

**Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zur
Rolle von Nrf2 bei der Alterung humaner neuraler
Progenitorzellen**

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von

Janette Schuwald

aus Hindenburg

Düsseldorf, Dezember 2012

Aus dem Leibniz Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

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

Referent: Prof. Dr. Ellen Fritsche

Korreferent: Prof. Dr. Christine R. Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2013

Jeder will lange leben, aber keiner will alt sein (Jonathan Swift)

Für Marius und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Alterungsprozesse im demographischen Wandel.....	1
1.2 Die physiologische Gehirnalterung.....	2
1.3 Die 'Free Radical Theory of Aging'	4
1.4 Oxidativer Stress im ZNS.....	5
1.5 Die antioxidative Abwehr	6
1.5.1 Zelluläre Abwehrstrategien gegen ROS.....	6
1.5.2 Die Aktivierung von Nrf2 zur antioxidativen Abwehr	7
1.5.2.1 Das antioxidative responsive Element.....	11
1.5.3 Die Rolle von Nrf2 bei Alterungsprozessen.....	12
1.6 Neurale Progenitorzellen (NPC) als 3D-Zellmodell für NPC-Alterung	13
1.7 Zielsetzung	16
2 Material	17
2.1 Material für die Zellkultur.....	17
2.1.1 Verwendete Zellen und Bakterien.....	17
2.1.2 Medienzusätze für die Zellkultur.....	17
2.1.3 Reagenzien für die Zellkultur.....	17
2.2 Sonstige Chemikalien.....	18
2.3 Material für molekularbiologische Methoden	18
2.3.1 Genexpressionsanalysen	18
2.3.2 Restriktionsenzyme	19
2.3.3 Aufreinigungssysteme („Kits“)	19
2.3.4 Nährmedien und Zusätze	20
2.4 Proteinanalytik.....	20
2.4.1 Verbrauchsmaterial.....	20
2.4.2 Verwendete Antikörper.....	21
2.5 Material für die Lentivirale Transduktion humane Zellen.....	21
2.5.1 Plasmide	21
2.5.1.1 Transferplasmide.....	21
2.5.1.2 Verpackungsplasmide.....	22
2.5.1.3 Hüllplasmide	23
2.5.2 Transfektions Reagenzien	23
2.5.3 Weitere Materialien	23
2.6 Assays/ELISA	23
2.7 Weitere Materialien.....	24

2.8	Geräte	25
2.9	Software.....	26
3	Methoden	27
3.1	Zellkultur.....	27
3.1.1	Kultivierung von humanen neuronalen Progenitorzellen (hNPC).....	27
3.1.1.1	Revitalisierung der kryokonservierten humanen neuronalen Progenitorzellen	27
3.1.1.2	Proliferationskultur.....	28
3.1.1.3	Passagieren der Neurosphären	28
3.1.1.4	Differenzierungskultur.....	29
3.1.2	Oberflächenbeschichtung	29
3.1.3	Zelllinien	30
3.1.3.1	SH-SY5Y-Zellen	30
3.1.3.2	HEK293FT Verpackungszellen.....	31
3.1.4	Kultivierung der Zelllinien	31
3.1.5	Differenzierungskultur von SH-SY5Y Zellen.....	32
3.1.6	Bestimmung der Zellzahl	33
3.1.6.1	Trypanblau-Färbung	33
3.1.6.2	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	33
3.1.7	Kryokonservierung von Zellen.....	34
3.1.8	Revitalisierung der kryokonservierten Zelllinien.....	34
3.2	Proteinanalytik.....	35
3.2.1	Proteinextraktion aus Zellen für das Western Blot Verfahren	35
3.2.1.1	Proteinisolation	35
3.2.1.2	Bestimmung der Proteinmenge	36
3.2.2	Western Blot Analysen	37
3.2.2.1	SDS-PAGE	37
3.2.2.2	Transfer.....	40
3.2.2.3	Ponceau-S-Färbung.....	41
3.2.2.4	Antikörperfärbung	42
3.2.2.5	Detektion	43
3.2.3	Immunzytochemie.....	44
3.3	Molekularbiologische Methoden	45
3.3.1	RNS-Isolation	45
3.3.1.1	RNS-Isolation aus Neurosphären.....	45
3.3.1.2	RNS-Isolation aus Zelllinien	46
3.3.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	46
3.3.3	Reverse Transkription (RT-PCR)	47
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
3.3.4.1	Konventionelle PCR	50
3.3.4.2	TBE-Agarose-Gelelektrophorese	51

3.3.4.3	Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR)	51
3.3.4.4	Standardherstellung für die RTQ-PCR	52
3.4	Gentechnische Verfahren	53
3.4.1	Transformation	53
3.4.1.1	Minipräparation	54
3.4.1.2	Maxipräparation	54
3.4.1.3	Restriktionsverdau	54
3.4.2	Transfektion	55
3.4.2.1	Transfektion mit kationischen Liposomen (Lipofektion)	55
3.4.2.2	Transfektion von HEK293FT Zellen zur Virusproduktion	56
3.4.3	Aufkonzentrierung der Virussuspension	57
3.4.4	Virustiter-Bestimmung	57
3.4.5	Lentivirale Transduktion	57
3.5	Zellbiologische Methoden	58
3.5.1	Migrationsassay	58
3.5.2	Proliferationsassay	59
3.5.2.1	Proliferationsassay (Durchmesser Bestimmung)	59
3.5.2.2	BrdU-Assay	60
3.5.3	β -Gal Färbung	60
3.5.4	Dichlorofluorescein (DCF) Assay	61
3.5.4.1	Durchführung des DCF-Assay in proliferierenden Sphären	61
3.5.4.2	Durchführung des DCF-Assay in differenzierenden Sphären	62
3.5.5	Zytotoxizitätsbestimmung	62
3.5.5.1	CellTiter-Blue Cell Viability Assay	62
3.5.5.2	CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay	63
3.5.6	Apoptosemessung	64
3.5.6.1	Apo One Homogeneous Caspase-3/7-Assay	64
3.5.6.2	TUNEL-Assay	65
3.6	Statistik	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Die Etablierung von humanen NPC als <i>in vitro</i> Alterungsmodell	67
4.1.1	Die Proliferationskapazität von <i>in vitro</i> gealterten hNPCs	68
4.1.2	Untersuchungen zur Migration und zum Differenzierungsverhalten von <i>in vitro</i> gealterten Neurosphären	71
4.1.3	Untersuchungen zur Expression von spezifischen Alterungsmarkern	74
4.2	Das antioxidative Potential von hNPCs	77
4.2.1	Effekte von H ₂ O ₂ auf hNPCs und SH-SY5Y-Zellen	78
4.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen zur Genexpression von CAT, GPx und SOD	82
4.2.3	Antwort auf oxidativen Stress in jungen <i>versus</i> alten Neurosphären	85
4.3	Die Rolle von Nrf2 während der Alterung	90

4.3.1 Die Funktion von Nrf2 in jungen <i>versus</i> alten NPCs.....	91
4.3.2 Lentiviraler Gen-Knockdown von Nrf2.....	94
4.4 Etablierung der automatischen Sortierung und Ausplattierung von Neurosphären.....	99
5 Diskussion	106
5.1 hNPCs als <i>in vitro</i> Modell für Alterungsprozesse.....	107
5.2 Der Verlust der antioxidativen Abwehr im Alter.....	113
5.3 Die Rolle von Nrf2 in der Alterung von NPCs.....	116
5.4 Abschließende Bewertung der hNPCs als <i>in vitro</i> Alterungsmodell und deren Einsatz in Substanztestungen	119
6 Ausblick.....	120
Zusammenfassung	121
Abstract	122
Literaturverzeichnis.....	123
Abkürzungsverzeichnis	148
Abbildungsverzeichnis.....	153
Tabellenverzeichnis.....	156
Formelverzeichnis	158
Veröffentlichungen	159
Eidesstattliche Erklärung	160
Danksagung	161

1 Einleitung

1.1 Alterungsprozesse im demographischen Wandel

Durch den demographischen Wandel wird in den nächsten Jahrzehnten der Bevölkerungsanteil der über 65-jährigen im Vergleich zu den Jüngeren beträchtlich zunehmen (Lehr, 2007) (Tabelle 1.1) und folglich wird die Zahl der altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen steigen. Aktuelle Schätzungen des Berliner Instituts für Bevölkerung und Entwicklung gehen davon aus, dass sich bis zum Jahr 2050 die Anzahl der Demenzkranken verdoppelt (Sütterlin, 2011) (Abbildung 1.1). Somit wird der Erhalt der Gesundheit, Arbeitsfähigkeit und Selbstständigkeit älterer Menschen ein wichtiges sozialpolitisches und gesamtgesellschaftliches Ziel (Düzel, 2010). Hinsichtlich dieser Veränderungen ist es unerlässlich, die neurobiologischen Grundlagen der physiologischen Gehirnalterung zu kennen, um ein gesundes Altern zu ermöglichen. In der Literatur werden verschiedene Verläufe der Alterung unterschieden: normales (physiologisches) Altern, leichte kognitive Beeinträchtigung und Demenz (Craik *et al.*, 1987; Fillit *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 1999). Bei der physiologischen Alterung zeigt sich ein normaler Alterungsprozess, welcher mit einer verminderten Lernfähigkeit und einer vermehrten Vergesslichkeit einhergeht (Lindenberger *et al.*, 2008). Allerdings sind sich diese Personen der altersbedingten Beeinträchtigung bewusst (Düzel, 2010).

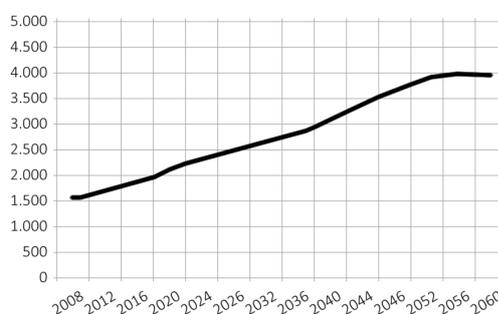


Abbildung 1.1: Anzahl Demenzkranker je 100.000 Einwohner 2008 bis 2060

Datengrundlage: Statistisches Bundesamt Deutschland, 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, Variante Untergrenze der „mittleren“ Bevölkerung (modifiziert nach Sütterlin 2011).

Tabelle 1.1: Bevölkerungsvorausberechnung

Angaben der Altersgruppen in Prozent der Gesamtbevölkerung (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009)

	<20	20-64	65+	Gesamt
1950	30	60	10	100
2012	18	61	21	100
2050	15	51	33	100

1.2 Die physiologische Gehirnalterung

Der Prozess der physiologischen oder auch ‚normalen‘ Gehirnalterung kann als eine zeitabhängige Abnahme der funktionellen Kapazität und Belastbarkeit des Gehirns definiert werden (Yankner *et al.*, 2008) (Abbildung 1.2). Diese physiologischen Alterungsprozesse gehen unter anderem mit vermehrter Vergesslichkeit, verminderter Lernfähigkeit sowie reduzierter räumlicher und zeitlicher Orientierung einher und ereilen in unterschiedlichem Ausmaß jedes Individuum (Lindenberger *et al.*, 2008). Diese Alterungsprozesse sind dabei eindeutig von Demenzerkrankungen abzugrenzen, da sie nicht mit den morphologischen Korrelaten sowie klinischen Erscheinungsbildern neurodegenerativer Erkrankungen einhergehen. Die neurodegenerativen Erkrankungen sind stets mit neuropathologischen Veränderungen wie z.B. einem vermehrten Neuronen und Synapsen Verlust assoziiert (Yankner *et al.*, 2008). Im Fall der Alzheimer-Krankheit (AD) finden sich zusätzlich zu dem Verlust von Synapsen und Neuronen für diese Krankheit charakteristische Eiweißablagerungen (A β -Plaques) und neurofibrilliäre Bündel (Tangleles; NFT) in den Gehirnen der AD-Patienten (Maccioni *et al.*, 2001; Yankner *et al.*, 2008).

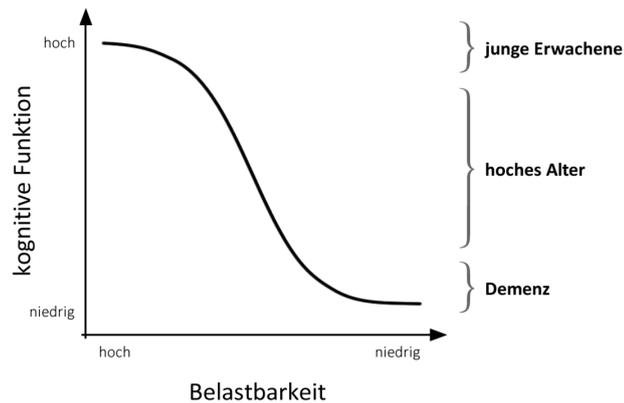


Abbildung 1.2: Zeitabhängiger Verlust der kognitiven Funktion und Belastbarkeit des Gehirns
(modifiziert nach Lindenberger *et al.*, 2008)

Die zellbiologischen Prozesse, die der verminderten Leistungsfähigkeit des Gehirns während der physiologischen Alterung zu Grunde liegen, sind jedoch nicht eindeutig geklärt. Eine mögliche Hypothese lässt vermuten, dass sich über die Lebenszeit die regenerativen Kapazitäten des Gehirns vermindern und somit ein adäquater Ersatz neuronaler Strukturen nicht oder nur verlangsamt gegeben ist (Artegiani und Calegari, 2012). Diese Hypothese basiert auf der erst vor weniger als zwei Dekaden gemachten Beobachtung, dass auch im adulten Gehirn des Menschen, sogar bis ins hohe Alter hinein, Neurogenese stattfindet (Eriksson *et al.*, 1998a). Zu der Zeit waren diese Forschungsergebnisse revolutionär, da man bis dahin davon ausging, dass das erwachsene Gehirn nicht zu Neurogenese in der Lage ist (Cajal, 1913).

Auch beim Nager lassen sich Zeichen der physiologischen Gehirnalterung wie z.B. Lern- und Gedächtnisstörungen mit zunehmendem Alter beobachten (Erickson und Barnes, 2003). Bei solchen physiologisch gealterten Tieren fand sich eine Reduktion der Proliferation neuraler Vorläuferzellen (NPC) in der subventriculären Zone (SVZ) des Gyrus dentatus um bis zu 80% (Jin *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 1996; Nacher *et al.*, 2003). Zudem nimmt auch die Differenzierung solcher NPCs zu Neuronen mit dem Alter der Nager ab (Lichtenwalner *et al.*, 2001). Diese Daten zeigen, dass während der physiologischen Gehirnalterung NPCs die Fähigkeit verlieren, zu proliferieren sowie zu Neuronen zu differenzieren (Shruster *et al.*, 2010a). Diese eingeschränkte NPC-Funktion ist jedoch durch Umwelteinflüsse modulierbar, da die adulte Neurogenese gealterter Tiere durch eine reizreiche Umgebung, körperliche Bewegung und kalorische Restriktion gesteigert werden kann (Vivar *et al.*, 2012). Auch beim Men-

schen gibt es Hinweise darauf, dass eine Abnahme der adulten Neurogenese zu eingeschränkter Hirnfunktion führt. So wurden bei Patienten, die entweder mit Chemotherapeutika oder aufgrund eines zerebralen Tumors mit γ -Strahlung behandelt wurden, kognitive Defizite beobachtet, welche einer reduzierten Neurogenese durch solche exogenen Noxen zugeschrieben werden (Monje, 2008; Monje und Dietrich, 2012).

1.3 Die ‚Free Radical Theory of Aging‘

Eine Theorie zum mechanistischen Ansatz der Zell- und Organalterung, die seit vielen Jahren intensiv untersucht wird, ist die ‚Free Radical Theory of Aging‘ (Harman, 1956). Diese postuliert, dass das Entstehen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche insbesondere als respiratorische- und Stoffwechsel-Nebenprodukte in den Mitochondrien gebildet werden (Droge, 2002), über die Zeit zelluläres Altern auslöst und fördert. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen gestützt, dass erhöhter oxidativer Stress zu Schäden an Nukleinsäuren, Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten führt (Sies und Cadenas, 1985). Desweiteren schädigt ROS die Mitochondrien, welche sodann in einem ‚Circulus Vitiosus‘ die Mitochondrienaktivität beeinträchtigt und wiederum in einer erhöhten ROS-Generierung resultiert (Schroeder *et al.*, 2008; Finkel und Holbrook, 2000).

