter (Noseworthy et al, 2000). Bei dieser Erkrankung werden durch das eigene Immunsystem sowohl die Oligodendrozyten, als auch die Myelinscheiden der Nervenfasern angegriffen und abgebaut. Im frühen Stadium von MS entstehen an einigen Stellen immer wiederkehrende Entzündungsherde, die zu einer Zerstörung des Myelins führen. In diesen Bereichen sind während einer aktiven Entzündung vermehrt T-Zellen und Makrophagen zu finden. Im Anschluss an die entzündliche Reaktion ist eine reaktive Gliose von Astrozyten zu sehen, die geschädigtes Gewebe durch Narbengewebe ersetzen (Lassmann et al., 1997). Solche Areale werden als MS-Plaques bezeichnet. Sie sind durch die pathologischen Veränderungen härter als das umliegende Gewebe und geben somit der Krankheit ihren Namen.

Der grundlegende Prozess der krankhaften Veränderung sind autoimmune Th1-Lymphozyten (CD4-positiv), welche das ZNS-Gewebe infiltrieren und mit verschiedenen Bestandteilen der Myelinscheiden reagieren können. Als Autoantigene dienen Myelinproteine wie Myelin Basisches Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP), Myelinoligodendrozyten Glykoprotein (MOG) oder Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG). Es gibt einige andere Myelinbestandteile, Lipide und Calcium-bindende Proteine, die ebenso als Autoantigene dienen können (Sospedra et al., 2005).

Durch den Verlust der schützenden, isolierenden Myelinscheiden, verkümmern die Axone und führen auf indirektem Wege zu einem Absterben von Nervenzellen (Kassmann et al., 2007). Krankheits-Symptome wie Sehstörungen, Muskellähmungen, Nervenschmerzen, Störung der Blasenfunktion oder ein verändertes Gefühlsempfinden der Haut sind die Folge. Meist verläuft die Krankheit zu Beginn schubförmig. Nach Jahren und bei ca. 10-15% der Patienten geht die Erkrankung direkt in einen chronisch progredienten Verlauf über. Ein direkter chronischer Verlauf ist prognostisch meist ungünstig (Schmidt & Hoffmann: Multiple Sklerose 2006).

Bei der Multiplen Sklerose kann je nach Verlauf und Behandlung mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung nach erfolgter Diagnosestellung von 25-30 Jahren gerechnet werden. Bei einem Drittel der Fälle ist sie sogar länger. Selten ist MS selbst die direkte Todesursache. Meist können sich in Folge der Erkrankung Bronchopneumonien, Pyelonephritiden mit Urämie oder Sepsis entwickeln (Allen et al., 1978), die zum Tode führen.

Die Ursachen für eine Erkrankung an MS sind bisher nicht genau geklärt. Möglicherweise ist eine multifaktorielle Kombination Auslöser für die neurologische Erkrankung, was aufgrund von klinischen, immunologischen und genetischen Daten unterstützt wird. (Sospedra und Martin, 2005)

Eine familiäre Häufung der MS ist bereits länger bekannt (Oksenberg et al., 2001). Genetische Faktoren zeigen in einigen Familien eine höhere Empfänglichkeit für MS wie z.B. Polymorphismen verschiedener Interleukin Rezeptor Gene (IL-7 und IL-2) (Svejgaard A, 2008). Auch eine Assoziation von humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) mit MS ist beschrieben worden. Das Risiko, an MS zu erkranken ist etwa vierfach höher wenn das Allel HLA-DR2 exprimiert wird (Oksenberg et al., 1993). HLA-A3 und HLA-B7 sind Antigene die nur schwach mit MS assoziiert sind. Der genaue funktionelle Zusammenhang von MS und HLA-Antigenen ist noch nicht geklärt.

Weitere Faktoren, die eine Erkrankung triggern können sind virale Infektionen wie Epstein-Barr Virus (EBV) (Wandinger et al., 2000; Martyn 1993) oder bakterielle Keime wie Chlamydia pneumoniae (Cpn) (Sriram et al., 1998; Pucci et al., 2000). Die Autoimmunantwort wird in diesem Fall vermutlich durch eine starke Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz von Virusantigenen zu Bestandteilen der Myelinscheide ausgelöst.

Einige Migrationsstudien lassen eine Verknüpfung mit Umweltfaktoren in geographischen Regionen zu. Bestimmte Faktoren in der Kindheit scheinen nach einigen Jahren zur Manifestation der Erkrankung zu führen (Compston, 1997). Wird das Geburtsland vor dem 15. Lebensjahr verlassen, so haben die Auswanderer das gleiche Risiko an MS zu erkranken, wie die Einwohner des neuen Heimatlandes. Menschen, die wesentlich später emigrieren, nehmen das Erkrankungsrisiko ihres Geburtslandes mit.

Die Diagnose von MS wird neben dem klinischen Verlauf und den neurologischen Symptomen durch verschiedene Untersuchungen wie MRT, evozierte Potentiale (EP) und die Liquoranalytik gestellt. Im MRT können die demyelinisierten Bereiche anatomisch genau lokalisiert werden und darüber hinaus durch Anreicherung des Kontrastmittels Gadolinium Narben von aktiven Entzündungen unterschieden werden. Somit wird das MRT nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die Verlaufskontrolle medikamentöser Therapien eingesetzt.

Der Nachweis einer Immunglobulin Produktion im ZNS Kompartiment bestätigt zusätzlich die Ergebnisse aus dem MRT.

Evozierte Potentiale bezeichnet eine medizinisch-elektrische Messmethode, bei der durch Stimulation verschiedener Reize (visuell, akustisch, sensibel, auditiv) messbare Potentialschwankungen und Verzögerung der Antworten im Großhirn auftreten. Mit Hilfe des

evozierten Potentials kann eine funktionelle Störung durch MS diagnostiziert und lokalisiert werden.

## **2. Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Viele verschiedene Erkrankungen führen zu einer Degeneration von Zellen, Geweben oder ganzen Organen, mit dramatischen Auswirkungen für den menschlichen Organismus. Eine medikamentöse Behandlung kann oft nur Symptome lindern, aber nicht die voranschreitende Zerstörung aufhalten. Eine Kombination von Medikamenten und Stammzelltherapie im Kampf gegen neurodegenerative Erkrankungen ist in Zukunft eine mögliche Behandlungsmethode.

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die Auswirkung von Signalbotenstoffen (Zytokine) auf neurale Progenitor-Zellen näher zu untersuchen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zytokine in der Lage sind Stamm-, Progenitor- und Vorläufer-Zellen massiv zu beeinflussen. Die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  während einer Immunantwort lockt weitere Immunzellen an, die das erkrankte Gewebe infiltrieren und die Immunabwehr verstärken. Einige dieser endogenen Zytokine besitzen starke immunmodulatorische Wirkung und werden gezielt für die Therapie von Erkrankungen eingesetzt. Vorzugsweise die Gruppe der Interferone werden in der klinischen Anwendung bei Multipler Sklerose, Hepatitis B/C und Krebs erfolgreich verwendet.

Einige Studien zeigten bereits eine ausgeprägte Wirkung inflammatorischer Zytokine auf Stamm- und Progenitor-Zellen.

Interferon- $\beta$ , Interferon- $\gamma$  und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  sind die Zytokine, die für die vorliegende Promotionsarbeit verwendet und im Vergleich zu den Ergebnissen der vorherrschenden Literatur analysiert wurden.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die vergleichende Bewertung dieser drei Zytokine mit ihrem Einfluss auf Proliferation, Toxizität und Differenzierung der neuronalen Progenitor-Zellen aus der Maus. Für die experimentellen Untersuchungen der Promotionsarbeit wurden verschiedene zell- und molekularbiologische Methoden angewandt.

### 3.1 Verwendete Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
100kB DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100kB DNA-Marker	New England Biolab, Ipswich, USA
10x BlueJuice™ Gel-Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4,6-diaminido-2-phenylindole, dihydrochlorid (Dapi) FluoroPure	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Basic fibroblast growth factor	Tebu-bio Le Perray an Yvelines Cedex, Frankreich
D-Glucose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) (speziell für die Stammzellen D5879)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Epidermal growth factor human, rekombinant	Tebu-bio Le Perray an Yvelines Cedex, Frankreich
Essigsäure	Merck, Haar, Deutschland
Ethanol (absolut)	Merck, Haar, Deutschland
Ethidiumbromid homodimer-2 liquid 1mM in DMSO	Molecular Probes Invitrogen
Fibronektin	Tebu-bio Le Perray an Yvelines Cedex, Frankreich
Foetales Kälberserum	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
HCl	Merck, Haar, Deutschland
Interferon-β rekombinant Maus	Chemicon, Schwalbach, Deutschland
Interferon-γ rekombinant Maus	Chemicon, Schwalbach, Deutschland
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
N,N-dimethylformamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Natrium-dodecyl-sulfat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Haar, Deutschland
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rnase ZIP Spray	Applied Biosystem, Foster City, USA
Triton-X	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tunicamycin in DMSO	Calbiochem, Gibbstown, USA

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
10x PBS Puffer liquid ph 7,4 ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS Puffer liquid ph 7,4 ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM/F12 Medium ohne Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes-Puffer 1M liquid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Low TE Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Natrium Bicarbonat 7,5% liquid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Pyruvat 100mM liquid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, liquid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-ornithin (PLO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNase/Dnase freies Wasser	Applied Biosystem, Foster City, USA
S.O.C.-Medium 10ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ultrapure 10x TBE-Puffer liquid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24iger-Lochplatten (flacher Boden)	Greiner, Solingen, Germany
25cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Standard)	Greiner, Solingen, Germany
6er-Lochplatten (flacher Boden)	Greiner, Solingen, Germany

96iger-Lochplatten (flacher Boden)	Greiner, Solingen, Germany
Bakterienröhrchen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Bakterienschalen 10cmØ	Greiner, Solingen, Germany
Deckgläschen rund 12mmØ	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eppendorfgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Impfösen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kosmetiktücher	Kimberly-Clark, Mainz, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Optische 96iger-Lochplatten für die PCR	Applied Biosystem, Foster City, USA
Parafilm	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße 200µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10µl	Starlab, Merenschwand, Schweiz
Pipettenspitzen 100-1000µl	Starlab, Merenschwand, Schweiz
Pipettenspitzen 2-200µl	Starlab, Merenschwand, Schweiz
Zellshredder/Qiashredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zentrifugentubes 15ml und 50ml	Greiner, Solingen, Germany

### 3.1.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystem, Foster City, USA
Biofuge Strato	Heraeus, Osterode, Deutschland
Captair Bio PCR-Sterilbank	Erlab, Köln, Deutschland
Fluoro Genios Pro Mikroplattenleser	Tecan, Crailsheim, Deutschland
GDS-Gel Dokumentationssystem	Intas, Göttingen, Deutschland
Heracell 150 Inkubator	Kendro, Schwerte, Deutschland
Herasafe Sterile Werkbank	Kendro, Schwerte, Deutschland
Inverses Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar, Deutschland
IX81-Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroliter Pipette 0,2µl-10µl	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Mikroliter Pipette 100µl-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroliter Pipette 2µl-20µl	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Mikroliter Pipette 20µl-200µl	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA

P25 Powerpack Gelkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Scotsman Eismaschine	Rauschenbach Kältetechnik, Bergneustadt, Deutschland
T Gradient PCR-Maschine	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zero Tare Waage	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland

### 3.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

#### Lösungen für die Zellkultur

##### **Proliferationsmedium**

DMEM/F12 Medium ohne L-Glutamin

10ml B27 Supplement

10ml Penicillin/Streptomycin

5ml L-Glutamin 2mM

1,5g D-Glucose

1,67 ml Natrium-Bicarbonat Lösung

2,5 ml Hepes 1M

20ng/ml EGF

20ng/ml FGF-2

##### **Differenzierungsmedium**

DMEM/F12 Medium ohne L-Glutamin

10ml B27 Supplement

10ml Penicillin/Streptomycin

5ml L-Glutamin 2mM

1,5g D-Glucose

1,67 ml Natrium-Bicarbonat Lösung

2,5 ml Hepes 1M

##### **Einfriermedium**

2ml steriles DMSO (speziell Sigma D5879) gelöst in 8ml FCS steril filtriert

**Poly-L-ornithin Gebrauchslösung (0,001%)**

5ml 0,01% PLO-Lösung gelöst in 45ml sterilem PBS

**Fibronectin-Stammlösung (1mg/ml)**

1mg humanes rekombinantes Fibronectin gelöst in 1ml sterilem PBS

**Fibronectin-Gebrauchslösung (5µg/ml)**

5µl Fibronectin-Stammlösung pro 1ml sterilem PBS

**EGF Stammlösung (100µg/ml)**

100µg EGF gelöst in 1ml sterilem PBS

**EGF Gebrauchslösung (20ng/ml)**

10µl EGF Stammlösung in 50ml Medium

**FGF-2 Stammlösung (100µg/ml)**

100µg FGF-2 gelöst in 1ml sterilem PBS

**FGF-2 Gebrauchslösung (20ng/ml)**

10µl FGF-2 Stammlösung in 50ml Medium

**Interferon-β Stammlösung (1000U/µl)**

100.000U Interferon-β gelöst in 100µl Differenzierungsmedium

**Interferon-β Gebrauchslösung (1-1000U/ml)**

1µl Interferon-β Stammlösung gelöst in 1ml Proliferationsmedium (1000U/ml = LsgA)

100µl Interferon-β LsgA gelöst in 900µl Proliferationsmedium (100U/ml = LsgB)

100µl Interferon-β LsgB gelöst in 900µl Proliferationsmedium (10U/ml = LsgC)

100µl Interferon-β LsgC gelöst in 900µl Proliferationsmedium (1U/ml)

**Interferon-γ Stammlösung (1000U/µl)**

100µg Interferon-γ gelöst in 1ml PBS (1U = 0,1ng)

**Interferon-γ Gebrauchslösung (1-1000U/ml)**

1µl Interferon-γ Stammlösung gelöst in 1ml Proliferationsmedium (1000U/ml = LsgA)

100µl Interferon-γ LsgA gelöst in 900µl Proliferationsmedium (100U/ml = LsgB)

100µl Interferon-γ LsgB gelöst in 900µl Proliferationsmedium (10U/ml = LsgC)

100µl Interferon-γ LsgC gelöst in 900µl Proliferationsmedium (1U/ml)

**BrdU Stammlösung (20mg/ml)**

20mg 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) gelöst in A.bidest.

**BrdU Gebrauchslösung (15µg/ml)**

15µl BrdU Stammlösung gelöst in 20ml Proliferationsmedium

**TNF- $\alpha$  Stammlösung (50µg/ml)**

50µg rekombinantes Maus TNF- $\alpha$  gelöst in 1ml PBS

**TNF- $\alpha$  Gebrauchslösung (0,1-100ng/ml)**

2µg TNF- $\alpha$  Stammlösung gelöst in 1ml Proliferationsmedium (100ng/ml = LsgA)

100µl TNF- $\alpha$  LsgA gelöst in 900µl Proliferationsmedium (10ng/ml = LsgB)

100µl TNF- $\alpha$  LsgB gelöst in 900µl Proliferationsmedium (10ng/ml = LsgC)

100µl TNF- $\alpha$  LsgC gelöst in 900µl Proliferationsmedium (10ng/ml)

**MTT Stammlösung (5mg/ml)**

5mg 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide in 5ml PBS

**MTT Gebrauchslösung (0,5mg/ml)**

1ml MTT Stammlösung in 9ml Proliferationsmedium

**Lösungen für den MTT-Test**

**Lyse-Puffer für den MTT-Test**

10ml N, N-Dimethylformamid

20ml Essigsäure

20g Natrium Dodecyl Sulfat

gelöst in 100ml A.dest.

**Lösungen für die Immunzytochemie**

**Paraformaldehydlösung (4%)**

4g Paraformaldehyd gelöst in 100ml PBS pH-Wert auf 7,4 einstellen

**Blockierlösung für die Immunzytochemie (0,2%BSA, 0,2%FCS, 0,01% Triton-X)**

0,2g BSA

200µl FCS

10µl Triton-X

alles gelöst in 100ml PBS

**Dapi Stocklösung (5mg/ml)**

10mg Dapi gelöst in 2ml A.bidest.

**Dapi Gebrauchslösung (50ng/ml)**

1µl Dapi-Stocklösung in 10ml PBS

**Lösungen für die Molekularbiologie**

**Lyse-Puffer für die mRNA Isolierung**

10µl 2-Mercaptoethanol gelöst 990µl RLT-Puffer aus dem Rneasy Mini Kit

**Gebrauchslösung DNA-Marker (100ng/µl)**

NEB-Marker (500µg/ml)

10µl Marker, 5µl 10x Gel-Ladepuffer gelöst in 35µl A.bidest.

Invitrogen-Marker (1µg/µl)

10µl Marker, 10µl 10x Gel-Ladepuffer gelöst in 80µl A.bidest

**TBE-Puffer für die Gelelektrophorese**

100ml 10xTBE Puffer verdünnt in 900ml A.bidest

**LB-Agar**

35g LB-Agarpulver gelöst in 1l A.bidest., pH-Wert auf 7 einstellen, für 20min bei 121°C autoklavieren und auf 45°C abkühlen lassen bevor der Agar in die Bakterien-Schalen gegeben werden kann.

**LB-Medium**

20g LB-Mediumpulver gelöst in 1l A.bidest., pH-Wert auf 7 einstellen, für 20min bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen lassen bevor Antibiotika zugegeben werden können.

### 3.1.6 Antikörper

#### 3.1.6. A Primärantikörper

Alle Primärantikörper wurden in PBS-Puffer verdünnt.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
ms anti Map2a-c IgG	Sigma-Aldrich	1:2000
ms anti Nestin IgG	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA	1:50
ms anti NeuN IgG	Chemicon	1:100
ms anti O4 IgG	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:50
ms anti $\beta$ -tubulinIII (Tuj1) IgG	R&D Systems	1:500
rb anti GFAP IgG	Dako, Hamburg, Deutschland	1:500
rb anti MBP IgG	Dako	1:500
ms anti BrdU IgG	Sigma-Aldrich	1:1000

#### 3.1.6. B Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden in PBS-Puffer verdünnt.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
gt anti ms IgG (FITC konjugiert)	Chemicon	1:500
gt anti rb IgG (Cy3 konjugiert)	Chemicon	1:800

#### 3.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Caspase3/7Glo Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
pGem Teasy cloning Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Plasmid mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Platinum PCR Supermix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rnase free Dnase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Superscript II First Strand Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sybr-Green Quantitect-Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.1.8 Programme

Bezeichnung	Hersteller
7500 Fast System Software	Applied Biosystem, Foster City, USA
AxioVision Digital Image Processing Software	Carl Zeiss Microimaging GmbH
Graphpad Prism 4	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

### 3.1.9 Primer

#### 3.1.9. A RT-PCR Primer

Ein menschliches Gen besteht aus kodierenden (Exons) und nicht kodierenden Abschnitten (Introns), welche in primäre messengerRNA (mRNA) transkribiert werden. Im Kern werden die Introns aus der primären mRNA rausgeschnitten (Splicing) und nur reife mRNA verlässt den Kern, um anschließend im Zytoplasma von den Ribosomen in ein Protein translatiert zu werden.

Soweit es möglich war wurden die Primer über angrenzende Exone gelegt, so dass eine Amplifikation von genomischer DNA oder primärer mRNA ausgeschlossen werden konnte.

Die Primerpaare (F Vorwärts und R Rückwärts) für die Transkripte der Rezeptoren sind alle persönlich ausgearbeitet und bei MWG-Biotech bestellt worden. Alle Primer wurden lyophilisiert geliefert und nach Herstellerangaben mit einer definierten Menge RNase/DNase freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 100pmol/µl gelöst und bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	GeneID	Sequenz
Ifnar1	ENSMUST00000023689	F 5' cca ata cta aga taa gca tgg a 3' R 5' ctt cta cag cga ccg tgt ct3' (405bp)
Ifnar2	ENSMUST00000023693	F 5' cag tca tga gca aag acg aa 3' R 5' agg ctc atc cat gga gct g 3' (1049bp)
Ifngr1	ENSMUST00000020188	F5' gtt aca cat tcg act ata ctg tg3' R 5' gctgtctggagctgtcactg 3' (503bp)
Ifngr2	ENSMUST00000023687	F 5' gag aat gtt act gtt gga cct 3' R 5' ggt gca ctg atc gct gcc 3' (675bp)

Tnfrs1b	ENSMUST00000030336	F 5' gaa tac tat gac agg aag gct c3' R 5' cag gca cat gag gca cct tg 3' (784bp)
Tnfrs1a	ENSMUST00000032491	F 5' ctc agg tac tgc ggt gct g 3' R 5' ctg cat tgt cag gac gtt gc 3' (440bp)

### 3.1.9. B Q-PCR Primer

Alle Q-PCR Primer wurden bei der Firma Qiagen bestellt. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und wurden nach Herstellerangaben mit 1,1ml TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	GeneID	Hersteller
ms GFAP	NM010277	Qiagen
ms Map2a-c	NM008632	Qiagen
ms Nestin	NM016701	Qiagen
ms PDGFR- $\alpha$	NM011058	Qiagen
ms $\beta$ -actin	NM007393	Qiagen
ms $\beta$ -tubulin III	NM023279	Qiagen

### 3.1.10 Versuchstiere

Für die Präparation der neuronalen Stammzellen wurden weibliche C57/Bl6J Mäuse im Stadium E14 der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf verwendet.

## **3.2. Angewandte Methoden**

### **3.2.1 Präparation der murinen neuralen Stammzellen**

Die experimentellen Versuche in dieser Dissertation sind mit selbst hergestellten neuralen Stammzellen aus embryonalen Mäusen durchgeführt worden. Tragende Mäuse im embryonalen Stadium Tag 14 (E14) der Tierversuchsanstalt Universität Düsseldorf wurden fachgerecht durch Genickbruch getötet, die Embryonen entnommen und dekaptiert. Jedem Embryo wurde mit Hilfe eines binokkularen Mikroskops und mikrochirurgischem Besteck innerhalb einer sterilen Werkbank die mediale und laterale Ganglionische Eminenz (GE) entfernt. Diese wurden dann in ein Zentrifugenröhrchen mit gekühltem sterilem PBS überführt und auf Eis gelagert. Eine vorübergehende Lagerung während der Präparation auf Eis verhindert schädigende autolytische Prozesse und somit das Absterben der Zellen. Anschließend wurde das gesammelte Gewebe mechanisch mit einer Pipette zerkleinert und in Proliferationsmedium mit einer Initialen Zelldichte von 200.000 Zellen/ml in Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert.

### **3.2.2 Kultivieren und Passagieren der neuralen Stammzellen**

Eine Kultivierung und Expansion der neuralen Stammzellen erfolgte in Zellkulturflaschen im Proliferationsmedium. Die Zellen expandieren in unbehandelten Flaschen als frei schwimmende klonale Zellhaufen (sog. Neurosphären) und stellen somit eine Suspensionskultur dar. Alle drei Tage wurde die Hälfte des verbrauchten Mediums vorsichtig mit einer Pipette herausgenommen und die gleiche Menge an frischem Proliferationsmedium hinzu gegeben. Einmal pro Woche wurde das Medium mit den gewachsenen Neurosphären mit einer Pipette in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde in der Zentrifuge für 3min bei 1200rpm zentrifugiert, das Medium vorsichtig dekantiert und 1ml frisches Medium auf das Zellpellet gegeben. Mit Hilfe der 1000µl Mikroliter Pipette wurden die Neurosphären dann mechanisch durch die entstehenden Scherkräfte in einzelne Zellen dissoziiert. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Trituration oder Passagieren (P). In frischem Proliferationsmedium wurden die Zellen weiterhin mit einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml wieder in eine Zellkulturflasche überführt, welche im Wärmeschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert wurde. Die Experimente wurden ausschließlich mit frischen neuralen Stammzellen aus den Passagen 1 bis 6 durchgeführt.

### 3.2.3 Einfrieren von neuronalen Stammzellen

Da die Kultivierung der Zellen recht viele Neurosphären ergab, wurden nach der ersten Passage (P1) einige Aliquots der neuronalen Stammzellen eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Neurosphären aus der Passage 1 wie bereits unter Punkt 3.2.2 beschrieben in ein Greiner Röhrchen überführt, zentrifugiert und das Pellet, in diesem Falle in 3 ml Medium vorsichtig ohne triturieren der Neurosphären, gelöst. Neuronale Stammzellen überleben den Einfriermechanismus besser, sofern sie als Neurosphären eingefroren werden. Aus diesem Grund konnte keine genaue Zellzahl bestimmt werden, aber die Erfahrung hat gezeigt, dass aus einer konfluenten 75cm<sup>2</sup> Flasche mit 25ml Medium sechs Aliquots generiert werden können. In spezielle auf Eis gestellte Einfrierröhrchen wurden 500µl Einfriermedium vorgelegt. Zu dem kalten Einfriermedium wurden 500µl Neurosphären-Suspension (Verhältnis 1:1) dazu gegeben und die Einfrierröhrchen in den -80°C Tiefkühlschrank eingelagert. 24h später wurden die Aliquots mit den Zellen in den Stickstofftank überführt.

### 3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit musste regelmäßig die Lebendzellzahl vor Aussaat der neuronalen Stammzellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben trituriert und 10µl der dissoziierten Zellsuspension mit 10µl Trypanblau und 20µl PBS versetzt.

Der Farbstoff Trypan Blau ist ein Derivat des Azofarbstoffes Benzopurpurin und kann Zellen nur penetrieren, wenn das, von der Zelle, aktiv aufrechterhaltene innere Membranpotential zusammengebrochen ist. Auch wenn einige elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass auch lebende Zellen mit morphologisch intaktem Membranpotential Trypan Blau aufnehmen können, so ist dennoch die lichtmikroskopische Anfärbung der Zelle ein Zeichen für eine irreversible Schädigung. In einer Hämocytozometerkammer nach Neubauer wurden die lebenden, weißen Zellen gezählt und über den Kammerfaktor  $10^4$  und die Verdünnung die Zellzahl/ml bestimmt.

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times \text{VF} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.2.5 Beschichtung der Zellkulturschalen und Glasplättchen

Damit eine Behandlung mit Zytokinen gleichmäßig alle Zellen erreicht und Färbungen mit Antikörpern möglich sind, wurde den Zellen das Anhaften an der Oberfläche durch eine Beschichtung ermöglicht. Aufgrund der Matrix in den beschichteten Schalen wuchsen die Zellen auf einer dünnen, monomolekularen Schicht, die eine Zugänglichkeit für Wachstumsfaktoren und Signalbotenstoffe erheblich verbesserte. Eine Beschichtung von dünnen Glasplättchen ermöglichte darüber hinaus immunzytochemische Reaktionen und das Transferieren der Zellen auf einen Glasobjektträger für die Fluoreszenz-Mikroskopie.

Für die Beschichtung wurde zuerst eine 0,001% Poly-L-ornithinlösung auf die Zellkulturschale bzw. Glasplättchen gebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Lösung entfernt und mehrmals mit sterilem PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde nochmals mit einer 5µg/ml Fibronectinlösung wiederholt und die Schalen im Anschluss direkt weiter verwendet.

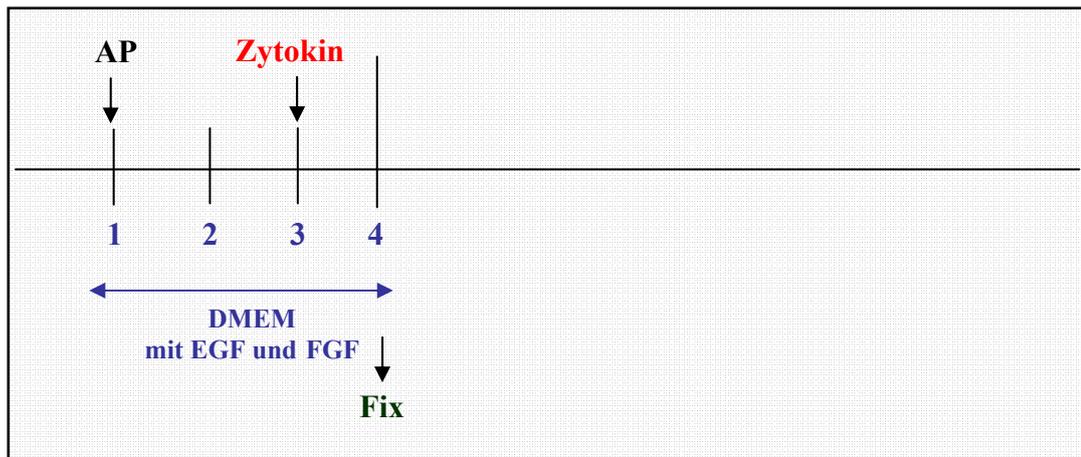
### 3.2.6 Behandlungsschema neuraler Stammzellen für die Experimente

Eine mögliche Proliferationshemmung und Zytotoxizität wurde nur an undifferenzierten, neuralen Stammzellen untersucht.

Die Auswirkung der Zytokine auf die Genexpression ist an undifferenzierten Zellen getestet worden. Weiterhin wurde der Einfluss von Zytokinen auf die Differenzierung getestet. Eine veränderte Genexpression, detektiert durch qPCR, wurde durch immunzytochemische Untersuchungen ergänzt und weiter charakterisiert.

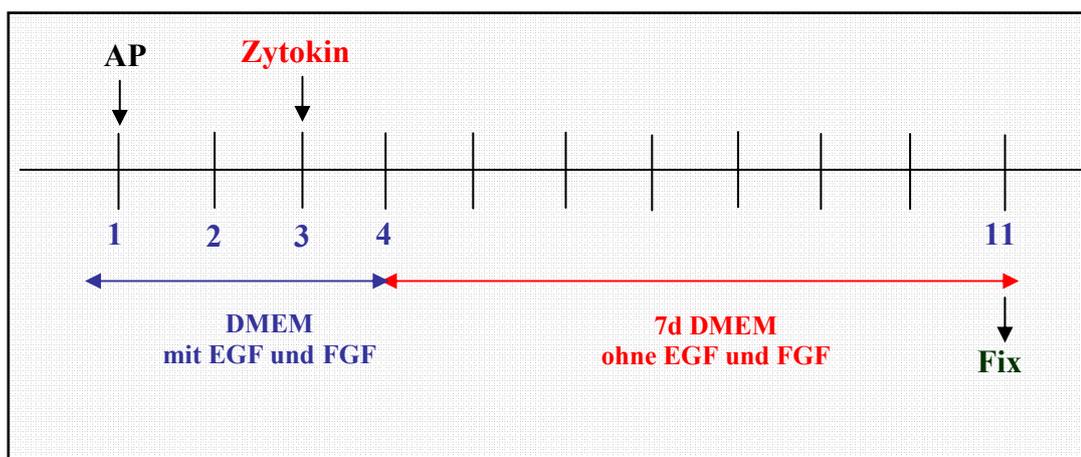
#### **Schema 24h undifferenziert**

Bei diesem Behandlungsschema wurden die Zellen in Proliferationsmedium ausplattiert (AP). Durch eine weitere Inkubationszeit von 48h konnten die Zellen sich erholen und an den beschichteten Materialien anhaften. Die Zytokine wurden für die Experimente in einer Konzentration von 1000U/ml für die Interferone und 100ng/ml für TNF- $\alpha$  eingesetzt. 24h nach der Zugabe der Zytokine zum Proliferationsmedium wurden die Zellen dann in einem undifferenzierten Stadium für die Immunzytochemie mit 4% Paraformaldehyd fixiert und für die qPCR mit RNA-Lysepuffer lysiert.