Zu den ROS, welche oxidativen Stress auslösen, gehören das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) (Ballal und Manna, 2009) sowie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Im Unterschied zum Ersten ist H_2O_2 chemisch gesehen kein Radikal, kann aber leicht in dieses überführt werden. Es kann sowohl enzymatisch, z.B. durch die Superoxiddismutase (SOD) (Marlatt *et al.*, 2004), als auch nicht-enzymatisch entstehen (Katiyar *et al.*, 2001; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997). Der toxische Effekt von H_2O_2 wird durch das $OH\cdot$ vermittelt, welches im Beisein von Metallen wie Eisen durch die Fenton-Reaktion entsteht (Formel 1.1) (Miguel *et al.*, 2009).



Formel 1.1: Fenton-Reaktion (Miguel *et al.*, 2009)

Dass ROS im Zusammenhang mit Alterungsprozessen stehen, konnte bereits mit verschiedenen Studien belegt werden. Unter anderem konnte in diesen ein Anstieg der Superoxidradikalbildung und Lipidoxidation in alten Ratten gemessen werden (Chung *et al.*, 1999; Sawada und Carlson, 1987). Diese Daten können durch humane Daten bestätigt werden, welche ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Superoxids während der Alterung zeigen (Hamilton *et al.*, 2001a). Untersuchungen an den langlebigen ‚Ames dwarf‘ (DW) -Mäusen, welche gegen oxidativen Stress resistent sind (Murakami *et al.*, 2003; Salmon *et al.*, 2005), zeigen, dass die Lebensdauer dieser mutierten Tiere mit ihrer Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress korreliert (Choksi *et al.*, 2007).

1.4 Oxidativer Stress im ZNS

Das adulte ZNS besteht aus verschiedenen Zelltypen, wie den Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia-Zellen und den Neuronen. Die Astrozyten bilden bis zu 50% der gesamten Zellpopulation (Chvatal *et al.*, 1995; Liu und Rao, 2004; Ullian *et al.*, 2001) und besitzen eine hohe Expression an antioxidativen Enzymen (Makar *et al.*, 1994; Sagara *et al.*, 1993). Dadurch sind sie in der Lage, Neurone vor oxidativem Stress zu schützen (Desagher *et al.*, 1996; Hochman *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999).

Auf ein Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien im Organismus reagiert das Gehirn besonders empfindlich (Mariani *et al.*, 2005). Gründe hierfür sind (i) die hohe Konzentration an polyungesättigten Fettsäuren (PUFA), (ii) die Nutzung der im Vergleich zu anderen Geweben hohen Menge an Sauerstoff (iii) sowie die relative Armut an antioxidativen Systemen verglichen mit anderen Organen (zusammengefasst in Mariani *et al.*, 2005). Während des normalen Alterungsprozesses kommt es im Gehirn, wie schon beschrieben, sowohl zu morphologischen wie auch zu funktionellen Veränderungen. Die altersbedingt entstehenden Defizite in der Gehirnfunktion scheinen durch die Abnahme der antioxidativen Schutzmechanismen und der schädlichen Wirkung von oxidativem Stress zu entstehen. Durch die erhöhte Sensitivität des Gehirns werden diese Defizite noch verstärkt (zusammengefasst in Mariani *et al.*, 2005). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine Überexpression von SOD und Katalase (CAT) vor altersbedingten kognitiven Beeinträchtigungen schützt (Lee *et al.*, 2012).

Aufgrund des hohen Sauerstoffverbrauchs entstehen im Gehirn vermehrt Superoxidradikale. Durch diese können Schäden an der mitochondrialen (mt) und genomischen (g) DNS entstehen (Cadenas und Davies, 2000). Die Schäden an der mtDNS akkumulieren mit der Zeit, wodurch es zum Verlust der Mitochondrienaktivität kommt. Hierdurch sterben die Zellen und der Organismus altert (Valko *et al.*, 2007). In verschiedenen Arbeiten konnte bereits eine Korrelation zwischen Sauerstoffverbrauch und Alterung festgestellt werden (zusammengefasst in Valko *et al.*, 2007).

1.5 Die antioxidative Abwehr

1.5.1 Zelluläre Abwehrstrategien gegen ROS

Jede Zelle bildet im Rahmen physiologischer Prozesse wie z.B. der Zellatmung ROS, die durch Antioxidantien ‚entgiftet‘ werden. Eine gehäufte ROS-Generierung wird als oxidativer Stress bezeichnet und führt zur Schädigung zellulärer Strukturen. ROS werden nicht nur endogen gebildet, sondern können auch durch exogene Noxen hervorgerufen werden (Brenneisen *et al.*, 2005). Zu diesen gehören vor allem Zigarettenrauch, Arzneistoffe und Strahlung (Bains und Shaw, 1997; Brenneisen *et al.*, 1998; Jesberger und Richardson, 1991; Schulz *et al.*, 2008). Ein Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und reaktiven Molekülen ist essenziell für die Zelle, da ein Ungleichgewicht in Richtung der instabilen Verbindung zur Schädigung und nachfolgend zum Tod der Zelle führt (Grazioli *et al.*, 1998; Trachootham *et al.*, 2008).

Die antioxidativen Schutzmechanismen, welche die Zellen vor ROS schützen, werden in zwei Gruppen unterteilt, die enzymatischen und die nicht-enzymatischen Abwehrsysteme. Zu den enzymatischen Schutzsystemen gehören die SOD, Glutathionperoxidase (GP) und CAT, während Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherole (Vitamin E), Glutathion (GSH), β -Karatine und Vitamin A zu der nicht-enzymatischen Abwehr gehören (Mates *et al.*, 1999; Squier, 2001). Die SOD katalysiert die Disproportionierung des Superoxidradikals zu dem hochreaktiven H_2O_2 und Sauerstoff (O_2). CAT und GP dienen der Detoxifizierung von H_2O_2 , wodurch Wasser und O_2 gebildet werden (Abbildung

1.3) (Cejkova *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2004). Um die Zelle nicht durch das entstehende H_2O_2 zu schädigen, ist es wichtig, dass die SOD mit den H_2O_2 -detoxifizierenden Enzymen zusammenwirkt. Dieses wird durch die Regulation der Expression dieser Enzyme durch den gemeinsamen Transkriptionsfaktor ‚nuclear factor erythroid 2-related factor 2‘ (Nrf2) gewährleistet (Kanninen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 2003a).

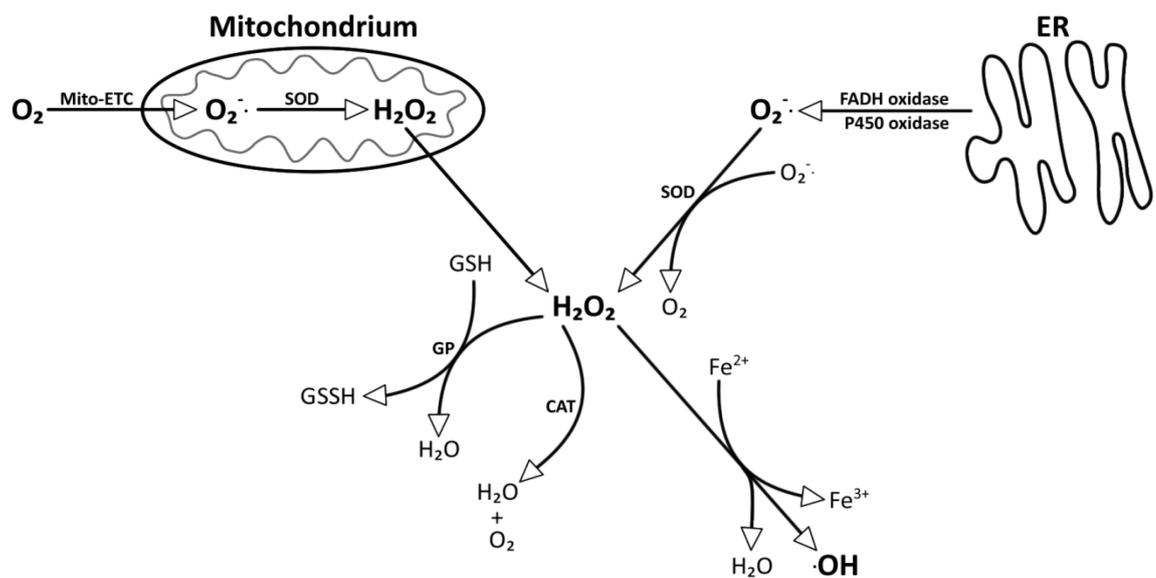


Abbildung 1.3: Das zelluläre Schicksal von ROS

Das in der Zelle entstehende $\text{O}_2^{\cdot-}$ wird durch die SOD in H_2O_2 umgewandelt. Dieses wird im Zytosol durch GP oder CAT zu H_2O reduziert. Eine Reduktion von H_2O_2 kann allerdings auch durch reduzierte Übergangsmetalle (wie Fe^{2+}) erfolgen. Dabei entstehen OH^- und $\text{OH}\cdot$ (Fenton-Reaktion). Das entstehende $\text{OH}\cdot$ ist hoch reaktiv und kann mit zellulären Makromolekülen interagieren (modifiziert nach Mates *et al.*, 1999; Trachootham *et al.*, 2009).

1.5.2 Die Aktivierung von Nrf2 zur antioxidativen Abwehr

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört zu der Gruppe der ‚cap’n’coller basic-leucine-zipper‘-Transkriptionsfaktoren (He *et al.*, 2007; Zhang, 2006) und wurde erst in den neunziger Jahren entdeckt (Moi *et al.*, 1994). Unter basalen Bedingungen ist Nrf2 an seinen zytoplasmatischen Inhibitor ‚Kelch-like-ECH-associating protein 1‘ (Keap1) gebunden (Itoh *et al.*, 1999; Sykiotis und Bohmann, 2008a; Zhang, 2006). Der Inhibitor Keap1 reguliert die Aktivität von Nrf2 durch Komplexbildung im Zytosol und verhindert die Translokation von Nrf2 in den Zellkern (Eggleter *et al.*, 2008; Giudice und

Montella, 2006; Itoh *et al.*, 1999). Keap1 reguliert Nrf2 nicht nur passiv, sondern auch aktiv über die Bindung des Cullin-3-Ligasekomplexes an seiner BTB-Domäne. Dadurch ist dieser Komplex im Basalzustand der Zellen in der Lage, Nrf2 zu ubiquitinieren, wodurch Nrf2 proteasomal abgebaut werden kann (Abbildung 1.4) (Buckley *et al.*, 2003; Cullinan *et al.*, 2004; Furukawa und Xiong, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004).

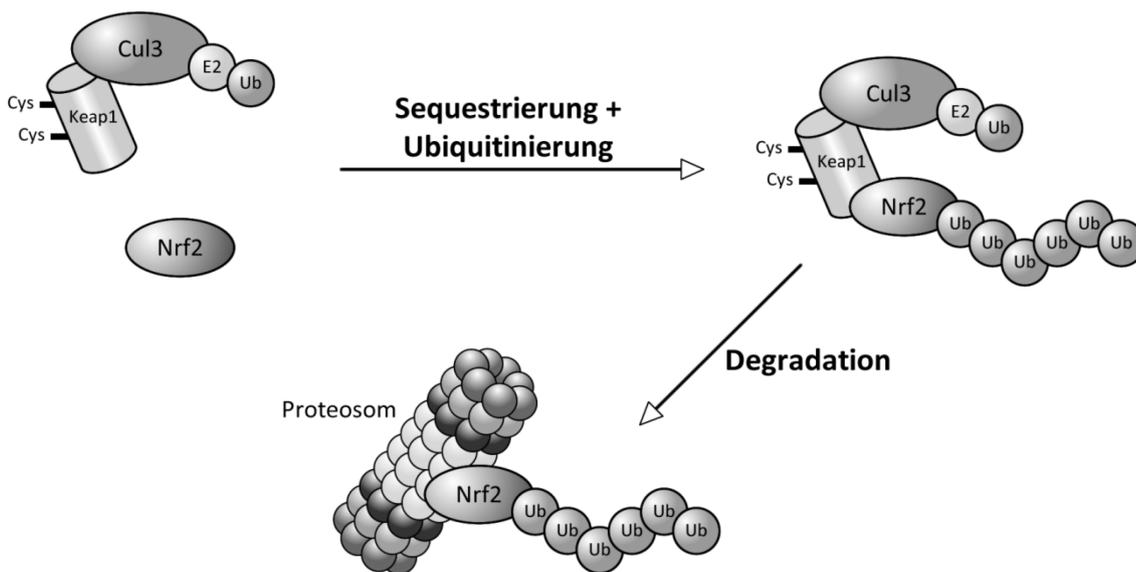


Abbildung 1.4: Proteasomaler Abbau von Nrf2

Unter normalen Bedingungen wird Nrf2 im Zytoplasma durch den Keap1-Cul3-Komplex sequestriert und nach seiner Ubiquitinierung proteasomal abgebaut (modifiziert nach Tong *et al.*, 2006; van Horssen *et al.*, 2011).

Neben der Funktion als Nrf2-Inhibitor fungiert Keap1 auch als Sensor für oxidativen Stress und reagiert auf diesen mit einer Konformationsänderung aufgrund einer Oxidierung am Cysteinrest Cy151. Diese Veränderung führt dazu, dass der Cullin-Ligasekomplex nicht mehr binden kann, wodurch eine Ubiquitinierung und damit der proteasomale Abbau von Nrf2 verhindert wird. Aufgrund dessen kann das neu synthetisierte Nrf2 in den Zellkern pendeln (Abbildung 1.5) (Kobayashi *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 2004; Zhang und Hannink, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

Ein weiterer Prozess, der eine Rolle bei der Aktivierung von Nrf2 zu haben scheint, ist die post-translationale Modifizierung von Nrf2. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Kinasen, wie unter anderem die Proteinkinase C (PKC), die mitogen-aktivierende Proteinkinasen (MAPKs), dabei speziell die MAPK ,extracellular signal-

regulated kinase' (ERK), die ‚phosphoinositide 3 kinase' (PI3K) und die ‚protein kinase like endoplasmic reticulum kinase' (PERK), in der Lage sind Nrf2 zu phosphorylieren (Cullinan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2002; Jain und Jaiswal, 2007; Keum *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1999). Durch die Phosphorylierung dissoziiert der Nrf2-Keap1-Komplex und das freigesetzte Nrf2 transloziert in den Zellkern (Cullinan *et al.*, 2003).