### Schema 7d differentenziert

Bei diesem Behandlungsschema wurden die Zellen in Proliferationsmedium ausplattiert (AP), 48h inkubiert und konnten dabei an den beschichteten Materialien anhaften, wie auch bei dem Behandlungsschema 24h undifferenziert. Die Zytokine wurden für die Experimente in einer Konzentration von 1000U/ml für die Interferone und 100ng/ml für TNF- $\alpha$  eingesetzt. 24h nach Zugabe der Zytokine mit Proliferationsmedium wurden den Zellen EGF und FGF entzogen und diese für 7d in Differenzierungsmedium weiter kultiviert. In einem ausdifferenzierten Stadium wurden die Zellen für die Immunzytochemie mit 4% Paraformaldehyd fixiert oder mit Lyse-Puffer für die RNA-Isolation lysiert.



### 3.2.7 MTT-Test

Der Nachweis der Populationsgröße von neuronalen Stammzellen unter dem Einfluss von Zytokinen erfolgte mit Hilfe des MTT-Tests. Eine Transformation des gelben wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in blau-violette, wasserunlösliche Formazan Kristalle ist abhängig von der Reduktion durch Succinat und pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH/NADPH funktionierender Mitochondrien. Die Menge des umgesetzten Farbstoffes entspricht somit der Zellatmung und Glykolyserate lebender vitaler Zellen.

Für diesen Versuch wurden die Neurosphären wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben trituriert und durch ein 70µm Nylon-Sieb von größeren Zellklumpen befreit. Mit einer Zellzahl von 15.000 Zellen pro Loch wurden die Zellen in 96iger-Lochplatten in Proliferationsmedium ausgesät und nach einer zweitägigen Erholungsphase mit den Zytokinen behandelt. Die 96iger-Lochplatten waren nicht beschichtet, so dass der Einfluss von Zytokinen auf die Populationsgröße im Neurosphären-Assay getestet wurde.

IFN-β und IFN-γ wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1U/ml, 10U/ml, 100U/ml und 1000U/ml eingesetzt, TNF-α dagegen in den Konzentrationen 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml. Die negative Kontrolle bekam nur PBS. Zu den Zeitpunkten 24h und 48h wurde MTT mit einer Endkonzentration von 0,5mg/ml zu den Zellen gegeben und diese für 2h im Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit einem Lysepuffer bestehend aus 20% Essigsäure, 20% Natrium-dodecyl-sulfat und 10% N,N-dimethylformamid versetzt, der sowohl die Zellen tötet als auch die Formazankristalle auflöst. Mit einem Tecan-Mikroplatten-Leser wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 562nm vermessen.

### 3.2.8 Zytotoxizitäts-Test

Mögliche zytotoxische Effekte von Zytokinen auf neurale Stammzellen wurden über die erhöhte Aktivität von Caspase 3 und 7 nach erfolgter Behandlung im Medium nachgewiesen. Das Promega Caspase3/7Glo Kit detektierte freie Caspasen im Medium über ein luminogenes Substrat. Für diesen Versuch wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben trituriert und mit 15.000 Zellen pro Loch in 96iger Loch-Platten in Proliferationsmedium ausgesät. Nach einer zweitägigen Erholungsphase wurden die Zellen mit den Zytokinen behandelt. Die 96iger-Lochplatten waren nicht beschichtet, so dass die Proliferationshemmung anhand von wachsenden Neurosphären getestet wurde.

IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1U/ml, 10U/ml, 100U/ml und 1000U/ml eingesetzt, TNF- $\alpha$  dagegen in den Konzentrationen 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml. Die negative Kontrolle wurde nur mit PBS behandelt. Zur positiven Kontrolle der Aktivität von Caspasen wurden einige Stammzellen mit einer Endkonzentration von 20 $\mu$ g/ml Tunicamycin einem zytotoxischen Reagenz, welches die Glykosylierung von Proteinen während der Biosynthese hemmt, inkubiert. Zu den Zeitpunkten 12h, 24h und 48h wurde 50 $\mu$ l Medium in eine durchsichtige Elisaplatte überführt, mit 50 $\mu$ l Caspase Glo Reagenz versetzt und für 1h im Dunkeln inkubiert. Mit einem Tecan-Mikroplatten-Leser wurde anschließend die abgestrahlte Luminiszenz in Lichtquanten vermessen.

### 3.2.9 Immunzytochemie

Eine häufig verwendete Methode zum Nachweis von Proteinen mittels Antikörperbindung ist die Immunzytochemie. Mit Hilfe dieser Methode können auch geringe Mengen an Protein (Antigen) im Gewebe nachgewiesen werden. Vorteil gegenüber anderen Nachweismethoden wie z.B. dem Immuno-Blot (Western) ist die genaue Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle. Die Antigen-Antikörper-Komplexe können anschließend durch Antikörper gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden.

Für die immunzytochemische Färbung wurden die neuronalen Stammzellen auf beschichteten Glasplättchen in 24iger-Lochplatten kultiviert. Die Behandlung mit den Zytokinen erfolgte wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben. Zu den passenden Zeitpunkten wurden das Medium mit einer Pipette abgezogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung für 10min bei RT fixiert. Vor der Färbung mussten die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen werden, um das Paraformaldehyd vollständig zu entfernen.

Mit einer Lösung aus 0,2% FCS/ 0,2%BSA/ 0,01% Triton-X wurden die Zellen für 20min auf Eis zuerst permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach dem Entfernen der Blockierlösung wurden die Glasplättchen über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte für 2h bei RT. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen für 5min bei RT mit einer Dapi-Lösung behandelt. Da es sich hier um Fluoreszenzfärbungen handelte wurden die Glasplättchen mit dem Fluoreszenz-Eindeckmittel Vectashield auf Glasobjektträgern eingedeckt. Durch die Lagerung der Objektträger bei 4°C im Dunkeln konnten die Färbungen auch Monate später noch unter dem Fluoreszenz-Mikroskop angeschaut werden.

### 3.2.10 RNA-Isolation aus Stammzellen

Für Experimente per Polymerase Kettenreaktion (PCR) musste die RNA aus den behandelten Zellen isoliert werden. Dazu wurden diese mit einer Zellzahl von 150.000 Zellen/ml in Proliferationsmedium ausplattiert in beschichteten 12er-Lochplatten kultiviert und je nach Versuchsansatz wie unter Punkt 3.2.6 mit den Zytokinen behandelt. Zu den passenden Zeitpunkten wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette abgezogen, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und 350µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Über Qiashredder-Säulen wurden die lysierten Zellen mittels Zentrifugation aufgeschlossen und anschließend nach Herstellerangaben die RNA über das RNeasy mini Kit isoliert.

Um zu vermeiden, dass möglicherweise genomische DNA die RNA verunreinigt, wurde vor der Elution der RNA ein DNase-Verdau durchgeführt. Verunreinigungen mit genomischer DNA können unter Umständen in anschließenden PCR Reaktionen zu falschpositiven Ergebnissen führen. Die isolierte RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.11 Umschreiben von messengerRNA in copyDNA

Aufgrund der Tatsache das mRNA-Moleküle recht instabil sind, werden für die PCR DNA-Kopien verwendet die allgemein als copyDNA (cDNA) bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich von der chromosomalen DNA, da die mRNA bereits durch den Prozess des Schneidens (Splicen) von nicht benötigten Sequenzen (Introns) befreit ist. Der erste Schritt der cDNA-Synthese ist das Hybridisieren eines Primers (Oligo-(dT)-Fragment) an das 3'-poly(A)-segment der mRNA. Im Anschluss daran ist das Enzym Reverse Transkriptase in der Lage an derselben Stelle Nukleotide komplementär zur mRNA an das Oligo-(dT)-Fragment anzuknüpfen. Es entsteht ein mRNA-DNA-Hybrid, welches im nächsten Schritt der Synthese getrennt und die RNA gleichermaßen durch cDNA ersetzt wird.

Für den ersten Schritt der cDNA Synthese wurde nach Herstellerangaben isolierte RNA, Primer und dNTP's in einem 200µl PCR-Reaktionsgefäß gemischt und in einer PCR-Maschine inkubiert. Nach dieser initialen Inkubation wurden in einem Zwischenschritt Synthesepuffer, DTT und die Reverse Transkriptase (Invitrogen, SuperscriptII) zu der Reaktion gegeben und die Gefäße wieder in die PCR-Maschine gestellt, um die RNA in cDNA umzuschreiben (siehe Tab.5). Die fertige cDNA wurde mit DNase freiem Wasser 1:1 verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Syntheseprotokoll**

Schritte	Temperatur	Laufzeit
1. Initiale Inkubation	65°C	5min
	4°C	1min
Pipettierzwischenschritt	-----	-----
2. Umschreiben	25°C	10min
	42°C	50min
	70°C	15min
3. Abkühlen/Aufbewahren	4°C/-20°C	-----

Tabelle 5: Syntheseprotokoll der cDNA

**3.2.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine schnelle und sensitive Methode der Gen-Analyse. Sie beruht auf einer *in vitro* Vermehrung von DNA-Abschnitten durch eine genetische Vorlage (cDNA) und sich mehrfach wiederholende Zyklen. Die exponentielle Amplifikation der Vorlage mit der Zielsequenz (z.B. ein Gen von Interesse) führt zu einer ausreichenden Menge an DNA, welche dann in einem Elektrophorese-Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht werden kann.

**3.2.12. A Reverse Transkriptase-PCR**

Eine Expression von Zytokin-Rezeptoren auf neuronalen Stammzellen wurde durch Nachweis von mRNA mittels der reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) geführt.

In einem 200µl PCR-Reaktionsgefäß wurden 20µl Platinum PCR Supermix mit je 1µl Primer1(Vorwärts), Primer2 (Rückwärts) und cDNA versetzt und mit 2µl Wasser auf 25µl Endvolumen gebracht. In der folgenden Tabelle (Tab.6) ist das Amplifikationsprotokoll der RT-PCR für die Primer

**Amplifikationsprotokoll**

Schritte	Temperatur	Laufzeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	10min
2. Denaturierung	95°C	30sec
3. Annealing	53°C	30sec
4. Elongation	72°C	30sec 1min
5. Abschließendes Annealing	60°C	5min
6. Abkühlen/Aufbewahren	4°C	Pause

**Tab.6: Amplifikationsprotokoll der RT-PCR**

*Schritt 2 bis 4 wurde 34 mal wiederholt!*

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die Proben mit je 5µl Lade-Puffer versetzt und auf ein Agarose-Gel geladen.

**3.2.12. B Quantitative PCR (qPCR)**

Einige Fragestellungen erfordern eine quantitative Ermittlung der Expression von mRNA mittels PCR. Zu diesem Zweck können fluoreszierende Farbstoffe wie z.B. SybrGreen verwendet werden, die mit der doppelsträngigen DNA interkalieren. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge an amplifizierten PCR-Produkten. Bei der relativen Quantifizierung wird ein stabil exprimiertes Haushalts Gen (hier  $\beta$ -Aktin) als interne Kontrolle eingesetzt.

Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen wurden immer drei PCR Reaktionen desselben Gens durchgeführt (Triplett).

Für ein Endvolumen von 20µl wurden 10µl Quantitect SybrGreen PCR-Mix, 6µl A.bidest, 2µl Quantitect Primer Assay und 2µl cDNA in eine optische 96-Loch Platte pipettiert und in die PCR-Maschine gebracht. Die Amplifikation erfolgte für jede cDNA in drei Ansätzen (Triplett), um Pipettier-Schwankungen des eingesetzten Materials auszuschließen. In der folgenden Tabelle (Tab.7) ist das genaue Amplifikationsprotokoll der quantitativen PCR dargestellt.

**Amplifikationsprotokoll der qPCR**

Schritte	Temperatur	Laufzeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	15min
2. Denaturierung	94°C	15sec
3. Annealing	55°C	20sec
4. Elongation	72°C	34sec
5. Abkühlen/Aufbewahren	4°C	Pause

**Tab.7: Amplifikationsprotokoll der qPCR**

Schritt 2 bis 4 wurde 40x mal wiederholt!

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die Messungen mit Hilfe der 7500 System Software ausgewertet und die Daten der Expression in einem Diagramm dargestellt. Der Punkt an dem die gemessene Fluoreszenz von der linearen in die exponentielle Phase übergeht wird als Schwellenwertzyklus oder Treshold-Cycle bezeichnet (CT). Je mehr Vorlagen bzw. Zielsequenzen sich in dem Ansatz befinden, desto eher wird dieser Schwellenwert erreicht. Eine Quantifizierung erfolgt über den Vergleich des CT Wertes der Zielsequenz und der parallel amplifizierten internen Kontrolle. Bei der Berechnung der deltaCT Methode wird der CT Wert der Zielsequenz von dem CT Wert der internen Kontrolle abgezogen ( $dCT = CT\text{-}\beta\text{-Aktin} \text{ minus } CT\text{-Zielsequenz}$ ). Um die Expression zu vergleichen, wurden die dCT Werte der Kontrollen und behandelten Proben in einem Diagramm dargestellt. Diese Darstellung der dCT Werte gibt zusätzlich Aufschluss über die grundlegende Menge an mRNA Expression einer Probe. Zusätzlich wurden die Daten statistisch ausgewertet.

**3.2.13 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Gelelektrophorese werden negativ geladene DNA-Fragmente durch das Anlegen eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe aufgetrennt. Trägermedium ist die Agarose, welche durch Auspolymerisieren zu einem festen Gel wird, in dem sich Poren befinden. Je höher konzentriert die Agarose ist, desto kleiner sind die Poren im Gel. Kleine Moleküle können sich schneller durch die Gelmatrix bewegen als große Moleküle, so dass eine Auftrennung der

Fragmente ermöglicht wird. Ein definierter DNA-Marker dient letztendlich für die genaue Größenbestimmung der Fragmente.

Zu diesem Zweck wurden die amplifizierten PCR-Proben mit 5µl Gel-Ladepuffer versehen und 10µl jeder Probe auf ein 1%iges Agarose-Gel, versetzt mit 0,01% Ethidiumbromid, aufgetragen. Das Agarose-Gel befand sich in einer Gelkammer gefüllt mit 1xTBE-Puffer. Für die genaue Größenbestimmung wurden zusätzlich 0,5µg einer DNA-Leiter als Standard aufgetragen. Bei einer Spannung von 100Volt wurden die Fragmente für ca. 1h Stunde aufgetrennt und anschließend mit dem Gel-Dokumentationssystem unter UV-Licht angeschaut bzw. fotografiert.

#### **3.2.14 Klonieren der qPCR Produkte**

Da die Primer für die Q-PCR bei Qiagen käuflich erworben wurden, sollte zur Kontrolle der Ergebnisse eine Sequenzierung der PCR-Produkte klären, ob diese die richtigen Gene amplifizieren. Aus diesem Grund wurden die kleinen PCR Produkte in den pGemTeasy Vektor einkloniert und anschließend bei der Firma MWG-Biotech sequenziert. Ein Blast der Sequenzen bei NCBI gab Aufschluss über das Produkt. Alle Primer amplifizierten spezifisch.

#### **3.2.14 A Ligation von Vektor und PCR-Produkt**

Das Einklonieren von Genen in den pGemTeasy Vektor funktioniert mit Hilfe von 3'-T-Überhängen am Vektor und den 3'-A-Überhängen am PCR-Produkt (TA-Klonierung). Bei einer quantitativen Amplifikation mit einem abschließenden Annealing von 10min hängt die *Taq*-Polymerase ein zusätzliches Nukleotid (dATP) an das 3'-Ende des synthetisierten Strangs an, welches sich einfach mit den 3'-T-Überhängen des Vektors mit dem Enzym DNA-Ligase zu einer ringförmigen Vektor-DNA verbinden lassen.

Für den Ligationsansatz wurden 3µl PCR-Produkt, 1µl Vektor und 1µl Ligase in 5µl T4-Ligasepuffer in einem 200µl PCR-Reaktionsgefäß gelöst und 1h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in chemokompetente Bakterien (*E. coli*).

#### **3.2.14 B Transformation von chemokompetenten Bakterien durch Hitzeschock**

Die Transformation bezeichnet in der Biologie den Prozess der Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterien. Diese Methode wird in der Gentechnik oftmals verwendet, um Vektor-DNA zu vervielfältigen. Der einfachste Mechanismus, DNA in Bakterien wie z.B. *E. coli*

einzubringen ist die kurzzeitige Permeabilisierung der Zellmembran durch einen Hitzeschock (Transformation).

Dazu wurde ein Aliquot mit chemokompetenten Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut, 5µl des Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Das Eppendorfgefäß mit dem DNA-Bakteriengemisch wurde dann für 90sec in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten. Ein schneller Temperaturanstieg von 4°C auf 42°C stellt für die Bakterien einen extremen Hitzeschock dar und gibt der DNA die Möglichkeit über Poren in der Zellmembran einzudringen. Es folgte eine kurze Inkubation für 5min auf Eis zum Schließen der Poren. Die Bakterien wurden dann in 1ml S.O.C.-Medium aufgenommen und für 2h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Folgenden wurden diese mit einer sterilen Impföse auf ampicillinhaltige Agar-Platten ausgestrichen. Die Kultivierung der Agarplatten erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht. Nur Bakterien die den Vektor aufgenommen haben verfügen über die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

#### **3.2.14 C Aussähen der transformierten Bakterien**

Die Agarplatten enthalten das Antibiotikum Ampicillin. Nicht transformierte Bakterien können nicht auf diesem Agar wachsen, da ihnen das Resistenzgen des Vektors fehlt.

Erst die Aufnahme eines Vektors ermöglicht das Wachstum, wobei es unerheblich ist, ob der Vektor bei der Ligation ein PCR-Produkt aufgenommen hat. Allerdings muss der Vektor zirkulär vorliegen, um von den Bakterien repliziert werden zu können. Somit können ebenfalls Kolonien von Bakterien auf den Agarplatten wachsen, die nur den leeren Vektor, in Folge einer Religation des Plasmides, repliziert haben. Um positive Vektoren zu finden, wurden 20 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einer 96iger-Lochplatte mit je 100µl LB-Medium pro Loch überführt. Die Platte wurde für 2h bei 37°C inkubiert und anschließend die 100µl in 2ml LB-Medium in einem Bakterienröhrchen überführt. Über Nacht wurden die Bakterienröhrchen auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert.

#### **3.2.14 D Präparation der Plasmid-DNA**

Die Plasmid-Moleküle werden von den Bakterien über Nacht in hoher Kopienzahl repliziert und können aus den Bakterien durch eine Präparation herausgelöst und von der genomischen DNA getrennt werden. Für die Präparation wurde das Qiagen Plasmid-mini-Kit verwendet und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

### **3.2.14 E Identifizierung positiver Kolonien**

Isolierte Plasmid-DNA wurde zum Identifizieren positiver Kolonien als Vorlage in der Q-PCR eingesetzt. Dazu wurden 10µl Quantitect SybrGreen PCR-Mix, 6µl A.bidest. 2µl Quantitect Primer Assay und 2ng Plasmid-DNA in eine optische 96iger-Lochplatte pipettiert und in die PCR-Maschine überführt. Befand sich das PCR-Produkt im Vektor befand war ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen. Positive Plasmid-DNA wurde dann in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und mit A.bidest. verdünnt, so daß sich eine Konzentration von 2µg in 20µl A.bidest. ergab. Die fertigen Proben wurden letztlich zum Sequenzieren zur Firma MWG-Biotech geschickt.

### **3.2.15 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 vorgenommen.

#### **3.2.15 A MTT-Test**

Für den MTT-Test wurden jeweils drei unabhängige Zellkulturexperimente mit je sechs Datenpunkten für jede Konzentration gesammelt. Die Daten wurden dann statistisch über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post hoc Test ausgewertet. Ein p-Wert kleiner 0.05 (\*) wurde als statistisch signifikant angenommen.

#### **3.2.15 B Zytotoxizitäts-Test**

Für den Zytotoxizitäts-Test wurden jeweils drei unabhängige Zellkulturexperimente mit je zwei Datenpunkten für jede Konzentration gesammelt. Die Daten wurden dann statistisch über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc Test ausgewertet. Ein p-Wert kleiner 0.05 (\*) wurde als statistisch signifikant angenommen.

#### **3.2.15 C qPCR**

Für die qPCR wurden jeweils drei unabhängige Zellkulturexperimente für jede Konzentration gesammelt. Die Daten wurden dann statistisch über eine Student's T-Test ausgewertet und in Fällen nicht normal verteilter Daten mit dem U-Test. Ein p-Wert kleiner 0.05 (\*) wurde als statistisch signifikant angenommen.

### **3.2.15 D Längenbestimmung der Zellfortsätze**

Die Länge der Zellfortsätze wurde in drei unabhängigen immunzytochemischen Färbungen vermessen. Die Daten wurden folgend statistisch über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc Test ausgewertet Ein p-Wert kleiner 0.05 (\*) wurde als statistisch signifikant angenommen.

### **3.2.15 E Bestimmung der Zellanzahl**

Die Daten der gezählten Zellen wurden in drei unabhängigen immunzytochemischen Färbungen gesammelt. Sie wurden statistisch über eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni post-hoc Test ausgewertet Ein p-Wert kleiner 0.05 (\*) wurde als statistisch signifikant angenommen.

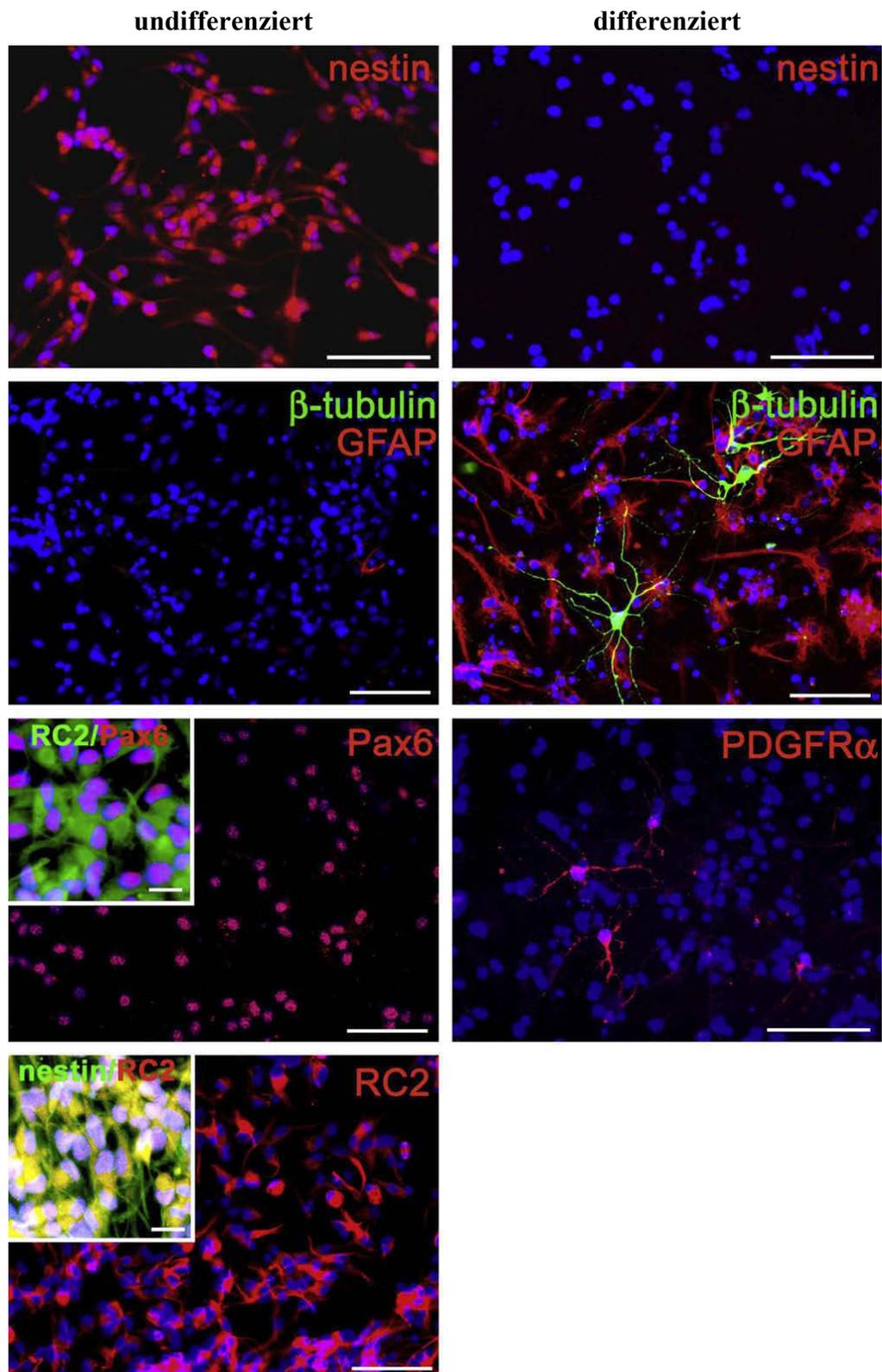
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Markerexpression undifferenzierter und differenzierter neuraler Stammzellen

Bei einem Vergleich von Stammzellen aus verschiedenen Gehirnregionen oder Entwicklungsstadien ist zu erkennen, dass nicht alle Stammzellen dieselbe Expression von Genen und Proteinen aufweisen. Eine genaue Charakterisierung der Zellen ist für die weiteren Versuche und vor allem für die Beschreibung der verwendeten Zellen sehr wichtig.

Proliferierende undifferenzierte Stammzellen der ganglionischen Eminenz aus dem Stadium E14 exprimieren neben dem Stammzellmarker Nestin einige Gene und Proteine wie z.B. das Gen für den Transkriptionsfaktor Pax-6 und den radialen Gliazellmarker RC2. Diese Marker sind bereits bei ausdifferenzierten Zellen nicht mehr nachzuweisen (*siehe Abbildung 9*). Stattdessen ist bei ausdifferenzierten Zellen eine Expression von  $\beta$ -tubulin und GFAP zu sehen, ähnlich wie bei Astrozyten und jungen Nervenzellen. Oligodendrozytäre Vorläuferzellen sind durch die Expression von PDGFR $\alpha$  gekennzeichnet und lassen sich bei differenzierten Zellen noch nachweisen (*siehe folgende Abbildung 8*). Proteine vollständig ausdifferenzierter und reifer Neurone (NF200) und Oligodendrozyten (MAG/MOG/MOBP) konnten nach 7d der Ausdifferenzierung nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (*Daten werden nicht gezeigt*).

Wichtig für undifferenzierte Zellen sind die beiden Wachstumsfaktoren EGF und FGF. Sie halten die Zellen in einem proliferierenden und undifferenzierten Stadium. Wie auch aus Publikationen bekannt, zeigten sehr lang kultivierte Stammzellen einen vorzeitigen Verlust des neurogenen Potentials und gelegentlich eine Ausdifferenzierung durch die Expression von Markern wie  $\beta$ -tubulin, GFAP, NG2 und PDGFR $\alpha$ . Unter dem Einfluss von EGF und FGF war dies bei jungen Passagen der undifferenzierten neuralen Stammzellen nicht zu sehen. Experimente wurden aus diesem Grund nur zwischen den Passagen 1 und 6 durchgeführt, um den Einfluss der Zytokine auf undifferenzierte Stammzellen zu zeigen.

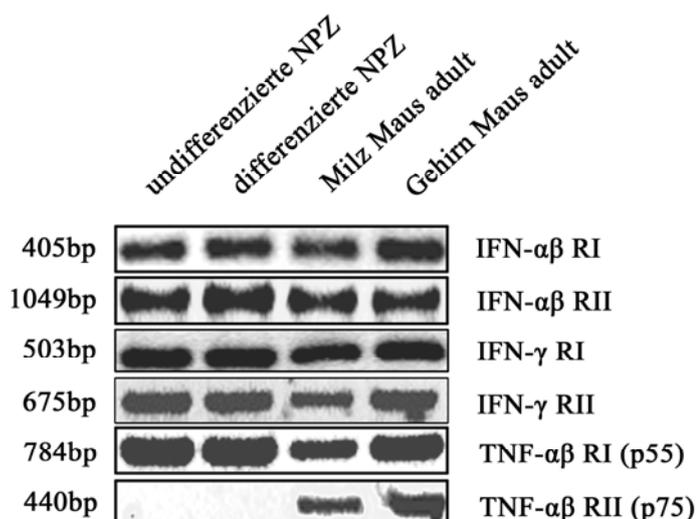


**Abb.9: Charakterisierung neuraler Stammzellen aus der Ganglionischen Eminenz**  
 Undifferenzierte Zellen exprimieren Nestin, Pax-6 und RC2. Differenzierte Stammzellen sind mit  $\beta$ -tubulin, GFAP und PDGFR $\alpha$  nachzuweisen. (Vergrößerung große Bilder 200x, kleine Bilder 400x)

## 4.2 Neurale Stammzellen exprimieren Zytokin-Rezeptoren

Eine Wirkung von Zytokinen auf neuronalen Stammzellen setzt die Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran voraus. Über den Nachweis der Expression von mRNA mit Hilfe der Methode der PCR wurden die verschiedenen Rezeptoruntereinheiten bzw. Rezeptoren sowohl bei undifferenzierten als auch bei differenzierten Stammzellen untersucht. Zur positiven Kontrolle der Methode erfolgte ebenfalls ein Rezeptornachweis bei Milz und Hirngewebe adulter Mäuse.

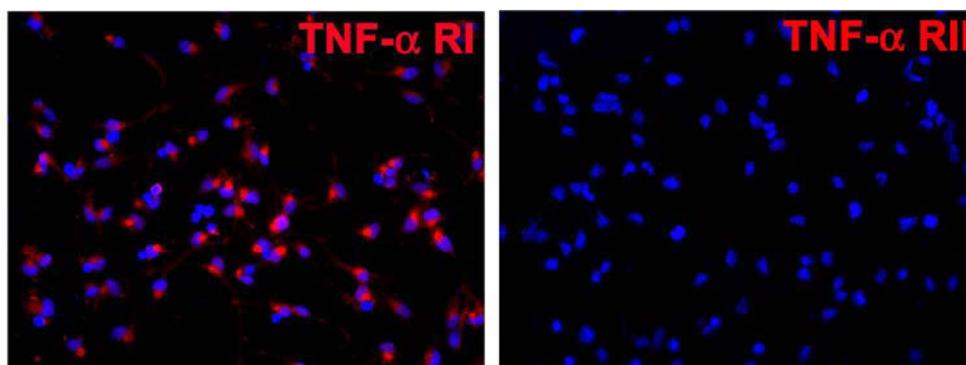
In der folgenden Abbildung (*siehe Abbildung 10*) sind die Ergebnisse der PCR-Experimente zusammengefasst. Sie zeigen eine Expression der beiden Rezeptoruntereinheiten IFN- $\alpha\beta$  RI und IFN- $\alpha\beta$  RII bei allen Proben. Interferone vom Typ I können über diese zwei oben genannten Untereinheiten einwirken und eine Signalvermittlung innerhalb der Zellen erreichen. IFN- $\gamma$  vermittelt seine Signale über die beiden Rezeptoruntereinheiten IFN- $\gamma$  RI und IFN- $\gamma$  RII, die ebenfalls bei allen Proben nachzuweisen waren. Für die Zytokine der Tumor-Nekrose-Faktor Gruppe gibt es zwei unterschiedliche Rezeptoren. TNF- $\alpha$  RI (synonym p55) und TNF- $\alpha$  RII (synonym p75). Der Rezeptor TNF- $\alpha$  RI war bei allen Proben zu detektieren, während der TNF- $\alpha$  RII sowohl von undifferenzierten, als auch von differenzierten neuronalen Stammzellen nicht exprimiert wurde. Dieses Ergebnis wurde mit mehreren unabhängigen Proben wiederholt und erfolgreich repliziert (*siehe Abbildung 10*).