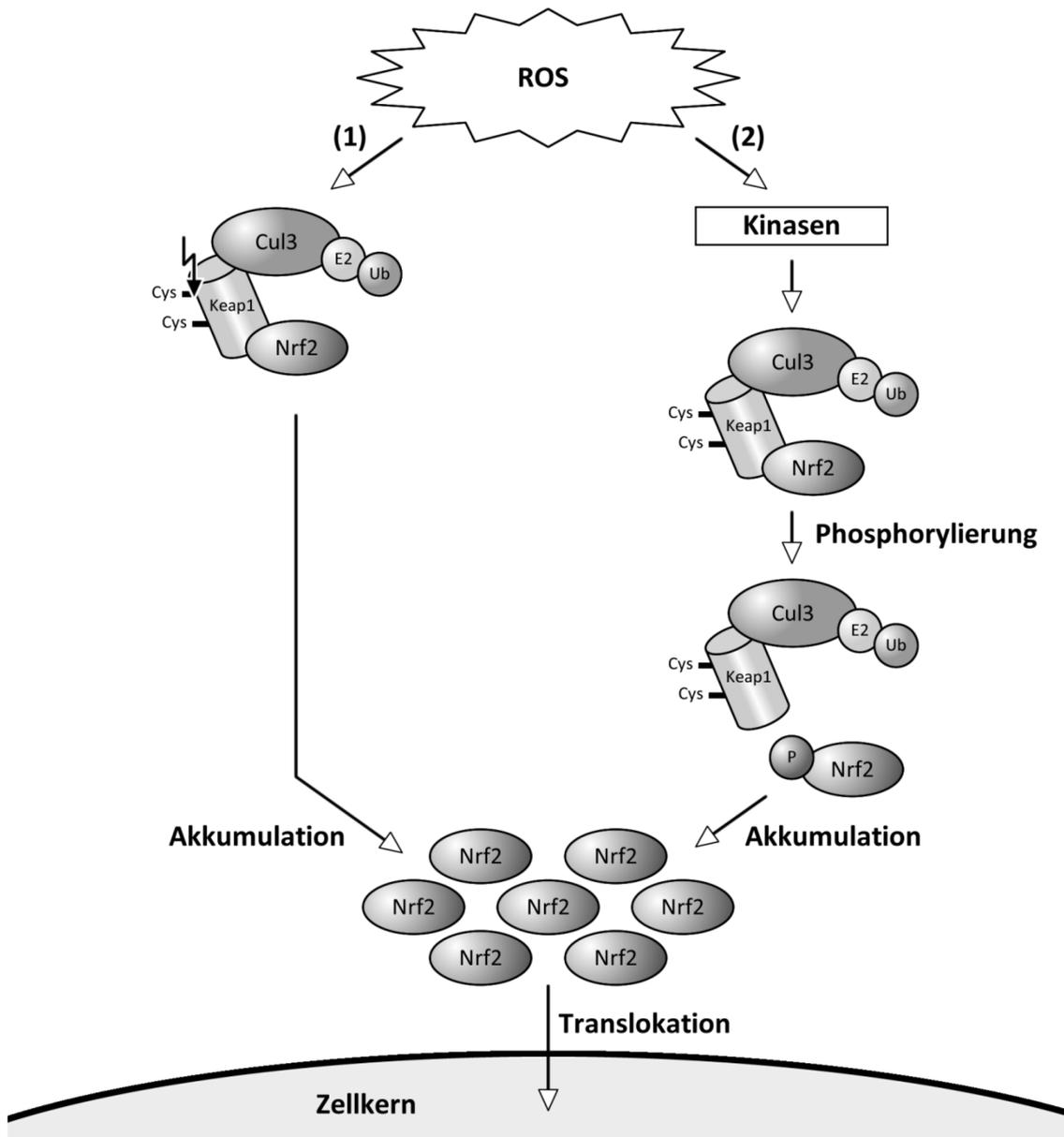


Abbildung 1.5: Darstellung des Nrf2-Signalwegs

Kommt die Zelle in Kontakt mit Nrf2-Aktivatoren wird (1) Keap1 einer post-translationalen Modifikation unterzogen, wodurch es zu einer Konformationsänderung am Keap1-Cul3-Komplex kommt. Durch diese Modifikation wird Nrf2 nicht mehr abgebaut und ist in der Lage in den Zellkern zu pendeln. (2) Eine andere Möglichkeit der Aktivierung geht über die Phosphorylierung von Nrf2 durch Proteinkinasen. Durch die Phosphorylierung ist eine Komplexbildung mit Keap1 nicht mehr möglich und es kommt ebenfalls zu einer Translokation von Nrf2 in den Zellkern (modifiziert nach Kim und Vaziri, 2010; Tong *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005).

Das Pendeln von Nrf2 in und aus dem Zellkern wird durch den Redox-Status der Zelle reguliert. Nrf2 besitzt Kernlokalisierungssignale (NLS) und Kernexportssignale (NES) (Jain *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Theodore *et al.*, 2008). NES werden unter oxidativen Bedingungen durch Modifikation am Cystein-183 inaktiviert, wodurch es zu einer Akkumulation von Nrf2 im Zellkern kommt (Li *et al.*, 2006). In mehreren Studien

konnte ebenfalls gezeigt werden das Keap1 in der Lage ist, zwischen Zytoplasma und Zellkern zu pendeln (Nguyen *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011; Velichkova und Hasson, 2005). Wie Keap1 in den Zellkern transportiert wird und welche Funktion es dort hat, ist noch nicht geklärt.

1.5.2.1 Das antioxidative responsive Element

Das Antioxidants-Respons-Element (ARE) wurde zuerst von Rushmore beschrieben (Rushmore und Pickett, 1990; Rushmore *et al.*, 1991). Bei dem ARE handelt es sich um ein ‚cis-acting enhancer‘-Element, welches in der ‚5'untranslated region‘ (UTR) vieler fremdstoffmetabolisierender und antioxidativer Enzyme lokalisiert ist (Chan und Kwong, 2000; Jodar *et al.*, 2011). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist für die Transkription der von ARE-abhängigen Gene essenziell (Nguyen *et al.*, 2003). Nach Aktivierung von Nrf2 kommt es zur Translokation in den Zellkern, wo es durch Bindung an andere regulatorische Proteine, wie ‚small Maf‘ (sMaf), zur Transkription der ARE-abhängigen Gene kommt (Abbildung 1.6) (Biswal S. *et al.*, 2012; Favreau und Pickett, 1993; Itoh *et al.*, 1997; Kohle und Bock, 2006; Marini *et al.*, 1997; Sykiotis und Bohmann, 2010). Es ist bekannt, dass die Funktion von Nrf2 und seinen nachgeschalteten Proteinen wichtig sind für den Schutz vor oxidativem Stress und auch chemisch induziertem Zelltod (Enomoto *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003b). Zu den zytoprotektiven Genen, die durch Nrf2 kontrolliert werden, gehören unter anderem die Häm-Oxygenasen (HOS), die SOD, die GPx und die CAT (Kanninen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 2003a). Diese antioxidativen Enzyme sind essenziell für die ROS-Abwehr der Zellen. So ist unter anderem aus Studien mit SOD- und GPx-defizienten Mäusen bekannt, dass diese wesentlich sensitiver auf oxidativen Stress reagieren als Wildtyp-Mäuse (de Haan *et al.*, 1998; Van *et al.*, 2001).

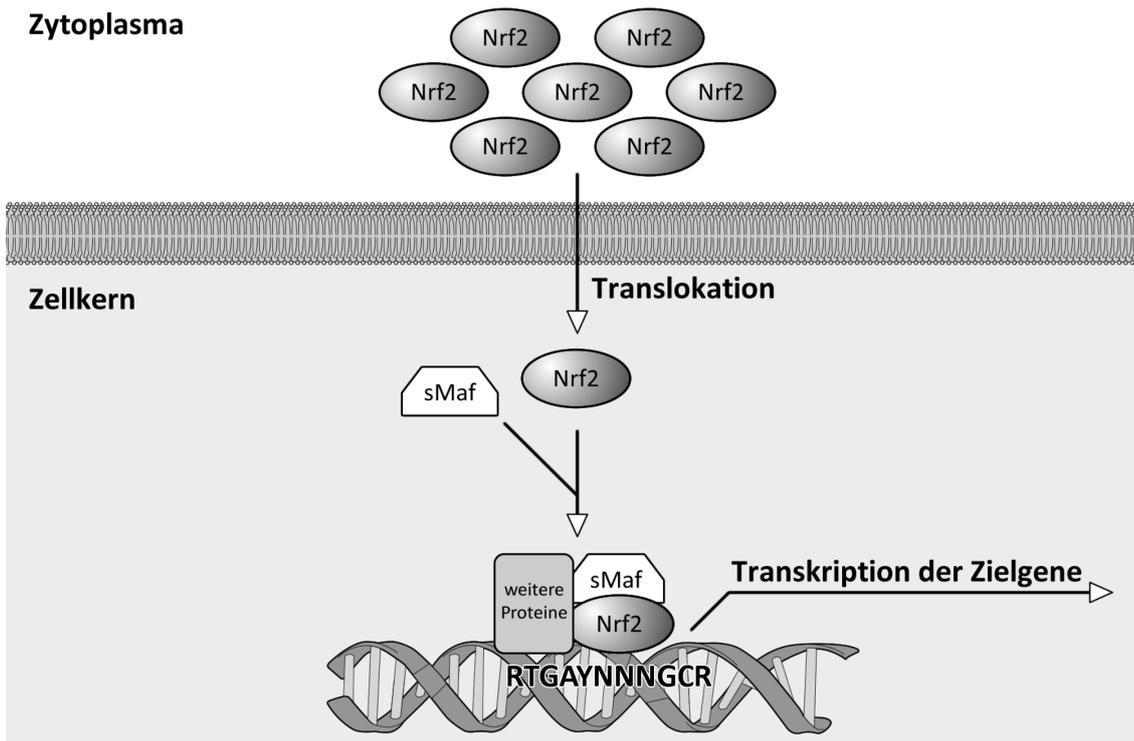


Abbildung 1.6: Transkription von ARE-abhängigen Genen

Nach Translokation von Nrf2 in den Zellkern kommt es zu einer Komplexbildung von Nrf2 mit sMaf und weiteren Proteinen. Durch diese Komplexbildung ist Nrf2 in der Lage, an ARE zu binden, wodurch es zur Transkription der Zielgene von Nrf2 kommt (modifiziert nach Biswal S. *et al.*, 2012; Sykiotis und Bohmann, 2010).

1.5.3 Die Rolle von Nrf2 bei Alterungsprozessen

Es ist bekannt, dass Nrf2 den Organismus vor oxidativem Stress schützt und die Lebensspanne durch eine Überexpression in den Modellorganismen ‚*C. Elegans*‘ (Park *et al.*, 2009; Tullet *et al.*, 2008) und ‚*Drosophila melanogaster*‘ (Sykiotis und Bohmann, 2008b) verlängert. Allerdings nimmt die Aktivität mit zunehmendem Alter ab (Suh *et al.*, 2004; Sykiotis und Bohmann, 2010). Eine altersabhängige Abnahme von Nrf2 wurde in Ratten gefunden. In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die basale Konzentration von Nrf2 in der Leber mit dem Alter der Tiere abnimmt und diese Abnahme mit der verringerten enzymatischen Aktivität der durch Nrf2-regulierten Gene, wie z.B. der GP und der CAT, korreliert (Shih und Yen, 2007; Suh *et al.*, 2004). Dass Nrf2 an der Alterung beteiligt ist, konnte durch Studien an Nrf2-defizienten Mäusen bestätigt werden. Durch die Nrf2-Defizienz verlieren die Tiere die Möglichkeit, sich vor oxidativem Stress zu schützen (Enomoto *et al.*, 2001). Zwar können sich diese

Mäuse normal entwickeln, jedoch weisen die Tiere im Alter vermehrte neurodegenerative Veränderungen des ZNS auf (Nguyen *et al.*, 2009). Allerdings besteht die Möglichkeit die mit dem Alter auftretende Suppression der Nrf2-Aktivität mit Pharmazeutika zu verringern (Collins *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2009; Habeos *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Noyan-Ashraf *et al.*, 2008; Sykiotis und Bohmann, 2010). Dass dies möglich ist, zeigen unter anderem Beobachtungen an alten Mäusen, welche mit dem Antioxidans Safran gefüttert wurden. Diese Tiere wiesen im Alter ein verbessertes Langzeitgedächtnis auf und im Gehirn konnte eine erhöhte antioxidative Kapazität gemessen werden (Papandreou *et al.*, 2011). Die genaue Rolle von Nrf2 und den antioxidativen Schutzmechanismen an den normalen Alterungsprozessen wurde jedoch bis jetzt nicht untersucht und ist deshalb zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

1.6 Neurale Progenitorzellen (NPC) als 3D-Zellmodell für NPC-Alterung

Progenitorzellen sind Tochterzellen einer pluripotenten Stammzelle adulten oder embryonalen Ursprungs, welche bereits auf ein Zielorgan determiniert sind, aber trotzdem, bezogen auf die Regenerationseigenschaft, den Stammzellcharakter behalten. Im adulten Gehirn sind neurale Progenitorzellen für die adulte Neurogenese in verschiedenen Bereichen des Gehirns, wie dem Hippocampus, olfaktorischen Bulbus und der subventrikulären Zone (SVZ), verantwortlich (Morshead *et al.*, 1994; Seaberg und van der Kooy, 2002; Liu und Martin, 2003; Walker *et al.*, 2008). Muraoka *et al.* verglich für therapeutische Zwecke embryonale und adulte NPCs. Die Ergebnisse dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den adulten und den embryonalen NPCs feststellen (Muraoka *et al.*, 2008).

In Vorarbeiten des eigenen Labors wurden embryonale NPCs als 3D-Zellkultursystem etabliert, welches die NPC-Proliferation, -Migration, sowie Neuro- und Gliogenese *in vitro* abbildet (Fritsche *et al.*, 2005; Fritsche *et al.*, 2011; Moors *et al.*, 2007; Moors *et al.*, 2009; Tegenge *et al.*, 2011). Diese Prozesse sind durch exogene Noxen modulierbar, was die Dynamik der Signaltransduktion dieses Systems demonstriert (Gassmann *et al.*, 2010; Moors *et al.*, 2007; Moors *et al.*, 2009; Schreiber *et al.*, 2010).

In Kultur lassen sich solche als ‚Neurosphären‘ wachsende NPCs aufgrund ihrer proliferativen Größenzunahme durch mechanische Zerkleinerung passagieren (Abbildung 1.7) (Svendsen *et al.*, 1998).

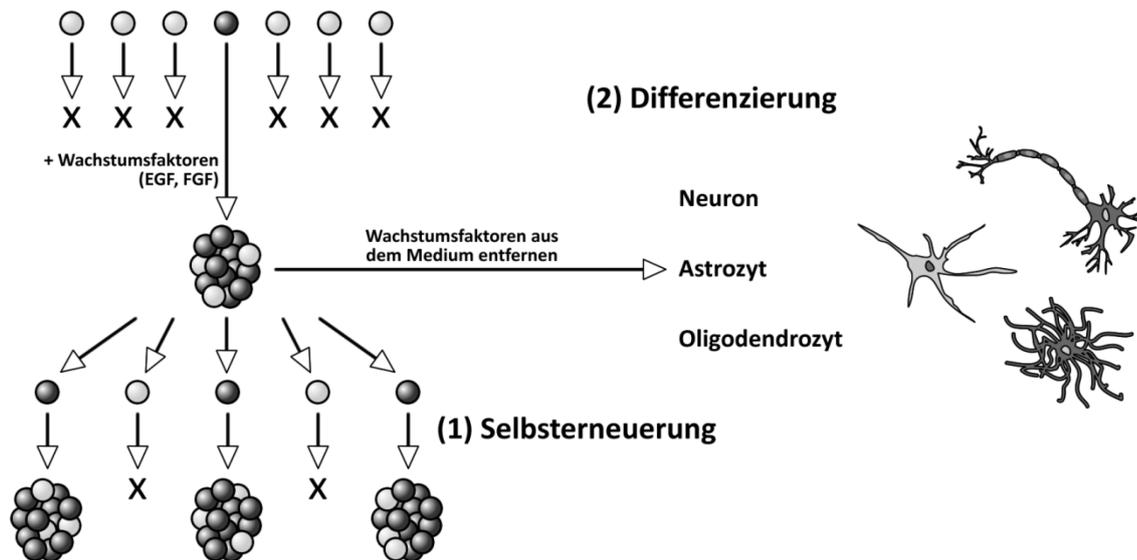


Abbildung 1.7: Das Prinzip der *in vitro*-Generierung von Neurosphären.

Progenitorzellen werden in einer Suspensionskultur mit Wachstumsfaktoren kultiviert. Diese Zellen bilden unter diesen Bedingungen dreidimensionale, freischwimmende Zellaggregate, die als Neurosphären bezeichnet werden. (1) Die Neurosphären sind nach mechanischer Zerkleinerung in der Lage neue Sphären zu generieren (Analysen zeigten, dass 2,25% der Zellen proliferative Eigenschaften besitzen). (2) Unter entsprechenden Kulturbedingungen (Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF, Angebot einer geeigneten extrazellulären Matrix) können sie in die Hauptzelltypen des ZNS differenzieren (Abbildung modifiziert nach Okano, 2002).