**Abb.10: Nachweis der Genexpression von Zytokin Rezeptoren**

Neurale Stammzellen exprimierten beide Untereinheiten für den IFN-Typ I Rezeptor, beide Untereinheiten für den IFN-Typ II Rezeptor und den TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor I (p55). TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor II (p75) wurde weder von undifferenzierten noch differenzierten Zellen exprimiert. In Milz und Hirngewebe war er jedoch nachweisbar.

Da die Expression des TNF- $\alpha$  RII Rezeptors durch die PCR nicht nachgewiesen werden konnte, in der Literatur jedoch die Expression bei hippocampalen neuronalen Stammzellen beschrieben ist (Neumann et al., 2002), wurden über eine immunzytochemische Färbung von undifferenzierten Stammzellen die Ergebnisse überprüft und die gewonnenen Daten der PCR-Methode nochmals in den immunzytochemischen Färbungen bestätigt. Auch auf Proteinebene war eine Expression des TNF- $\alpha$  RII bei neuronalen Stammzellen nicht zu detektieren. Die publizierten Primer aus der Publikation Neuman et al., 2002 für TNF- $\alpha$  RII wurden ebenfalls synthetisiert und angewandt. Sie brachten die gleichen negativen Ergebnisse. In den folgenden Abbildungen (*siehe Abbildung 11*) ist die Expression der TNF- $\alpha$  Rezeptoren I und II in der immunzytochemischen Färbung zu sehen.



**Abb.11: Immunzytochemischer Nachweis der TNF- $\alpha$  Rezeptoren.**

Undifferenzierte neurale Stammzellen exprimierten nachweislich nur den TNF- $\alpha$  Rezeptor I. (Vergrößerung 200x)

### 4.3 Signalbotenstoffe beeinflussen die Populationsgröße neuraler Stammzellen

Mit Hilfe des MTT-Testes wurde der Einfluss von Zytokinen auf die Populationsgröße von undifferenzierten neuralen Stammzellen nach 24 und 48h in Proliferationsmedium untersucht. Aus jeweils drei unabhängigen Zellkulturexperimenten wurden je Konzentration und Zeitpunkt sechs Datenpunkte gesammelt, der Mittelwert gebildet und dieser mit der Standardabweichung von  $1\sigma$  in einem Diagramm aufgetragen. Über eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test (Bonferroni) wurden die Daten ausgewertet.

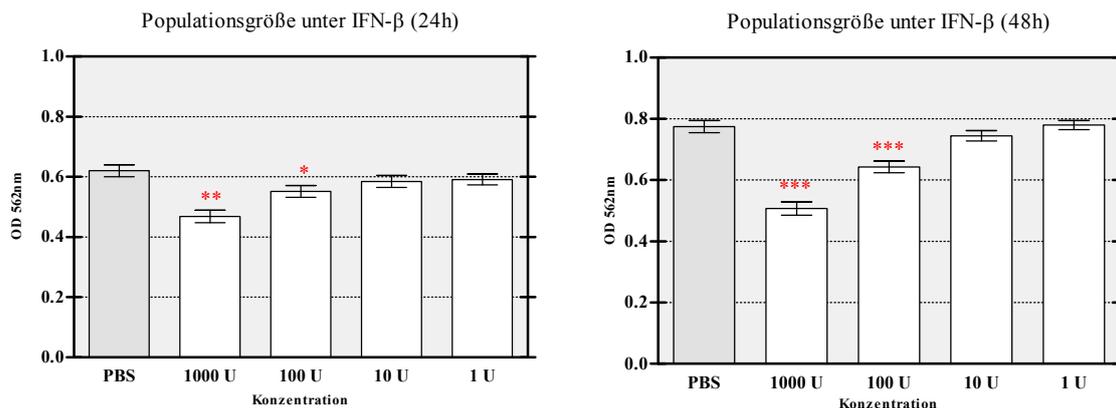
IFN- $\beta$  induzierte bereits nach 24h nach Zugabe einer Konzentration von 1000U/ml und 100U/ml einen signifikant hemmenden Effekt auf die Populationsgröße der neuralen Stammzellen. Dieser Effekt steigerte sich und zeigte auch nach 48h einen Unterschied gegenüber der Kontrolle bei 1000U/ml und 100U/ml. Zu Erkennen war bei niedrigeren Konzentrationen ebenfalls eine leichte Veränderung in der Zellzahl, die sich jedoch bei der statistischen Auswertung als nicht signifikant herausstellte (*siehe Diagramm 1a und b*).

Eine Hemmung durch IFN- $\gamma$  ist 24h nach Zugabe bei allen Konzentrationen statistisch signifikant und verdeutlicht somit eine stärkere Wirkung dieses Zytokins im Gegensatz zu IFN- $\beta$ . Diese Wirkung ist jedoch nur von kurzer Dauer, da nach 48h bereits bei den niedrigen Konzentrationen von 10U/ml und 1U/ml die signifikante Änderung absinkt bzw. gegen null geht (*siehe Diagramm 1c und d*). Im Vergleich der Zytokine miteinander war eine sehr schnell einsetzende und starke Wirkung von IFN- $\gamma$  zu sehen, die nach 48h der Inkubation bereits bei niedrigen Konzentrationen absank. IFN- $\beta$  hatte eine anfänglich schwächere Wirkung, die im Vergleich zu IFN- $\gamma$  länger anhielt und somit im Endeffekt die Veränderung der Größe der Population nachhaltiger störte.

TNF- $\alpha$  erwies sich als das Zytokin mit der geringsten hemmenden Wirkung. Nach 24h war ein signifikanter Effekt bei den hohen Konzentrationen 100ng/ml und 10ng/ml zu sehen, welcher bereits nach 48h wieder nachließ (*siehe Diagramm 1e und f*).

Da MTT lediglich einen Hinweis auf die Größe der Population und die Vitalität der Zellen gibt, wurden einige immunzytochemische Doppel-Färbungen mit dem Basenanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) und Nestin angefertigt, um das Ausmaß der Proliferation in neuralen Vorläuferzellen zeigen zu können. BrdU wird in einer wachsenden Population statt der Base Thymidin in die DNA eingebaut, sofern es den Zellen angeboten wird. Durch Antikörper kann später ein Nachweis BrdU positiver Zellkerne erfolgen, die zeigen, wie teilungsaktiv die Zellen waren (*siehe Abbildung 12*).

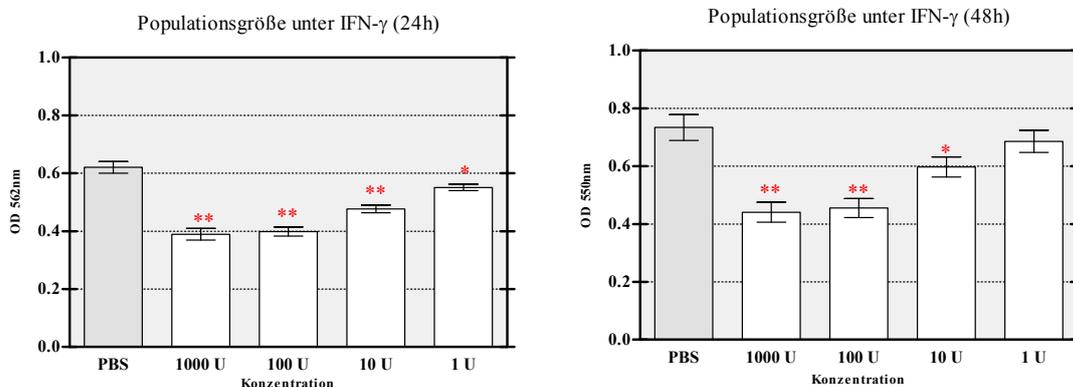
Auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der Experimente und deren statistische Auswertung sowie die immunzytochemischen Färbungen dargestellt.



**Diagramm 1a und b: Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN-β**

Aufgetragen wurden die Mittelwerte der optischen Dichte im MTT-Test in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin IFN-β. Die Standardabweichung beträgt 1σ. Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

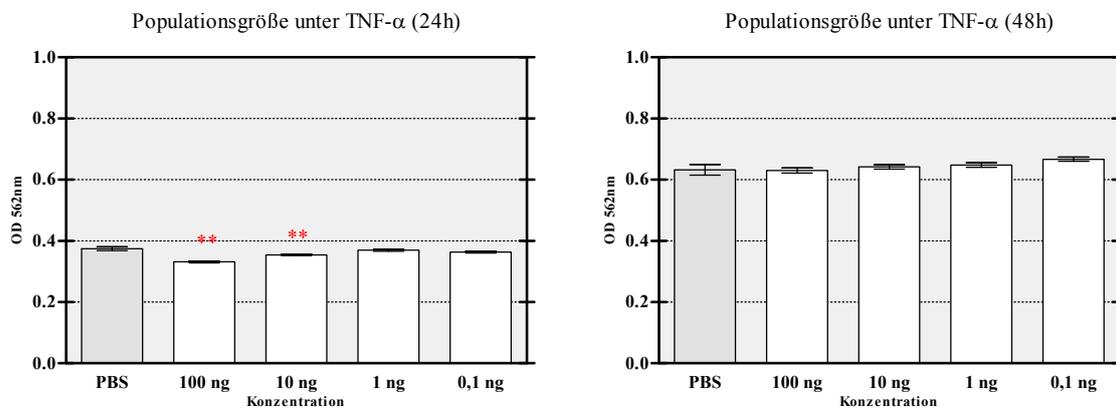
$P < 0,001$ \*\*\*;  $P < 0,01$ \*\*;  $P < 0,05$ \*     unbehandelt     behandelt



**Diagramm 1c und d: Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN-γ**

Aufgetragen wurden die Mittelwerte der optischen Dichte im MTT-Test in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin IFN-γ. Die Standardabweichung beträgt 1σ. Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

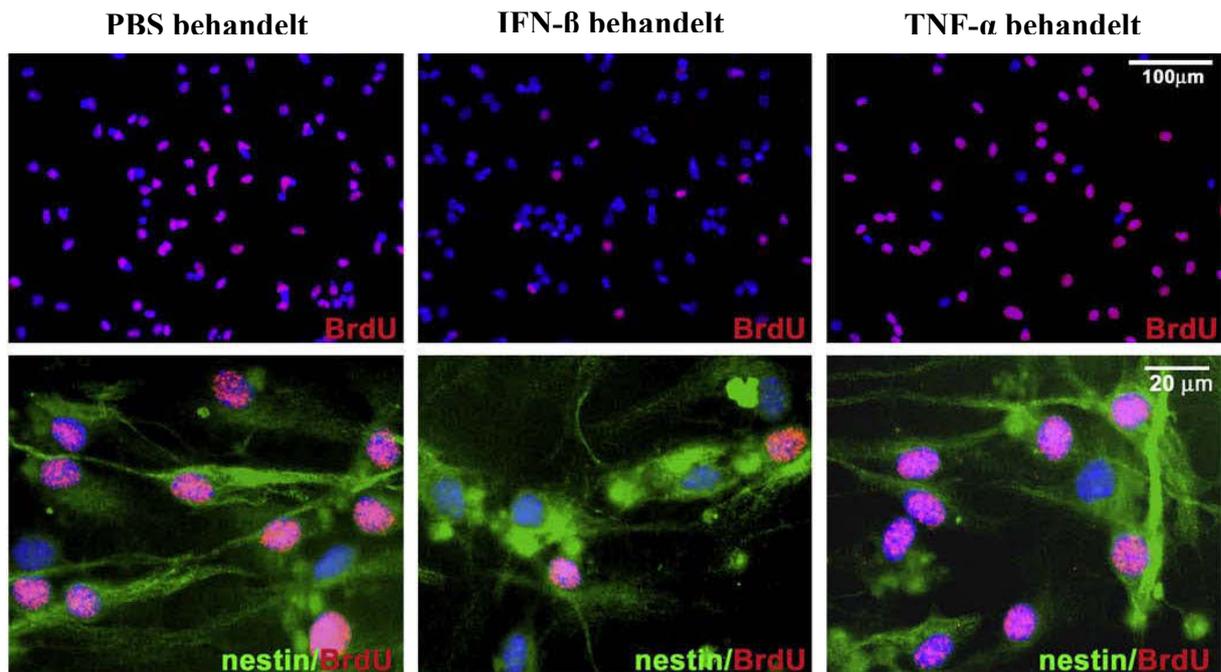
$P < 0,001$ \*\*\*;  $P < 0,01$ \*\*;  $P < 0,05$ \*     unbehandelt     behandelt



**Diagramm 1e und f: Größe der Population undifferenzierter neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von TNF-α**

Aufgetragen wurden die Mittelwerte der optischen Dichte im MTT-Test in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin TNF-α. Die Standardabweichung beträgt 1σ. Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$ \*\*\*;  $P < 0,01$ \*\*;  $P < 0,05$ \*     unbehandelt     behandelt



**Abb.12: Proliferationshemmung neuraler Stammzellen durch Zytokine**

PBS behandelte, Nestin positive Stammzellen zeigten eine normale Proliferation im Gegensatz zu Zytokin behandelten Zellen. Insbesondere Interferone können die Proliferation hemmen, wie hier am Beispiel von IFN- $\beta$  zu sehen ist. Es sind wesentlich weniger BRDU positive Kerne zu sehen. (Vergrößerung obere Reihe 100x ; untere Reihe 400x)

#### 4.4 IFN- $\gamma$ wirkt zytotoxisch auf neurale Stammzellen

Neben der Hemmung der Proliferation ist ebenfalls eine toxische Wirkung von Zytokinen auf Zellen beobachtet worden. Ein möglicher toxischer Einfluss von Zytokinen auf undifferenzierte neurale Stammzellen wurde nach einer Inkubationszeit von 24h und 48h in Proliferationsmedium über die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 gemessen.

Sterben Zellen ab, so müssen DNA und Proteine der Zelle fragmentiert und abtransportiert werden. Die Zerkleinerung der DNA und Spaltung von Proteinen wird durch Caspasen bewerkstelligt. Insbesondere Caspase 3 und 7 sind Effektor-Caspasen die wiederum Nukleasen für die DNA-Spaltung aktivieren können. Eine hohe Aktivität an Caspasen 3 und 7 bedeutet demnach eine hohe Zelltod-Rate. Mit Hilfe des Caspase-Glo-Tests werden Caspase 3 und 7 durch die Bildung eines Komplexes mit einem luminogenen Substrat gebunden und können durch die Messung der Lichtquanten quantitativ ermittelt werden.

In einem Zellkulturexperiment wurden je Konzentration und Zeitpunkt sechs Datenpunkte gesammelt, die Daten gegen die Kontrolle prozentual normalisiert und der Mittelwert gebildet. Eine Normalisierung der Daten musste erfolgen, da die Ergebnisse der Messung von Lichtquanten zu verschiedenen Zeitpunkten aufgrund der Abweichungen nicht vergleichbar waren. Aufgetragen wurden somit die Mittelwerte in Prozent mit einer Standardabweichung von  $1\sigma$ . Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem post-hoc Test (Bonferroni).

Unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  war nach 24h keine ansteigende Caspase-Aktivität zu sehen. Erst 48h später war eine mehr als doppelt so hohe Aktivität bei drei von vier eingesetzten Konzentrationen zu verzeichnen. Eine zytotoxische Wirkung von IFN- $\gamma$  setzte also zeitverzögert ein. Ein schädlicher Zellkultureffekt konnte ausgeschlossen werden, da die unbehandelten und IFN- $\beta$  Proben nach der Zeit von 48h keinen derartigen Effekt aufwiesen (*siehe Diagramm 2c und d*).

Durch die Behandlung mit IFN- $\beta$  war im Vergleich zum IFN- $\gamma$  lediglich 24h nach Zugabe bei der höchst eingesetzten Konzentration von 1000U/ml ein signifikanter Anstieg der Caspasen zu verzeichnen, der nach 48h der Inkubation wieder deutlich abnahm. IFN- $\beta$  war also nur kurzzeitig in einer hohen Konzentration leicht toxisch (*siehe Diagramm 2a und b*).

Alle vier eingesetzten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  zeigten 24h nach Zugabe einen umgekehrten Effekt. Die Caspase-Aktivität ging gegenüber der mit PBS behandelten Probe zurück und sprach eher für einen zytoprotektiven Effekt durch TNF- $\alpha$ . Erst nach einer Inkubation von 48h stieg die toxische Aktivität bei den hohen Konzentrationen von 100ng/ml

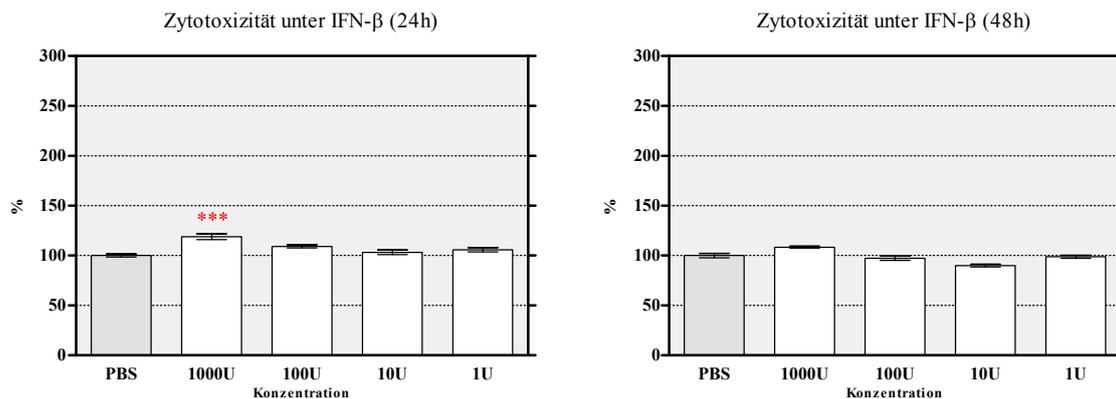
und 10ng/ml leicht an. Nicht toxisch zeigten sich die Proben die mit 1ng/ml und 0,1ng/ml behandelt wurden (*siehe Diagramm 2e und f*).

Eine positive Kontrolle der Methode mit dem zytotoxischen Proteinbiosynthesehemmer Tunicamycin zeigte zu den Zeitpunkten 24h und 48h eine sehr hohe Konzentration an Caspase 3 und 7. Nach Zugabe von Tunicamycin war 24h später eine dreifach höhere Aktivität von Caspasen zu verzeichnen. Die Wirkung ließ nach 48h der Inkubation deutlich nach, zeigte trotz allem immer noch eine höhere Aktivität von Caspasen, als die mit PBS behandelten Zellproben (*siehe Diagramm 2g*).

Vergleicht man die drei Zytokine, so stellte sich IFN- $\beta$  als das Zytokin mit der geringsten toxischen Wirkung dar. Lediglich der Wert 1000U/ml war 24h nach Inkubation in der Auswertung als statistisch signifikant zu verzeichnen. IFN- $\gamma$  entfaltete seine toxische Wirkung zeitverzögert 48h nach Zugabe, allerdings war bei drei von vier eingesetzten Konzentrationen ein vergleichbar hoher Anstieg von Caspasen zu messen. IFN- $\gamma$  ist somit das Zytokin mit der stärksten zytotoxischen Wirkung auf neurale Stammzellen.

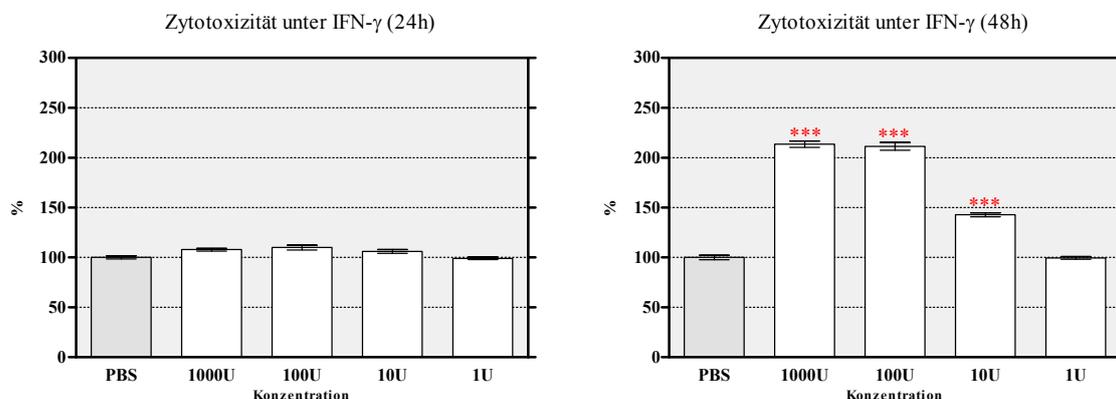
Eine verminderte Caspase-Aktivität, ausgelöst durch TNF- $\alpha$  gegenüber den zwei Interferonen, ergab nach 24h einen scheinbar gegenteiligen protektiven Effekt, der nach 48h bei den hohen Konzentrationen in toxische Aktivität umschlug.

Auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der Experimente und die statistische Auswertung der Daten dargestellt (*siehe Diagramm 2a-g*).



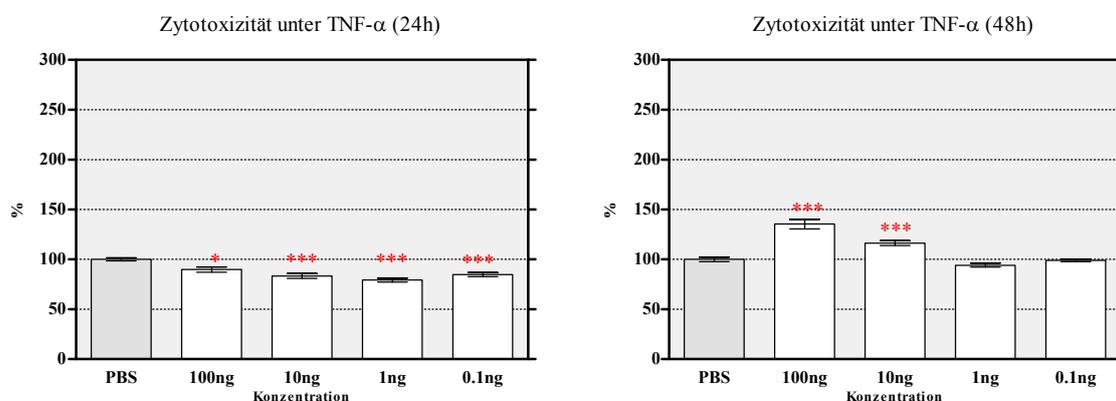
**Diagramm 2a und b: Zytotoxische Wirkung von IFN- $\beta$  auf undifferenzierte neurale Stammzellen**  
 Aufgetragen wurden die normalisierten Werte der gemessenen Lichtquanten im Caspase-Test (Prozent) in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin IFN- $\beta$ . Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt



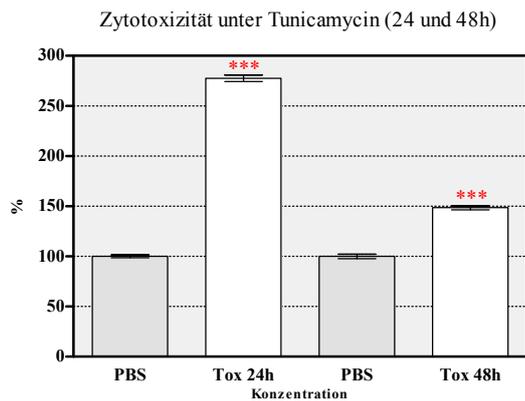
**Diagramm 2c und d: Zytotoxische Wirkung von IFN- $\gamma$  auf undifferenzierte neurale Stammzellen**  
 Aufgetragen wurden die normalisierten Werte der gemessenen Lichtquanten im Caspase-Test (Prozent) in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin IFN- $\gamma$ . Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt



**Diagramm 2e und f: Zytotoxische Wirkung von TNF- $\alpha$  auf undifferenzierte neurale Stammzellen**  
 Aufgetragen wurden die normalisierten Werte der gemessenen Lichtquanten im Caspase-Test (Prozent) in Abhängigkeit zur Konzentration des Zytokin TNF- $\alpha$ . Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt



**Diagramm 2g: Zytotoxische Wirkung von Tunicamycin auf undifferenzierte neurale Stammzellen**

Tunicamycin ist ein Proteinbiosynthesehemmer und wirkt auf Zellen stark toxisch. Ein Anstieg von Caspase-Aktivität nach Tunicamycin Behandlung war die Positivkontrolle für die Methode. Aufgetragen wurden die normalisierten Werte der gemessenen Lichtquanten im Caspase-Test (in Prozent) bei Tunicamycin (20µg/ml) behandelten Proben. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$ \*\*\*;  $P < 0,01$ \*\*;  $P < 0,05$ \*     *unbehandelt*     *behandelt*

#### 4.5 Zytokine verändern die Genexpression neuraler Stammzellen

In der Literatur wird beschrieben, dass Zytokine neben der Proliferationshemmung und Zytotoxizität zusätzlich über den Jak-Stat-Signaltransduktionsweg die Transkription von über 300 verschiedenen Genen induzieren können. Insbesondere die Aktivierung der Stat-Gene kann bei Stammzellen die Ausdifferenzierung eines bestimmten Zelltypen favorisieren. Aus diesem Grund wurde die quantitative Expression von Genen verschiedener neurobiologischer Zellmarker im undifferenzierten Zustand (24h) untersucht und die Auswirkungen der Zytokin Behandlung auf Ausdifferenzierung (7d) der Stammzellen beobachtet.

In drei unabhängigen Zellkulturexperimenten wurden die Zellen mit den drei Zytokinen behandelt und im Anschluss mittels der quantitativen PCR auf fünf verschiedene Zellmarker untersucht.

Als Gliamarker wurden GFAP und PDGFR $\alpha$  verwendet. GFAP wird vor allem von Astrozyten exprimiert, während PDGFR $\alpha$  bei Oligodendrozyten Stammzellen zu finden ist. Map2a-c sowie  $\beta$ -tubulin sind zwei Marker für neuronale Stammzellen und junge Neurone. Nestin ist ein Stammzellmarker und wird von undifferenzierten Stammzellen exprimiert und geht bei der Ausdifferenzierung der Zellen nach und nach zurück. Für die interne Kontrolle wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin, einem zu jedem Zeitpunkt stabil exprimiertem, so genannten „Haushaltsgen“, herangezogen. Ausgewertet wurden die Schwellenwertzyklen (CT-Werte) nach der  $\Delta$ CT Methode, das bedeutet CT-Wert der internen Kontrolle  $\beta$ -Aktin minus dem CT-Wert des Gens von Interesse (*siehe Material und Methode, qPCR*). Aus den gesammelten CT-Werten wurde ein Mittelwert gebildet und mit einer Standardabweichung von  $1\sigma$  aufgetragen. Statistisch ausgewertet wurden die Daten über einen gepaarten Student's T-Test und in Fällen der nicht Normalverteilung über einen U-Test ausgewertet.

Durch die Behandlung der neuralen Stammzellen mit IFN- $\beta$  stieg insbesondere die Expression der Gene GFAP und  $\beta$ -tubulin an. Differenzieren die Zellen 7d durch Wachstumsfaktorentzug unter dem Einfluss von IFN- $\beta$  aus, so sind nach 7d Tagen keine Unterschiede mehr in der Genexpression zu erkennen. Einzig der Zellmarker PDGFR $\alpha$  der junge Oligodendrozyten detektiert, scheint bei den behandelten Proben nach 7d Differenzierung anzusteigen, doch bei der statistischen Analyse stellte sich dieser Wert als nicht signifikant heraus (*siehe Diagramm 3a und b*). Möglicherweise ergab sich hier aufgrund der hohen Standardabweichung keine statistische Signifikanz, zeigt jedoch eine Tendenz.

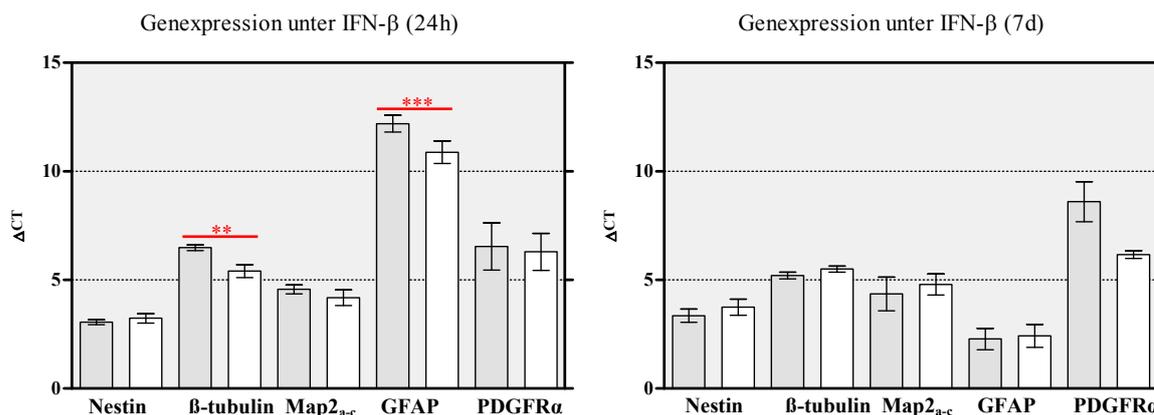
Eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  zeigt eine ähnliche Veränderung der Genexpression. Die Gene für  $\beta$ -tubulin und GFAP werden stark hoch reguliert. Vor allem der Marker  $\beta$ -tubulin junger

Neurone weicht bereits 24h nach IFN- $\gamma$  Zugabe um ca. 4 Zyklen von der mit PBS behandelten Kontrolle ab und ist somit statistisch hoch signifikant. Nach 7d gleichen sich die Werte wieder an. Lediglich der Wert für  $\beta$ -tubulin ist noch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (*siehe Diagramm 3c und d*). Die Expression des Stammzellmarkers Nestin wird unter Einfluss durch IFN- $\gamma$  weniger, was für eine stärkere Ausreifung der Zellen spricht.

Im Vergleich sieht man ähnliche Effekte bei den beiden Interferonen Typ I und Typ II, die sich auf  $\beta$ -tubulin und GFAP auswirken. Es zeigt sich auch hier wieder eine stärkere Wirkung des IFN- $\gamma$  im Gegensatz zum IFN- $\beta$ . Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -tubulin und GFAP sowohl bei IFN- $\beta$  als auch bei IFN- $\gamma$  angefertigt.

Im Gegensatz zu den Interferonen zeigte TNF- $\alpha$  eine andere Wirkung auf die Genexpression der neuralen Stammzellen.  $\beta$ -tubulin und GFAP sind hier nicht betroffen, stattdessen wirkt sich TNF- $\alpha$  auf den Marker junger Neurone Map2a-c aus, der bereits 24h nach Zugabe deutlich herab reguliert wurde. Durch den Einfluss über 7d verstärkte sich dieser Effekt noch ein wenig, so dass eine statistische Signifikanz von  $P < 0,01$  ermittelt werden konnte. Der Marker Nestin zeigte auch bei TNF- $\alpha$  eine Tendenz zur Abnahme, die für eine vorzeitige Ausdifferenzierung der Zellen spricht. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant (*siehe Diagramm 3e und f*).

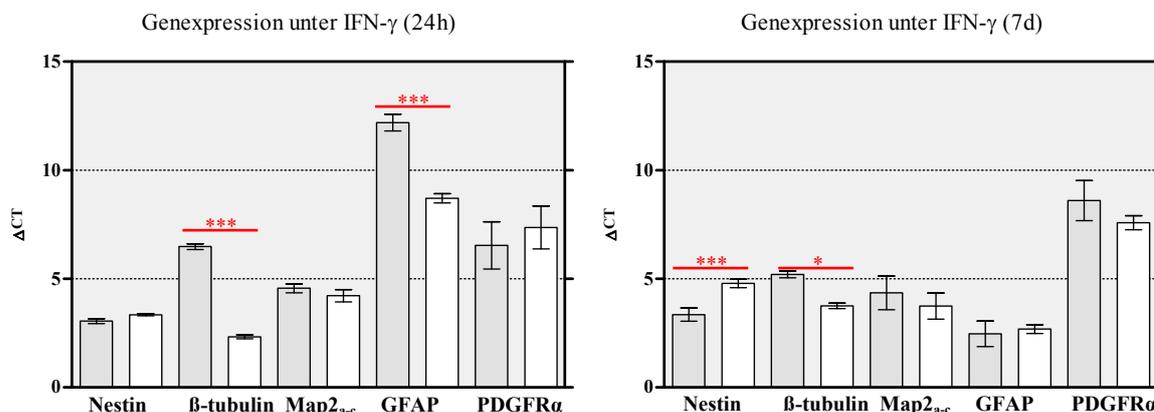
Durch den Einfluss von TNF- $\alpha$  wird der Neuronenmarker Map2a-c herunter reguliert was einen Hinweis auf Ausdifferenzierung der jungen Neurone zu reifen Nervenzellen sein kann. Durch die quantitative Ermittlung des reifen Neuronenmarkers NF200 mittels qPCR zeigte sich, dass die Population von neuralen Stammzellen trotz TNF- $\alpha$  Behandlung recht unreif waren und NF200 nur sehr gering bei undifferenzierten und auch bei ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird. Weder in den Kontrollen noch in den behandelten Proben waren die Daten der qPCR sicher auswertbar. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in immunzytochemischen Färbungen der ausdifferenzierten Zellen. (*Daten werden nicht gezeigt!*)



### Diagramm 3a und b: Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\beta$

Die Behandlung der Zellen mit IFN- $\beta$  veränderte die Expression der Gene  $\beta$ -tubulin und GFAP. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der gemessenen  $\Delta$ CT-Werte aus der quantitativen PCR. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

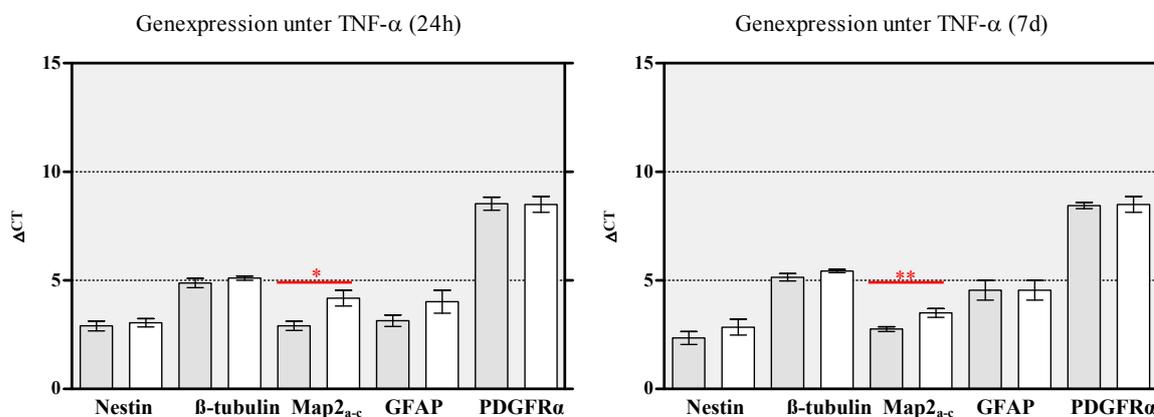
$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \* \*     unbehandelt     behandelt



### Diagramm 3c und d: Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$

Durch IFN- $\gamma$  wurde die Expression der Gene Nestin,  $\beta$ -tubulin und GFAP verändert. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der gemessenen  $\Delta$ CT-Werte aus der quantitativen PCR. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \* \*     unbehandelt     behandelt



### Diagramm 3e und f: Veränderte Genexpression unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$

Durch TNF- $\alpha$  wurde insbesondere die Expression des Markers Map2<sub>a-c</sub> vermindert. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der gemessenen  $\Delta$ CT-Werte aus der quantitativen PCR. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

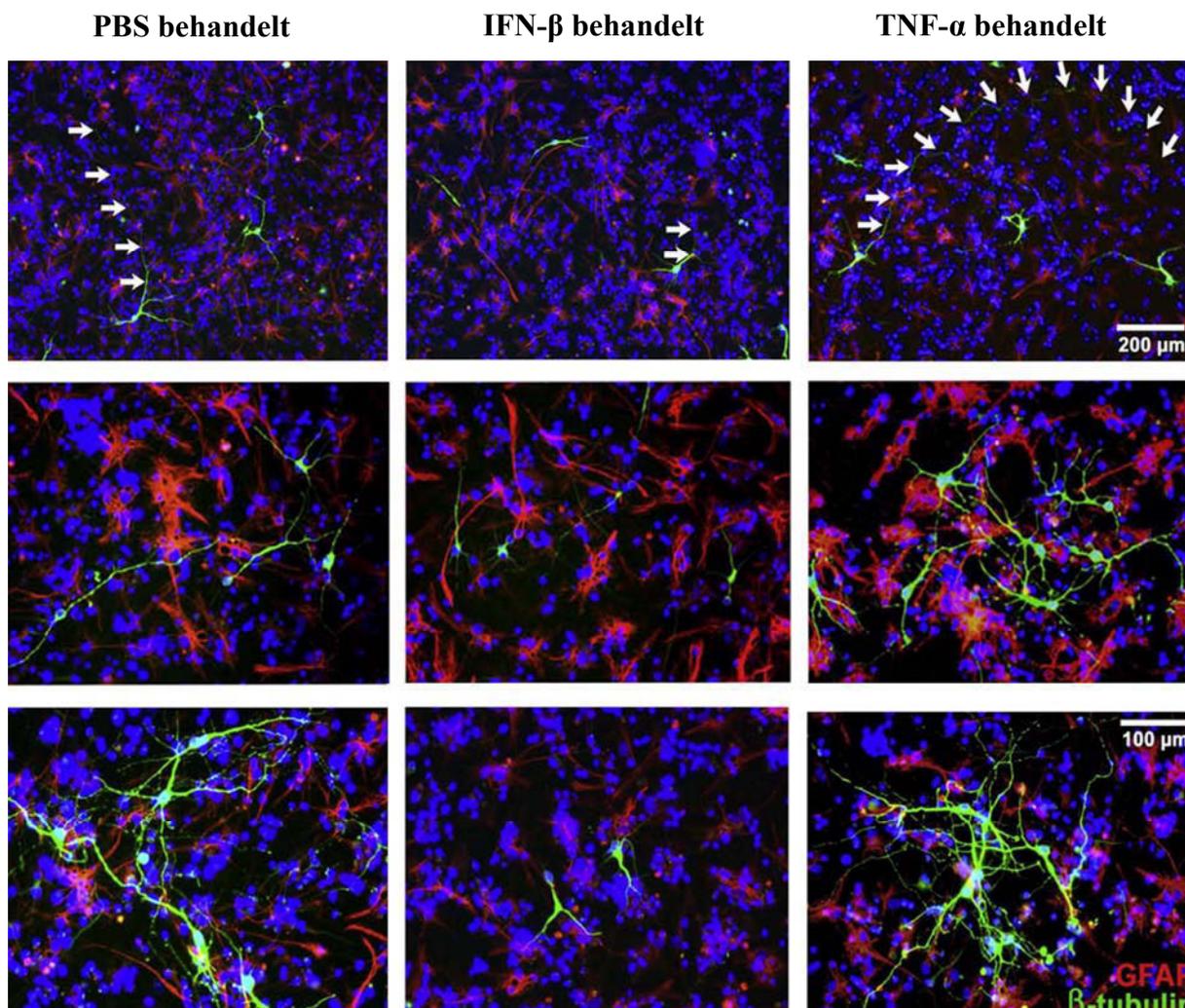
$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt

#### **4.6 Morphologische Veränderungen neuraler Stammzellen durch Zytokine**

Die quantitative PCR ermittelt lediglich die Menge an Kopien von transkribierten Genen und gibt keinerlei Aufschluss über mögliche Veränderungen der Transkription von Proteinen der Zellen. Welchen Einfluss Zytokine auf Proteinbiosynthese und Entwicklung von verschiedenen Morphologien neuraler Stammzellen nehmen können, kann man mit Hilfe der Färbung von Antikörpern (Immunzytochemie) darstellen. Einige Effekte der Zytokine die bei dem quantitativen Nachweis nicht zu sehen waren oder sich bereits angedeutet hatten, konnten intensiver untersucht werden.

#### 4.6.1 IFN- $\beta$ beeinflusst die neuronale Differenzierung von neuronalen Stammzellen

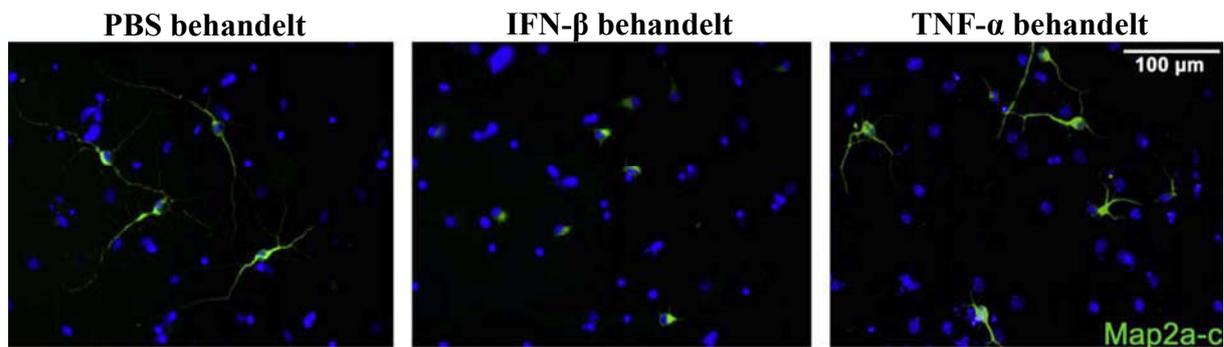
Es zeigte sich bei den Färbungen mit dem neuronalen Marker  $\beta$ -tubulin, dass die Länge der Zellfortsätze (Neuriten und Dendriten) bei den IFN- $\beta$  behandelten Zellen nach 7d Ausdifferenzierung unter Zytokin Einfluss im Vergleich zur Kontrolle deutlich kürzer waren. Dieser Effekt war ebenfalls bei Map2a-c zu sehen, der ebenfalls junge Neurone und deren Zellfortsätze darstellte (siehe die folgende Abb.13 und 14)



**Abb. 13: Zellfortsätze bei behandelten neuronalen Stammzellen gefärbt mit  $\beta$ -tubulin**

Durch immunzytochemische Färbung der Zellen mit neuronalen Markern waren deutlich kürzere Zellfortsätze bei IFN- $\beta$  zu sehen. TNF- $\alpha$  zeigte normale Fortsätze im Vergleich zur Kontrolle. Färbung GFAP/  $\beta$ -tubulin

(Vergrößerung Bilderreihe oben 100x, Bilderreihe in der mitte und unten 200x)



**Abb. 14: Zellfortsätze bei behandelten neuralen Stammzellen gefärbt mit Map2a-c**

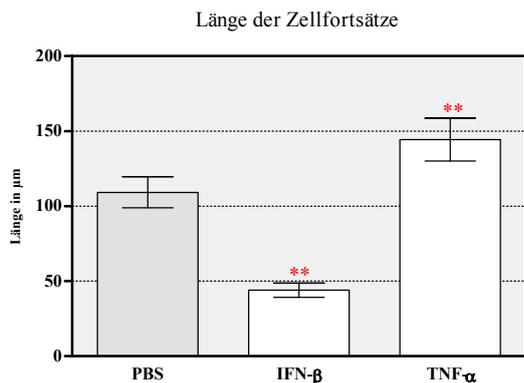
Durch Darstellung der Zellen mit dem neuronalen Markern Map2a-c waren ebenfalls deutlich kürzere Zellfortsätze bei IFN- $\beta$  zu sehen. TNF- $\alpha$  zeigte normale Fortsätze im Vergleich zur Kontrolle. (Vergrößerung 200x)

Durch die quantitative Ermittlung der Fortsatz-Länge in drei unabhängigen Zellkulturexperimenten mit Hilfe einer speziellen Mikroskop-Software (Axiovision) konnten diese Beobachtungen nochmals bestätigt werden. Bei normal ausdifferenzierten Stammzellen war eine durchschnittliche Länge von ca. 100 $\mu$ m zu verzeichnen, während die Fortsätze der mit IFN- $\beta$  behandelten Proben um mehr als die Hälfte und somit statistisch signifikant kürzer waren (*siehe folgendes Diagramm 4*).

Morphologische Veränderungen in Form von kürzeren Zellfortsätzen bei neuralen Stammzellen können ein Hinweis auf eine gehemmte neuronale Differenzierung sein. Eine quantitative Analyse der Anzahl von reifen Neuronen nach erfolgter Ausdifferenzierung unter dem Einfluss von IFN- $\beta$ , zeigte eine deutliche Reduzierung der NeuN positiven Zellen. NeuN ist ein Zellmarker für reife postmitotische Neurone, ganz im Gegensatz zu  $\beta$ -tubulin und Map2a-c. Diese Marker färben vorwiegend neuronale Vorläuferzellen und junge Neurone. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die differenzierten Zellen immunzytochemisch mit NeuN und Dapi gefärbt, sowie NeuN und Dapi positiven Kerne quantifiziert. Durch die prozentuale Ermittlung der NeuN positiven Nervenzellen und deren statistischen Auswertungen über eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test (Bonferroni), konnte ein hemmender Effekt durch IFN- $\beta$  auf die Neurogenese festgestellt werden (*siehe folgend: Diagramm 5 und Abbildung 15*).

Die Ermittlung der Neuronenzahl nach 7d Ausdifferenzierung unter IFN- $\beta$  zeigt eine signifikante Verringerung im Vergleich zu den mit PBS behandelten Zellen. IFN- $\beta$  behinderte somit die Ausbildung von Neuriten und insgesamt die Ausdifferenzierung von normalen funktionstüchtigen Nervenzellen.

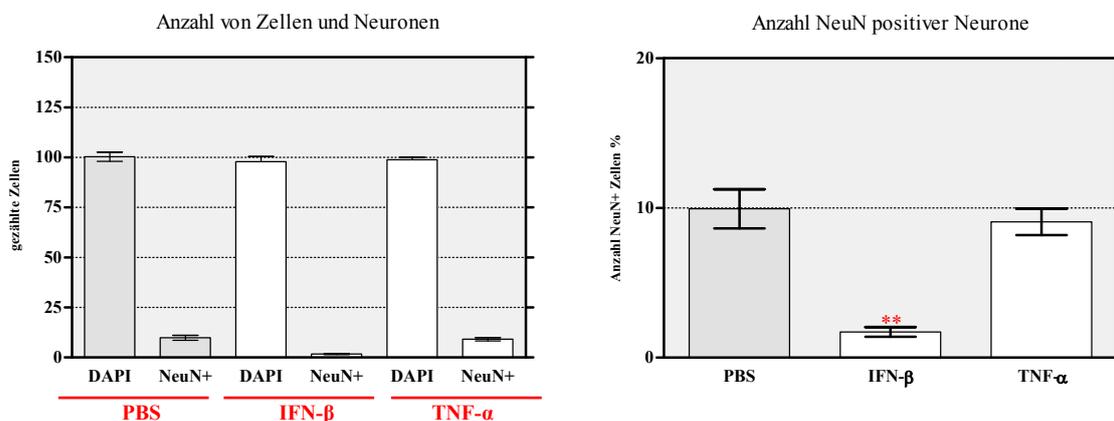
Die Diagramme und Abbildungen auf der folgenden Seite zeigen die Ergebnisse mit statistischer Auswertung der Längenvermessung und Dapi/NeuN Auszählung



**Diagramm 4: Länge der Zellfortsätze IFN-β behandelte Stammzellen**

IFN-β behandelte Zellen zeigten nach 7d Ausdifferenzierung deutlich kürzere Zellfortsätze als unbehandelte oder mit TNF-α behandelte Zellen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der vermessenen Neuritenlängen. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

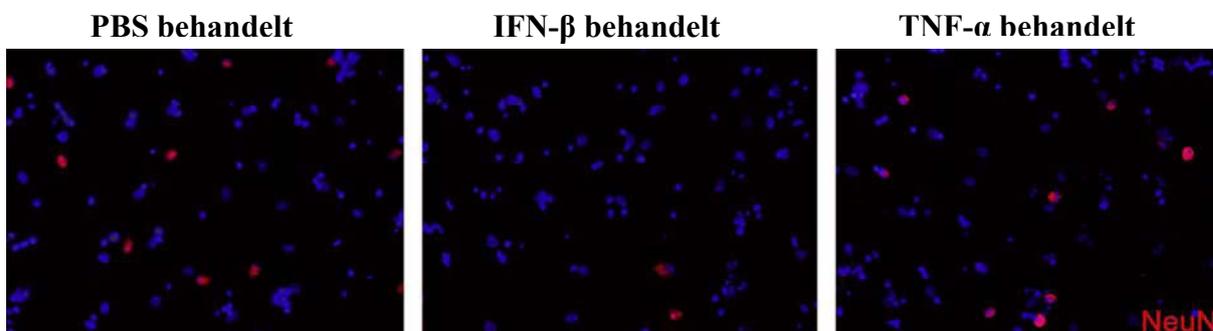
$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt



**Diagramm 5: Anzahl NeuN positiver Zellen bei IFN-β behandelten Stammzellen**

IFN-β behandelte Zellen zeigten nach 7d Ausdifferenzierung deutlich weniger NeuN positive Kerne im Verhältnis zur Kontrolle oder TNF-α behandelte Zellen. Aufgetragen wurden links die Anzahl der gezählten Zellen (Dapi und NeuN). Rechts zeigt den prozentualen Anteil an NeuN positiven Zellen in den Kulturen. Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

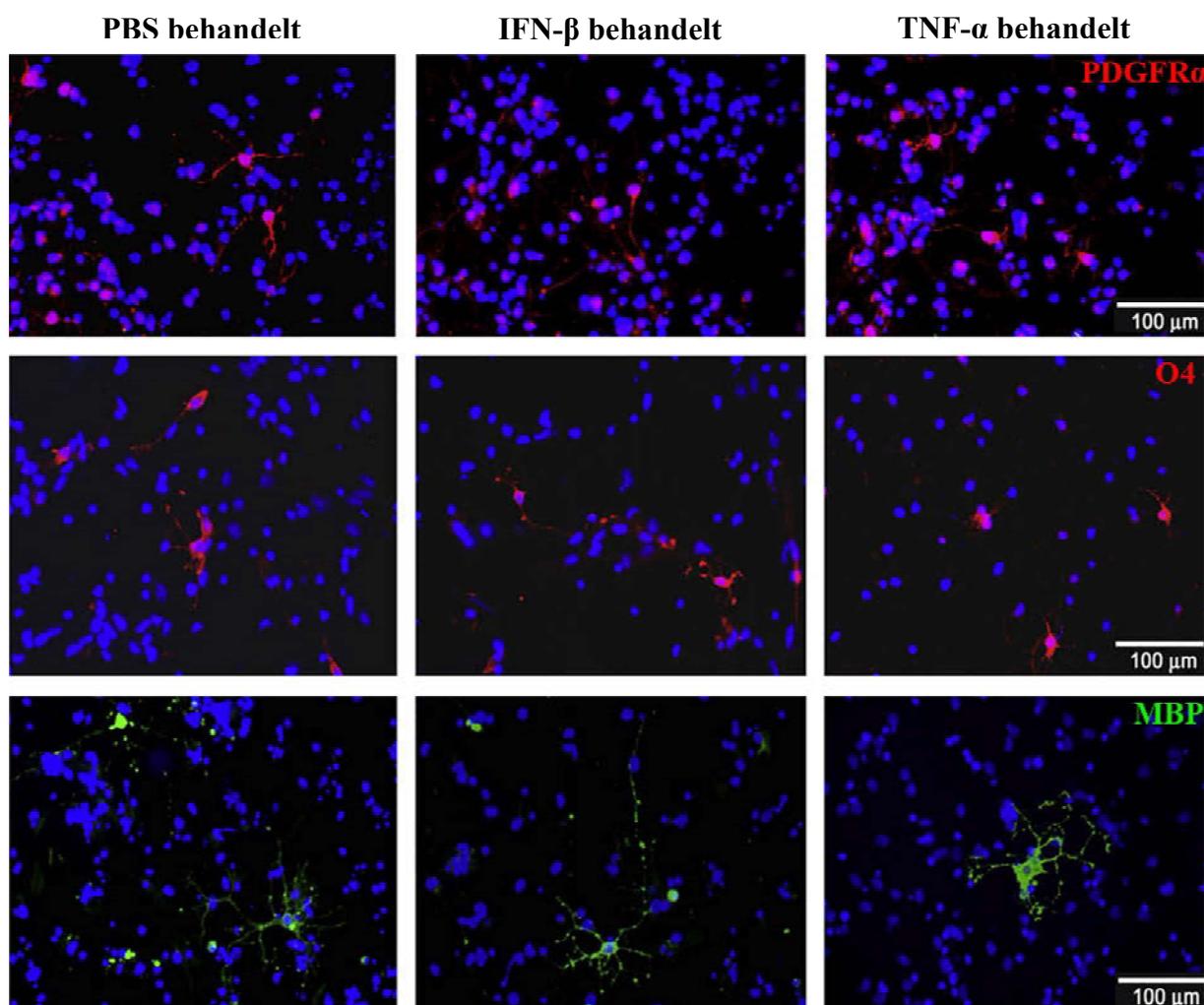
$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \*     unbehandelt     behandelt



**Abb. 15: Differenzierung von NeuN positiven Zellen unter Zytokin Einfluss**

IFN-β behandelte Zellen zeigten nach 7d Ausdifferenzierung deutlich weniger NeuN positive Zellen als unbehandelte oder mit TNF-α behandelte Zellen. (Vergrößerung 200x)

Aufgrund der Erkenntnis einer veränderten Differenzierung neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von IFN- $\beta$  wurde zusätzlich ein möglicher Einfluss auf die Differenzierung der Gliazellen in Betracht gezogen. Insbesondere der Marker PDGFR $\alpha$  zeigte sich in der quantitativen PCR nach 7d unter IFN- $\beta$  gegenüber den mit PBS behandelten Zellen leicht erhöht. Mit dem Zellmarker PDGFR $\alpha$  können Oligodendrozyten Vorläufer-Zellen (OPZ) dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Färbungen mit den Markern PDGFR $\alpha$ , O4 und MBP angefertigt, die jedoch keinerlei Veränderungen zeigten (siehe folgende Abbildung 16). IFN- $\beta$  hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung und Ausdifferenzierung der OPZ.



**Abb. 16: Gliale Differenzierung neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von Zytokinen**  
IFN- $\beta$  und TNF- $\alpha$  hatten bei der Ausdifferenzierung der Gliazellen keine morphologischen Veränderungen zur Folge. (Vergrößerung 200x)

#### 4.6.2 TNF- $\alpha$ beeinflusst weder die neuronale noch die gliale Differenzierung

In der Analyse mittels quantitativer PCR (*siehe Kapitel 4.5, Diagramme 3e und f*) war sowohl nach 24h als auch nach 7d Ausdifferenzierung eine verminderte Expression von Map2a-c zu verzeichnen. Dies ließ auf eine schnellere Ausreifung der neuronalen Stammzellen zu reifen Neuronen unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  vermuten. Immunhistochemische Färbungen mit  $\beta$ -tubulin und Map2a-c zeigten keine gravierenden morphologischen Veränderungen. Auffällig waren lediglich auf den ersten Blick die etwas längeren Zellfortsätze (*siehe Kapitel 4.6, Abbildung 12*). Durch das Vermessen der Fortsatz-Länge ausdifferenzierter Stammzellen, wie bereits bei IFN- $\beta$  beschrieben (*siehe Kapitel 4.6.1*), zeigten die TNF- $\alpha$  behandelten Proben längere Fortsätzen, die sich sogar als statistisch signifikant auswerten ließen. (*siehe Kapitel 4.6.1, Diagramm 4*) Dieser Effekt war wiederum ein weiterer Hinweis auf schnellere Ausreifung unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ . Die Auswertung der Neuronenzahl über den Quotienten aus Dapi/NeuN positiven Zellen nach 7d Ausdifferenzierung zeigte jedoch keine Veränderung der Anzahl reiferer Neurone im Vergleich zur Kontrolle (*siehe Kapitel 4.6.1, Diagramm 5*).

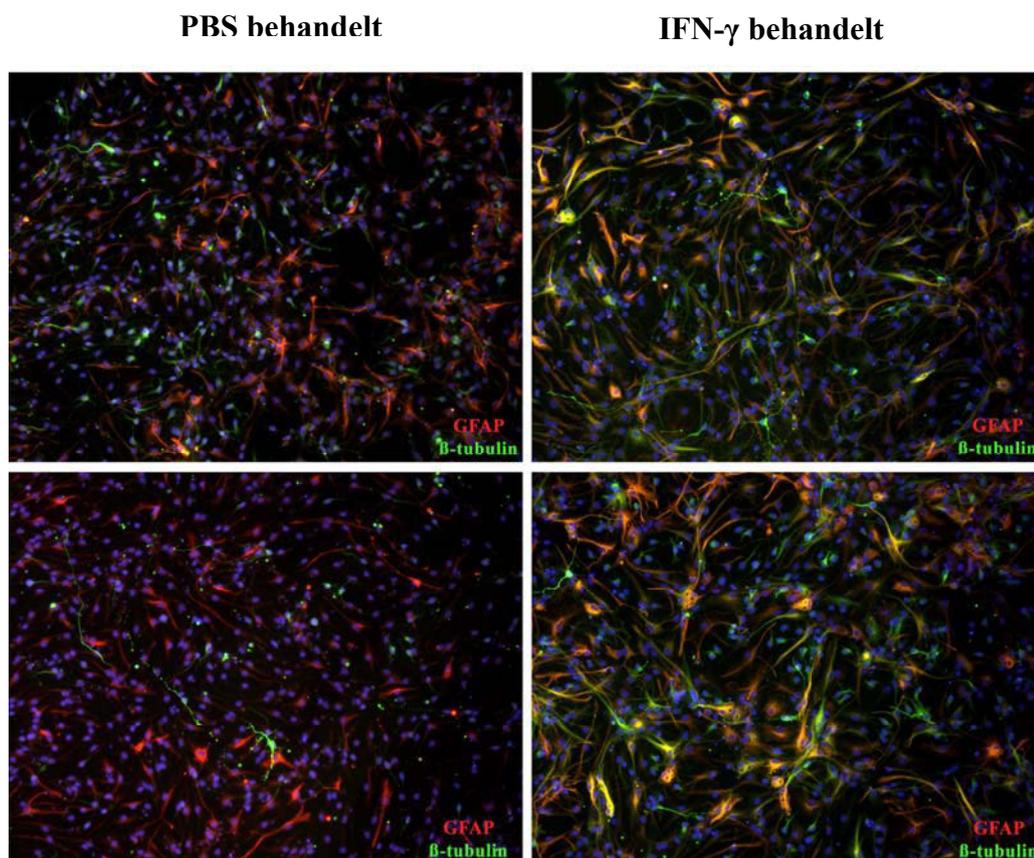
Zusätzlich wurde eine quantitative PCR mit dem Neuronenmarker NF200 durchgeführt. NF200 wird nur von reifen, post mitotischen Neuronen exprimiert. Die Ergebnisse der quantitativen PCR waren aufgrund der extrem geringen Menge an vorhandenem NF200 nicht sicher auswertbar, bestätigen aber indirekt die Ergebnisse der NeuN Zählungen (*NF200 Daten werden nicht gezeigt*).

Die Ausdifferenzierung von OPZ zu Oligodendrozyten wird durch TNF- $\alpha$  ebenfalls nicht verändert. Immunhistochemische Färbungen mit PDGFR $\alpha$ , O4 und MBP zeigten normale Anzahlen und Morphologien von Oligodendrozyten (*siehe Kapitel 4.6.1, Abbildung 15*).

#### 4.6.3 IFN- $\gamma$ induziert die simultane Expression von GFAP und $\beta$ -tubulin III bei murinen neuronalen Stammzellen

Unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  veränderte sich die Genexpression der beiden Marker  $\beta$ -tubulin und GFAP. Bereits 24h nach Zugabe war ein signifikanter Anstieg der Expression auf mRNA Ebene zu sehen. Dieser Effekt wurde ebenfalls durch Färbungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -tubulin und GFAP sichtbar. Besonders stark wurde die Expression des jungen Neuronenmarkers  $\beta$ -tubulin sowohl auf Gen, als auch Proteinebene induziert.

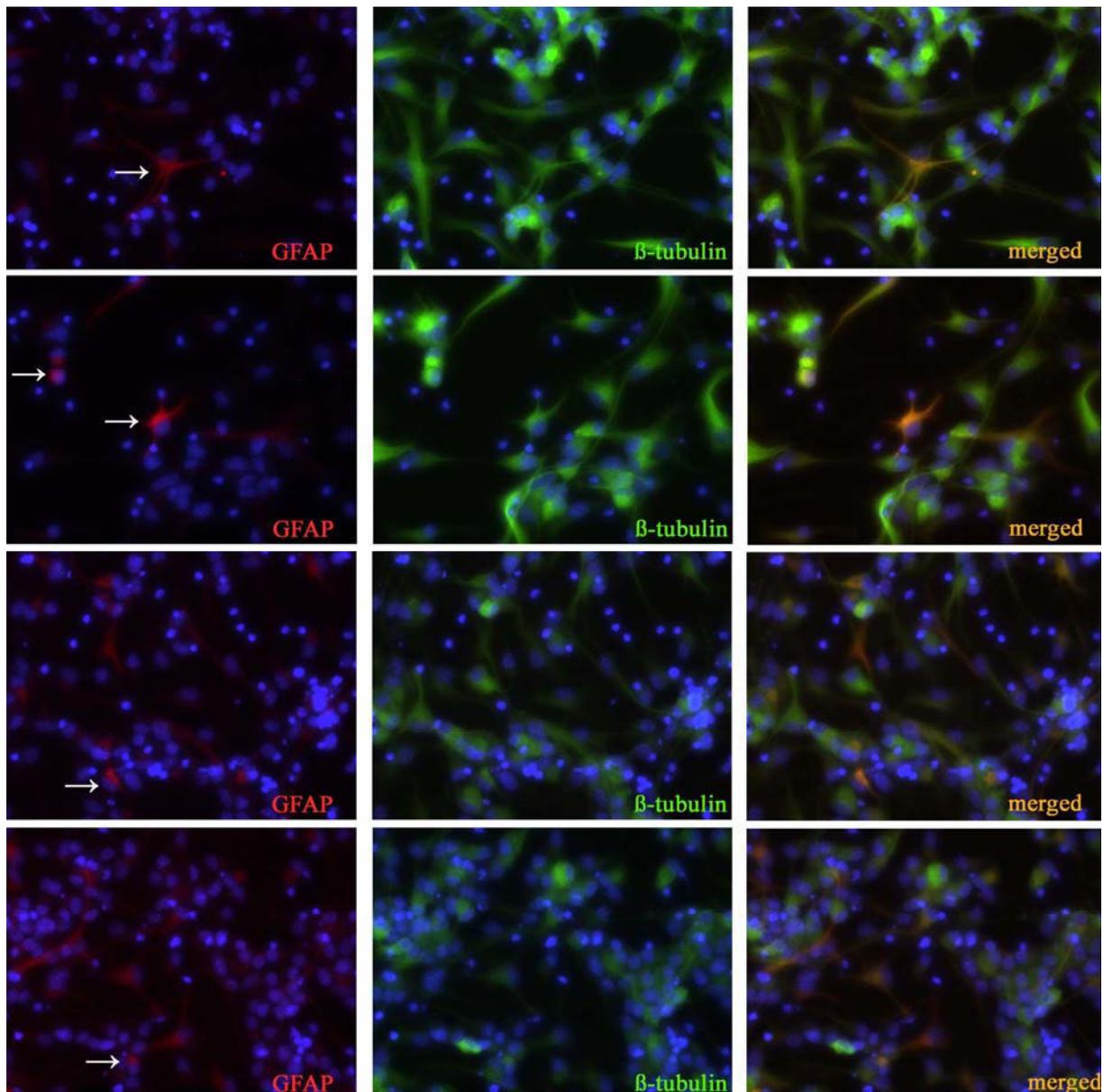
Bei näherer Betrachtung von Doppelfärbungen mit GFAP und  $\beta$ -tubulin zeigte sich bei den IFN- $\gamma$  behandelten Proben das Auftreten von doppelt positiven Zellen, die bei den unbehandelten Zellen nicht zu finden waren. Da die Negativ-Kontrollen keine Färbung aufwiesen, konnte eine unspezifische Antikörperbindung (Primär und Sekundär) ausgeschlossen werden. Aufgrund des Fehlens der doppelt positiven Zellen in den unbehandelten PBS-Proben war eine Überlappung der beiden Fluoreszenzfilter ausgeschlossen (*siehe folgende Abbildung 17*).