Neurosphären sind eine heterogene Zellpopulation, welche den Progenitorzellmarker Nestin sowie charakteristische Proteine der drei dominanten Zelltypen des ZNS, Neurone (β -III-Tubulin⁺), Astrozyten (GFAP⁺) und Oligodendrozyten (O4⁺) exprimieren (Brannen und Sugaya, 2000; Lobo *et al.*, 2003; Piper *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2001). Zudem besitzen die NPCs die Fähigkeit, nach Entzug von Wachstumsfaktoren und in Gegenwart einer extrazellulären Matrix zu differenzieren und in einer kreisrunden Migrationsfläche zu migrieren. Dieser Prozess spiegelt *in vitro* die radiale Migration während der Gehirnentwicklung wider (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Die Zusammensetzung der differenzierenden Zellen innerhalb der Migrationsfläche *in vitro* ist der *in vivo* Situation ähnlich (Gassmann, 2009). Nach zwei Tagen Differenzierung besteht die Migrationsfläche aus 10% neuronalen und 90% glialen Zellen (Moors *et al.*, 2007). NPCs migrieren und differenzieren jedoch nicht nur *in vitro*, sondern sie können

sich auch nach Transplantation in Nagergehirne in das fremde Gehirn integrieren und anschließend in alle drei neuronalen Zelltypen des Gehirns differenzieren (Gage, 2000; McKay, 1997).

Es ist wenig über die Veränderungen der NPC-Funktionen während der Alterung bekannt (Ahlenius *et al.*, 2009), allerdings nehmen die Proliferationsrate sowie die Differenzierungskapazität von NPCs, welche aus Embryonen, adulten und alten Tieren präpariert wurden, *in vitro* mit dem Alter des Ausgangsmaterials ab (Ahlenius *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die altersabhängige Reduktion der NPC-Funktionen, die *in vivo* beobachtet wurden (Shruster *et al.*, 2010a), auch *in vitro* konserviert bleiben. Ob ‚junge‘ NPCs auch *in vitro* altern können und dabei dem Phänotyp von *in situ* gealterten NPCs entsprechen, war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt.

1.7 Zielsetzung

Während des natürlichen Alterungsprozesses verliert das Gehirn einen Teil seiner Funktionen. Zur Entwicklung präventiver Strategien gegen den Verlust von Hirnfunktionen im Alter und somit der Ermöglichung eines gesunden Alterns ist es notwendig, die Signalwege und Mechanismen zu verstehen, die an solchen deteriorierenden Prozessen beteiligt sind. Publierte Ergebnisse Anderer lassen vermuten, dass Alterungsprozesse des NPC-Pools im alternden Gehirn die regenerative Kapazität beeinträchtigen und somit an der Ausprägung des Hirnalterungsphänotyps beteiligt sind. Aus diesem Grund waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. Die Etablierung eines Zellmodells, welches Alterungsprozesse von NPCs *in vitro* abbildet. Solch ein Zellmodell ist notwendig, um non-invasive Einblicke in die Mechanismen zu gewinnen, welche den Alterungsprozessen von NPCs zu Grunde liegen. Zudem war es das Ziel, Zellen des Menschen zu verwenden, da NPC-Funktionen *in vivo* sich bekanntermaßen zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden.
2. Die Untersuchungen der antioxidativen Kapazitäten junger versus gealterter humaner NPCs. Dabei standen vor dem Hintergrund der ‚Free Radical Theory of Aging‘ die altersabhängige Regulation von ROS-detoxifizierenden Enzymen im Vordergrund der Arbeiten.
3. Die Aufklärung der Rolle von Nrf2 bei der Alterung humaner NPCs. Diese Untersuchungen fußten auf der Rationale, dass Nrf2 ein Master Regulator der antioxidativen Abwehr ist, welcher als Transkriptionsfaktor die Expression ROS-detoxifizierender Enzyme reguliert. Zudem gab es Hinweise, dass Nrf2 in Alterungsprozesse involviert ist.

2 Material

2.1 Material für die Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zellen und Bakterien

SH-SY5Y-Zellen	Dr. Weggen
HEK239FT-Verpackungszellen	Dr. Altschmied
hNPC-Zellen (Individuum 5F0503)	Lonza
Kompetente E.coli Bakterien	Agilent

2.1.2 Medienzusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen
N2 Supplement	Gibco, Invitrogen
Hams F12	Gibco, Invitrogen
EGF (Human recombinant EGF)	Biosource
rhFGF-basic (Human recombinant FGF)	R&D Systems
B27 Supplement	Gibco, Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco, Invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Natriumpyruvat	Sigma
L-Glutamin	PAA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	PAA

2.1.3 Reagenzien für die Zellkultur

Trypanblau	Sigma
------------	-------

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA
Accutase	PAA
Laminin	Sigma
Poly-D-Lysin-Hydrobromid (PDL)	Sigma
Retinolsäure	Sigma

2.2 Sonstige Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Staurosporin (1 mM in DMSO)	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth
TCHQ	Fisher Scientific
Ethanol (EtOH)	Roth
Terminal Transferase Buffer	Roche
CoCl ₂	Roche
Vectashield	Vector
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Terralin	Schülke & Meyer
β-Gal	AppliChem
HBSS	Gibco, Invitrogen

2.3 Material für molekularbiologische Methoden

2.3.1 Genexpressionsanalysen

DEPC*H ₂ O	Roth
6x DNS Ladepuffer	AppliChem
DNS Ladder (100bp)	Roth
dNTP-Mix	Peqlab

M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen
p(dT) ₁₅ Primer	Roche
Prime RNase Inhibitor	Eppendorf
DTT	Invitrogen
2x SYBR Green Mix	Qiagen
10x PCR-Reaktionspuffer	Invitrogen
10x TBE-Puffer	Roth
5x First Strand Buffer	Invitrogen
Taq Polymerase	Qiagen
Primer	MWG
Agarose	Eurogentec
Ethidiumbromid	Sigma
DNS-ExitusPlus	AppliChem

2.3.2 Restriktionsenzyme

BpmI	Biolabs
BsaI	Biolabs
BsrDI	Biolabs
HincII	Biolabs
EcoRI	Biolabs

2.3.3 Aufreinigungssysteme („Kits“)

DNase Kit (RNase free)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	QIAquick, Qiagen
RNA [®] Microprep Kit	Qiagen
peqGold Total RNA Kits	Peqlab, Erlangen
Plasmid maxi Präp	Qiagen
Plasmid mini Präp	Qiagen

2.3.4 Nährmedien und Zusätze

LB-Medium	Roth
LB-Agar	Roth
SOC-Medium	Roth
Ampicillin	Applichem

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Verbrauchsmaterial

Entwicklerlösung	Koda
Fixierlösung	Koda
Röntgenfilme	Amersham
Tris	MP Biomedicals Inc
SDS	Serva
Magermilchpulver	Handelsübliches
Tween	Sigma-Aldrich
NaCl	Roth
Glycin	Serva
Methanol	Roth
Isopropanol	Roth
ECL Plus Detection System	GE Healthcare
PVDF Transfer Membrane	GE Healthcare
Essigsäure	Merck
Ponceau-S	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad
DC Protein Assay	Bio-Rad
Salzsäure	Roth

Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
TEMED	Sigma
Triton X	Sigma
Aqua Poly/Mount	Polysciences
5x PBS	Biochrom

2.4.2 Verwendete Antikörper

β III-Tubulin	Sigma
O4	Millipore
GFAP	abcam
Alexa546	MobiTec
Alexa488	MobiTec
Rhodamin-Red	Jackson
Nrf2	Santa-Cruz
GAPDH	abcam
ECL Anti-mouse IgG	GE Healthcare
ECL Anti-rabbit IgG	GE Healthcare
Hoechst 33342	Sigma

2.5 Material für die Lentivirale Transduktion humane Zellen

2.5.1 Plasmide

2.5.1.1 Transferplasmide

pLKO.1 Nrf2	open Biosystems
pLKO.1 Kontroll Vektor	open Biosystems
SEW-GFP	Dr. Altschmied

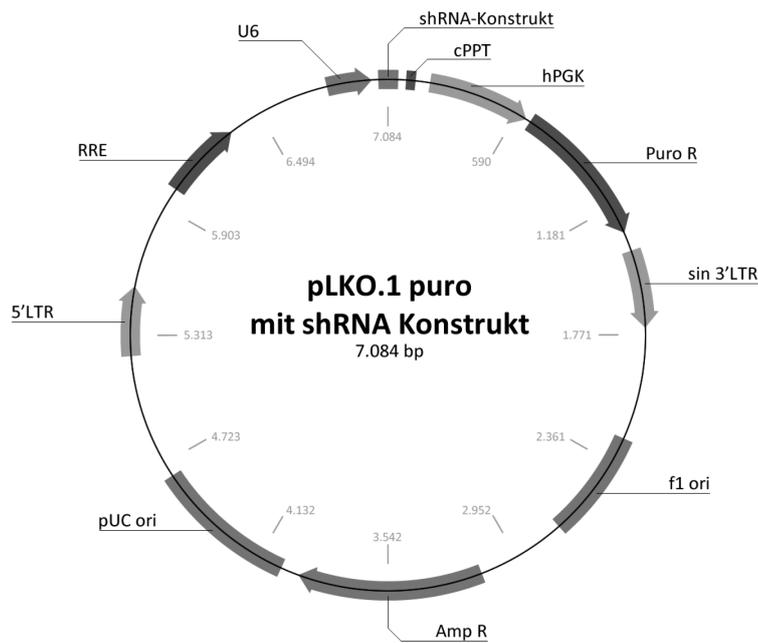


Abbildung 2.1: Plasmidkarte pLKO.1

2.5.1.2 Verpackungsplasmide

pCMVΔR8.91

Dr. Altschmied

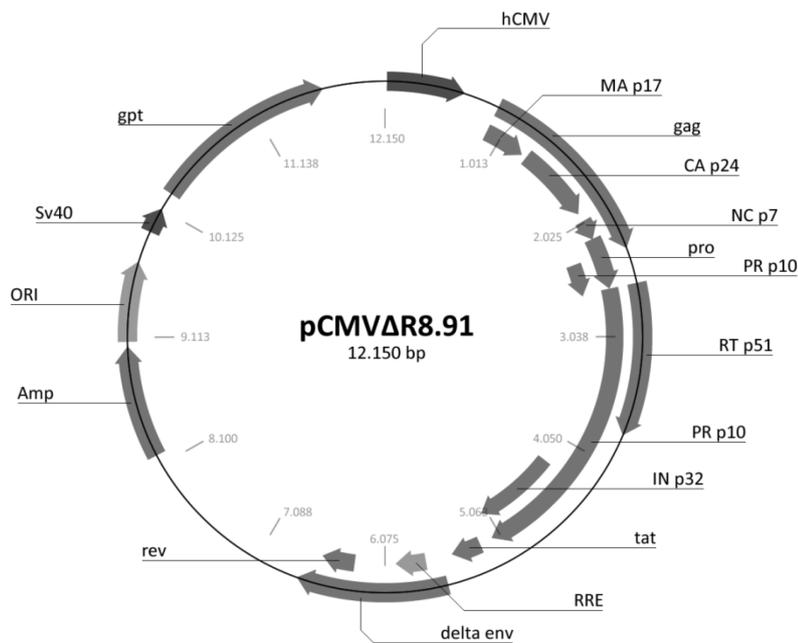


Abbildung 2.2: Plasmidkarte pCMVDR8.91

2.5.1.3 Hüllplasmide

pMD2.G

Dr. Altschmied

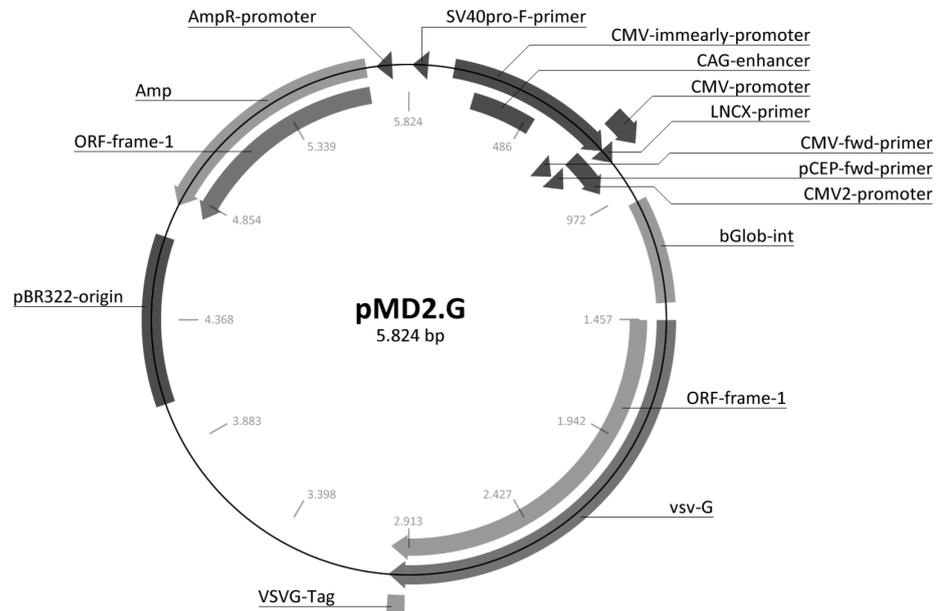


Abbildung 2.3: Plasmidkarte pMD2.G

2.5.2 Transfektions Reagenzien

Lipofectamin mit PLUS Reagenz

Invitrogen

Cacium Phosphate Transfection Kit

Sigma

2.5.3 Weitere Materialien

Durapore™ 0.45 µm Stericup

Millipore

Centricon Plus-70 Ultracel PL-100

Millipore

2.6 Assays/ELISA

CellTiterBlue

Promega

CytoToxOne

Promega

Apo One Homogeneous	Promega
BrdU cell proliferation	Roche
Quick Titer Lentivirus Titer Kit	Cell Biolabs

2.7 Weitere Materialien

Zellkulturflaschen	Greiner
24-Well-Zellkulturplatten	Falcon
96-Well-Zellkulturplatten	Falcon
12-Well-Zellkulturplatten	Falcon
6-Well-Zellkulturplatten	Falcon
Zellkulturschalen	Greiner
8-Kammer Objektträger (unbeschichtet)	BD-Falcon
Zellschaber	Coster
Eppendorf Gefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
50 ml Falcons Röhrchen	Greiner Bio One
15 ml Falcons Röhrchen	Greiner Bio One
Sterilfilter	Pall
Bechergläser verschiedener Größe	Schütt
Messkolben verschiedener Größe	Schütt
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Rasierklingen	Wilkinson
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Parafilm	Pechinery
Petrischalen Ø 35x10 mm	BDFalconTM, BD Biosciences
Petrischalen Ø 60x15 mm	BDFalconTM, BD Biosciences
Petrischalen Ø 100x20 mm	BDFalconTM, BD Biosciences
Einfrierröhrchen	Nunc

2.8 Geräte

Autoklav	KSG GmbH, Bioclav
Biometra	TRIO-Thermoblock Biotron
Feinwaage	Satorius, A200S
Fluoreszenzreader	Fluoroscans Ascent, Labsystems
Gelauswertungstisch	Bio-Rad, Fluor-S Multimager
Gelelektrophoresekammer	OWI Separation Systems
Gewebezerkleinerer	Vibratome
Heizblock	Mixing Block MB-102, Bioer
Inkubationsschrank	HeraCell 240, Heraeus
Kamera	VisitronSystems
Kühlzentrifuge	Mikro 22R, Hettich Zentrifugen
Lichtmikroskop	CKX41, Olympus
Magnetrührer	Monotherm
MikroWelle	Daewoo, Quick Cookmate
pH-Meter	WTW, pH537
Photometer	Amersham Biosciences
Real-Time PCR Detektor	Chromo 4, BioRad
RoboCycler	Stratagene
Rotor Gene Q	Qiagen
Schüttler	Infors AG
SDS-PAGE-Kammer	Hoefer, SE600
Semi-Dry-Blotter	Bio-Rad, Trans-Blot SD
Sterilbank	HeraGuard, Heraeus
Tischzentrifuge	Eppendorf, 5417R
Waage	Satorius, 1204MP
Wasser-Deionisierer	Milli-Q, Millipore
Wasserbad	Memmert
Wasserstrahlpumpe	KNF Laboport
Zentrifuge	Megafuge 3.0R, Heraeus

Infinite M200PRO Tecan	Tecan
FACS Calibur	BD Bioscience
Copas	Union Biometrica Inc

2.9 Software

Photoshop CS4	Adobe
Alingments	Mega 4.0
Fluor-S Multiimager	Bio-Rad, Quantity One 4.1.0
Rotor Gene Q 1.7	Qiagen
Primererstellung	NCBI
Zellgrößenvermessung	MetaMorph
Analyse Programm	GraphPad Prism 5
FlowJo	Baum Star, Inc., Ashland, OR, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Zur Vermeidung von möglichen Kontaminationen durch Bakterien oder Pilzkulturen wurden bei allen Versuchen mit lebenden Zellen Einmalhandschuhe, welche vor dem Arbeiten mit Sterilium desinfiziert wurden, autoklavierte Glas- und Eppendorfgefäße (Eppis) sowie sterile Einmalpipettenspitzen verwendet.

3.1.1 Kultivierung von humanen neuralen Progenitorzellen (hNPC)

Die Kultivierung der neuralen Progenitorzellen kann sowohl unter proliferierenden als auch unter differenzierenden Bedingungen stattfinden, wobei dieser Unterschied auf der Verwendung verschiedener Nährmedien und der Oberflächenbeschichtung verschiedener Multiwell-Platten basiert.

3.1.1.1 Revitalisierung der kryokonservierten humanen neuralen Progenitorzellen

Beim Auftauen der Neurosphären ist darauf zu achten, dass die Auftauphase nicht länger als zwei Minuten dauert, da sich sonst Kristalle in dem Zellkultur-Stock bilden könnten, welche zum Zelltod führen. Vor dem Auftauen der im flüssigen Stickstoff eingefrorenen hNPCs wurden 100 ml Proliferationsmedium für mindestens eine halbe Stunde bei 37°C und 7,5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Je 10 ml des aufgewärmten Mediums wurden in fünf 100 x 20 mm Petrischalen gegeben. Der Rest des Mediums wurde in ein 50 ml Röhrchen pipettiert. Das kryokonservierte Röhrchen mit den Neurosphären wurde im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in das Falcon-Röhrchen mit dem warmen Proliferationsmedium pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Petrischalen mit dem vorgelegten Medium verteilt. Danach erfolgte die Kultivierung, wie im Abschnitt 3.1.1.3 beschrieben. Nachdem die Neurosphären ein bis zwei Tage in Kultur waren,

erfolgte eine Qualitätskontrolle. Dafür wurden die Sphären auf einen mit Poly-D-Lysin-Hydrobromid-Lösung (PDL) und Laminin beschichteten Objektträger (siehe Abschnitt 3.1.2) in Differenzierungsmedium (N2) ausplattiert und nach 24 Stunden (h) die Ausdifferenzierung der Zellen kontrolliert. Bei einer nicht ausreichenden Ausdifferenzierung der Sphären wurden die Zellen noch eine weitere Woche in Kultur gehalten und anschließend einer weiteren Kontrolle unterzogen. Zeigte diese weiterhin nicht eine ausreichende Differenzierung, wurde die Kultivierung dieser Neurosphären nicht fortgeführt.

3.1.1.2 Proliferationskultur

Die verwendeten Neurosphären wurden in Zellkulturschalen (100 x 20 mm) mit 25 ml Proliferationsmedium (B27) im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage zu 50% durch frisches B27 ersetzt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Proliferationsmedium B27

Proliferationsmedium B27	
DMEM	2/3
F12	1/3
B27	1:50
EGF	20 ng/ml
FGF	20 ng/ml
Penicillin/Streptomycin (P/S)	1:100

3.1.1.3 Passagieren der Neurosphären

Da die NPC-Zellen bei einer Kultivierung unter proliferierenden Bedingungen als dreidimensionale Sphären wachsen, führt eine Kultivierung unter diesen Bedingungen zu einer Zunahme des Sphärendurchmessers. Aus diesem Grund wurden die neuralen Progenitorzellen zur Passagierung ab einem Durchmesser von ca. 0,7 mm mit einem McIlwain Tissue Chopper auf eine Größe von 0,3 mm zerkleinert. Hierfür wurde aus der Proliferationskultur die benötigte Anzahl an Sphären entnommen und auf den Deckel einer 60 x 15 mm Petrischale mit möglichst wenig Medium gesetzt und

gechoppt. Anschließend konnten die zerkleinerten Sphären in ca. 100 µl Medium resuspendiert und in einer 100 x 20 mm Zellkulturschale weiterkultiviert werden (Abschnitt 3.1.1.2).

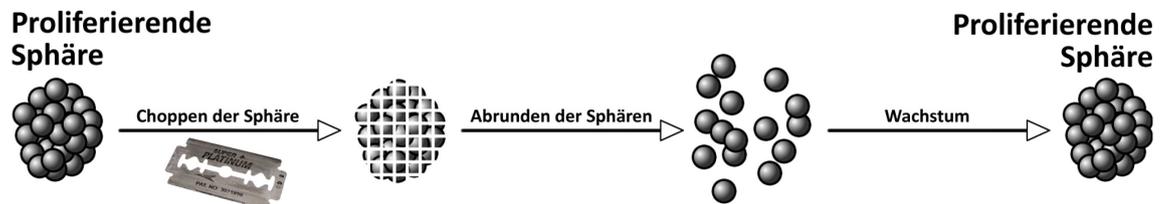


Abbildung 3.1: Passagieren der humanen Sphären durch Chopping

3.1.1.4 Differenzierungskultur

Die Sphären (Abschnitt 3.1.1.3) wurden auf beschichteten Oberflächen unter Entzug der Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium (N2) ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Pro Sphäre wurden 100 µl Medium in die Wells vorgelegt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums N2

Differenzierungsmedium N2	
DMEM	2/3
F12	1/3
N2 Supplement	1:100
P/S	1:100

3.1.2 Oberflächenbeschichtung

Die zu beschichteten Oberflächen wurde im ersten Schritt mit PDL (0,1 µg/ml in sterilem H₂O) überschichtet und bei 37°C mindestens eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgten ein vollständiges Absaugen der PDL-Lösung sowie zwei Waschschrte mit sterilem Millipor Wasser. Daraufhin folgte eine weitere mindestens einstündige Inkubation bei 37°C mit Laminin (1:100 Verdünnung). Anschließend wurde das Laminin ebenfalls abgenommen und nach zwei weiteren Waschschrten wurden

die Wells mit PBS (Phosphate-buffered Saline) benetzt. Die beschichteten Platten konnten, mit Parafilm abgedichtet, bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert werden. Laminin wird an die Plastikoberfläche mittels PDL gebunden, welches aufgrund seiner negativen Ladung als Vermittler zwischen Plastik und Protein fungiert (Jacobson und Branton, 1977).

Tabelle 3.3: Pipettierschema der zu verwendenden Substanzen für die Plattenbeschichtung

Pipettierschema	6-Well-Platte	12-Well-Platte	24-Well-Platte	8-Kammer-Objektträger
PDL	1 ml	500 µl	250 µl	250 µl
Laminin	1 ml	500 µl	250 µl	250 µl

3.1.3 Zelllinien

3.1.3.1 SH-SY5Y-Zellen

Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um einen von drei Subklonen (SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y) der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, welche 1970 einer vierjährigen Patientin aus einem Tumor entnommen wurden (Biedler *et al.*, 1973). Die Verdopplungszeit dieser Zellen beträgt durchschnittlich 48 Stunden, wobei die Anzahl der SH-SY5Y-Zellen bei einer vollständigen Konfluenz ca. 1×10^5 Zellen/cm² beträgt. In den Experimenten wurden die Zellen aus den Passagen vier bis 30 verwendet. Die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen erfolgte in DMEM Medium. Das Medium wurde jeweils vor Gebrauch im Wärmebad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Weggen (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Nährmediums für SH-SY5Y-Zellen

Medium SH-SY5Y-Zellen	
DMEM	500 ml
FCS	50 ml
A/A	5 ml

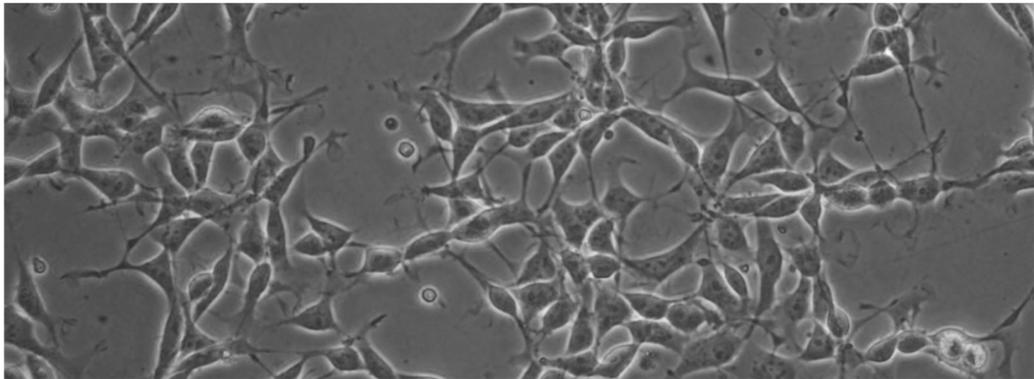


Abbildung 3.2: 400-fache Vergrößerung der SH-SY5Y-Zellen

3.1.3.2 HEK293FT Verpackungszellen

Die Kultivierung der Verpackungszellen erfolgte bei 37°C und 7,5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit mit dem Nährmedium DMEM. Da die Transfektionseffizienz in höheren Passagen drastisch abnimmt, wurden die Zellen nur bis zur dreißigsten Passage verwendet. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Altschmied (Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Nährmediums für HEK293FT -Zellen

Medium HEK293FT-Zellen	
DMEM	500 ml
FBS (hitzeinaktiviert)	50 ml
A/A	3 ml
Geneticin	5 ml
Non-essential amino acids	5 ml

3.1.4 Kultivierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) mit 25-30 ml des jeweiligen Nährmediums im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums, wobei das komplette Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und

durch frisches Nährmedium ersetzt wurde. Die Inkubation in den Zellkulturflaschen erfolgte bis zu einer ca. 90-prozentigen Konfluenz. Danach wurde das Medium komplett abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS + A/A gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin behandelt und anschließend je nach Zelllinie für ca. eins bis zehn Minuten (min) zurück in den Inkubator gestellt, bis sich die Zellen von der Schale und die Zellkontakte zwischen den Zellen gelöst hatten. Anschließend wurde die Reaktion mit 8 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden je nach Bedarf 1:10 oder 2:5 gesplittet und in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt.

3.1.5 Differenzierungskultur von SH-SY5Y Zellen

Die Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen war notwendig um einen Vergleich mit den differenzierten hNPCs zu ermöglichen. Hierfür wurden die Zellen in Kulturflaschen ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Daraufhin wurde das Medium gegen SH-SY5Y-Differenzierungsmedium (Tab. 3.7) ausgetauscht, um die Zellen vier Tage in der Flasche vordifferenzieren zu lassen. Im Anschluss wurden die Zellen im Differenzierungsmedium in der benötigten Anzahl in Multiwell-Platten ausplattiert.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums SH-SY5Y-Zellen

Differenzierungsmedium SH-SY5Y-Zellen	
DMEM	500 ml
FCS	50 ml
P/S	5 ml
Retinolsäure (RA)	10 µM

3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

3.1.6.1 Trypanblau-Färbung

Um bei der Zellzahlbestimmung tote Zellen von lebenden zu unterscheiden, wird eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen sauren Farbstoff, dessen Anionen an Zellproteine binden. Der Farbstoff kann selektiv in tote Zellen eindringen, da die Membran toter Zellen für ihn durchlässig wird. Aufgrund seiner Größe ist es dem Farbstoff nicht möglich in lebende Zellen einzudringen, da dieser die Membran nicht passieren kann. Unter dem Mikroskop erscheinen tote Zellen tiefblau und lebende Zellen hell.

3.1.6.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um eine Glasplatte, die in der Mittelfläche mit zwei rechtwinkligen Zählnetzen versehen ist, welche aus Linien in definierten Abständen bestehen. Über der Bodenfläche wurde ein Deckglas aufgebracht, wodurch zwischen der Glasplatte und dem Deckgläschen ein definierter Raum entsteht. Das Deckglas liegt korrekt auf der Fläche auf, wenn die so genannten Newton'sche-Ringe seitlich sichtbar sind. Die auszuzählende Zellsuspension wird mit einer Pipette seitlich am Rand des Deckgläschens aufgetragen. Die Suspension wird durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Kammer und Deckglas gesaugt, woraufhin die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden können. Beim Zählen ist es wichtig, die doppelte Zählung der Zellen auf den Grenzlinien zu vermeiden.

$$MW \times F \times 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen/ml}$$

Formel 3.1: Berechnung der Zellzahl

MW: Mittelwert der Zellen aus den gezählten Quadraten
F: Verdünnungsfaktor
 10^4 : Kammerfaktor

3.1.7 Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, mit Trypsin abgelöst, die Reaktion mit 45 ml Medium gestoppt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Daraufhin erfolgte bei 300 xg das Abzentrifugieren der Zellen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 6 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte anschließend in 1,8 ml Portionen in Einfrierröhrchen aliquotiert werden. Die Röhrchen wurden in einem geeigneten Einfriergefäß, welches mit Isopropanol befüllt wurde und mit Schaumstoff rundherum ausgekleidet war, verpackt. So kühlt das Gefäß 1°C/min herunter. Die Zellen müssen unter diesen Umständen mindestens 16 Stunden bei -80°C gelagert werden, bevor sie für die langfristige Aufbewahrung in Flüssigstickstoff überführt werden können.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Einfriermediums

Einfriermedium		
Nährmedium	4,8 ml	
DMSO	0,6 ml	• DMSO entspricht einer Endkonzentration von 10%
FCS	0,6 ml	• FCS entspricht einer Endkonzentration von 20%, da schon 10% im Medium standardmäßig vorhanden sind

3.1.8 Revitalisierung der kryokonservierten Zelllinien

Beim Auftauen der kryokonservierten Zelllinien ist auf eine möglichst kurze Auftaudauer zu achten, da sich sonst Kristalle in dem Zellkulturstock bilden, welche zum Tod der Zellen führen. Aus diesem Grund sollten die Zellen zum Auftauen unter fließendes lauwarmes Wasser gehalten werden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein mit 45 ml Medium gefülltes Röhrchen überführt und bei 300 xg abzentrifugiert, um die Zellen von den Resten des Einfriermediums zu befreien. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 15 ml Nährmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Medium gefüttert, um tote Zellen und noch eventuell vorhandene DMSO-

Reste zu entfernen. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, weiter kultiviert. Erst ab der dritten bis vierten Passage nach dem Auftauen wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt.

3.2 Proteinanalytik

3.2.1 Proteinextraktion aus Zellen für das Western-Blot Verfahren

3.2.1.1 Proteinisolation

Zur Herstellung eines Gesamtzellextrakts wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Bei den Sphären wurden pro Well 60 Sphären (\varnothing 0,3 mm) und bei den Zelllinien 2×10^5 Zellen in 5 ml ausplattiert. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde das Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Dieser Waschschrift wurde bei den Neurosphären ausgelassen, da dieser einen starken Zellverlust zur Folge gehabt hätte. Weiterhin wurden die Zellen mit 50 μ l 1x RIPA (*radio-immunoprecipitation-assay*) -Puffer versetzt und durch mehrmaliges Resuspendieren lysiert. Das so entstandene Lysat wurde bei 20000 xg und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Bis zur Verwendung wurde der Überstand bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung 2x RIPA-Puffer Stocklösung

2x RIPA-Puffer		
Tris HCL pH 7,4	50 mM	
NaCl	300 mM	
EDTA pH 8,0	0,2 mM	• Natriumazid ist nicht zwingend notwendig
Nonidet P40 (= Igepal)	2%	• mit A. dest auffüllen
Desoxycholat	2%	• bei -20°C lagern
SDS	0,20%	
Natriumazid	0,05%	

Tabelle 3.9: Zusammensetzung 1x RIPA-Puffer Gebrauchslösung

1x RIPA-Puffer		
2xRIPA	500 µl	• bei -20°C lagern
0,5 % PMSF	10 µl	
0,5% PIC	10 µl	
A. dest.	480 µl	

3.2.1.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinbestimmung erfolgte unter Einsatz einer kommerziell erhältlichen Lösung (DC Protein Assay) nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Die verwendeten Standards wurden nach Angaben des Herstellers, aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt.