**Abb. 17: Immunzytochemische Doppelfärbung mit  $\beta$ -tubulin und GFAP neuronaler Stammzellen**

Direkt nach 24h IFN- $\gamma$  Behandlung veränderte sich das immunzytochemische Muster undifferenzierter Stammzellen. Es tauchten vermehrt doppelt positive Zellen auf, die bei unbehandelten Proben nicht zu sehen waren. (Vergrößerung 100x)

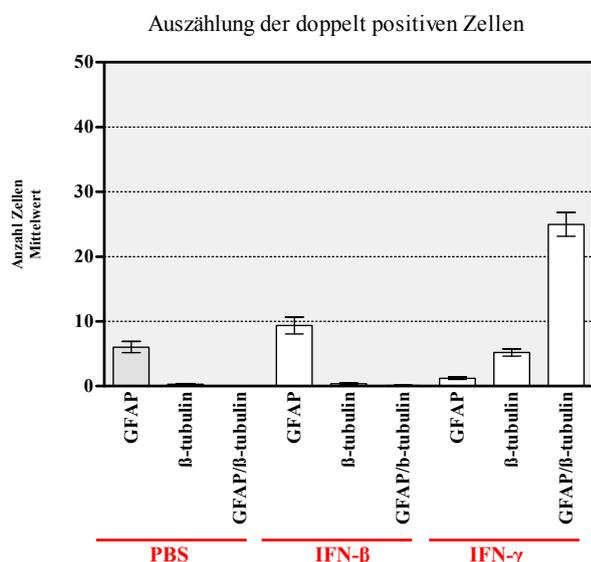
Es stellte sich heraus, dass meist die GFAP positiven Zellen auch  $\beta$ -tubulin positiv waren. Die Expression der beiden Marker war nicht immer gleich stark. Es fanden sich sowohl stark GFAP exprimierende Zellen die weniger auf  $\beta$ -tubulin positiv waren, als auch in umgekehrter Weise. Schwankungen in der Häufigkeit und vor allem in der Morphologie der doppelt positiven Zellen waren zusätzlich bei verschiedenen Zellkulturexperimenten trotz gleich bleibender Bedingungen zu registrieren (*siehe folgende Abbildung 18*).



**Abb. 18: GFAP und  $\beta$ tubulin doppelt positive Zellen induziert durch IFN- $\gamma$**

Das Zytokin IFN- $\gamma$  induzierte direkt nach 24h bei neuronalen Stammzellen nicht nur vermehrt das Auftreten von  $\beta$ -tubulin und GFAP positiven Zellen, sondern auch allgemein eine erhöhte Expression von  $\beta$ -tubulin. (Vergrößerung 400x)

Um einen Überblick über die Häufigkeit der induzierten, doppelt positiven Zellen nach IFN- $\gamma$  Behandlung zu bekommen, wurden die undifferenzierten Zellen von drei unabhängigen Zellkulturexperimenten gefärbt und jeweils zehn Gesichtsfelder pro Experiment gezählt. Quantifiziert wurden GFAP positive Zellen,  $\beta$ -tubulin positive Zellen und GFAP/  $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen im Verhältnis zur gesamten Anzahl von Zellen, die durch Dapi positive Kerne ermittelt wurden. Der Zeitpunkt 24h inkubiert und undifferenziert wurde für dieses Experiment ausgewählt, da in diesem Stadium ein sehr deutlicher Effekt durch IFN- $\gamma$  zu sehen war. Zum Vergleich wurden PBS und IFN- $\beta$  behandelte Zellen ebenfalls gezählt. Im folgenden Diagramm (siehe Diagramm 6) ist die Ermittlung der Zählraten zu sehen:



**Diagramm 6: Auszählung der GFAP und  $\beta$ -tubulin positiven Zellen nach 24h**

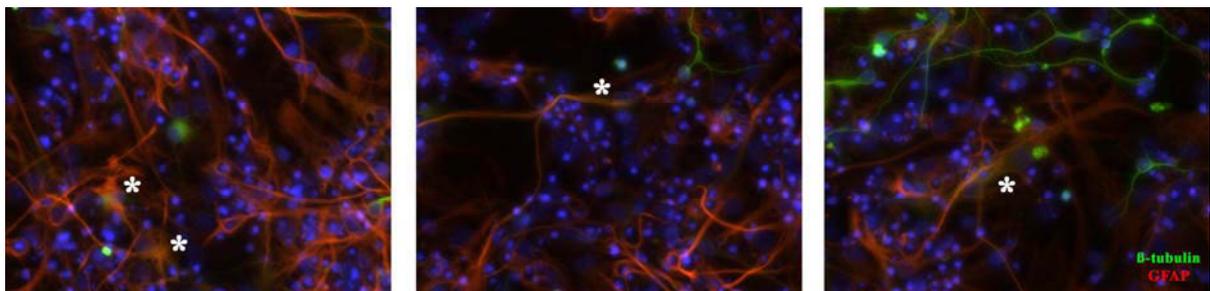
Aufgetragen wurden die Mittelwerte der gezählten positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern (200x) pro Experiment (n=3). Dapi positive Zellkerne gaben Aufschluss über die gesamte Anzahl an gezählten Zellen.

■ unbehandelt □ behandelt

Eine Behandlung der Stammzellen mit IFN- $\gamma$  zeigte im Gegensatz zu den unbehandelten und mit IFN- $\beta$  behandelten Proben eine deutliche Erhöhung der doppelt positiven Zellen, während die Anzahl der nur GFAP positiven Zellen absank. Zusammen wurden bei den unbehandelten und IFN- $\beta$  behandelten Proben nur vier Zellen von 3947 gezählten Zellen gefunden, die doppelt positiv waren. Es scheint, dass doppelt positive Zellen auch ohne IFN- $\gamma$  Stimulierung vorkommen, jedoch durch IFN- $\gamma$  die Menge der doppelt positiven Zellen um ein vielfaches gesteigert wird (2030 gezählte Zellen, davon 749 Zellen doppelt positiv). Insgesamt ist die Summe der  $\beta$ -tubulin und GFAP positiven Zellen höher, als bei den anderen Proben. Somit werden nicht nur bereits die Zellen, die GFAP positiv sind, induziert  $\beta$ -tubulin zu

exprimieren, sondern es werden scheinbar auch undifferenzierte Zellen zur Expression von GFAP und  $\beta$ -tubulin angeregt.

Auch 7d nach Ausdifferenzierung war unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  ein ähnlicher Effekt zu sehen (*siehe folgende Abbildung 19*). Allerdings geht die allgemeine  $\beta$ -tubulin Expression im Vergleich zum 24h Wert nach unten und bestätigt damit die Ergebnisse aus der qPCR. Auch die doppelt positiven Zellen waren nicht mehr so kräftig gefärbt zu sehen. Eine quantitative Ermittlung erfolgte nicht.



**Abb. 19: GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen induziert durch IFN- $\gamma$  nach 7d Differenzierung**

Das Zytokin IFN- $\gamma$  induzierte auch nach 7d bei neuronalen Stammzellen die Entstehung von Zellen, die sowohl  $\beta$ -tubulin als auch GFAP positiv sind. Auch hier zeigt sich eine Expression von  $\beta$ -tubulin, jedoch ist der Effekt wesentlich schwächer als nach 24h. (Vergrößerung 200x)

#### 4.6.3. A IFN- $\gamma$ induziert GFAP und $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen auch bei ESC abgeleiteten neuralen Stammzellkulturen

Stammzellkulturen nach Conti et al., 2005 werden als Kultur mit reinen Stammzellen beschrieben. In einer Neurosphäre haben nur ca. 2-3% der Zellen einen Stammzellcharakter während der restliche Prozentsatz aus neuronalen und glialen Vorläufer-Zellen zusammengesetzt ist. Die Zellen der Neurosphären differenzieren größtenteils in Astrozyten aus. Conti et al., 2005 zeigten in ihrer Publikation die Vermehrung von Nestin positiven Stammzellen auf Gelatine beschichteten Schalen unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF. Diese Kulturen bestehen aus reinen Stammzellen und können im Gegensatz zu den neuronalen Stammzellen über weitaus mehr Passagen kultiviert werden. Diese Art der Kultivierung verhindert zudem eine vorschnelle Ausdifferenzierung der Zellen in Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten.

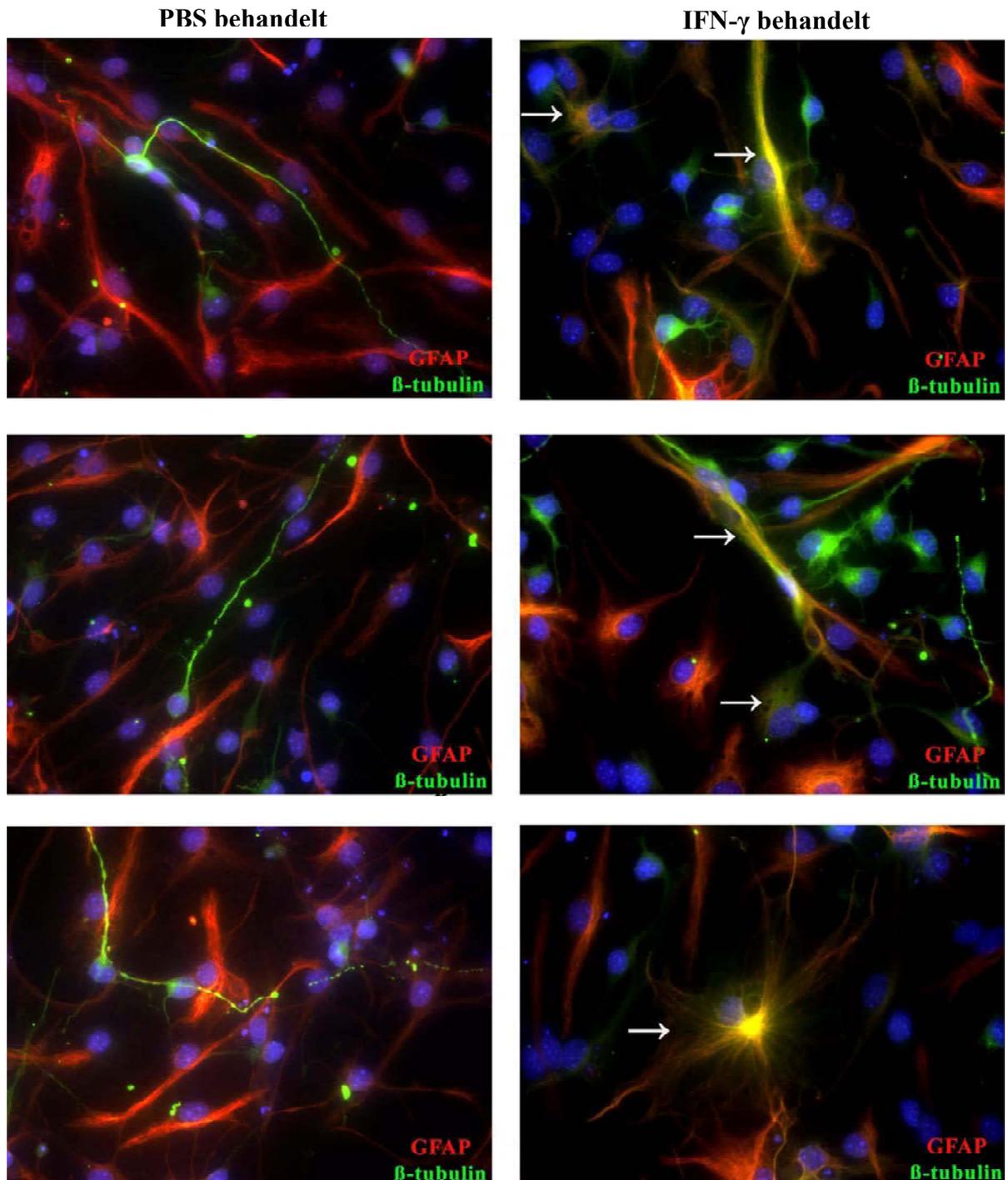
Um zu zeigen, dass der IFN- $\gamma$  Effekt sich auch auf die reinen Stammzellen auswirkt, wurden die ES abgeleiteten neuronalen Zellen nach dem Protokoll der Publikation (Conti et al., 2005) auf Gelatine beschichteten Platten in DMEM/N2 Medium unter dem Einfluss von EGF und FGF kultiviert und nach einiger Zeit mit IFN- $\gamma$  behandelt. Eine Etablierung des Protokolls mit neuronalen Stammzellen aus der Ganglionischen Eminenz (E14) schlug fehl, da die Zellen auf Gelatine beschichteten Platten nicht anhaften konnten (*siehe Einleitung Kapitel 1.1.2.1.c*).

In der quantitativen PCR wurden die drei Marker Nestin,  $\beta$ -tubulin und GFAP in drei unabhängigen Zellkulturexperimenten bei behandelten und unbehandelten Conti-Stammzellen überprüft und anschließend statistisch ausgewertet (*siehe folgendes Diagramm 7*).

Quantitative Analysen der IFN- $\gamma$  behandelten ESC abgeleiteten neuronalen Stammzellen zeigten in mehreren Experimenten überwiegend den gleichen Effekt, der bereits bei den murinen neuronalen Stammzellen der GE detektiert wurde. Auch hier war bereits nach einer Inkubationszeit von 24h bei einer Konzentration von 1000U/ml eine signifikant stärkere Genexpression von  $\beta$ -tubulin und GFAP in der qPCR zu verzeichnen (*siehe Diagramm 7, zum Vergleich siehe Kapitel 4.6.1*).

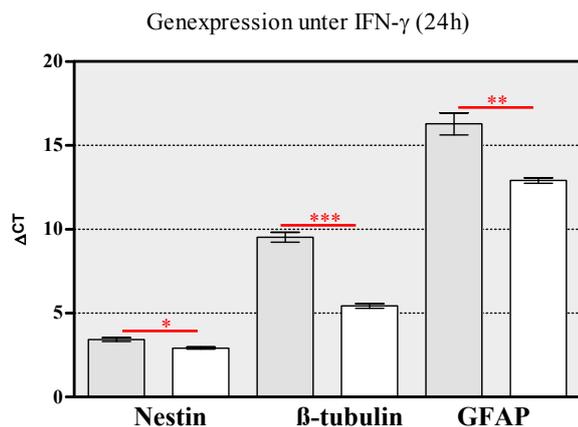
Interessanterweise wurde der Stammzellmarker Nestin ebenfalls signifikant hoch reguliert (*siehe Diagramm 7*), was ein konträrer Punkt zu den Analysen der neuronalen Stammzellen der GE darstellt. Bei allen Zytokin Behandlungen der murinen neuronalen Stammzellen zeigte sich, im Gegensatz dazu nach 24h in der qPCR eine Tendenz zur Herabregulation des Stammzellmarkers Nestin.

In einer immunzytochemischen Färbung der Zellen mit  $\beta$ -tubulin und GFAP bestätigte sich das Ergebnis aus der qPCR nochmals. IFN- $\gamma$  induziert auch bei ESC abgeleiteten neuronalen Stammzellen doppelt positive Zellen (siehe Abbildung 20, Zellen wurden von Dipl. Biol. Sebastian Illes kultiviert und freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt).



**Abb. 20: ESC abgeleitete neurale doppelt positive Stammzellen**

IFN- $\gamma$  kann auch bei embryonal abgeleiteten neuronalen Stammzellen GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen induzieren. (Vergrößerung 400x)



**Diagramm 7: Genexpression ESC abgeleiteter neuraler Stammzellen kultiviert nach Conti et al., 2005 unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  verändert auch die Genexpression ES abgeleiteter neuraler Stammzellen die nach Conti et al., 2005 in DMEM/N2 unter dem Einfluss von EGF und FGF auf Gelatine beschichteten Platten kultiviert wurden.

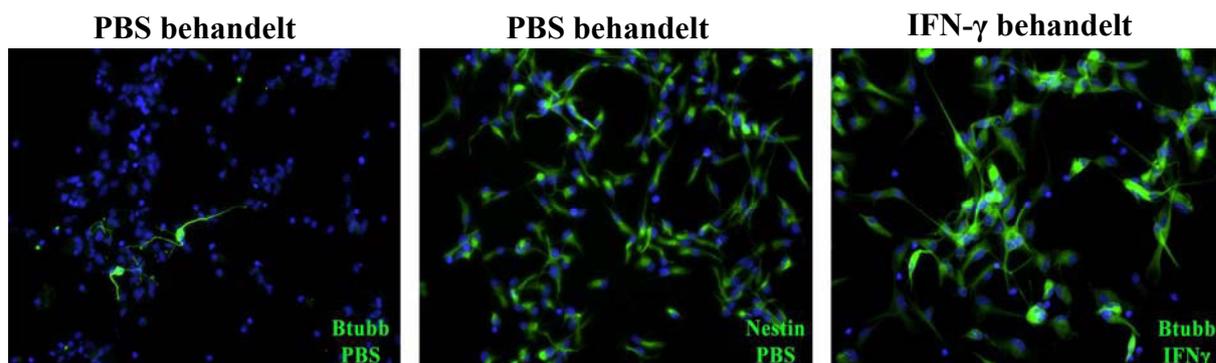
Aufgetragen sind die Mittelwerte der gemessenen  $\Delta$ CT-Werte aus der quantitativen PCR.

Die Standardabweichung beträgt  $1\sigma$ . Ein P-Wert von  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant definiert.

$P < 0,001$  \*\*\*;  $P < 0,01$  \*\*;  $P < 0,05$  \* ,  unbehandelt  behandelt

#### 4.6.3 B Die durch IFN- $\gamma$ induzierten GFAP und $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen zeigen überwiegend astrozytäre Morphologie

In den frühen Passagen kultivierter Stammzellen induzierte IFN- $\gamma$  eher doppelt positive Zellen, die nicht an junge  $\beta$ -tubulin gefärbte Neurone erinnerten, sondern an neurale Stammzellen, die mit dem Stammzellmarker Nestin gefärbt wurden (siehe folgende Abbildung 21).

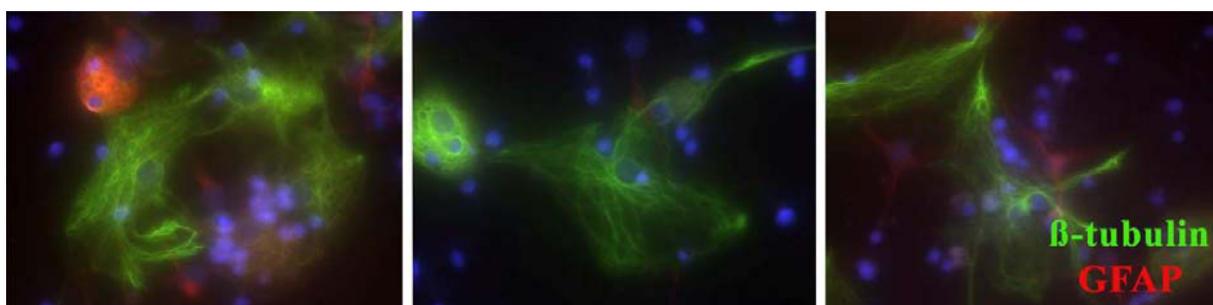


**Abb. 21: Morphologische Veränderung junger Stammzellen**

Junge Passagen der Stammzellen weisen nach IFN- $\gamma$  Behandlung eher die Morphologie junger Nestin gefärbter Stammzellen auf. (Vergrößerung 200x)

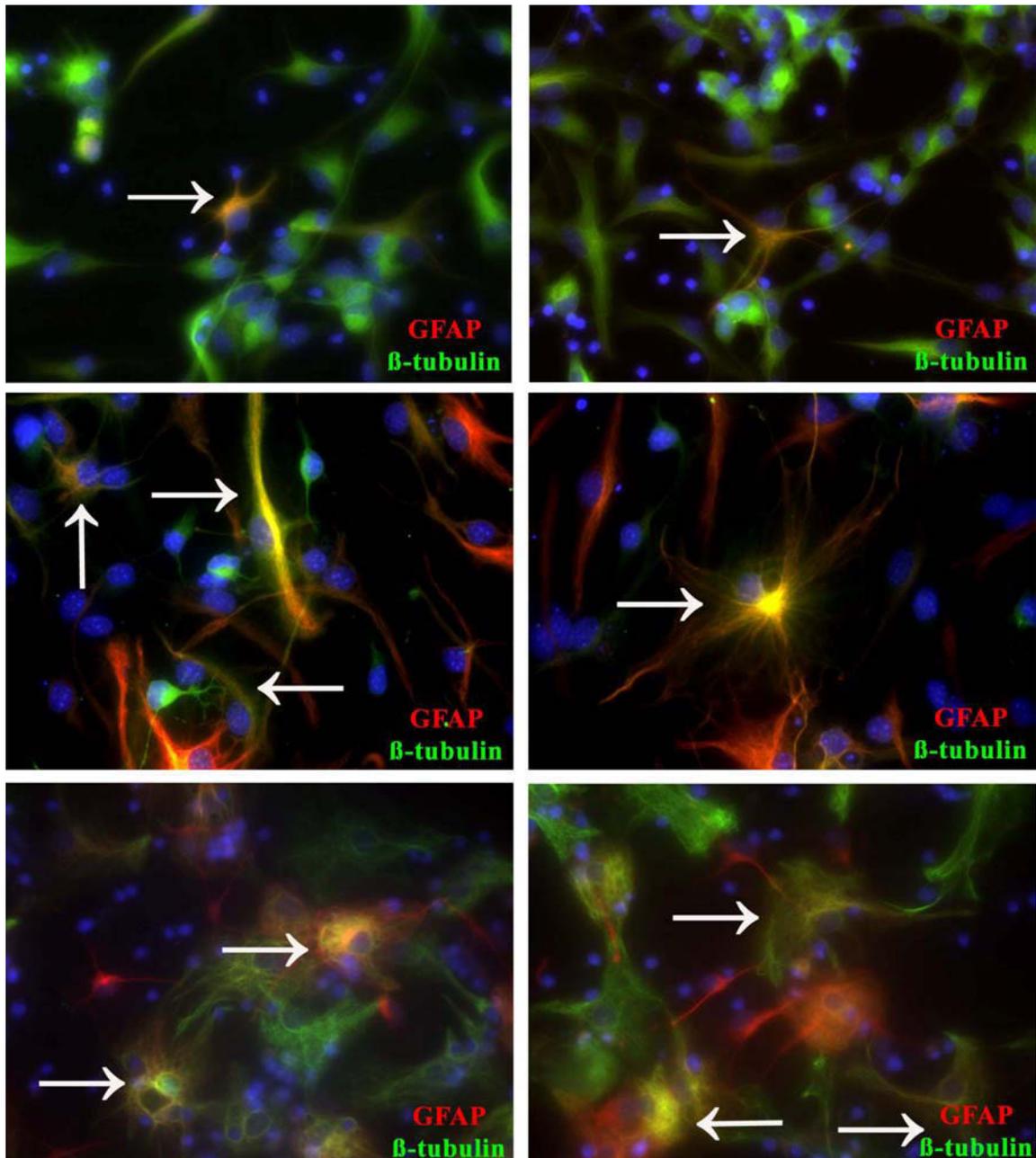
Ältere undifferenzierte Passagen wiesen wiederum verschiedene morphologische Formen auf, die im überwiegenden Teil an astrozytäre Zellen erinnerten (siehe Abbildung 22 und 23).

In einigen Fällen gab es sogar rein  $\beta$ -tubulin positive Zellen mit der Morphologie eines Astrozyten. Die Expression von  $\beta$ -tubulin erinnerte in diesen Färbungen an eine klassische GFAP Färbung (siehe folgende Abbildung 22).



**Abb. 22: Morphologische Veränderung älterer Stammzellen**

Ältere Passagen der Stammzellen weisen nach IFN- $\gamma$  Behandlung eher die Morphologie von astrozytären Zellen auf. Insbesondere rein  $\beta$ -tubulin positive Astrozyten-ähnliche Zellen sind zu sehen. (Vergrößerung 400x)



**Abb. 23: Verschiedene Morphologien der GFAP β-tubulin doppelt positiven Stammzellen**  
 Stammzellen weisen nach IFN- $\gamma$  Behandlung verschiedene Morphologien von GFAP und  $\beta$ -tubulin positiven Zellen auf. Überwiegend ist die astrozytäre Morphologie zusehen je höher die Passagen der Zellen sind. (Vergrößerung 400x)

## 5. Diskussion

### 5.1 Neurale Stammzellen exprimieren neuronale und gliale Marker

#### 5.1.1 Undifferenzierte neurale Stammzellen exprimieren Pax6, RC2 und Nestin

Pax-6 ist ein paired box Gen das einen Transkriptionsfaktor kodiert. Dieser hat einen großen Einfluss auf die Genexpression in der Nervenzellentwicklung. Bei einer Abwesenheit von Pax6 ist die Neurogenese stark beeinträchtigt und die Nervenzellen die gebildet werden, sind überwiegend GABAerg (Chapouton et al. 1999). Aus neuronalen Stammzellen Nervenzellen zu differenzieren, setzt die Expression von Pax6 voraus. In der Publikation Hack et al., 2004 konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von Pax6 in neurale Stammzellen einen sehr viel höheren Anteil an Nervenzellen hervorbringt.

Neuroepitheliale Progenitor Zellen (NEP) tauchen *in vivo* bereits während der Bildung des Neuralrohres auf und sind verantwortlich für die erste Welle der Neurogenese. Sie teilen sich symmetrisch um den Pool an Progenitor-Zellen aufrecht zu halten. Später teilen sie sich auch asymmetrisch in eine ventrikulärzonen Progenitor-Zelle und eine Zelle die in die Peripherie auswandern kann. Aus der Neuroepithelzelle der frühen Embryonalentwicklung gehen auch die radiale Gliazellen hervor. Sie exprimieren Marker wie RC1, RC2, Nestin, GLAST und GFAP und sind am häufigsten im ZNS zu finden. Radiale Gliazellen können sich sowohl symmetrisch zur Proliferation, als auch asymmetrisch zur weiteren Differenzierung von neuronalen und glialen Vorläuferzellen teilen, aus denen Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können. Noch vor ein paar Jahren hat man die radiale Gliazelle als reine Gliazelle angesehen, die unter anderem wichtig für die Wanderung von Nervenzellen und Formung von Kerngebieten während der Embryonalentwicklung ist (Mai et al., 1998). Zum heutigen Zeitpunkt ist aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse die radiale Gliazelle zur wichtigsten Stammzelle im ZNS geworden.

Die Stammzellen der radialen Glia werden auch *in vitro* durch die Expression von RC1, RC2, Pax-6 und Nestin charakterisiert. RC1 und RC2 sind Antigene, die im ZNS spezifisch von radialer Glia exprimiert werden. Nestin ist ein Intermediär-Filament, welches mit den Neurofilamenten eng verwandt ist. Gallo und Armstrong zeigten 1995, dass auch frühe Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, sowie radiale Glia Nestin in hohem Maße exprimieren.

Pax6, RC2 und Nestin können mit Hilfe von Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen werden. Sie unterscheiden einerseits die undifferenzierten Stammzellen von bereits weiter differenzierten Zellen und zeigen zusätzlich in den undifferenzierten neuronalen Stammzellen der Ganglionischen Eminenz (siehe Abbildung 9, Kapitel 4.1) deren radialen Glia Abstammung.

### 5.1.2 Differenzierte neurale Stammzellen exprimieren PDGFR $\alpha$ , GFAP, $\beta$ -tubulin III und Map2

Radiale Gliazellen können in andere Zelltypen differenzieren und die Marker Expression von RC2, Nestin und Pax-6 Zellmarkern wie GFAP,  $\beta$ -tubulin Map2 und PDGFR $\alpha$  Platz machen, die reifere Zellen charakterisieren (Malatesta et al., 2000; Gotz et al., 2002).

Transkripte des Rezeptors für PDGF $\alpha$ , ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Entwicklung der Oligodendrozyten, dienen als spezifische Marker bei der Untersuchung der Differenzierung von Stammzellen zu Oligodendrozyten. Hall et al. 1996 kamen bei ihren Experimenten zu der Erkenntnis, dass PDGFR $\alpha$  positive Zellen im embryonalen ZNS Oligodendrozyten-Vorläufer sind. Wurden diese Zellen isoliert und *in vitro* unter entsprechenden Bedingungen weiter kultiviert, so entwickelten sie sich ausnahmslos zu Oligodendrozyten.

GFAP ist ein saures Protein, welches zu den Intermediärfilamenten der Gliazellen gezählt wird. Es ist vorwiegend im Zytoplasma von Astrozyten und Ependymzellen zu finden. Die Funktion von GFAP ist bis heute nicht genau geklärt, soll aber für die mechanischen Eigenschaften, die Beweglichkeit und die Zellform der Gliazellen verantwortlich sein.

Map2 ist ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, welches vorwiegend in Nervenzellen exprimiert wird. Es gibt einige Hinweise darauf, das Map2 in seltenen Fällen auch in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. Oligodendrozyten zu detektieren ist. Map2 kommt in den drei Subtypen a,b und c vor. Map2c ist die juvenile Isoform, dessen Expression in der späten Phase der Entwicklung herab reguliert wird. Map2b ist bereits während der Entwicklung bis hin zum Erwachsenenalter in Dendriten und Nervenzellkörpern zu finden (Garner et al., 1988). Map2a wird nur von reifen Nervenzellen exprimiert und ist in Axonen und Synapsen zu finden. Die Hochregulierte Expression von Map2a löst die Herabregulation von Map2c ab (Chung et al., 1996). Allgemein ist die Expression von Map2 in neuronalen Stammzellen gering und wird durch die Differenzierung der Zellen stärker. Die Expression von Map2b läuft fast parallel zur Expression von  $\beta$ -tubulin, einem weiteren neuronalen Marker.

Tubuline sind heterodimere Proteine, die am Aufbau der Mikrotubuli beteiligt sind. Mikrotubuli sind Bestandteile des Zytoskelettes von Zellen. Tubulin kann in verschiedenen Isoformen vorkommen. Die Isoform  $\beta$ -tubulin III ist spezifisch für Nervenzellen, so daß die Expression dieser Form eine Markierung für neuronale Vorläufer und Nervenzellen darstellt (Ferreira und Caceres, 1992).

Werden den neuronalen Stammzellen die Wachstumsfaktoren entzogen, so differenzieren sie aus und exprimieren Marker reifer Glia- und Nervenzellen. In differenzierten Kulturen der neuronalen Stammzellen der GE konnten PDGFR $\alpha$ , GFAP,  $\beta$ -tubulin und Map2a-c

nachgewiesen werden (*siehe Abbildung 9 Kapitel 4.1 und Abbildung 13, Kapitel 4.6.1*). Dies gibt Aufschluss über die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu annähernd reifen Oligodendrozyten, Astrozyten und Nervenzellen.

## **5.2 Fehlende Expression von TNF- $\alpha$ RII auf neuronalen Stammzellen**

Die antivirale, tumorsuppressive und immunmodulatorische Wirkung von Zytokinen wird über Reaktionen des entsprechenden Zytokins mit einem spezifischen Rezeptor auf den Zellen ausgelöst. Innerhalb der Zelle wird im nachfolgenden Schritt ein Signaltransduktionsweg angeschaltet, welcher verschiedenste Mechanismen zur Folge haben kann. Meist wird über spezifische, an die DNA gekoppelte Proteinkomplexe (Transkriptionsfaktoren), die Transkription von Genen aktiviert oder gehemmt. Dies führt wiederum zu einer veränderten Proteinbiosynthese, durch die Zellen mit einer veränderten Enzym oder Filamentausstattung antworten können. Im Falle der Interferone wird der Jak/Stat-Signaltransduktionsweg eingeschlagen, der sich auf die Expression von über 300 verschiedenen Genen auswirken kann (*siehe Kapitel 1.2*).

Vorraussetzung für die Wirkung von Zytokinen auf neurale Stammzellen ist die Expression der spezifischen Rezeptoren. Mittels der RT-PCR wurde die Genexpression der neuronalen Stammzellen auf das Vorhandensein von Rezeptoren für IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  untersucht. IFN- $\beta$  ist ein Typ I Interferon und reagiert mit einem Rezeptor (R) der aus zwei Untereinheiten (UE) zusammengesetzt wird: IFN- $\alpha$  RI und RII. Beide UE waren sowohl bei undifferenzierten, als auch bei differenzierten neuronalen Stammzellen zu detektieren. IFN- $\gamma$  ist das einzige Mitglied der Typ II Interferongruppe und reagiert mit einem Rezeptor der aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, die als IFN- $\gamma$  RI und IFN- $\gamma$  RII bezeichnet werden. Auch diese beiden Untereinheiten waren bei undifferenzierten und differenzierten neuronalen Stammzellen nachweisbar.

Eine weitere bekannte Gruppe der Zytokine sind die Tumornekrosefaktoren (TNF). TNF- $\alpha$  wird im ZNS größtenteils von Mikroglia sezerniert und kann seine biologische Aktivität über die Rezeptoren TNF- $\alpha$  RI (p55) und TNF- $\alpha$  RII (p75) entfalten. (Zusammengefasst in Hehlgans und Pfeffer, 2005). TNF- $\alpha$  RI hat eine intrazelluläre Todesdomäne und vermittelt sowohl neuronalen Zelltod, als auch die Transkription von inflammatorischen Genen. Aus der Literatur ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  RI seine apoptotischen Signale über die Caspase-Kaskade aktiviert, sofern die Proteinbiosynthese der Zelle blockiert ist (Legler et al., 2003; Micheau et

al., 2003). TNF- $\alpha\beta$  RI wird auf fast allen Körperzellen exprimiert, mit Ausnahme von Erythrozyten und ruhenden T-Zellen (Fitzgerald et al., 2001)

Der TNF- $\alpha\beta$  RII kann einerseits neuroprotektiv wirken (Fontaine et al., 2002; Yang et al., 2002,; Marchetti et al., 2004), aber auch Apoptose (Depuydt et al., 2005) induzieren. TNF- $\alpha\beta$  RII ist unter physiologischen Bedingungen im ZNS kaum nachweisbar. Im Hippocampus der Ratte (Nadeau et al., 1999a) sowie in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen war er nur schwach exprimiert (Lung et al., 2001; Doop et al., 1997), konnte aber durch die Gabe von Lipopolysaccharid stimuliert werden.

Allgemein ist bekannt, dass die beiden Rezeptoren in erster Linie über die Aktivierung der Signaltransduktionswege NF- $\kappa$ B und JNK, die Expression von zahlreichen inflammatorischen Genen für die Immunabwehr vermitteln.

Einige Publikationen beschreiben die Expression von TNF- $\alpha\beta$  RI und II bei Stammzellen aus dem Hippocampus (Klaassen et al., 2003) und TNF- $\alpha\beta$  RI aus dem neonatalen Striatum (Ben-Hur et al., 2003) von Ratten. Humane neurale Stammzellen aus fetalem Gewebe zeigten ebenfalls eine schwache Expression der Rezeptoren I und II (Sheng et al., 2005).

Neurale Stammzellen der Ganglionischen Eminenz aus dem Stadium E14, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, exprimierten sowohl im undifferenzierten, als auch im differenzierten Stadium nur mRNA für den TNF- $\alpha\beta$  RI. (*siehe Abb.10 und 11, Kapitel 4.2*) Dies wurde mit mehreren Proben repliziert und auch die Verwendung der Primer-Sequenzen aus den Publikationen ergaben die gleichen Ergebnisse. Über die immunzytochemische Färbung konnte das Fehlen des TNF- $\alpha\beta$  RII auch auf Proteinebene bewiesen werden.

Eine mögliche Ursache für eine fehlende Expression der TNF- $\alpha\beta$  RII Rezeptoren auf neuronalen Stammzellen könnte ein zeitlicher Effekt sein. Gerade in der Embryonalentwicklung des ZNS ist das Stadium bzw. der Zeitpunkt der Entwicklung sehr wichtig für den Nachweis verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen. Einige Oberflächenmoleküle unterliegen keiner permanenten Expression. Die Zellen befinden sich während der Entwicklung im Kreislauf der Proliferation, Migration und Differenzierung. Diese Prozesse werden durch Signalbotenstoffe und ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Neurale Zellen müssen demnach ihre Rezeptor-Ausstattung spezifisch dem Wachstum, der Wanderung und der Reifung anpassen. Dazu wird der TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor II insgesamt nur sehr wenig und bevorzugt von Gliazellen exprimiert.

Möglicherweise wird der TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor II gerade zu dem Zeitpunkt E14 nicht exprimiert oder so gering, daß er mit der Methode der RT-PCR und Immunzytochemie nicht detektierbar

ist. In der Ausdifferenzierung der neuralen Stammzellen gibt es, um ein Beispiel zu nennen, gravierende Unterschiede im Verhältnis von Astrozyten : Neuronen : Oligodendrozyten, wenn die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert wurden (Abramova et al., 2005). Gerade bei Mäusen, die im Durchschnitt nur 21 Tage tragen machen bereits wenige Stunden einen gravierenden Unterschied. Da alle neuralen Stammzellen am Tag E14 präpariert wurden, könnte es möglich sein, dass genau zu diesem Zeitpunkt nur TNF- $\alpha$  RI exprimiert wurde.

In einer Studie an hippocampalen Neuronen waren ebenfalls nur 18 von 25 reifen Nervenzellen, die durch patch-clamp Technik identifiziert wurden, auch mit den TNF- $\alpha$  RII ausgestattet (Neumann et al., 2002).

Da über den TNF- $\alpha$  RI sowohl apoptotische, als auch die Expression inflammatorischer Gene vermittelt werden kann, ist das Fehlen des zweiten Rezeptors scheinbar kein Nachteil für neurale Stammzellen.

Möglicherweise könnte hier eine detaillierte Studie über die Expression des TNF- $\alpha$  RII Rezeptors in der SVZ-Region und der ZNS-Entwicklung der Maus eine Klärung bringen. Interessant wäre ebenfalls, ob eine Stimulation der neuralen Stammzellen *in vitro* durch Lipopolysaccharid oder bakterielle Toxine eine Expression von TNF- $\alpha$  RII induzieren kann und welche Folgen dies für die Stammzellen mit sich bringt.

### **5.3 Einfluss der Zytokine auf die Populationsgröße und Zytotoxizität neuraler Stammzellen**

Interferone spielen in der Immunabwehr viraler Infektionen eine sehr große Rolle. Wichtig dabei ist, die Proliferation bereits erkrankter Zellen zu hemmen, um eine Ausbreitung weiterer Viren im Körper zu verhindern. Viele Studien zeigten bereits eine proliferationshemmende Wirkung der Interferone auf verschiedenste Stammzellen (Ben-Hur et al., 2003; Wong et al., 2004; Heine et al., 2006; Kim et al., 2007) in Abhängigkeit zur Konzentration.

Um den hemmenden Effekt von Zytokinen auf murine neurale Stammzellen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der MTT-Test verwendet. Unbehandelte Zellen zeigten einen höheren Umsatz von MTT in Formazan-Kristalle, als Zytokin behandelte Zellen (*siehe Kapitel 4.3, Diagramm 1a-f* ). Dies ist ein Hinweis auf unterschiedlich große Zell- Populationen. Da dieser Effekt sowohl durch eine direkte Proliferationshemmung der Zellen, als auch durch zytotoxische Einflüsse zustande kommen kann, wurden zusätzlich immunzytochemische Färbungen mit dem Basenanalogen BrdU und auch Caspase Zytotoxizitäts-Versuche durchgeführt. Diese weiteren Versuche gaben eine genaue Erklärung

für die hemmenden Effekte der Zytokine auf die Populationsgröße, die mit dem MTT-Test gemessen wurde.

Immunzytochemische Färbungen der mit Interferon behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen weniger BrdU positive Kerne, was den Schluss zulässt, daß die Proliferation, die mit der Verdopplung der DNA einhergeht, seltener statt findet. Der Anstieg von Caspase Aktivität in Zytokin behandelten Kulturen bewies einen zusätzlichen Effekt, der neben der Proliferationshemmung auch die Zellzahl durch Toxizität beeinflussen kann.

### **5.3.1 Interferone hemmen die Proliferation und sind zytotoxisch**

Die Wirkung von IFN- $\beta$  beruhte überwiegend auf der direkten Proliferationshemmung, da nur bei der sehr hohen Konzentration von 1000U/ml nach 24h ein toxischer Effekt nachweisbar war (*siehe Kapitel 4.4, Diagramm 2a und b*) und nach 24h weniger BrdU positive Zellen zu detektieren waren (*siehe Kapitel 4.3, Abbildung 12*). IFN- $\gamma$  hemmte nicht nur die Proliferation, sondern zeigte sich auch im Vergleich zum IFN- $\beta$  toxisch, durch eine hohe Aktivität der Caspasen bei drei Konzentrationen nach 48h Inkubationszeit (*siehe Kapitel 4.4, Diagramm 2c und d*).

In der Literatur verglich nur eine wissenschaftliche Publikation die Effekte von IFN- $\gamma$  und IFN- $\beta$  direkt miteinander (Lum et al., 2009). Sie beschrieb einen gleich starken inhibitorischen Effekt auf die Proliferation bei denselben Konzentrationen von IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  auf neurale Stammzellen aus der SVZ adulter C57/Bl6J Mäusen. Die eigenen Experimente gaben allerdings einen Aufschluss über eine wesentlich stärkere Proliferationshemmung durch IFN- $\gamma$ . Bei den zytotoxischen Analysen der eigenen Arbeit stellte sich heraus, dass IFN- $\beta$  nur 24h nach Zugabe bei der höchsten Konzentration toxisch war, während IFN- $\gamma$  erst 48h nach Zugabe bei drei von vier Konzentrationen einen Anstieg von aktiven Caspasen hervorrief. Somit ist neben der Proliferationshemmung auch ein stark toxischer Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Populationsgröße zu erwähnen.

Einen apoptotischen Einfluss von IFN- $\gamma$  auf Stammzellen wurde schon mehrfach beschrieben (Horiuchi et al., 2006; Wong et al., 2004; Ben-Hur et al., 2004) und bestätigte die eigenen Ergebnisse. Interessanterweise wurde in der Arbeit von Ben-Hur (Ben-Hur et al., 2004) eine reversible Zytotoxizität von IFN- $\gamma$  durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit experimentell nicht getestet wurde.

In der Studie von Heine et al., 2006 wird kein Einfluss von IFN- $\beta$  auf das Wachstum der Zellen beobachtet, wobei es sich bei dieser Studie um Oligodendrozyten Stammzellen handelte.

In der Publikation von Lum (Lum et al., 2009) wurde IFN- $\beta$  als leicht zytotoxisch beschrieben. Für die Messung der Zytotoxizität wurde die Menge an Lactat-Dehydrogenase im Kulturmedium bestimmt. Dies ist eine andere Art der Zelltod Messung, dessen Ergebnisse jedoch mit den eigenen Beobachtungen durch die Caspase-Aktivität übereinstimmten. Auf die Zytotoxizität von IFN- $\gamma$  ging die Arbeitsgruppe nicht ein. Vergleicht man die eigenen Daten, so ist festzustellen, dass IFN- $\gamma$  im Gegensatz zu IFN- $\beta$  nach einer Inkubationszeit von 48h bei den Konzentrationen 1000U/ml, 100U/ml und 10U/ml toxisch war. Da es sich bei der Lum Studie um adulte SVZ Stammzellen handelte, könnte hier eine mögliche Ursache für die geringere Sensitivität der Zellen auf zytotoxische Einflüsse begründet sein. Auch bei der Heine Studie handelte es sich um OPZ, deren Sensitivität mit den Zellen der eigenen Arbeit nicht vergleichbar ist.

### **5.3.2 TNF- $\alpha$ zeigt sich sowohl neuroprotektiv als auch zytotoxisch**

TNF- $\alpha$  wird als Induktor der Proliferation bezeichnet. Bei verschiedenen Zellarten wie Fibroblasten (Battegay et al., 1995) Oligodendrozyten Stammzellen (Arnett et al., 2001) und hämatopoetischen Stammzellen kann TNF- $\alpha$  stimulierend, in einzelnen Fällen auch inhibierend auf das Zellwachstum wirken (Jacobsen et al., 1992; Jacobsen et al., 1995). Die eigenen Studien mit den neuralen Stammzellen zeigten einen leicht hemmenden Effekt bei den Konzentration von 100 und 10ng/ml nach 24h Inkubation. Dies bedeutet, dass TNF- $\alpha$  sich nur leicht auf die Populationsgröße der Zellen auswirkt und die Wirkung nicht anhaltend ist, da 48h nach Zugabe die behandelten Zellen annähernd die gleiche Zellzahl aufwiesen, wie die unbehandelten Zellen (*siehe Kapitel 4.3, Diagramm 2e und f und Abbildung 12*). Nach 24h Inkubationszeit zeigten sich bei TNF- $\alpha$  und PBS behandelten Stammzellen ähnlich viele BrdU positive Zellen. Widera et al., 2006 beschrieben in ihrer Publikation einen Anstieg der Proliferation und eine Vergrößerung des Volumens der Neurosphären bei neuralen SVZ Stammzellen unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ . Als Ursache wird die Aktivierung des NF- $\kappa$ b Signaltransduktionsweges genannt, der auch nachweislich als positiver Regulator für die Proliferation dient.

Die Messung der Caspase-Aktivität nach TNF- $\alpha$  Behandlung undifferenzierter neuraler Stammzellen ergab in den Experimenten lediglich bei höheren Konzentrationen von 100ng/ml

oder 10ng/ml nach 48h einen Anstieg, so dass hier von einer toxischen Wirkung ausgegangen werden muss (*siehe Kapitel 4.3 und 4.4, Diagramme 2e und f*).

Einige wissenschaftliche Arbeiten zeigten bereits einen protektiven Effekt durch TNF- $\alpha$  (Barger et al., 1995; Ben-Hur et al., 2003; Cheng et al., 1994). Die reversible Zytotoxizität von IFN- $\gamma$  durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ , wie sie in der Ben-Hur Publikation (Ben-Hur et al., 2004) beschrieben ist, könnte möglicherweise ebenso durch die protektive Wirkung von TNF- $\alpha$  bedingt sein, die sich in den eigenen Ergebnissen nach 24h Inkubationszeit bereits andeutete. Alle vier eingesetzten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  wiesen nach 24h eine geringere Caspase-Aktivität als die unbehandelten Zellen auf (*siehe Kapitel 4.4, Diagramm 2e und f*), wobei die statistisch signifikante Proliferationshemmung bei 100 und 10ng/ml diesem Ergebnis konträr gegenübersteht und nicht erklärt werden kann.

Im Gegensatz dazu scheint von aktivierter Mikroglia sekretiertes TNF- $\alpha$  für hippocampale Stammzellen tödlich (Cacci et al., 2005) zu sein, was wiederum den Anstieg der Caspase-Aktivität nach 48h TNF- $\alpha$  erklären würde.

Welches Signal, ob protektiv oder apoptotisch, an die Zellen vermittelt wird, scheint über die verschiedenen TNF-Rezeptoren gesteuert zu werden. Während TNF- $\alpha$ RI eine intrazelluläre Todesdomäne trägt und apoptotische Signale übertragen kann, wirkt sich vorwiegend TNF- $\alpha$ RII neuroprotektiv aus (Fontaine et al., 2002; Marchetti et al., 2004). Da die neuronalen Stammzellen nur den TNF- $\alpha$ RI exprimierten, kann ein neuroprotektiver Effekt durch den TNF- $\alpha$ RII somit ausgeschlossen werden. Allerdings kann der TNF- $\alpha$ RI sowohl apoptotische Signale, als auch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signaltransduktionsweges vermitteln.

Schaut man sich die Literatur zu den TNF-Rezeptoren etwas genauer an, so gibt es Hinweise darauf, dass die Apoptose über den Rezeptor p53 induziert wird, sofern die Proteinbiosynthese der Zelle blockiert ist (Legler et al., 2003; Micheau und Tschopp, 2003). Zusätzlich gibt es einige Anhaltspunkte die zeigen, dass der p53 Rezeptor die Hauptrolle in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B Transduktionsweges in Stammzellen spielt (Kolesnick und Golde, 1994). Somit wird vermutlich bei den neuronalen Stammzellen durch TNF- $\alpha$  vorrangig nach 24h eine veränderte Expression der Gene über NF- $\kappa$ B induziert, die sich an einigen Stellen protektiv auf die Zellen auswirkt und nach 48h auch apoptotische Signale an die Zellen vermittelt. Ebenfalls ist eine Hemmung der Proteinbiosynthese der Zellen durch die hohe Konzentration an TNF- $\alpha$  denkbar.

Ein Experiment mit den neuronalen Stammzellen und der gezielten Blockierung der Proteinbiosynthese wäre zur Klärung dieser Hypothese erforderlich. Es gibt einige

Antibiotika, die die Proteinbiosynthese an den rRNA's der Ribosomen von Pro und Eukaryonten hemmen, wie z.B. Tetrazyklin, Chloramphenicol oder Erythromycin. Dies erlaubt nicht nur den Einsatz der Antibiotika als Antiinfektiva, sondern auch die Verwendung in zellbiologischen Experimenten. Cycloheximid blockiert selektiv die zytoplasmatische Proteinbiosynthese in Eukaryonten.

Zusätzlich wäre der Nachweis der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  vermittelte Signale bei neuralen Stammzellen der Ganglionischen Eminenz interessant, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

#### **5.4 Veränderte Differenzierung von neuralen Stammzellen unter dem Einfluss von Zytokinen**

Um einen Einfluss der Zytokine auf die Genexpression neuraler Stammzellen detektieren zu können, wurde die mRNA behandelter Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die behandelten Zellen wurden für 24h unter dem Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren EGF und FGF mit den Zytokinen stimuliert und anschließend isoliert. Für den Nachweis des Einflusses von Zytokinen auf die Differenzierung der Stammzellen wurde nach 24h Stimulus unter EGF und FGF den Zellen für 7 Tage Wachstumsfaktoren und Zytokine entzogen und im Anschluss die mRNA isoliert.

##### **5.4.1 Genexpression Interferon behandelter Stammzellen**

Quantitative Analysen zeigten bereits 24h nach Zugabe deutliche Veränderungen in der mRNA Expression der Stammzellen durch eine Behandlung mit Zytokinen. Insbesondere die Gene für  $\beta$ -tubulin und GFAP wurden durch den Einfluss der Interferone hoch reguliert. Die Induktion der vermehrten Genexpression war besonders deutlich bei IFN- $\gamma$  zu beobachten (*siehe Diagramm 3a-d, Kapitel 4.5*). Nach 7d Differenzierung sind die Effekte bei IFN- $\beta$  vollständig verschwunden, während sich bei IFN- $\gamma$  auch nach 7 Tagen eine geringere Expression des Stammzellmarkers Nestin und eine anhaltende, erhöhte Expression von  $\beta$ -tubulin III zeigte, im Vergleich zu nicht behandelten Kulturen. Die vermehrte Expression der beiden reifen Marker lässt die Vermutung zu, dass Interferone möglicherweise eine verfrühte Differenzierung der Stammzellen anregen, die sich nach 7 Tagen Ausdifferenzierung ohne EGF, FGF und Zytokin Einfluss wieder der natürlichen Genexpression ausdifferenzierter Zellen angleichen.

Map2a-c zeigte ebenfalls eine Tendenz zur verstärkten Expression bei beiden Interferonen, die aber statistisch nicht signifikant auswertbar war (*siehe Kapitel 4.5, Diagramm 3c und d*).

Bei IFN- $\gamma$  war der Effekt der verfrühten Ausdifferenzierung so deutlich, dass sich dies zusätzlich auf den Marker Nestin auswirkte, der vorwiegend in unreifen Zellen zu detektieren ist. Nestin wurde im Gegensatz zu  $\beta$ -tubulin und GFAP bei IFN- $\gamma$  deutlich herab reguliert und bestätigte eine vorzeitige Differenzierung der Zellen unter dem Einfluss von EGF und FGF.

Da die Zellen während der ganzen 24h Stunden unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren standen, macht dies vor allem deutlich, daß Zytokine die Wirkung von Wachstumsfaktoren inhibieren oder aufheben können und somit eine sehr starke Wirkung auf die Zellen besitzen. (siehe 4.5, Diagramm 3a-d)

#### 5.4.2 Genexpression TNF- $\alpha$ behandelter Stammzellen

Die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf neurale Stammzellen induzierte keine Veränderung in der mRNA Expression von  $\beta$ -tubulin und GFAP. Anstelle von  $\beta$ -tubulin wurde der Neuronenmarker Map2a-c auf Transkript-Ebene herab reguliert, was ebenfalls für eine verfrühte Ausdifferenzierung der Stammzellen sprechen kann. In der qPCR wurden alle Map-Subtypen detektiert, so daß ein Absinken von Map2a-c aufgrund der verringerten Transkripte von Map2b und c, die vorwiegend in Vorläuferzellen zu detektieren sind, durchaus auf eine vorzeitige Differenzierung der Zellen hinweisen kann aber nicht erklärt, wieso der neuronale Marker  $\beta$ -tubulin unverändert blieb (siehe Kapitel 4.5, Diagramm 3e und f) . GFAP wurde durch TNF- $\alpha$  nicht beeinflusst, was eine Differenzierung der Stammzellen in die astrozytäre Richtung, induziert durch TNF- $\alpha$ , ausschließt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Einfluss der Zytokine auf die Genexpression neuraler Stammzellen quantitativ ermittelt. Die meisten Studien basieren auf morphologischen Untersuchungen mittels der Methode der Immunzytochemie, da quantitative Analysen lediglich einen Überblick über die Menge an Genexpression geben. Sie zeigen keine morphologischen Veränderungen der Zellen während der Differenzierung. Da es keine vergleichenden Daten in der Literatur gibt, wurden die in der qPCR auffälligen Gene mit Hilfe von Antikörperfärbungen intensiver untersucht, um mögliche morphologische Veränderungen sehen zu können.

#### 5.5 Morphologische Veränderungen durch Zytokine

In zahlreichen immunzytochemischen Experimenten konnten die Daten der qPCR zum Teil bestätigt und zusätzlich hemmende Effekte der Zytokine auf die morphologische Entwicklung der Zellen beobachtet werden (siehe Kapitel 4.6).

### 5.5.1 IFN- $\beta$ inhibiert die neuronale Reifung von neuralen Stammzellen

IFN- $\beta$  ist ein Zytokin, welches zur Schubprophylaxe von MS eingesetzt wird. Die Kenntnis über die Wirkung von IFN- $\beta$  auf Stammzellen und mögliche morphologische Veränderungen während der Differenzierung sind folglich sehr wichtig. Ein hemmender Effekt auf die Oligodendrozyten-Differenzierung wäre für eine Kombination aus IFN- $\beta$  und Stammzelltherapie eher von Nachteil für den Patienten.

In zahlreichen immunzytochemischen Färbungen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit einige Veränderungen innerhalb des Prozesses der Proliferation und Differenzierung neuraler Stammzellen zu reifen Nervenzellen, nicht dagegen jedoch in der Ausreifung von Oligodendrozyten. Differenzieren die Zellen 7 Tage lang unter IFN- $\beta$  aus, so ist im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine verkürzte Länge der Zellfortsätze zu sehen. Auch die Anzahl der ausgereiften NeuN positiven, reifen Neurone ist geringer. Dies zeigte den hemmenden Effekt auf die Bildung und Reifung von Nervenzellen sehr deutlich (*siehe Kapitel 4.6, Abb. 13,14 und 15, Diagramm 4 und 5*). Die Studie von Heine et al., 2006 beschrieb einen inhibierenden Einfluss von IFN- $\beta$  auf die Entwicklung von Zellfortsätzen bei OPZ, die zu Oligodendrozyten ausreifen. Dies bestätigte sich in den eigenen Experimenten dagegen nicht. Immunzytochemische Färbungen mit Oligodendrozyten Markern wie MBP, O4 und PDGFR $\alpha$  zeigten keinerlei Veränderungen in der Anzahl oder Morphologie von OPZ unbehandelter Kulturen im Vergleich zu Zytokin behandelten Kulturen. (*siehe Kapitel 4.6.1, Abb. 16*)

Hemmende Eigenschaften von IFN- $\beta$  auf die OPZ-Differenzierung wurden in der Publikation von Heine durch verschiedene Experimente als ein indirekter Effekt durch IFN- $\beta$  aktivierte Mikrogliazellen erklärt. Da Kulturen neuraler Stammzellen immer gemischte Zell-Population darstellen, hätte hier möglicherweise ein indirekter Effekt durch aktivierte Gliazellen zu sehen sein können. Hingegen zeigten die Experimente der vorliegenden Arbeit, dass IFN- $\beta$  keinerlei Wirkung auf die Differenzierung von Oligodendrozyten hat. Da es sich bei der Studie von Heine und Kollegen um reine neonatal präparierte Ratten OPZ aus dem Cortex handelte, und diese mit Mikroglia Co-kultiviert wurden, ist der hemmende Einfluss sicherlich stärker. Der Anteil aktivierter Mikroglia in den eigenen Kulturen ist um ein vielfaches geringer, als bei definierten Co-Kultivierungsversuchen. Eine Kultivierung der neuralen Stammzellen der GE mit IFN- $\beta$  aktivierter Mikroglia könnte hier eine Klärung bringen und diese Hypothese bestätigen.

In der vergleichenden Publikation Lum et al., 2009 beobachteten die Wissenschaftler, dass IFN- $\beta$  keine vermehrte Bildung von Nervenzellen aus Stammzellen induzierte und keinen

Effekt auf die Neuritenlänge habe. Der Einfluss von IFN- $\beta$  auf die Neuritenlänge wurde hier mit Hilfe des Markers  $\beta$ -tubulin immunzytochemisch untersucht. Die eigenen Daten zeigten jedoch einen inhibierenden Effekt auf die neuronale Reifung von aus neuronalen Stammzellen hervorgegangenen Neuronen und vor allem kürzere Fortsätze der Nervenzellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen nach 7 Tagen Differenzierung unter IFN- $\beta$  Einfluss. Dazu wurden die Ergebnisse mit zwei verschiedenen Zellmarkern für junge Neurone,  $\beta$ -tubulin und Map2a-c, überprüft und repliziert.

Die Stammzellen der Studie Lum et al., 2009 wurden zu den Zeitpunkten bei 24h und 72h unter dem Einfluss von IFN- $\beta$  getestet. Dies könnte erklären, dass die Arbeitsgruppe keinen Effekt beschrieben hat. Nach 7 Tagen Differenzierung ist vermutlich der hemmende Einfluss durch IFN- $\beta$  auf die neuronale Ausreifung von Stammzellen intensiver und vor allem deutlicher zusehen. Kürzere Inkubationszeiten von IFN- $\beta$  und deren Auswirkungen auf die Differenzierung wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die eingesetzte Konzentration von 1000U/ml in den eigenen Versuchen im Gegensatz zu 100U/ml bei Lum kann an dieser Stelle ebenfalls einen gravierenden Unterschied machen. Womöglich wird auch der verwendete adulte SVZ Progenitor-Zelltyp der Lum-Studie anders reagieren, als die neuronalen Stammzellen aus E14. Wie bereits oben unter Punkt 5.3.1 erwähnt, scheinen adulte Stammzellen generell weniger sensitiv zu reagieren, als fetale.

### **5.5.2 TNF- $\alpha$ hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Stammzellen**

In der Gesamtheit der Literatur wird TNF- $\alpha$  als ein Zytokin beschrieben, welches einen geringen Effekt auf die morphologische Entwicklung von Stammzellen aufweist. Neumann et al., 2002 beschrieben im Vergleich zu unbehandelten Zellen verkürzte Neuriten bei einer Konzentration von 10ng/ml nach einer Inkubationszeit von 16h. Die Daten der qPCR aus der eigenen Arbeit und immunologischen Färbungen zeigten eine leicht veränderte Genexpression des Markers Map2a-c und immunzytochemisch längere Neuriten (*siehe Kapitel 4.5, Diagramm 3e und f, Kapitel 4.6, Diagramm 4, Abb. 13 und 14*). Dies ist ein konträres Ergebnis zu den Daten der Neumann Studie. Wiederum sind in der Neumann Veröffentlichung die durch TNF- $\alpha$  ausgelösten Effekte bei TNF- $\alpha$  RI und RII defizienten Mäusen nicht zu sehen. Die Arbeitsgruppe zeigte somit, dass die Wirkung von TNF- $\alpha$  wirklich über die TNF Rezeptoren vermittelt wird. Da neurale Stammzellen aus der GE nur TNF- $\alpha$  RI exprimieren wäre ein Experiment mit der gezielten Blockierung des Rezeptors interessant und könnte erstmalig zeigen, daß über den TNF- $\alpha$  RI ebenfalls neuroprotektive Signale vermittelt werden, die sogar zu längeren Zellfortsätzen führen.