Für die Proteinbestimmung wurden 0,5 µl Lösung S mit 24,5 µl der Lösung A vermischt. Dieses Gemisch sowie 200 µl der Lösung A wurden zur 5 µl der Probe pipettiert. Daraufhin folgte im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) eine 15-minütige Inkubationsphase. Anschließend wurden die Proben bei 750 nm gemessen. Aus den Daten des BSA-Proteinstandards wurde eine Standardkurve erstellt und durch lineare Regression der Proteingehalt der Proben berechnet. In Abbildung 3.5 ist ein Beispiel für eine BSA-Standardkurve dargestellt.

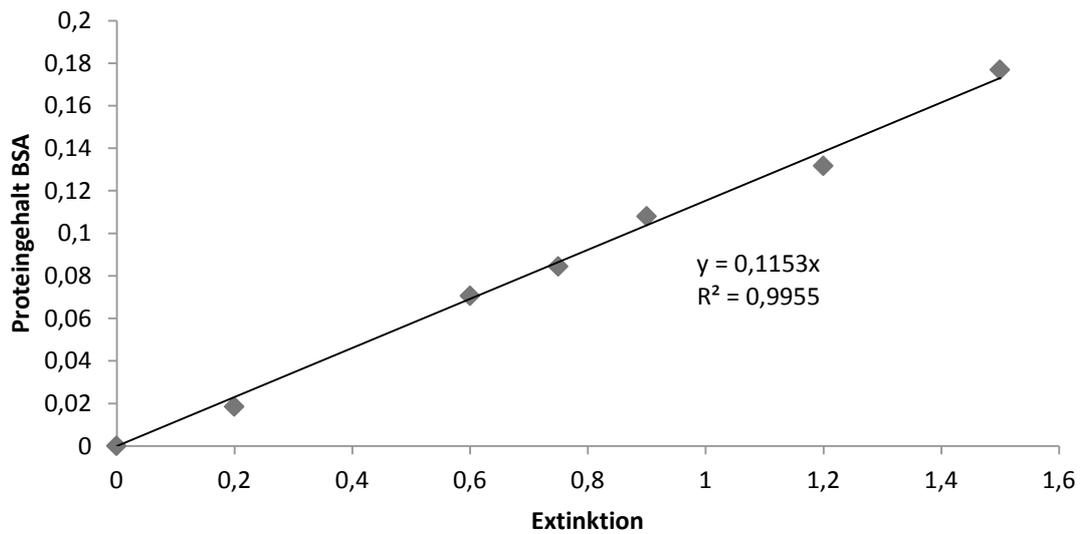


Abbildung 3.3: Grafische Darstellung eines BSA-Standards zur Berechnung des Proteingehaltes einer Probe.

3.2.2 Western-Blot Analysen

3.2.2.1 SDS-PAGE

Zur Analyse von Proteinen wurde in dieser Arbeit das SDS-PAGE-Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewandt. Bei diesem Verfahren wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bisacrylamid (siehe Abbildung 3.6). Es handelt sich um ein diskontinuierliches Gel, welches in ein Sammelgel und in ein Trenngel unterteilt ist. Das Sammelgel enthält weniger Acrylamid als das Trenngel, ist somit grobporiger und bewirkt eine Fokussierung der Proben im Gel, wodurch ermöglicht wird, dass das gesamte Protein gleichzeitig ins Trenngel einläuft. Dieser Effekt entsteht durch die unterschiedlichen pH-Werte in den Gelen. Die Proteine werden zwischen den schneller wandernden Cl⁻ Ionen und den langsamer wandernden Glycin-Ionen gefangen. Aufgrund des pH-Werts von 6,8 liegt das Glycin im Sammelgel als Zwitterion vor und wandert nur langsam. Im Trenngel, werden die Proteine dann nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies ist durch den Zusatz des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) möglich, welches mit seinen lipophilen aliphatischen Ketten in das Innere der gefalteten Proteine eindringt und dadurch ihre Tertiärstruktur zerstört.

Pro Tasche wurden 20 µg Protein aufgetragen. Diese wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend wurden die Proben bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Um eine Ausbildung thermodynamischer Strukturen sowie eine Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern, wurden diese bis zur Auftragung aufs Gel auf Eis aufbewahrt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurde 4 µl Proteinmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 90 V über zehn Minuten und anschließend bei 120 V über 60 Minuten.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung Trenngel

10%iges Trenngel		
H ₂ O	4,7 ml	• 10 ml Ansatz für 2 Gele
40% Acrylamid	2,5 ml	
1,5 M Tris pH 8,8	2,6 ml	
20% SDS	0,05 ml	
20% APS	0,05 ml	
TEMED	0,004 ml	

Tabelle 3.11: Zusammensetzung Sammelgel

5%iges Sammelgel		
H ₂ O	4.3 ml	• 6 ml Ansatz für 2 Gele
40% Acrylamid	0,8 ml	
1,5 M Tris pH 8,8	0,8 ml	
20% SDS	0,03 ml	
20% APS	0,03 ml	
TEMED	0,006 ml	

Tabelle 3.12: Zusammensetzung Laufpuffer

10x Laufpuffer		
Trisbase	200 mM	• auf 1 l mit A. dest auffüllen • pH-Wert 8,3 • Puffer bei 4°C Lagern
Glycin	2 M	
SDS	1% (w/v)	

Tabelle 3.13: Herstellung vom 20% Ammoniumpersulfat (APS)

20% Ammoniumpersulfat		
APS	20% (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> • in A. dest • Lagerung in 1 ml Aliquots bei -20°C, nach dem Auftauen Lagerung bis zum Verbrauch bei 4°C möglich

Tabelle 3.14: Sammelgelpuffer

Sammelgelpuffer		
TRIS	1 M	<ul style="list-style-type: none"> • in A. dest • pH-Wert 6,8 • Lagerung bei RT

Tabelle 3.15: Trenngelpuffer

Trenngelpuffer		
TRIS	1,5 M	<ul style="list-style-type: none"> • in A. dest • pH-Wert 8,8 • Lagerung bei RT

Tabelle 3.16: 5x Auftragungspuffer für SDS-PAGE

5x Auftragungspuffer		
TRIS	500 mM	<ul style="list-style-type: none"> • pH-Wert 6,8 • Lagerung bei -20°C
SDS	16% (w/v)	
Glycerin	30% (w/v)	
DTT	400 mM	
Bromphenolblau	min. 0,04%	

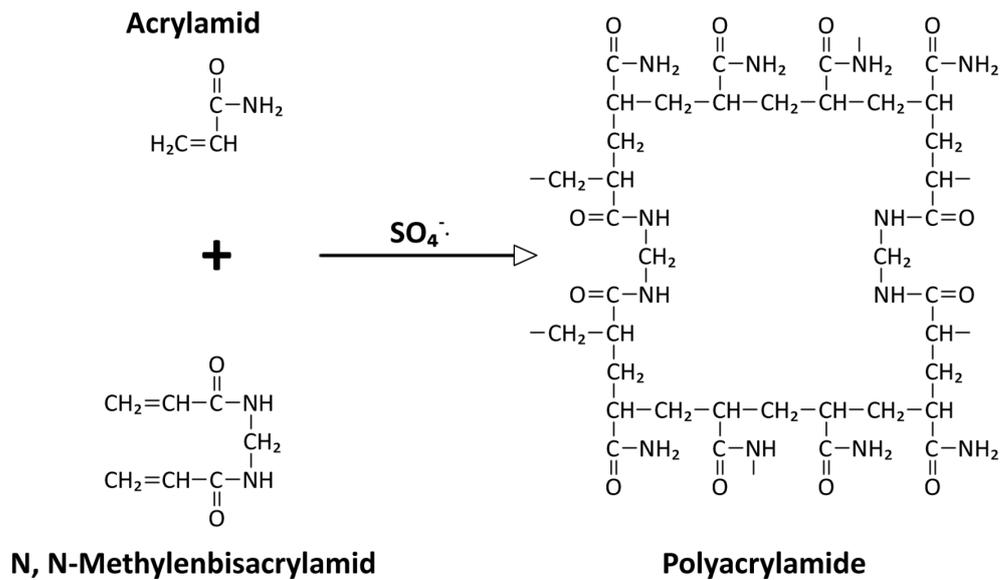


Abbildung 3.4: Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid

3.2.2.2 Transfer

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einen entsprechenden Trägerfilter zur weiteren Behandlung mit Antikörpern zu übertragen, wurde ein Western-Blot durchgeführt.

Beim Blotten erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken eine Bindung der Proteine an die Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF-Membran). Um eine nicht kovalente Bindung der Moleküle zu ermöglichen, muss die Membran zunächst in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurde sie mit den Whatmanpapieren und den Schwämmchen (*Fiber pad*) zehn Minuten im Transferpuffer quellen gelassen. Die einzelnen Komponenten wurden dann wie in der Abbildung 3.7 dargestellt zusammengesetzt.

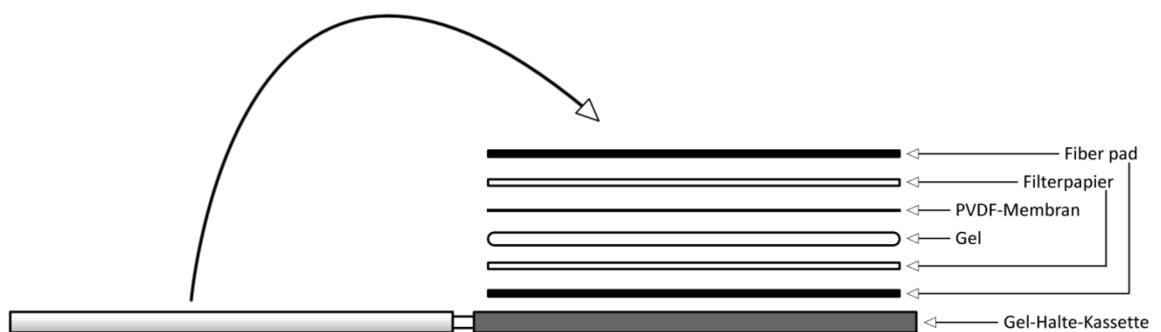
Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Proteine bleibt nach der Übertragung erhalten, sodass eine exakte Replik des ursprünglichen Gels entsteht. Der Transfer erfolgt über eine Stunde bei 100 V.

Tabelle 3.17: 10x Transferpuffer nach Biorad Gebrauchsanweisung ohne SDS

10x Transferpuffer		
TRIS	250 mM	• mit A. dest auffüllen
Glycerin	1,92 mM	• Lagerung bei 4°C

Tabelle 3.18: 1x Transferpuffer

1x Transferpuffer		
10x Transferpuffer	1:10	• mit A. dest auffüllen
MeOH	1:5	• Lagerung bei 4°C
		• mit MeOH Lagerung mit max. 2 Wochen

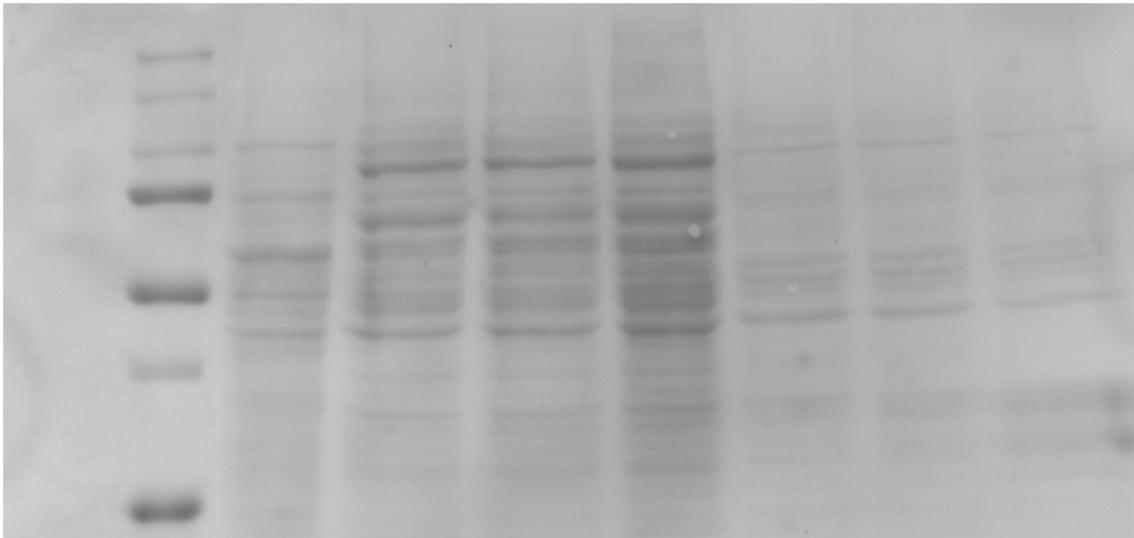
**Abbildung 3.5: Aufbau einer Transfervorrichtung für einen Western-Blot**

3.2.2.3 Ponceau-S-Färbung

Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wird die PVDF-Membran zur Kontrolle einige Minuten in Ponceau-S-Lösung gefärbt (Salinovich und Montelaro, 1986). Die Banden werden sichtbar gemacht, indem der überschüssige Farbstoff mit Wasser von der Membran gewaschen wird. Die Ponceau-S-Lösung bildet mit der Membran und den Proteinen einen wasserlöslichen Komplex. Da der PVDF-Ponceau-Komplex viel schneller dissoziiert als der Protein-Ponceau-Komplex, werden erst beim Waschen die rot gefärbten Proteinbanden sichtbar (siehe Abbildung 3.8). Einige Zeit später verschwinden auch diese Banden, weil der Ponceau-Protein-Komplex ebenfalls dissoziiert.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung der Ponceau-S-Lösung

Ponceau-S-Lösung		
Ponceau-S	0,1% (w/v)	• Lagerung im Dunkeln bei RT
Essigsäure	5% (v/v)	

**Abbildung 3.6: Eine mit Ponceau-S gefärbte PVDF-Membran**

3.2.2.4 Antikörperfärbung

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über 60 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für je zehn Minuten mit TBS-T folgte eine 60-minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Verdünnung der Sekundärantikörper betrug 1:5000 in Blocklösung. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal zehn Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Tabelle 3.20: Zusammensetzung des 10x TBS-T-Puffer

10x TBS-T		
TRIS	1,5 M	• mit A. dest auffüllen
NaCl	0,5 M	• pH-Wert 7,6
Tween 20	1% (v/v)	• Lagerung bei RT

Tabelle 3.21: Herstellung des Blockpuffers

Blockpuffer		
Magermilchpulver	5% (w/v)	• mit TBS-T auffüllen

Tabelle 3.22: Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Anti β III-Tubulin	1:500
Anti-Nestin	1:500
Anti-EGFR	1:500
Anti-Nrf2	1:500
Anti-Tubulin	1:100000
Anti-GAPDH	1: 100000

3.2.2.5 Detektion

Luminol (3-Aminophthalhydrazid) wird bei der peroxidasekatalysierten Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter alkalischen Bedingungen über mehrere Zwischenstufen und Abspaltungen von molekularem Stickstoff (N_2) zu einem kurzlebigen, energiereichen und cyclischen Peroxid oxidiert. Die beim Zerfall freiwerdende Energie führt zur Anregung einer der beiden entstehenden Carbonylverbindungen. Die so entstehende Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm kann auf einem blaulichtempfindlichen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die Expositionszeit der Filme lag bei wenigen Sekunden (GAPDH) bis zu 15 Minuten.

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL-System von der Firma Amersham eingesetzt. Die Membran wurde für fünf Minuten bei RT mit ECL inkubiert.