Widera et al., 2006 beschrieben keinen Effekt auf die Expression von  $\beta$ -tubulin und GFAP. Dies zeichnete sich ebenfalls in den eigenen quantitativen Genanalysen ab. Interessanterweise ist in der Publikation eine immunzytochemische Färbung mit  $\beta$ -tubulin zu sehen, wo unbehandelte Zellen den TNF- $\alpha$  behandelten Zellen gegenüber gestellt werden. Die Neuriten der TNF- $\alpha$  behandelten Zellen scheinen zahlreicher und etwas länger im Vergleich zur Kontrolle zu sein. Dies ist aber keine gesicherte Aussage sondern lediglich eine persönliche Beobachtung.

Wong et al., 2004 zeigt zum einen keinen Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Differenzierung von Neuronen und Astrozyten, zum anderen einen neuronal induzierenden Effekt von TNF- $\alpha$  in Kombination mit IFN- $\gamma$ . Da bereits die reversible Zytotoxizität von IFN- $\gamma$  durch die Kombination mit TNF- $\alpha$  in der Publikation Ben-Hur et al., 2003 beschrieben wurde, könnte die Auswirkung der Kombination von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf die quantitative Genexpression und morphologischen Veränderungen bei Differenzierung neuraler Stammzellen recht interessant sein. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht überprüft.

### **5.5.3 IFN- $\gamma$ induziert nicht die neuronale Differenzierung, sondern die Bildung von GFAP und $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen**

IFN- $\gamma$  wird in einigen Publikationen als Induktor der Nervenzellentwicklung beschrieben, das bedeutet die Stammzellen differenzieren häufiger als normal zu Nervenzellen aus. Sie exprimieren den Marker  $\beta$ -tubulin und sind durch längere Neuriten charakterisiert (Wong et al., 2004; Lum et al., 2009; Kim et al., 2007) Es gibt nur eine Publikation Ricci-Vitiani et al., 2006, die keinen Effekt von IFN- $\gamma$  auf neurale Stammzellen aus E14 Cortex beschrieben hat. In den Experimenten wurde IFN- $\gamma$  in einer Konzentration von 500U/ml für eine immunzytochemische Färbung mit anschließendem Diaminobenzidin (DAB) Nachweis eingesetzt. In den eigenen Experimenten war bereits der Effekt des ansteigenden Markers  $\beta$ -tubulin bei 10U/ml IFN- $\gamma$  beobachtet worden (*Daten werden nicht gezeigt*). Dazu sind die Zellen durch die gleichzeitige Expression von  $\beta$ -tubulin und GFAP charakterisiert.

Wong et al., 2004 haben nach 24h IFN- $\gamma$  Stimulus eine 3-4fach höhere Zellzahl an  $\beta$ -tubulin positiven Zellen beobachten können, was sich wiederum mit den eigenen Daten der qPCR und immunzytochemischen Färbungen deckt. Auch eine Verringerung der Anzahl  $\beta$ -tubulin positiver Zellen nach kurzer Zeit (hier 72h) entspricht den eigenen Beobachtungen. Bereits 7 Tage nach dem IFN- $\gamma$  Stimulus glich sich die Expression der beiden Gene  $\beta$ -tubulin und GFAP den unbehandelten Zellen an, was zeigte, dass eine kurzfristige Stimulation mit IFN- $\gamma$

für einen kurzen Zeitraum die Genexpression von Stammzellen beeinflussen kann, aber keinen dauerhaften Effekt hat.

Die Morphologie  $\beta$ -tubulin positiver Zellen sowie die längeren Neuriten wurden in dieser Publikation nicht durch Fotos immunzytochemischer Färbungen belegt. Zusätzlich beobachtete die Arbeitsgruppe eine Herab-Regulation von GFAP im Immuno-Blot (Western-Blot), die nicht durch die eigenen Daten bestätigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit war ein deutlicher Effekt von  $\text{IFN-}\gamma$  auf die beiden Marker  $\beta$ -tubulin und GFAP bei undifferenzierten und auf beschichtete Kulturschalen ausplattierte Zellen bereits nach 24h zu sehen (*siehe Kapitel 4.5, Diagramm 3c und d*). Wong et al., 2004 haben undifferenzierte Neurosphären mit  $\text{IFN-}\gamma$  behandelt und konnten im Gegensatz zu den differenzierten Zellen keinen Effekt sehen. Neurale Stammzellen, die als Zellschicht in den Kulturschalen wachsen sind für Zytokine besser zugänglich, reagieren sensitiver und weisen unter Umständen ein anderes Verhalten auf als ganze Neurosphären.

Eine weitere Publikation (Kim et al., 2007) beschrieb ebenfalls einen induzierenden Effekt von  $\text{IFN-}\gamma$  auf eine mögliche neuronale Differenzierung der Stammzellen. Im Phasenkontrastmikroskop wurden längere Neuriten beobachtet. Im Immuno-Blot (Western-Blot) war ein Anstieg von  $\beta$ -tubulin zu detektieren. GFAP wurde als Marker nicht verwendet. Auch in dieser Publikation gab es keine immunzytochemischen Bilder, die Aufschluss über die induzierte Morphologie der Zellen durch  $\text{IFN-}\gamma$  geben. Beide Publikationen beschrieben ähnliche Effekte und sahen die induzierte Genexpression von  $\beta$ -tubulin als Hinweis auf neuronale Differenzierung an, die nicht durch morphologische Daten belegt wurden.

In der Publikation Lum et al., 2009 wurden  $\text{IFN-}\beta$  und  $\text{IFN-}\gamma$  direkt miteinander verglichen und auch hier wurde ein Anstieg der  $\beta$ -tubulin positiven Zellen unter dem Einfluss von  $\text{IFN-}\gamma$  beschrieben. Auf die Neuritenlängen der  $\text{IFN-}\gamma$  behandelten Zellen ging diese Arbeitsgruppe nicht ein, da der Schwerpunkt in dieser Studie bei der unbeeinflussten Neuritenlänge von  $\text{IFN-}\beta$  lag.

Dennoch ist ergänzend zur Studie Kim et al., 2007 eine durch  $\text{IFN-}\gamma$  ausgelöste Aktivierung der beiden Gene Stat1 und Stat3 beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe konnte die durch  $\text{IFN-}\gamma$  ausgelöste Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweg zeigen. Die Janus-Kinasen sind Phospho-Tyrosin-Kinasen, die intrazelluläre Domänen der Rezeptoren phosphorylieren, die wiederum mit den Signalübermittelnden Transkriptionsmolekülen (Stat) interagieren.

Insgesamt wird in diesen Publikation  $\text{IFN-}\gamma$  als Induktor für neuronale Differenzierung beschrieben, was nicht mit den eigenen Beobachtungen übereinstimmte, denn ein Anstieg von  $\beta$ -tubulin positiven Zellen muss nicht direkt eine veränderte Differenzierung zur Folge haben.

Eigene Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass der Marker  $\beta$ -tubulin neben GFAP erhöht ist, aber die Morphologie und vor allem die doppelte Positivität von GFAP und  $\beta$ -tubulin der Zellen zeigen, dass dieser Effekt nicht mit neuronaler Differenzierung verglichen werden darf. In diesem Falle sollten gliale Marker nicht stärker exprimiert werden. Zudem zeigte sich, dass die  $\beta$ -tubulin gefärbten Zellen keine neuronale Morphologie zeigten, sondern in frühen Passagen an unreife Zellen und älteren Passagen an reaktive Astrozyten erinnerten. Interessanterweise war in der Publikation Lum et al., 2009 eine immunzytochemische Färbung zu sehen. Bei näherer Betrachtung der  $\beta$ -tubulin Färbung IFN- $\gamma$  behandelter Zellen, waren großflächige, rotgefärbte,  $\beta$ -tubulin positive Zellen zu sehen, deren Morphologien an Astrozyten erinnerten. Hier wäre eine immunzytochemische Doppel-Färbung dieser behandelten Zellen mit GFAP und  $\beta$ -tubulin sehr aufschlussreich.

Aufgrund der eigenen Beobachtungen ist festzustellen, dass IFN- $\gamma$  nicht die neuronale Differenzierung vermittelt, sondern das gehäufte Auftreten von GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen fördert (*siehe Kapitel 4.6.3, Abb. 17 und 18*).

In der Publikation von Laywell et al., 2005 wurden Zellen beschrieben die sich unter physiologischen Bedingungen doppelt positiv auf  $\beta$ -tubulin und GFAP zeigten. Diese Zellen wurden von der Laywell-Arbeitsgruppe als „Asterons“ bezeichnet und stellen möglicherweise eine Zwischenstufe in der Differenzierung von Stammzellen dar.

Neurosphären Zellen aus postnatalen C57/Bl6 Mäusen wurden von der Arbeitsgruppe Laywell mit  $\beta$ -tubulin und GFAP in verschiedenen Differenzierungsstadien gefärbt und auf Aussehen und Anzahl der Asterons untersucht.

Sie beschrieben in der Veröffentlichung das Auftreten von Asterons 1-2 Tage nach dem Ausplattieren von Neurosphären in Differenzierungsmedium. Bereits 4 Tagen später steigt die Anzahl der Asterons an, erreicht ihr Maximum (ca. 8 Asterons pro Neurosphäre an Tag 2 und 23 Asterons pro Neurosphäre an Tag 4) und die Morphologie der Asterons verändert sich von eher neuronalem Aussehen zu einer fibroblasten ähnlichen Morphologie, wie sie Astrozyten in Kultur haben.

Dies passt zu den eigenen Beobachtungen. In den jüngeren Passagen der IFN- $\gamma$  behandelten Stammzellen wurden vorwiegend GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positive Stammzellen gefunden, deren Aussehen an undifferenzierte Stammzellen erinnerte. Ältere Passagen zeigten vermehrt fibroblastische, astrozytäre Morphologie nach IFN- $\gamma$  Behandlung (*siehe Kapitel 4.6.3, Abb. 21 und 22*). Dennoch waren in den eigenen unbehandelten Kulturen von differenzierten Stammzellen die doppelt positiven Zellen nur selten zu sehen (4 positive von 3947 gezählten Zellen). Eine mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen

Zellkulturbedingungen sein. Die Arbeitsgruppe aus der Publikation Laywell et al., 2005 hatte ganze Neurosphären auf beschichtete Coverslips gesetzt und mit DMEM/F12/N2 Medium und 5% Serum (Fetal, Kalb) kultiviert. Allgemein wird Fetales Kälber-Serum in der Stammzellforschung für die Differenzierung von Astrozyten aus Stammzellen verwendet. In der Dissertation wurden vereinzelte Zellen auf beschichtete Glasplättchen ausplattiert und in DMEM/F12/B27 ohne Serum kultiviert. Da das zugesetzte Serum generell die Ausbildung des astrozytären Phänotyps fördert, kann es sein, dass bei der Kultivierung mit Serum GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positive Zellen häufiger auftauchen, als in einer Serum freien Kultur. Hier würde ein Experiment mit den unbehandelten Zellen in einer Serum-Kultur, und zusätzlich IFN- $\gamma$  behandelte Zellen in Serum-Kultur Aufschluss geben.

Eine elektrische Ableitung in der Laywell Veröffentlichung zeigte, dass die Asterons nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell an Astrozyten erinnern.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der eigenen Hypothese wäre an dieser Stelle, die durch IFN- $\gamma$  induzierten GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen, ebenfalls elektrophysiologisch zu untersuchen (Patch-Clamp Methode) und die Ausstattung der Zellen mit Kanälen für Natrium und Kalium zu überprüfen. Sollten die durch IFN- $\gamma$  induzierten doppelt positiven Zellen neue Neurone darstellen, so wie es die meisten Publikationen beschrieben, müssten sie über spannungsabhängige Natriumkanäle verfügen, die in der Lage sind ein Aktionspotential (Spike) zu bilden. Ferner könnte über eine genaue Ermittlung der spezifischen Ausstattung mit Kalium-Kanälen dieser Zellen die Art bzw. Subpopulation von Gliazelle ermittelt werden und die Hypothese der reaktiven Astrozyten bestätigt werden. Zusätzlich könnten die durch IFN- $\gamma$  künstlich induzierten GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen mit den natürlich auftretenden Asterons nach Laywell/Steindler verglichen werden.

### **5.6 Asterons: mobilisierte Stammzellen für den Reparatur- und Selbstheilungs-Prozess des ZNS oder dysregulierte Zellen?**

Die Arbeitsgruppe Laywell erklärten das Auftauchen dieser Zellen als ein Übergangszustand von Neuronen über die Asteron Zwischenstufe zu Astrozyten. Sie verwendeten den Begriff der Phänotypischen Fluidität von Nervenzellen zu Astrozyten. Das bedeutet, die Zellen können zwischen verschiedenen Phänotypen wechseln. Das einige Subpopulationen der Astrozyten neurale Stammzell-Eigenschaften besitzen und Nervenzellen generieren können, halten Sie für den Beweis ihrer „Phenotypic Fluidity“ Theorie.

Das Auftreten von GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen induziert durch IFN- $\gamma$  kann möglicherweise eine reaktive Gliose sein. Was eine induzierte Gliose bei neuronalen Stammzellen bedeutet kann nicht genau definiert werden. Eine Vermutung wäre die Reaktion der Zellen auf den inflammatorischen Einfluss, der zur Induktion eines Heilungs- oder Reparaturprozesses des Körpers führen soll. IFN- $\gamma$  ist ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese inflammatorischen Erkrankungen des Gehirns wie MS. Eine Überexpression von IFN- $\gamma$  in Mäusen zeigte spontan die Entwicklung von einer MS ähnlichen demyelinisierenden Erkrankung (Horwitz et al., 1997). Bei einer entzündlichen Reaktion ist eine reaktive Gliose von Astrozyten zu sehen, die geschädigtes Gewebe durch Narbengewebe ersetzen (Lassmann et al., 1997). Solche Areale werden als MS-Plaques bezeichnet und sind durch die pathologischen Veränderungen härter als das umliegende Gewebe. Da durch die Zerstörung der Myelinscheiden im nachfolgenden auch die Nervenfasern angegriffen und somit die Nervenzellen zerstört werden, könnten die durch IFN- $\gamma$  aktivierten, GFAP  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen eine Möglichkeit zur körpereigenen Reparatur darstellen. Eigene Experimente, diese doppelt positiven Zellen durch verschiedene Wachstumsfaktor-Kombinationen mit FGF-8, SHH oder NGF zu Neuronen zu differenzieren scheiterten (*Daten werden nicht gezeigt*). Dies wäre eine mögliche Ursache für die durch IFN- $\gamma$  induzierten doppelt positiven Zellen.

Eine andere und negative Schlussfolgerung wäre das Auftreten von doppelt positiven Zellen verursacht durch IFN- $\gamma$  in Form einer Dysregulation der Zellen, bedingt durch eine hohe Konzentration an Zytokinen. Einige proinflammatorische Zytokine sind nachweislich an der Entstehung chronischer Erkrankungen beteiligt, wie z.B. TNF- $\alpha$  bei der Modulation von chronisch entzündlichen Erkrankungen des Darmes oder IFN- $\gamma$  bei chronischen Multisystemerkrankungen. Bei einer Überproduktion von Zytokinen kann es zu autoimmunen Reaktionen des Körpers kommen und die Bildung von dysregulierten Zellen gefördert werden. Zytokin Rezeptoren finden sich auf allen Körperzellen, so daß sich eine Vielzahl von Möglichkeiten für chronische Erkrankungen bietet. In den *in vitro* Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die Stammzellen einem Überangebot an Zytokinen ausgesetzt. Die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  *in vivo* im ZNS ist nicht genau bekannt. In der Literatur finden sich verschiedenste Angaben über IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Blut die sich im 0-5000pg/ml Bereich ansiedeln. In den Zellkulturexperimenten entsprechen 1000U IFN- $\gamma$  der Konzentration von 100ng/ml, daß wirklich einem Überangebot entspricht. Die Effekte auf die Stammzellen waren bereits bei 1U/ml zusehen (*Daten werden nicht gezeigt*).

Weitere *in vitro* und *in vivo* Experimente müssten dieser Arbeit angefügt werden, um die genaue Funktion von diesen doppelt positiven Zellen zu klären und sie mit den natürlich vorkommenden Astrozyten nach Laywell/Steindler zu vergleichen. Es gibt einige Aspekte die eine Klärung zur Funktion dieser  $\beta$ -tubulin GFAP doppelt positiven Zellen beitragen würden:

- genauere immunzytochemische Charakterisierung der Zellen
- Elektrische Ableitung der Zellen mittels patch-clamp
- das Migrations- und Differenzierungsverhalten von GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen *in vitro* und *in vivo*
- durch IFN- $\gamma$  angeschaltete Signaltransduktionswege bei GFAP und  $\beta$ -tubulin doppelt positiven Zellen *in vitro*
- oder auch das Vorkommen von doppelt positiven Zellen *in vivo*.

Die genaue Funktion der Zellen soll durch weiterführende Experimente geklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation wurde angefertigt, um die Einflüsse von inflammatorischen Zytokinen auf neurale Stammzellen zu untersuchen. Sie haben das Potential strukturelle Veränderungen im ZNS geringfügig wieder zu regenerieren. Da neurale Stammzellen bis ins hohe Alter des Menschen im ZNS zu finden sind und in alle Zelltypen differenzieren können, entwickelten sich verschiedenste Stammzell-basierte Strategien, degeneriertes Gewebe, wie z.B. Nervenzellen, durch Stammzellen zu ersetzen. Bei der Entstehung von Krankheitsbildern wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Multipler Sklerose spielen inflammatorische Reaktionen oft eine große Rolle. Inflammatorische Prozesse führen zur Sekretion von Zytokinen durch Zellen der Immunabwehr und wirken sich auf umliegende Gewebszellen aus. Verschiedenste Signaltransduktionswege, die durch Zytokine angeschaltet werden, können wiederum die Expression von hunderten Genen aktivieren und vielfältige Funktionen induzieren. Insbesondere die Interferone werden therapeutisch bei viralen Infektionen, neurodegenerativen Erkrankungen oder in der Tumorthherapie eingesetzt. Interferon- $\beta$  war beispielsweise ein Meilenstein in der Therapie von schubförmig-remittierender Multipler Sklerose.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der drei proinflammatorischen Zytokine IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  untersucht.

Vorraussetzung für die Wirkung von Zytokinen ist die Ausstattung der Zellen mit spezifischen Rezeptoren, die mittels der Methoden der PCR auf mRNA Ebene und der Expression der Rezeptoren auf Proteinlevel über die Immunzytochemie überprüft wurden.

Neurale Stammzellen exprimieren nachweislich die Untereinheiten für den IFN- $\alpha\beta$  Rezeptor, beide Untereinheiten für den IFN- $\gamma$  Rezeptor und den TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor I (p55). Der Rezeptor TNF- $\alpha\beta$  Rezeptor II (p75) konnte sowohl auf Gen, als auch auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

Da aus der Literatur bekannt war, daß Zytokine eine antiproliferative Wirkung auf, z.B. hämatopoetische Progenitor-Zellen haben (Carlo-Stella et al., 1987), wurde mit Hilfe des MTT-Testes eine mögliche Wirkung der Zytokine auf die Populationsgröße von neuronalen Stammzellen untersucht. Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Nachweis für die Aktivität mitochondrialer Enzyme in vitalen Zellen, welcher Aufschluss darüber gab, daß alle drei Zytokine in unterschiedlichen Graden die Größe der Stammzell-Population inhibierten. Eine Interferon Behandlung führte bereits 24 und 48h später bei den höchsten Konzentrationen von 1000U und 100U pro ml, im Vergleich zu unbehandelten Proben, zu einer reduzierten

Populationsgröße. Insbesondere IFN- $\gamma$  stellte sich in den Experimenten als das Zytokin mit der stärksten Wirkung dar. TNF- $\alpha$  behandelte Zellen zeigten lediglich nach 24h bei den Konzentrationen von 100ng und 10ng pro ml eine leichte, inhibierte Extension der Population.

Um zu klären, ob die Populationsgröße durch Proliferationshemmung, oder durch Zytotoxizität verursacht wurde, sind die Zytokin behandelte Zellen mit Hilfe eines Caspase-Test und immunzytochemischen Färbungen mit dem Wachstumsmarker BrdU genauer untersucht worden. Bei dem Wachstumsmarker BrdU handelt es sich um ein Basen-Analogon, welches anstelle von Thymidin in die DNA, sich teilender Zellen, eingebaut wird. Wenn die Hemmung der Populationsgröße durch einen antiproliferativen Effekt begründet ist, so sollte die Anzahl BrdU positiver Zellen bei behandelten Zellen, im Vergleich zu unbehandelten, geringer sein. Mögliche zytotoxische Effekte der Interferone werden durch einen Anstieg von apoptotischen Enzymen wie z.B. Caspase 3 und 7 sichtbar.

Interferon- $\beta$  stellte sich anhand von weniger BrdU positiven Zellkernen nach 24h als antiproliferatives und leicht zytotoxisches Zytokin dar. Die Wirkung von IFN- $\gamma$  war dagegen durch einen sehr starken zytotoxischen Effekt, welcher nach 48h bei hohen und auch niedrigen Konzentrationen zu sehen war, begründet. Werden beide Interferone miteinander verglichen, so ist festzustellen, daß Interferon- $\beta$  seine Wirkung vermehrt über antiproliferative Wirkung vermittelt, während der Wachstum der Population durch IFN- $\gamma$  primär durch Zytotoxizität inhibiert wird. Im Gegensatz zur Interferon Behandlung neuraler Stammzellen zeigte sich TNF- $\alpha$  nach 48h Inkubationszeit bei den beiden höchsten Konzentrationen von 100ng und 10ng/ml nur leicht toxisch. Die Anzahl BrdU positiver Zellen blieb, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, völlig unverändert.

Zytokine sind in der Lage über den Jak/Stat-Signaltransduktionsweg die Expression von circa 300 verschiedenen Genen zu verändern (Der et al., 1998). Um zu klären, ob Zytokine auch einen Einfluss auf wichtige Gene der Differenzierung von neuralen Stammzellen haben, wurde mit Hilfe der PCR und der Immunzytochemie, die Differenzierung unter Zytokin Einfluss, überprüft. Insbesondere die veränderte Differenzierung der neuralen Stammzellen in Astrozyten und Nervenzellen, waren von großem Interesse. Fünf verschiedene Marker wurden für diese Untersuchung verwendet. Nestin ist ein Marker für unreife und undifferenzierte Stammzellen. Map2a-c sowie  $\beta$ -tubulin III sind gängige Marker für die Differenzierung von Stammzellen in Nervenzellen und als Marker für die gliale Differenzierung wurden GFAP sowie PDGFR $\alpha$  untersucht.

IFN- $\beta$  und vor allem IFN- $\gamma$  wirkten sich auf die Expression der zwei Zellmarker  $\beta$ -tubulin III und GFAP aus. Neurale Stammzellen exprimieren 24h nach IFN-Behandlung vermehrt  $\beta$ -tubulin und GFAP im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Vor allem IFN- $\gamma$  zeigte eine verstärkte Regulation der beiden Gene. Im Gegensatz dazu induzierte TNF- $\alpha$  eine verminderte Regulation des neuronalen Markers Map2a-c.

Eine veränderte Regulation der drei Marker unter Zytokin Einfluss kann ein Hinweis auf eine beginnende Differenzierung sein. Morphologische Experimente durch immunzytochemische Färbungen sollten diese Hypothese bestätigen.

Wie zu erwarten, konnten die Ergebnisse der PCR durch die Immunzytochemie nochmals repliziert werden. Interferon behandelte Zellen zeigten auch auf Proteinebene eine verstärkte Expression von GFAP sowie  $\beta$ -tubulin III und überraschender Weise eine veränderte Morphologie der Zellen. Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  induzierte die Bildung von GFAP und  $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen, mit überwiegend astrozytären Morphologien. Die Zellen zeigten ein dysreguliertes, abnormes morphologisches Aussehen und tauchten im Gegensatz dazu bei unbehandelten Zellen nicht auf. ESC abgeleitete neurale Stammzellen konnten ebenfalls durch IFN- $\gamma$  zur erhöhten Genexpression von  $\beta$ -tubulin und GFAP, sowie zur Ausbildung von astrozytären Morphologien angeregt werden.

IFN- $\beta$  induzierte keine GFAP und  $\beta$ -tubulin III doppelt positiven Zellen, statt dessen hemmte IFN- $\beta$  die neurale Differenzierung der Stammzellen durch eine Verminderung der Anzahl reifer Neurone mit Hemmung des Neuritenwachstums. Die gliale Differenzierung sowie die Anzahl  $\beta$ -tubulin positiver Zellen blieb durch IFN- $\beta$  völlig unbeeinflusst. TNF- $\alpha$  wirkte sich weder auf die gliale noch die neurale Differenzierung in negativer Form aus. Im Zuge dessen zeigte sich eine leicht neuroprotektive Wirkung mit der Tendenz zu längeren Neuriten.

Die Kenntnis über den Einfluss von Zytokinen auf neurale Stammzellen ist besonders wichtig für das Verständnis des Selbstheilungsprozesses des ZNS und auch für den therapeutischen Einsatz von Stammzellen bei Transplantationen. Stammzellen die in degeneriertes Gewebe von Parkinson oder MS Patienten eingebracht werden sollen, können durch die pathologische Umgebung und inflammatorischen Zytokine beeinflusst werden. Auch die *in vivo* persistierenden Progenitor-Zellen können durch Zytokine beeinflusst werden, wie z.B. bei inflammatorischen Prozessen der MS. Wie man unschwer an der vorliegenden Arbeit erkennen kann, haben gerade die Interferone einen starken Effekt auf die Expression von Genen und Morphologien der neuralen Stammzellen während der Differenzierung. Es besteht die Möglichkeit, daß diese Zellen dysregulierte Zellen darstellen. Welches Potential

dysregulierte Zellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* aufweisen, ist zum Teil noch ungeklärt und muss vor einer therapeutischen Anwendung von neuronalen Stammzellen genauestens untersucht werden.

## 7. Summary

The thesis was conducted in order to investigate the influence of inflammatory cytokines on neural stem cells. Neural stem and progenitor cells have the potential for structural repair of the brain and spinal cord. Their ability to generate neurons and glial cells until adulthood in the human brain resulted in the development of stem-cell based strategies for neuronal repair. Various inflammatory processes play a role in the pathology of brain diseases like Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease or Multiple Sclerosis. Inflammatory processes lead to secretion of cytokines by cells of the immune system and have an impact on surrounding tissues. Different signal transduction pathways switched on by cytokines can activate gene-expression and induce various cell functions. In recent years, various inflammatory cytokines were shown to influence also neural stem cells. Noteworthy, interferons are also therapeutic for viral infections, tumour therapy or neurodegenerative diseases. For instance, IFN- $\beta$  is a milestone in the treatment of relapsing Multiple Sclerosis.

In this study, the effects of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on neural stem cells were investigated.

As effects of cytokines can only be mediated through specific receptors, in a first set of experiments, the presence of these receptors on neural stem cells was verified with techniques like PCR and immunocytochemistry. PCR is a method for detecting expressed mRNA and immunocytochemistry for staining expressed proteins in or on cells.

These investigations showed that neural stem cells express subunits of the IFN- $\alpha\beta$  receptor, both subunits for the IFN- $\gamma$  receptor and the TNF- $\alpha\beta$  receptor I (p55). The receptor TNF- $\alpha\beta$  receptor II (p75) could neither be detected on transcript level nor on protein level.

As cytokines often exert antiproliferative effects, for instance on hematopoietic progenitor cells (Carlo-Stella et al., 1987), the MTT Assay was used as a first approach to clarify any effects on population extension of neural stem cells. MTT is a colorimetric assay for measuring the activity of mitochondrial enzymes in existing cells and revealed that all three cytokines inhibited the extension of neural stem cell population at varying levels. Interferon treatment led to reduction at 24 and 48 hours of incubation at high concentrations of 1000 and 100U per ml in contrast to untreated cells. Predominantly IFN- $\gamma$  treated neural populations were significantly smaller in comparison to untreated populations. TNF- $\alpha$  treated populations showed only after 24hours an inhibited extension at highest concentration of 100 and 10ng per ml.

To clarify whether the reduced populations after cytokine treatment were due to antiproliferative or cytotoxic effects, the Caspase Assay and BrdU labelling were used. BrdU is a thymidine nucleotide substitute which can bind into the DNA structure of dividing cells. If the population extension is caused by an antiproliferative effect the number of BrdU positive cells should be smaller. The Caspase Assay is based on the measurement of apoptotic enzymes (Caspase 3 and 7) and detects any cytotoxic effect induced by cytokine treatment. These investigations showed antiproliferative effects of IFN- $\beta$  after 24hours with slightly toxic effect at 1000U per ml. After IFN- $\gamma$  application strong cytotoxic effects were detected at 48 hours of incubation at high and low concentrations. In comparison to Interferon treatment the TNF- $\alpha$  treated populations showed after 48 hours of incubation at higher concentrations of 100 and 10ng per ml slight toxic effects. The number of BrdU positive cells of TNF- $\alpha$  compared to untreated cells was not affected.

Cytokines are able to change gene expression of cells via the Jak/Stat-Pathway and are known to change differentiation and maturation of stem cells. Of significant interest was the influence in differentiation of cytokine treated neural stem cells, particularly with regard to differentiation of neural stem cells into neurons or astrocytes.

To clarify the differentiation of cytokine treated neural stem cells, PCR as well as immunocytochemistry were used for analysing five important marker. Nestin was used as a significant marker of premature cells.  $\beta$ -tubulin III and Map2a-c are important markers for neuronal differentiation and GFAP as well as PDGFR $\alpha$  are necessary markers for glial differentiation of neural stem cells.

Both cytokines, IFN- $\beta$  and especially IFN- $\gamma$ , influenced gene-expression of two genes:  $\beta$ -tubulin III and glial fibrillary acidic protein (GFAP). The up-regulation of GFAP and  $\beta$ -tubulin III could already be seen after 24hours in comparison to untreated cells. IFN- $\gamma$  treatment of neural stem cells showed the strongest increased levels of  $\beta$ -tubulin III and GFAP. In contrast, TNF- $\alpha$  induced only a down regulation of the neuronal marker Map2a-c. To corroborate the hypothesis that the up regulation of  $\beta$ -tubulin III, Map2a-c and GFAP means induction of differentiation, immunocytochemical and morphological investigations were performed.

As we expected we could confirm the results of the PCR experiments. Interferone treated populations showed up regulation of  $\beta$ -tubulin III and GFAP also on protein level. Surprisingly, morphologic investigations of cytokine treatment confirmed not only the differential gene and protein expression of  $\beta$ -tubulin III and GFAP in neural stem cells, but

also resulted in comparable changes in the morphologic differentiation of these cells. The treatment of neural stem cells with IFN- $\gamma$  led to  $\beta$ -tubulin III and GFAP double positive cells with predominantly astrocytic morphologies. The appearance of these cells was dysmorphic and unusual. ESC-derived neural stem cells also showed an increased co-localized expression of  $\beta$ -tubulin III and GFAP and astrocytic morphologies of double labeled cells after IFN- $\gamma$  treatment.

In contrast, IFN- $\beta$  treatment did not result in GFAP and  $\beta$ -tubulin III double labeled cells, but inhibited neuronal maturation by reduction of the total number of NeuN-positive neurons and by inhibition of neurite outgrowth. The mere number of  $\beta$ -tubulin-positive neurons was not affected by IFN- $\beta$ . The glial differentiation was completely unaffected by IFN- $\beta$ . TNF- $\alpha$  affected neither glial nor neuronal differentiation. Rather a slight effect of TNF- $\alpha$  with tendency to longer neurites after treatment was detected.

The elucidation of cytokines influencing neural stem cells is essential for a comprehensive understanding of adult neurogenesis and the potential of therapeutic transplantation of stem cell-derived neural populations. Stem cells transplanted into degenerated brains of patients suffering from Parkinson Disease or Multiple Sclerosis can be influenced by the cytokine environment. Moreover, endogenous stem cells can be affected by inflammation processes as described for Multiple Sclerosis. As presented in this thesis, the effect of IFN- $\beta$  and IFN- $\gamma$  treatment *in vitro* disclosed strong effects on neural stem cell differentiation. Predominantly the observation of IFN- $\gamma$ -induced unusual phenotypes led to the hypothesis that these cells are dysregulated. The potential of dysregulated stem cells *in vivo* or *in vitro* is not well-known yet and remains to be elucidated until valid approach in therapeutic application can be realised.

1. Abramova N, Charniga C, Goderie SK, Temple S  
**Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells**  
Dev Biol. 2005 Jul 15;283(2):269-81
2. Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V  
**NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus**  
J Cell Biol. 2004 May 24;165(4):575-89
3. Allen IV, Millar JH, Hutchinson M  
**General disease in 120 necropsy-proven cases of multiple sclerosis**  
J Neuropathol Appl Neurobiol. 1978 Jul-Aug;4(4):279-84
4. Altman J, Das GD  
**Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats**  
J Comp Neurol, 1966, 126, 337-389
5. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP  
**TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination**  
Nat Neurosci. 2001 Nov;4(11):1116-22
6. Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Déglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P  
**Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain**  
Exp Neurol. 2001 Jul;170(1):48-62
7. Auvergne R, Leré C, El Bahh B, Arthaud S, Lespinet V, Rougier A, Le Gal La Salle G  
**Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment**  
Brain Res. 2002 Nov 8;954(2):277-85
8. Backhouse B, Barochovsky O, Malik C, Patel AJ, Lewis PD  
**Effects of haloperidol on cell proliferation in the early postnatal rat brain**  
Neuropathol Appl Neurobiol. 1982 Mar-Apr;8(2):109-16
9. Barger S W, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP  
**Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 September 26; 92(20): 9328–9332
10. Battegay EJ, Raines EW, Colbert T, Ross R  
**TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression**  
J Immunol. 1995 Jun 1;154(11):6040-7

11. Berling B, Wille H, Röhl B, Mandelkow EM, Garner C, Mandelkow E  
**Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2a,b and MAP2c at Ser136 by proline-directed kinases in vivo and in vitro**  
Eur J Cell Biol. 1994 Jun;64(1):120-30
12. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Capobianco M, Malucchi S, Milano E, Melis F, Marnetto F, Lindberg RL, Bottero R, Di Sapio A, Giordana MT  
**Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioavailability in MS patients**  
Neurology. 2003 Feb 25;60(4):634-9
13. Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A  
**Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis**  
Arch Neurol. 2005 Apr;62(4):563-8
14. Blakemore WF  
**The ultrastructure of the subependymal plate in the rat**  
J Anat. 1969 May;104(Pt 3):423-33
15. Blakemore WF, Jolly RD  
**The subependymal plate and associated ependyma in the dog. An ultrastructural study**  
J Neurocytol. 1972 Jul;1(1):69-84
16. Bottai D, Fiocco R, Gelain F, Defilippis L, Galli R, Gritti A, Vescovi LA  
**Neural stem cells in the adult nervous system**  
J Hematother Stem Cell Res. 2003 Dec;12(6):655-70
17. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA  
**Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells**  
Cell. 2005 Sep 23;122(6):947-56
18. Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C  
**Remyelination in multiple sclerosis**  
J Neurol Sci. 2003 Feb 15;206(2):181-5
19. Brück W, Stadelmann C  
**Inflammation and degeneration in multiple sclerosis**  
Neurol Sci. 2003 Dec;24 Suppl 5:S265-7
20. Brüstle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD  
**In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 23;94(26):14809-14
21. Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z  
**Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro**  
J Neurosci Res. 2005 Jun 15;80(6):789-97

22. Cameron HA, McEwen BS, Gould E  
**Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus**  
J Neurosci. 1995 Jun;15(6):4687-92
23. Cameron RS, Rakic P  
**Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis**  
Glia. 1991;4(2):124-37
24. Campbell IL  
**Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS**  
Brain Res. 2005 Apr;48(2):166-77
25. Capela A, Temple S  
**LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal**  
Neuron. 2002 Aug 29;35(5):865-75
26. Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascari E  
**Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia**  
Blood. 1987 Oct;70(4):1014-9
27. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S  
**LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism**  
Development. 2005 Mar;132(5):885-96. Epub 2005 Jan 26
28. Chapouton P, Gärtner A, Götz M  
**The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia**  
Development 1999 Dec;126(24):5569-79
29. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP  
**Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain**  
Dev Biol. 2003 Jun 15;258(2):319-33
30. Cheng B, Christakos S, Mattson MP  
**Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis**  
Neuron. 1994 Jan;12(1):139-53
31. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH  
**Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells**  
Mol Cell Biol. 2005 Jul;25(14):6031-46

32. Chinnaiyan AM, Dixit VM  
**The cell-death machine**  
Curr Biol. 1996 May 1;6(5):555-62
33. Christensen T  
**The role of EBV in MS pathogenesis**  
Int MS J. 2006 May;13(2):52-7
34. Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC  
**MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2**  
J Neurochem. 1996 Mar;66(3):1273-81
35. Clark WM, Lutsep HL  
**Potential of anticytokine therapies in central nervous system ischaemia**  
Expert Opin Biol Ther. 2001 Mar;1(2):227-37
36. Compston A  
**Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver, by S. A. Kinnier Wilson, (From the National Hospital, and the Laboratory of the National Hospital, Queen Square, London) Brain 1912: 34; 295-509**  
Brain. 2009 Aug;132(Pt 8):1997-2001
37. Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A  
**Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell**  
PLoS Biol. 2005 Sep;3(9):e283. Epub 2005 Aug 16
38. Crews FT, Miller MW, Ma W, Nixon K, Zawada WM, Zakhari S  
**Neural stem cells and alcohol**  
Alcohol Clin Exp Res. 2003 Feb;27(2):324-35
39. Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL  
**Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):9023-7
40. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR  
**Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins**  
Science. 1994 Jun 3;264(5164):1415-21
41. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA  
**Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus**  
J Comp Neurol. 2003 Jun 9;460(4):563-72
42. Dehmelt L, Halpain S  
**The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins**  
Genome Biol. 2005 Dec 23;6(1):204

43. De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J  
**You cannot get away from interferon**  
J Interferon Res. 1987 Oct;7(5):467-70
44. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH  
**Identification of genes differentially regulated by interferon a, b, or g using oligonucleotide arrays**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15623-8
45. Doetsch F  
**The glial identity of neural stem cells**  
Nat Neurosci. 2003 Nov;6(11):1127-34
46. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A  
**Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain**  
Cell. 1999 Jun 11;97(6):703-16
47. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A  
**Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain**  
J Neurosci. 1997 Jul 1;17(13):5046-61
48. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A  
**EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells**  
Neuron. 2002 Dec 19;36(6):1021-34
49. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC  
**Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha**  
Glia. 1999 Nov;28(2):114-27
50. Drago J, Nurcombe V, Pearse MJ, Murphy M, Bartlett PF  
**Basic fibroblast growth factor upregulates steady-state levels of laminin B1 and B2 chain mRNA in cultured neuroepithelial cells**  
Exp Cell Res. 1991 Oct;196(2):246-54
51. Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J  
**Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling**  
Cell. 1997 Jul 11;90(1):169-80
52. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD  
**A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells**  
Nat Cell Biol. 2004 Nov;6(11):1082-93 Erratum in: Nat Cell Biol. 2005 May;7(5):531
53. Fernandes KJ, Miller FD  
**Isolation, expansion, and differentiation of mouse skin-derived precursors**  
Methods Mol Biol. 2009;482:159-70

54. Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD  
**Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential**  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008 Jan 12;363(1489):185-98
55. Ferreira A, Caceres A  
**Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture**  
J Neurosci Res. 1992 Aug;32(4):516-29
56. Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE  
**The Cytokine factsbook**  
Factsbook Series, Academic Press 2001
57. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U  
**Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2**  
J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):RC216
58. Forsberg-Nilsson K, Behar TN, Afrakhte M, Barker JL, McKay RD  
**Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells**  
J Neurosci Res. 1998 Sep 1;53(5):521-30
59. Franklin RJ, Blakemore WF  
**Glial-cell transplantation and plasticity in the O-2A lineage--implications for CNS repair**  
Trends Neurosci. 1995 Mar;18(3):151-6
60. Freed WJ  
**A perspective on transplantation therapy and stem cells for Parkinson's disease**  
Cell Transplant. 2004;13(3):319-27
61. Gage FH  
**Mammalian neural stem cells**  
Science. 2000 Feb 25;287(5457):1433-8
62. Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J  
**Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus**  
J Neurobiol. 1998 Aug;36(2):249-66
63. Gallo V, Armstrong RC  
**Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells**  
J Neurosci. 1995 Jan;15(1 Pt 1):394-406
64. Garner CC, Brugg B, Matus A  
**A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2**  
J Neurochem. 1988 Feb;50(2):609-15
65. Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfield R  
**Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence**  
Brain 2000; 123 Pt 3:508-518

66. Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V  
**Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation.**  
Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):619-31
67. González-Martínez JA, Bingaman WE, Toms SA, Najm IM  
**Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain**  
J Neurosurg. 2007 Sep;107(3):628-35
68. Gopinath S, Vanamala SK, Gondi CS, Rao JS  
**Human umbilical cord blood derived stem cells repair doxorubicin-induced pathological cardiac hypertrophy in mice**  
Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 9. [Epub ahead of print]
69. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ  
**Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation**  
Nat Neurosci. 1999 Mar;2(3):260-5
70. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E  
**Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation**  
J Neurosci. 1997 Apr 1;17(7):2492-8
71. Götz M, Hartfuss E, Malatesta P  
**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. 2002 Apr;57(6):777-88
72. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL  
**Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents**  
Neurosci. 2002 Jan 15;22(2):437-45
73. Gritti A, Vescovi AL, Galli R  
**Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential**  
J Physiol Paris. 2002 Jan-Mar;96(1-2):81-90
74. Groves AK, Barnett SC, Franklin RJ, Crang AJ, Mayer M, Blakemore WF, Noble M  
**Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells**  
Nature. 1993 Apr 1;362(6419):453-5
75. Günther, HL, Kaiser, P, Taupitz, J  
**Kommentar zum Embryonenschutzgesetz**  
Kohlhammer Verlag, 2008
76. Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M  
**Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6**  
Mol Cell Neurosci. 2004 Apr;25(4):664-78

77. Hagell P, Brundin P  
**Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease**  
Neuropathol Exp Neurol. 2001 Aug;60(8):741-52
78. Hall A, Giese NA, Richardson WD  
**Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors**  
Development 1996 Dec;122(12):4085-94
79. Hall PA  
**What are stem cells and how are they controlled?**  
J Pathol. 1989 Aug;158(4):275-7
80. Hall PA, Watt FM  
**Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity**  
Development. 1989 Aug;106(4):619-33
81. Hartung HP, Kieseier BC  
**Targets for the therapeutic action of interferon-beta in multiple sclerosis**  
Ann Neurol. 1996 Dec;40(6):825-6
82. Haughey NJ, Liu D, Nath A, Borchard AC, Mattson MP  
**Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease**  
Neuromolecular Med. 2002;1(2):125-35
83. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP  
**Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease**  
J Neurochem. 2002 Dec;83(6):1509-24
84. Hehlhans T, Pfeffer K  
**The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games**  
Immunology. 2005 May;115(1):1-20
85. Heine S, Ebnet J, Maysami S, Stangel M  
**Effects of interferon-beta on oligodendroglial cells**  
J Neuroimmunol. 2006 Aug;177(1-2):173-80
86. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC  
**Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease**  
Nat Neurosci. 2004 Jul;7(7):726-35
87. Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T  
**MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells**  
J Biol Chem. 2006 Jul 21;281(29):20095-106

88. Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH  
**Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord**  
J Neurosci. 2000 Mar 15;20(6):2218-28
89. Horwitz MS, Evans CF, McGavern DB, Rodriguez M, Oldstone MB  
**Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma**  
Nat Med. 1997 Sep;3(9):1037-41
90. Ihle JN  
**The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling**  
Adv Immunol. 1995;60:1-35
91. Ihle JN, Kerr IM  
**Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily**  
Trends Genet. 1995 Feb;11(2):69-74
92. Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K, Akaza H  
**Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells**  
Int J Urol. 2002 Jan;9(1):29-35
93. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV  
**The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP**  
J Neurosci. 2003 Apr 1;23(7):2824-32
94. Isaacs A, Lindenmann J  
**Virus interference. I. The interferon**  
J Interferon Res. 1987 Oct;7(5):429-38
95. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR  
**Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference**  
Nature. 2006 Aug 3;442(7102):533-8. Epub 2006 Jun 11
96. Jacobs L, Kaba S, Pullicino P  
**The lesion causing continuous facial myokymia in multiple sclerosis**  
Arch Neurol. 1994 Nov;51(11):1115-9
97. Jacobsen FW, Dubois CM, Rusten LS, Veiby OP, Jacobsen SE  
**Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Regulation of c-kit and p53 expression**  
J Immunol. 1995 Apr 15;154(8):3732-41
98. Jacobsen SE, Ruscetti FW, Dubois CM, Keller JR  
**Tumor necrosis factor alpha directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role of colony-stimulating factor receptor modulation**  
J Exp Med. 1992 Jun 1;175(6):1759-72

99. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA  
**Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4710-5
100. Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Bateur S, Greenberg DA  
**Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum.**  
Mol Cell Neurosci. 2003 Sep;24(1):171-89
101. Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, Majed H, Sterling J, Compston A, Chandran S  
**Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells**  
Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):172-8
102. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J  
**Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system**  
Cell. 1999 Jan 8;96(1):25-34
103. Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J  
**Neural stem cells in the adult human brain**  
Exp Cell Res. 1999 Dec 15;253(2):733-6
104. Johe KK  
**Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system**  
Genes Dev 1996; 10:3129-40
105. Kaplan MS, Bell DH  
**Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus**  
Exp Brain Res. 1983;52(1):1-5
106. Kaplan MS, Hinds JW  
**Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs**  
Science. 1977 Sep 9;197(4308):1092-4
107. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA  
**Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes**  
Nat Genet. 2007 Aug;39(8):936-8
108. Kaut, O  
**Expression von TNF- $\alpha$  und seinen Rezeptoren p55TNFR und p75TNFR im Gehirn der Maus nach SEB- und LPS-Stimulation**  
Inaugural Dissertation, Universität Marburg, 2005
109. Kim IJ, Beck HN, Lein PJ, Higgins D  
**Interferon  $\gamma$  Induces Retrograde Dendritic Retraction and Inhibits Synapse Formation**  
J Neurosci. 2002 Jun 1;22(11):4530-9

110. Kim SJ, Son TG, Kim K, Park HR, Mattson MP, Lee J  
**Interferon-gamma promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway**  
Neurochem Res. 2007 Aug;32(8):1399-406
111. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A  
**Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5**  
Immunity. 2000 Jun;12(6):611-20
112. Kolesnick R, Golde DW  
**The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling**  
Cell. 1994 May 6;77(3):325-8
113. Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP  
**Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease**  
N Engl J Med. 1995 Apr 27;332(17):1118-24
114. Kornack DR, Rakic P  
**The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4752-7
115. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP  
**IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex**  
Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):69-77
116. Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Muthukumaran G, Paukku K, Silvennoinen O, Ihle JN, Pestka S  
**Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma**  
J Biol Chem. 1996 Jul 19;271(29):17174-82
117. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH  
**Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation**  
J Neurosci. 1996 Mar 15;16(6):2027-33
118. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA  
**Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain**  
Exp Neurol. 1999 Apr;156(2):333-44
119. Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA  
**Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus**  
Eur J Neurosci. 2002 Nov;16(10):2008-12

120. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T  
**Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression**  
Mol Cell Biol. 2005 Mar;25(6):2475-85
121. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S  
**The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions**  
Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Feb;15(1):33-48
122. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, Rodriguez M  
**Remyelination in multiple sclerosis**  
Mult Scler. 1997 Apr;3(2):133-6
123. Laywell ED, Kearns SM, Zheng T, Chen KA, Deng J, Chen HX, Roper SN, Steindler DA  
**Neuron-to-astrocyte transition: phenotypic fluidity and the formation of hybrid asteroons in differentiating neurospheres**  
J Comp Neurol. 2005 Dec 19;493(3):321-33
124. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA  
**Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13883-8
125. Lee J, Kim SJ, Son TG, Chan SL, Mattson MP  
**Interferon-gamma is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity**  
J Neurosci Res. 2006 Jun;83(8):1552-7
126. Lefèvre F, Guillomot M, D'Andréa S, Battegay S, La Bonnardière C  
**Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family**  
Biochimie. 1998 Aug-Sep;80(8-9):779-88
127. Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C  
**Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation**  
Immunity. 2003 May;18(5):655-64
128. Lenington JB, Yang Z, Conover JC  
**Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis**  
Reprod Biol Endocrinol. 2003 Nov 13;1:99
129. Levison SW, Goldman JE  
**Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain**  
Neuron. 1993 Feb;10(2):201-12
130. Lewis PD  
**A quantitative study of cell proliferation in the subependymal layer of the adult rat brain**  
Exp Neurol. 1968 Feb;20(2):203-7

131. Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A  
**The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies**  
Neurosurg Clin N Am. 2007 Jan;18(1):81-92
132. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW  
**Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 23;97(11):6126-31
133. Lobo MV, Alonso FJ, Redondo C, López-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paíno CL, Reimers D, Bazán E  
**Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres**  
J Histochem Cytochem. 2003 Jan;51(1):89-103
134. Lois C, Alvarez-Buylla A  
**Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain**  
Science. 1994 May 20;264(5162):1145-8
135. Lois C, Alvarez-Buylla A  
**Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 1;90(5):2074-7
136. Lum M, Croze E, Wagner C, McLenachan S, Mitrovic B, Turnley AM  
**Inhibition of neurosphere proliferation by IFNgamma but not IFNbeta is coupled to neuronal differentiation**  
J Neuroimmunol. 2009 Jan 3;206(1-2):32-8
137. Lundberg C, Martínez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RD, Björklund A  
**Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum**  
Exp Neurol. 1997 Jun;145(2 Pt 1):342-60
138. Mai JK, Andressen C, Ashwell KW  
**Demarcation of prosencephalic regions by CD15-positive radial glia**  
Eur J Neurosci. 1998 Feb;10(2):746-51
139. Malatesta P, Hartfuss E, Götz M  
**Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage**  
Development. 2000 Dec;127(24):5253-63
140. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS  
**Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus**  
J Neurosci. 2000 Dec 15;20(24):9104-10

141. Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL  
**Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway**  
J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32869-81
142. Markakis EA, Gage FH  
**Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles**  
J Comp Neurol. 1999 Apr 19;406(4):449-60
143. Martyn CN, Cruddas M, Compston DA  
**Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis**  
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1993 Feb;56(2):167-8
144. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A  
**Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain**  
J Neurosci. 2006 Jul 26;26(30):7907-18
145. Micheau O, Tschopp J  
**Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes**  
Cell. 2003 Jul 25;114(2):148-50
146. Moe MC, Varghese M, Danilov AI, Westerlund U, Ramm-Petersen J, Brundin L, Svensson M, Berg-Johnsen J, Langmoen IA  
**Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons**  
Brain. 2005 Sep;128(Pt 9):2189-99
147. Mori T, Buffo A, Götz M  
**The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis**  
Curr Top Dev Biol. 2005;69:67-99
148. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ  
**Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells**  
Cell. 1999 Mar 5;96(5):737-49
149. Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D  
**In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain**  
Development. 1998 Jun;125(12):2251-61
150. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D  
**Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells**  
Neuron. 1994 Nov;13(5):1071-82

151. Morshead CM, van der Kooy D  
**Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain**  
J Neurosci. 1992 Jan;12(1):249-56
152. Murphy TH, Baraban JM.  
**Glutamate toxicity in immature cortical neurons precedes development of glutamate receptor currents**  
Brain Res Dev Brain Res. 1990 Dec 1;57(1):146-50
153. Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA  
**Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism**  
J Neurosci. 2002 Feb 1;22(3):854-62
154. Nixon K, Crews FT  
**Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus**  
J Neurochem. 2002 Dec;83(5):1087-93
155. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG  
**Multiple sclerosis**  
N Engl J Med. 2000 Sep 28;343(13):938-52
156. Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA  
**Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain**  
Nat Med. 2003 Apr;9(4):439-47. Epub 2003 Mar 10
157. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL  
**Multiple sclerosis: genomic rewards**  
J Neuroimmunol. 2001 Feb 15;113(2):171-84
158. Oksenberg JR, Begovich AB, Erlich HA, Steinman L  
**Genetic factors in multiple sclerosis**  
JAMA. 1993 Nov 17;270(19):2362-9
159. Olanow CW  
**Surgical therapy for Parkinson's disease**  
Eur J Neurol. 2002 Nov;9 Suppl 3:31-9
160. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB  
**A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease**  
Ann Neurol. 2003 Sep;54(3):403-14
161. Oritani K, Kincade PW, Tomiyama Y  
**Limitin: an interferon-like cytokine without myeloerythroid suppressive properties**  
J Mol Med. 2001 May;79(4):168-74. Review. Erratum in: J Mol Med 2001 Aug;79(8):475

162. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH  
**Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS**  
J Neurosci. 1999 Oct 1;19(19):8487-97
163. Palmer TD, Ray J, Gage FH  
**FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain**  
Mol Cell Neurosci. 1995 Oct;6(5):474-86
164. Parent JM  
**The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair**  
Epilepsy Res. 2002 Jun;50(1-2):179-89
165. Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH  
**Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway**  
J Neurosci. 2002 Apr 15;22(8):3174-88
166. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H  
**Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients**  
Brain. 2006 Dec;129(Pt 12):3165-72. Erratum in: Brain. 2007 Mar;130(Pt 3):879
167. Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB  
**Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain**  
Exp Neurol. 2001 Nov;172(1):1-16
168. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB  
**Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus**  
J Neurosci. 2001 Sep 1;21(17):6706-17
169. Périer O, Grégoire A  
**Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions**  
Brain. 1965 Dec;88(5):937-52
170. Pestka S, Krause CD, Walter MR  
**Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors**  
Immunol Rev. 2004 Dec;202:8-32
171. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE  
**Interferons and their actions**  
Annu Rev Biochem. 1987;56:727-77
172. Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS  
**Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus**  
Eur J Neurosci. 2003 Feb;17(4):879-86

173. Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnström S, Widner H, Lindvall O  
**Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient**  
Nat Neurosci. 1999 Dec;2(12):1137-40
174. Polman C, Kappos L, White R, Dahlke F, Beckmann K, Pozzilli C, Thompson A, Petkau J, Miller D; European Study Group in Interferon Beta-1b in Secondary Progressive MS  
**Neutralizing antibodies during treatment of secondary progressive MS with interferon beta-1b**  
Neurology. 2003 Jan 14;60(1):37-43
175. Potten CS, Morris RJ  
**Epithelial stem cells in vivo**  
J Cell Sci Suppl. 1988;10:45-62
176. Pucci MJ, Dougherty TJ, Barrett JF  
**Targets, targets everywhere--so where are the new antibacterial drugs?**  
Drugs. 2000 Mar;3(3):249-50
177. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A  
**Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells**  
J Comp Neurol. 2006 Jan 20;494(3):415-34
178. Ra SM, Kim H, Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Kim CJ, Kim EH, Kim KM, Kim SS  
**Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats**  
Neurosci Lett. 2002 Nov 22;333(2):123-6
179. Ray J, Gage FH  
**Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor**  
J Neurosci. 1994 Jun;14(6):3548-64
180. Reznikov K, Acklin SE, van der Kooy D  
**Clonal heterogeneity in the early embryonic rodent cortical germinal zone and the separation of subventricular from ventricular zone lineages**  
Dev Dyn. 1997 Nov;210(3):328-43
181. Reynolds BA, Rietze RL  
**Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship**  
Nat Methods. 2005 May;2(5):333-6
182. Reynolds BA, Weiss S  
**Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system**  
Science. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10

183. Ricci-Vitiani L, Casalbore P, Petrucci G, Lauretti L, Montano N, Larocca LM, Falchetti ML, Lombardi DG, Gerevini VD, Cenciarelli C, D'Alessandris QG, Fernandez E, De Maria R, Maira G, Peschle C, Parati E, Pallini R  
**Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord**  
Neurol Res. 2006 Jul;28(5):488-92
184. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF  
**De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 15;89(18):8591-5
185. Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J  
**The evolution of the type I interferons**  
J Interferon Cytokine Res. 1998 Oct;18(10):805-16  
Erratum in: J Interferon Cytokine Res 1999 Apr;19(4):427
186. Rowland BD, Denissov SG, Douma S, Stunnenberg HG, Bernards R, Peeper DS  
**E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest**  
Cancer Cell. 2002 Jul;2(1):55-65
187. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A  
**Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration**  
Nature. 2004 Feb 19;427(6976):740-4
188. Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr  
**Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor**  
Science. 1992 Aug 7;257(5071):809-13
189. Schmidt und Hoffmann  
**Multiple Sklerose**  
Elsevier-Verlag 2006
190. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM  
**IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R**  
Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):63-8
191. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S  
**Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin**  
Science. 2003 Jan 3;299(5603):117-20
192. Sidman RL, Rakic P  
**Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review**  
Brain Res. 1973 Nov 9;62(1):1-35

193. Soilu-Hänninen M, Salmi A, Salonen R  
**Interferon-beta downregulates expression of VLA-4 antigen and antagonizes interferon-gamma-induced expression of HLA-DQ on human peripheral blood monocytes**  
J Neuroimmunol. 1995 Jul;60(1-2):99-106
194. Song H, Stevens CF, Gage FH  
**Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells**  
Nature. 2002 May 2;417(6884):39-44
195. Sospedra M, Martin R  
**Immunology of multiple sclerosis**  
Annu Rev Immunol. 2005;23:683-747
196. Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM  
**Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis**  
Ann Neurol. 1999 Jul;46(1):6-14
197. Svejgaard A  
**The immunogenetics of multiple sclerosis**  
Immunogenetics. 2008 Jun;60(6):275-86
198. Szele FG, Chesselet MF  
**Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats**  
J Comp Neurol. 1996 May 6;368(3):439-54
199. Takahashi K, Yamanaka S  
**Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors**  
Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10
200. Takaoka A, Yanai H  
**Interferon signalling network in innate defence**  
Cell Microbiol. 2006 Jun;8(6):907-22
201. Tanapat P, Galea LA, Gould E  
**Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus**  
Int J Dev Neurosci. 1998 Jun-Jul;16(3-4):235-9.
202. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E  
**Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat**  
J Neurosci. 1999 Jul 15;19(14):5792-801
203. Taupin P  
**Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest**  
Med Sci Monit. 2005 Jul;11(7):RA247-252. Epub 2005 Jun 29

204. Temple S  
**The development of neural stem cells**  
Nature. 2001 Nov 1;414(6859):112-7
205. Toda H, Takahashi J, Iwakami N, Kimura T, Hoki S, Mozumi-Kitamura K, Ono S, Hashimoto N  
**Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats**  
Neurosci Lett. 2001 Dec 4;316(1):9-12
206. Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, Takahashi K, Mitsui K, Maeda M, Niwa H, Yamanaka S  
**Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development**  
Mol Cell Biol. 2003 Apr;23(8):2699-708
207. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD  
**Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin**  
Nat Cell Biol. 2001 Sep;3(9):778-84
208. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD  
**Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin**  
Stem Cells. 2005 Jun-Jul;23(6):727-37
209. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D  
**Retinal stem cells in the adult mammalian eye**  
Science. 2000 Mar 17;287(5460):2032-6
210. Tropepe V, Sibilina M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D  
**Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon**  
Dev Biol 1999;208:166-188
211. Ulfig, N  
**Kurzlehrbuch Embryologie**  
Thieme Verlag 2007
212. van der Meide PH, de Labie MC, Ruuls SR, Groenestein RJ, Botman CA, Olsson T, Dijkstra CD  
**Discontinuation of treatment with IFN-beta leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. Rapid reversal of the antiproliferative activity of IFN-beta and excessive expansion of autoreactive T cells as disease promoting mechanisms**  
J Neuroimmunol. 1998 Apr 1;84(1):14-23
213. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH  
**Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 9;96(23):13427-31

214. van Praag H, Kempermann G, Gage FH  
**Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus**  
Nat Neurosci. 1999 Mar;2(3):266-70
215. Vescovi AL, Gritti A, Galli R, Parati EA  
**Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells**  
J Neurotrauma. 1999 Aug;16(8):689-93
216. Vilcek J  
**Novel interferons**  
Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):8-9
217. Vilcek JT  
**Cytokines in 1995**  
Cytokine Growth Factor Rev. 1996 Jun;7(1):103-6
218. Voigt T  
**Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes**  
J Comp Neurol. 1989 Nov 1;289(1):74-88
219. Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C, Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L  
**High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells**  
Lab Invest. 2003 Jul;83(7):949-62
220. Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A  
**Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint**  
Rheumatology (Oxford). 2003 Jan;42(1):162-5
221. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H, Hennig H  
**Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS**  
Neurology. 2000 Jul 25;55(2):178-84
222. Wang HD, Dunnivant FD, Jarman T, Deutch AY  
**Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat**  
Neuropsychopharmacology. 2004 Jul;29(7):1230-8
223. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A  
**Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands**  
Cancer Res. 2008 Oct 15;68(20):8437-45

224. Wennersten A, Meier X, Holmin S, Wahlberg L, Mathiesen T  
**Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury**  
J Neurosurg. 2004 Jan;100(1):88-96
225. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R  
**Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 15;105(15):5856-61. Epub 2008 Apr 7
226. Widera D, Mikenberg I, Elvers M, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B  
**Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF- $\kappa$ B signaling**  
BMC Neurosci. 2006 Sep 20;7:64
227. Windrem MS, Roy NS, Wang J, Nunes M, Benraiss A, Goodman R, McKhann GM 2nd, Goldman SA  
**Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain**  
J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):966-75
228. Wong G, Goldshmit Y, Turnley AM  
**Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells**  
Exp Neurol. 2004 May;187(1):171-7
229. Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M  
**Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord**  
J Neurosci. 2001 Dec 15;21(24):9814-23
230. Yanai J, Doetchman T, Laufer N, Maslaton J, Mor-Yosef S, Safran A, Shani M, Sofer D  
**Embryonic cultures but not embryos transplanted to the mouse's brain grow rapidly without immunosuppression**  
Int J Neurosci. 1995 Mar;81(1-2):21-6
231. Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R, Shen Y  
**Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways**  
J Neurosci. 2002 Apr 15;22(8):3025-32
232. Yang M, Stull ND, Berk MA, Snyder EY, Iacovitti L  
**Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine-lesioned rat**  
Exp Neurol. 2002 Sep;177(1):50-60
233. Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M  
**Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia**  
Neuroscience. 2001;105(1):33-41

234. Zhang S, Jia Z, Ge J, Gong L, Ma Y, Li T, Guo J, Chen P, Hu Q, Zhang P, Liu Y, Li Z, Ma K, Li L, Zhou C  
**Purified human bone marrow multipotent mesenchymal stem cells regenerate infarcted myocardium in experimental rats**  
Cell Transplant. 2005;14(10):787-98
235. Zhang SC, Ge B, Duncan ID  
**Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):4089-94
236. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM  
**Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7925-30