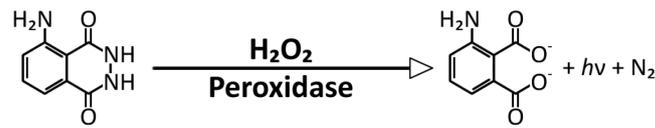


Abbildung 3.7: Chemische Grundlage der ECL-Plus-Reaktion (Amersham)

3.2.3 Immunzytochemie

Für diese Versuche wurden die Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern ausplattiert. Nach der gewünschten Behandlungszeit/Differenzierungszeit wurde 12% Paraformaldehyd (PFA) (Endkonzentration 4%) in jedes Well pipettiert und im Wärmeschrank bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der gesamte Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS für je fünf Minuten gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem Erst-Antikörper je nach Protokoll für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde der Objektträger erneut mit PBS gewaschen. Die Inkubationszeit der Zweit-Antikörperlösung, welcher für eine Zellkernfärbung Hoechst 33342 zugegeben wurde, erfolgte je nach verwendetem Antikörper 30-60 Minuten bei 37°C. Nach abermaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Deckgläschen auf den Objektträger eingebettet. Die Analyse der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

Tabelle 3.23: Verwendete Antikörper

Erst-antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Zweit-antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
β(III)-Tubulin	1:100	1 h bei 37°C	Anti-Maus IgG Alexa	1:250	30 min
GFAP	1:100	1 h bei 37°C	Anti-Hase IgG Alexa	1:200	30 min
O4	1:50	1 h bei 37°C	Anti-Maus IgM Rhodamin	1:100	30 min
Nestin	1:100	1 h bei 37°C	Anti-Maus IgG Alexa	1:250	30 min
Nrf2	1:50	Über Nacht bei 4°C	Anti-Kaninchen IgG Alexa	1:200	1 h

3.3 Molekularbiologische Methoden

Zum Schutz vor DNAsen und RNAsen sowie weiteren Kontaminationen wurde der Arbeitsplatz vor Beginn der Experimente mit DNS-ExitusPlus von AppliChem gereinigt. Außerdem wurden Einmalhandschuhe sowie sterile Eppis und Einmalpipettenspitzen benutzt.

3.3.1 RNS-Isolation

Die RNS-Isolation erfolgte mit Hilfe des ‚Absolutely RNA Microprep Kit‘ von Stratagene oder mittels ‚peqGold Total RNA Kits‘ von Peqlab. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Beide Methoden beruhen auf der spezifischen Bindung der RNS an die Oberfläche von Silicagel unter Hochsalzbedingungen.

3.3.1.1 RNS-Isolation aus Neurosphären

Zehn Neurosphären mit einem Durchmesser von ca. 0,3 mm wurden auf eine mit PDL-Laminin (Abschnitt 3.1.2) beschichtete 12-Well-Platte in 1 ml Differenzierungsmedium ausplattiert.

Die Differenzierung erfolgte mindestens 24 Stunden, bevor eine Behandlung mit den gewünschten Noxen gestartet wurde. Nach Ablauf der Behandlungszeiträume erfolgte eine komplette Abnahme des Mediums. Anschließend wurden 100 µl Lysispuffer (+ 0,7

µl β-Mercaptoethanol) auf die Zellen pipettiert, welche dann mit Hilfe eines Zellschabers (Costar) abgelöst, in ein Eppi (1,5 ml) überführt und resuspendiert wurden. Nach der anschließenden Zugabe von 100 µl EtOH (70%) und fünf Sekunden Vortexen erfolgte die Aufreinigung der RNS nach Herstellerangaben (peqGold Total RNA Kits). Die RNS-Aufreinigung wurde, um mögliche Kontaminationen mit DNS zu vermeiden, mit einem *DNase*-I-Verdau kombiniert. Alternativ konnte die Probe nach Zugabe des EtOH bei -80°C bis zur Isolation gelagert werden. Im Laufe dieser Dissertation wurde das RNS-Isolations Protokoll optimiert und auf das RNeasy Mini Kit (Qiagen) umgestellt, die Isolation erfolgt nach Angaben des Herstellers.

3.3.1.2 RNS-Isolation aus Zelllinien

Zur Isolation von RNS aus Zelllinien wurden diese mindestens 24 Stunden vor der Behandlung in einer 6-Well-Platte ausplattiert (Anzahl der ausplattierten Zellen kann der Tabelle 3.31 entnommen werden). Nach Ablauf der jeweiligen Behandlungszeit wurde das komplette Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen in 400 µl Lysispuffer bei RT für ca. fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und auf eine Aufreinigungssäule pipettiert. Die Isolierung der RNS erfolgte nach Angaben des Herstellers (Absolutely RNA Microprep Kit von Stratagene). Alternativ konnten die Proben nach Zugabe des Lysispuffers bis zur RNS-Isolierung bei -80°C aufbewahrt werden.

3.3.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNS erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Nucleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einen für die RNS-spezifischen Multiplikationsfaktor (Formel 3.2). Die Reinheit der Probe kann durch das Verhältnis der $OD_{260\text{nm}}$ und der $OD_{280\text{nm}}$ erschlossen werden, wobei ein Wert von 1,8 charakteristisch für eine reine DNS- und ein Wert von 2,0 spezifisch für eine RNS-Lösung ist. Ein weiterer Parameter für die Reinheit der Probe ist die Absorption bei 230

nm. Der Quotient $OD_{260\text{nm}}/OD_{230\text{nm}}$ gibt Aufschluss über eine Verunreinigung mit Salzen oder organischen Verbindungen und sollte nicht über 1,7 liegen (Mülhardt, 2006b).

$$C_{\text{RNS}} = \frac{OD_{260} * 40 * \text{Verdünnung}}{100}$$

Formel 3.2: Berechnung der RNS-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNS-Lösung von Zelllinien erfolgte an einem Photometer in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Verdünnungsfaktor von 1:10. Da die Konzentration der RNS-Lösung aus den Neurosphären für eine Verdünnung zu gering ausfiel, erfolgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung an einem Nano-Drop.

3.3.3 Reverse Transkription (RT-PCR)

Aus der in Abschnitt 3.3.1 gewonnenen RNS-Lösung muss in der RT-PCR zunächst komplementäre DNS (cDNS) synthetisiert werden, da RNS dem in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzten DNS-Polymerasen nicht als Matrize dienen kann. Die Synthese der cDNS erfolgte nach Vogel *et al.* Mit Hilfe der Reverse Transkriptase aus dem ‚*Moloney murine leukemia virus*‘ (MMLV-RT) (Vogel *et al.*, 1997).

Durch die Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 3.3.2) konnte gezeigt werden, dass der RNS-Gehalt primärer Zellen sehr gering ist. Aus diesem Grund wurde ein konstantes Volumen RNS-Lösung von 10 µl für die cDNS-Synthese verwendet. Ein Abgleich auf den ursprünglichen RNS-Gehalt erfolgte durch eine Normierung auf das konstant exprimierte Haushaltsgen β-Aktin.

0,5 µg der aus den Zelllinien gewonnenen RNS-Lösung wurden vor dem Einsetzen in die RT-Reaktion auf ein Volumen von 7,75 µl mit DEPC-H₂O verdünnt.

Tabelle 3.24: RT-Primer Annealing Pipettierschema

Mastermix	hNPC	Zelllinien
dNTP	-	1 μ l
Oligo dT-Primer	1,5 μ l	1,25 μ l
RNS-Lsg	10 μ l	7,75 μ l

Nach der Zugabe von weiteren Komponenten (Tabelle 3.25) erfolgte ein fünfminütiges Anlagern der Oligo dT-Primer an die mRNA bei 65°C. Zu dem Annealing-Ansatz wurde anschließend ein RT-Ansatz auf Eis hinzupipettiert (Tabelle 3.25).

Tabelle 3.25: Pipettierschema für den RT –Ansatz (Mastermix)

Mastermix	hNPC	Zelllinien
dNTP	1 μ l	-
RNAse Inhibitor	0,5 μ l	0,5 μ l
5x RT-Puffer	4 μ l	4 μ l
DTT	2 μ l	2 μ l
MMLV RT	1 μ l	1 μ l
DEPC-Wasser	-	2,5 μ l

Das Reaktionsvolumen betrug 20 μ l. Um den Pipettierfehler zu minimieren und damit die Genauigkeit zu erhöhen, wurde von dem RT-Ansatz ein Mastermix erstellt. Die RT-Reaktion erfolgte in einem Biometra-Block bei 37°C für 52 Minuten. Zum Abbruch der Synthesereaktion wurde die Reverse Transkriptase durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Im Laufe dieser Dissertation wurde das cDNS Synthese Protokoll optimiert und auf das Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) umgestellt, die cDNS-Synthese erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte cDNS wurde entweder in einer nachfolgenden PCR weiterverwendet oder alternativ bei -20°C zwischengelagert.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde von Kary Mullis konzipiert (Mullis *et al.*, 1986). Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mit der die DNS *in vitro* vervielfältigt werden kann.

Das Prinzip basiert auf der Eigenschaft der DNS-Polymerase, einen doppelsträngigen DNS-Strang mit einem freien 3'-OH-Ende verlängern zu können. Die Reaktion läuft in drei Schritten ab. Im ersten Schritt wird die DNS, die das zu amplifizierende Gen enthält, durch eine Hitzebehandlung bei 95°C in ihre Einzelstränge zerlegt (Denaturierungsphase). Anschließend wird die Temperatur auf 50 bis 60°C gesenkt, sodass eine spezifische Anlagerung der verwendeten Primer an die DNS gewährleistet ist (Annealingphase). Die so entstandenen kurzen doppelsträngigen DNS-Bereiche dienen in der Elongationsphase der Taq-Polymerase als Startpunkt. Hierbei wird die Temperatur dem Optimum der Polymerase angepasst, welches im Bereich um 72°C liegt.

Tabelle 3.26: Übersicht der verwendeten Primerpaare

Gen	Hybridisierungstemperatur(°C)	Produktlänge (bp)	Sequenz (5'-3')
SOD	60	209	FW: ggc cga tgt gtc tat tga aga RV: ggg cct cag act aca tcc aa
GP	60	127	FW: tct gtt gct cgt agc tgc tg RV: ggg gtc aag agg agg aga ga
CAT	60	119	FW: cgt gct gaa tga gga aca ga RV: agt cag ggt gga cct cag tg
β-Aktin	60	263	FW: ccc cag gca cca ggg cgt gat RV: ggt cat ctt ctc gcg gtt ggc ctt ggg gt
Keap1	60	134	FW: cac agc aat gaa cac catc c RV: cac agc aat gaa cac cat cc
Nrf2	60	181	FW: gcg acg gaa aga gta tga gc RV: gtt ggc aga tcc act ggt tt

3.3.4.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde zur Bestimmung der spezifischen Annealing-Temperatur der neu entworfenen Primer sowie zur Herstellung von Standards für die RTQ-PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Die verwendeten Primer sowie die ermittelten Annealing-Temperaturen können der Tabelle 3.26 entnommen werden.

Tabelle 3.27: PCR-Bedingungen

PCR Programm			
1. Zyklus	Denaturierung	4 min 94°C	1x
2. Zyklus	Denaturierung	30 sec 94°C	40x
	Annealing	30 sec	
	Elongation	30 sec 72°C	
3. Zyklus	Elongation	4 min 72°C	1x
4. Zyklus	Kühlung	∞ min 4°C	1x

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz. Neben den Proben wurden in einem weiteren Reaktionsgefäß Negativkontrollen mitgeführt. Dabei wurde, um mögliche Bildung von Primer-Dimeren und Kontaminationen ausschließen zu können, die cDNS durch 2 µl DEPC-Wasser ersetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes kann der Tabelle 3.28 entnommen werden.

Tabelle 3.28: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

Volumen	Mastermix
2 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
0,4 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,2 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)
13,4 µl	DEPC-Wasser
1 µl	5'-Primer (4 µM)
1 µl	3'-Primer (4 µM)
2 µl	cDNS (siehe 3.3.3)

3.3.4.2 TBE-Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer Ladung wandern sowohl DNS- als auch RNS-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Anode, und zwar umso langsamer, je länger sie sind. Die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren können durch Ethidiumbromid (EtBr) Färbung sichtbar gemacht werden. Das EtBr interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle, die dann unter UV-Licht fluoreszieren.

Zur Analyse der DNS-Produkte wurden jeweils 20 µl des PCR-Reaktionsvolumens mit 5 µl 6x Probenpuffer versetzt und auf ein 1 prozentiges Agarosegel aufgetragen. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines 100 bp DNS-Längenmarkers bestimmt. Die Elektrophorese erfolgt bei 140 V und 1x TBE-Lösung als Laufpuffer. Die TBE-Agarose-Gelelektrophorese dient der Ergebnisüberprüfung verschiedener PCR-Produkte.

3.3.4.3 Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Mit der quantitativen Real-Time-PCR ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkallierenden Farbstoffes, kontinuierlich die Menge der entstehenden Produkte während der PCR zu messen (Freeman *et al.*, 1999). Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate.

Der Nachweis der PCR-Produkte basiert auf einem Schwellenwert, dem CT-Wert. Der CT-Wert ist der erste PCR-Zyklus, der eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz zeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR mit dem RotorGeneQ (Qiagen) und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green durchgeführt. SYBR Green ist ein sogenannter Interkalator, der an jede doppelsträngige DNS bindet (Morrison *et al.*, 1998). Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von $1,5 \times 10^2$ bis $1,5 \times 10^6$ produktspezifischer Kopien. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Rotor-Gene Q-Software 1.7 (Qiagen).

Tabelle 3.29: RTQ-PCR Bedingungen

RTQ-PCR Programm			
1. Zyklus	Denaturierung	15 min 94°C	1x
2. Zyklus	Denaturierung	15 sec 94°C	40x
	Annealing	25 sec	
	Elongation	30 sec 72°C	
3. Zyklus	Fluoreszenzmessung	2 sec 72°C	1x
4. Zyklus	Kühlung	∞ min 4°C	1x

Die Durchführung der RTQ-PCR erfolgte in einem 15 µl Reaktionsansatz. Neben den Proben wurden in einem weiteren Reaktionsgefäß Negativkontrollen durchgeführt. Dabei wurde die cDNS durch 3 µl DEPC-Wasser ersetzt. Die Zusammensetzung des RTQ-PCR-Ansatzes kann der Tabelle 3.30 entnommen werden.

Tabelle 3.30: Pipettierschema für den RTQ-PCR-Ansatz

Volumen	Mastermix:
7,5 µl	SYBR Green Quantace
1 µl	3' Primer (4 µM)
1 µl	5' Primer (4 µM)
2,5 µl	DEPC H ₂ O
3 µl	cDNS (1:3 Verdünnung)

3.3.4.4 Standardherstellung für die RTQ-PCR

Für die qRT-PCR sind Standards mit bestimmten Kopiezahlen erforderlich. Daher erfolgte eine Synthese der Standards mit dem Qia-quick PCR-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers. Nach Aufreinigen der PCR-Produkte erfolgte eine DNS-Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 3.3.2). Die vorhandenen Kopiezahlen der DNS-Fragmente konnten mit Hilfe einer Formel (siehe Formel 3.3) bestimmt werden.

$$C = \frac{[X \cdot (6,022 \cdot 10^{23})]}{(Y \cdot 660)}$$

Formel 3.3: Gleichung zur Berechnung der Kopiezahl der DNS-Fragmente

- C: Kopienanzahl pro μl
X: DNS-Konzentration [$\text{g}/\mu\text{l}$]
Y: Fragmentgröße in Basenpaaren (bp)

Auf Basis dieser Gleichung wurde ein Standard mit $1,5 \times 10^8$ Molekülen/ μl in DEPC-Wasser hergestellt. Dieser wurde dann als Ausgang für die Verdünnungsreihen der qRT-PCR verwendet.

3.4 Gentechnische Verfahren

3.4.1 Transformation

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNS wurde das Hitzeschock-Verfahren nach Sambrook verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Transformation wurden kompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien eingesetzt. Diese wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit β -Mercaptoethanol für zehn Minuten ebenfalls auf Eis inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNS hinzupipettiert und dieser Ansatz für weitere 30 Minuten inkubiert. Diesem Schritt folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Anschließend wurde die Suspension direkt auf Eis für zwei Minuten abgekühlt. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml SOC-Medium ohne Antibiotika der Suspension hinzugefügt und diese für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln in einem Wasserbad inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde daraufhin auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden gepickt und in 2 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C hochgezogen. Die Präparation der Plasmid-DNS erfolgte mit Hilfe einer Minipräparation (siehe Abschnitt 3.4.1.1). Durch einen Testverdau mit Restriktionsenzymen (siehe Abschnitt 3.4.1.3) wurde die isolierte DNS kontrolliert. Zeigten die Plasmide das richtige Schnittmuster, wurden 150 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit

der Vorkultur angeimpft und über Nacht angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgt durch eine Maxipräparation (siehe Abschnitt 3.4.1.2).

3.4.1.1 Minipräparation

Die Minipräparation erfolgte mit 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur und wurde mit Hilfe des ‚QIAprep Plasmid Purification Mini Kits‘ von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kontrolle der isolierten Plasmid-DNS wurde ein Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.4.1.3) durchgeführt.

3.4.1.2 Maxipräparation

Die Isolierung der Plasmid-DNS aus 150 ml einer *E. coli*-Kultur erfolgte durch die Aufreinigung mit dem ‚QIAprep Plasmid Purification Maxi Kits‘ von Qiagen nach Herstellerangaben. Mit Hilfe eines Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.4.1.3) wurde die präparierte DNS kontrolliert.

3.4.1.3 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der isolierten Plasmid-DNS wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Enzyme sind in der Lage, Sequenzen innerhalb der Plasmid-DNS zu erkennen und an diesen spezifisch zu schneiden. Je nach Plasmid werden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, sodass unterschiedlich große DNS-Fragmente entstehen. Diese Fragmente können mit Hilfe einer Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.4.2) aufgetrennt und so die Größe des entstandenden Produkts überprüft werden.

Tabelle 3.31: Pipettierschema für den Restriktionsverdau

Volumen	Mastermix:
BSA	0,2 µl
Puffer	2 µl
Enzym	10 U
DNS	1 µg
ad Wasser	20 µl

3.4.2 Transfektion

3.4.2.1 Transfektion mit kationischen Liposomen (Lipofektion)

Die Transfektion mit kationischen Liposomen (Lipofektion) wurde zuerst von Felgner *et al.* beschrieben (Felgner *et al.*, 1987). Das Prinzip dieser Transfektion basiert auf einem Drei-Komponentensystem, welches aus kationischen Lipiden, ungeladenen Helferlipiden und DNS-kompaktierenden Substanzen besteht (Mülhardt, 2006a). Für die Transfektion der Plasmid-DNS wurde ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz, Lipofectamine mit PLUS Reagenz der Firma Invitrogen verwendet. Für die Durchführung der Transfektion wurden die HEK293FT Zellen 24 Stunden vor Versuchsdurchführung ausplattiert. Am folgenden Tag wurde die Lipid-Komponente, das Lipofectamine, mit Serum freiem Kulturmedium vorverdünnt und getrennt davon wurde das PLUS Reagenz mit der DNS bei RT für 15 Minuten inkubiert. Nach der Vorinkubation, wurden beide Komponenten gemischt und es folgte eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten. Im Anschluss wurde diese Mischung zu den Zellen, welche sich im Serum freien Medium befanden, unter Schwenken hinzupipettiert. Nach weiteren drei Stunden wurde Serum haltiges Medium zu den Zellen hinzugefügt.

Tabelle 3.32: Pipettierschema

Zellkulturplatten	35 mm	60 mm	100 mm
DNA	0,8 µg	1,3 µg	3,2 µg
Plus Reagenz	4 µl	8 µl	20 µl
DMEM 0% FCS	100 µl	250 µl	750 µl
Mit oberen Absatz mischen-> 15 min RT			
Lipofectamin	6 µl	11 µl	28 µl
DMEM 0% FCS	100 µl	250 µl	750 µl
3 Stunden 37°C Inkubation			
DMEM 0% FCS in gewaschenes Well vorlegen	800 µl	2 ml	5 ml
Ansatz	200 µl	500 µl	1,5 ml
3 Stunden 37°C Inkubation			
DMEM mit FCS dazu pipettieren	1,5 ml	3 ml	7 ml

3.4.2.2 Transfektion von HEK293FT Zellen zur Virusproduktion

Die Transfektion der HEK293FT Zellen erfolgte mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode. Für die Durchführung wurden pro Ansatz 5×10^6 Zellen am Vortag ausplattiert. Direkt vor Beginn der Transfektion wurde bei den ausplattierten Zellen ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Im Anschluss wurde das Transfektionsgemisch wie folgt angesetzt:

In einem Falcon-Röhrchen wurden das Transferplasmid, das Verpackungsplasmid sowie das Hüllplasmid mit Calciumchlorid gemischt und mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Diesem Gemisch wurde tropfenweise unter Vortexen 2x HeBS-Puffer zugegeben. Das Calciumphosphat-DNS-Gemisch wurde nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten vorsichtig tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach vier Stunden wurde zu den Zellen 10 ml frisches Medium hinzugegeben. Am folgenden Tag wurde das komplette Medium durch 10 ml Proliferationsmedium B27 (siehe Tabelle 3.1) ersetzt. Nach zwei und fünf Tagen wurde der Virusüberstand geerntet. Um restliche Zellen und Zelltrümmer aus dem Virusüberstand zu entfernen, wurde dieser bei 4750 xg zentrifugiert und anschließend mit einem 0,45 µm Sterilfilter

filtriert. Darauf folgend wurde der Virusüberstand wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben aufkonzentriert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.33: Pipettierschema

Volumen	Mastermix:
10 µg	Transfervektor
3,5 µg	pMD2.G (VSV-G Expressionsvektor)
6,5 µg	pCMVΔR8.91 (gag-pol Expressionsvektor)
50 µl	2.5M CaCl ₂
ad. 500 µl	Wasser

3.4.3 Aufkonzentrierung der Virussuspension

Der aufgereinigte Virusüberstand wurde durch Ultrafiltration mit Centricon Plus-70 Ultracel PL-100 MWCO 100.000 von Millipore nach Herstellerangaben aufkonzentriert und im Anschluss in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert.

3.4.4 Virustiter-Bestimmung

Der Virustiter wurde mit einem kommerziell erhältlichen p24 ELISA der Firma BioCat nach Herstellerangaben bestimmt. Da das Einfrieren und Auftauen zum Verlust von Viren führt, wurde der Virustiter aus bereits gefrorenen Aliquots bestimmt.

3.4.5 Lentivirale Transduktion

Zur Infektion von hNPC mit Lentiviren wurden pro Infektion 200 Sphären in 1 ml virushaltiges Medium pipettiert und Polybren in einer Endkonzentration von 5 µg/ml hinzugefügt. Nach vier Stunden Inkubationszeit wurde zu den Zellen 1,5 ml frisches Proliferationsmedium B27 (siehe Tabelle 3.1) hinzugegeben. Am Folgetag wurde das Medium komplette ausgewechselt. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die

Sphären auf Selektionsmedium gesetzt. Der Gen-Knockdown wurde mittels qRT-PCR (siehe Abschnitt 3.3.4.3) überprüft.

3.5 Zellbiologische Methoden

Um die Toxizität der eingesetzten Substanzen sowie die durch das Alter der Kultur einhergehenden Veränderungen bestimmen zu können, wurden verschiedene Assays durchgeführt. In Abhängigkeit der Experimentgröße wurden verschiedene Platten verwendet, welche zuvor für differenzierende Bedingungen, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, beschichtet wurden. Nach Abnahme des PBS-Puffers wurde die entsprechende Anzahl an Zellen, welche aus Tabelle 3.31 ersichtlich ist, ausplattiert. Die Exposition mit den zu untersuchenden Noxen erfolgte sowohl unter differenzierenden als auch unter proliferierenden Bedingungen. Die jeweiligen Behandlungszeiträume sind den entsprechenden Legenden der Experimente zu entnehmen.

Tabelle 3.34: Darstellung der verwendeten Platten mit der entsprechenden Anzahl ausplattierter Zellen pro Well.

Platte	Fläche in cm ²	Bodenform	Zellen (HaCaT/HepG2)	Zellen (SH-SY5Y)	hNPCs	Volumen in µl
8 Kammer- Objekträger	0,8	Flat-bottom	5×10^4	2×10^5	5	500
6-Well	9,6	Flat-bottom	2×10^5	8×10^5	60	5000
12-Well	3,8	Flat-bottom	1×10^5	4×10^5	10	1000
24-Well	2	Flat-bottom	5×10^4	2×10^5	5	500
48-Well	0,75	Flat-bottom	2×10^4	1×10^5	5	500
96-Well	0,32	Flat-bottom	1×10^4	5×10^4	1	100

3.5.1 Migrationsassay

Um mögliche Veränderungen des Migrationsverhaltens zu analysieren, wurden Fotos aller ausplattierten Sphären im Phasenkontrast aufgenommen. Die somit erhaltenen Bilder wurden am Computer mit dem Programm MetaMorph ausgewertet (siehe

Abbildung 3.10). Dabei wurde die zurückgelegte Distanz der ausmigrierten Zellen vom Sphärenrand an mindestens drei verschiedenen Positionen, welche mindestens 90° voneinander entfernt waren, vermessen. Um eine Gleichheit der verschiedenen Versuche zu gewährleisten, mussten mindestens drei der fünf ausplattierten Sphären auswertbar sein. Die somit ermittelten Messwerte aus einer Kammer wurden zu einem Wert gemittelt und gegen die Kontrolle aufgetragen.

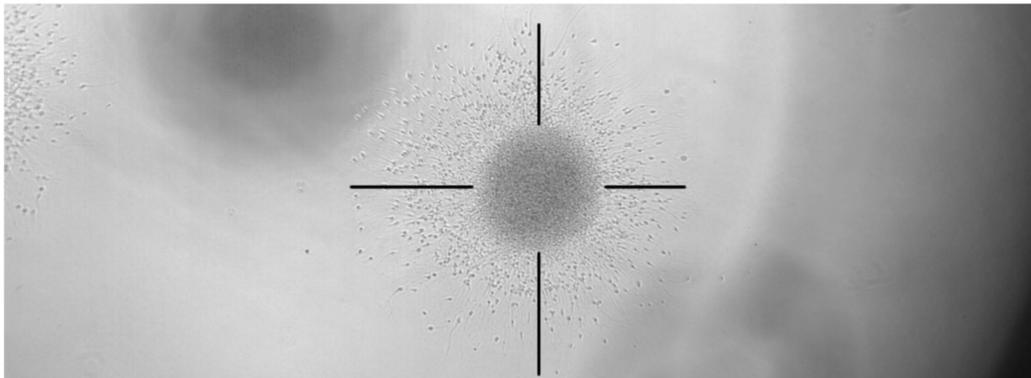


Abbildung 3.8: Migrationsstrecken-Vermessung

Phasenkontrastaufnahme einer migrierenden Sphäre (Vergrößerung 100x)

3.5.2 Proliferationsassay

Um mögliche Effekte der Alterung in Kultur auf das Proliferationsverhalten der hNPCs zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Proliferationsassays durchgeführt. Die Sphären wurden hierfür in Proliferationsmedium (B27) ausplattiert. Als Negativkontrolle dienten Sphären, welche im Medium ohne Wachstumsfaktoren ausplattiert wurden. Um eine Verklumpung der Sphären zu vermeiden, wurde pro Well jeweils nur eine Sphäre ausplattiert.

3.5.2.1 Proliferationsassay (Durchmesser Bestimmung)

Die hNPCs wurden in 96-Well-Platten ausplattiert und in einem Zeitraum von bis zu drei Wochen wurde die Größenzunahme der einzelnen Sphären bestimmt. Dafür wurden die Neurosphären zur Durchmesserbestimmung alle zwei bis drei Tage mikroskopisch durch ein Foto dokumentiert. Der Durchmesser wurde im Anschluss mit Hilfe des Programms MetaMorph bestimmt.

3.5.2.2 BrdU-Assay

Zur Quantifizierung der Proliferation der Neurosphären wurde der BrdU cell proliferation ELISA (Roche) (Chemilumineszenz) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Technik basiert auf dem Einbau von BrdU in die DNS von proliferierenden Zellen. Nach Einbau in die DNS kann das BrdU mit einem Immunoassay detektiert werden. Da für die Durchführung des Assays eine adhärenente Monolayer-Zellschicht benötigt wird, müssen die Neurosphären nach einer 16 stündigen BrdU-Inkubationszeit, durch eine zehnmütige Accutase-Behandlung vereinzelt werden. Um im Nachhinein die Zellen auf dem Plattenboden zu fixieren, muss die Accutase vollständig entfernt werden. Hierfür wird die Platte mit Hilfe eines Föhns erwärmt, bis die gesamte Flüssigkeit verdampft ist. Die Messung erfolgte in einem Luminometer (Tecan).

3.5.3 β -Gal Färbung

Die β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen kann durch eine Enzym-Substrat-Farbreaktion nachgewiesen werden. Für diesen Versuch wurden die Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern ausplattiert. Nach der gewünschten Differenzierungszeit wurde 250 μ l 12% PFA in jedes Well pipettiert und im Wärmeschrank bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der gesamte Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS für je fünf Minuten gewaschen. Anschließend folgte eine Übernachtinkubation bei 37°C mit einer X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)-Substratlösung. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mikroskopisch die gebildete Blaufärbung (5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol) dokumentiert.

Tabelle 3.35: X-Gal Puffer

Volumen	Mastermix
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	160 mg (5 mM)
Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat	210 mg (5 mM)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	40 mg (2 mM)
PBS	100 ml

Tabelle 3.36: X-Gal Stock Lösung

Volumen	Mastermix
x-Gal Puffer	20 mg
DMF (N,N Dimethylformamide)	0,5 ml

Tabelle 3.37: X-Gal Substratlösung

Volumen	Mastermix
X-Gal Stock Lösung in warmen X-Gal Puffer verdünnen	1:40

3.5.4 Dichlorofluorescein (DCF) Assay

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS-Bildung wurden die Zellen mit dem Farbstoff H₂DCF-DA gefärbt. DCF ist ein ROS-sensitiver Farbstoff, der aufgrund seiner fehlenden Polarität membrangängig und nicht fluoreszierend ist. Durch intrazelluläre freie Radikale wird der Farbstoff in der Zelle oxidiert (Barja, 2002). Das Reaktionsprodukt ist fluoreszierend und kann aufgrund seiner Polarität die Zelle nicht mehr verlassen. Durch Messung der Fluoreszenzintensität ist es möglich, die intrazellulären freien Radikale zu quantifizieren.

3.5.4.1 Durchführung des DCF-Assay in proliferierenden Sphären

Die proliferierenden Neurosphären wurden direkt nach der Behandlung mit HBSS-Puffer gewaschen und unter Zellkulturbedingungen mit 20 µM H₂DCF-DA in HBSS für

eine Stunde inkubiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Neurosphären nach erneutem Waschen mit Accutase für 20 Minuten bei 37°C behandelt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Zellpellet im kalten HBSS-Puffer resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem FACS-Calibur bestimmt und mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet.

3.5.4.2 Durchführung des DCF-Assay in differenzierenden Sphären

Differenzierende Zellen wurden direkt nach der Behandlung mit warmem HBSS-Puffer gewaschen und unter Zellkulturbedingungen mit 50 µM H₂DCF-DA in HBSS für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gewaschen und mit HBSS-Puffer bedeckt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am Tecan (475 Ex/525 Em).

3.5.5 Zytotoxizitätsbestimmung

Um die toxischen Effekte der verwendeten Substanzen auf die Vitalität der Zellkulturen zu bestimmen, wurde ein Viabilitätstest (CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Alamar Blue Assay) von Promega) sowie ein Zytotoxizitätstest (CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay (LDH) von Promega) durchgeführt.

3.5.5.1 CellTiter-Blue Cell Viability Assay

Bei der Atmungskette handelt es sich um einen wichtigen Teil des Energiestoffwechsels, der für das Überleben der Zellen essenziell ist. Der verwendete Assay benutzt diese Eigenschaft der Zelle zur Bestimmung der Vitalität. Dabei wird der Redoxfarbstoff Resazurin durch metabolisch aktive Zellen in den pink-farbenen fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umgesetzt (siehe Abbildung 3.11). Sterbende Zellen hingegen verlieren innerhalb kurzer Zeit ihre metabolische Aktivität, wodurch das gemessene Signal proportional zur Vitalität der Zellen ist. Für die Durchführung wurde das Reagenz in einem Verhältnis von 1:10 in das Medium pipettiert und für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Proben am Ascent Fluoroscan (540 Ex/590 Em) gemessen.

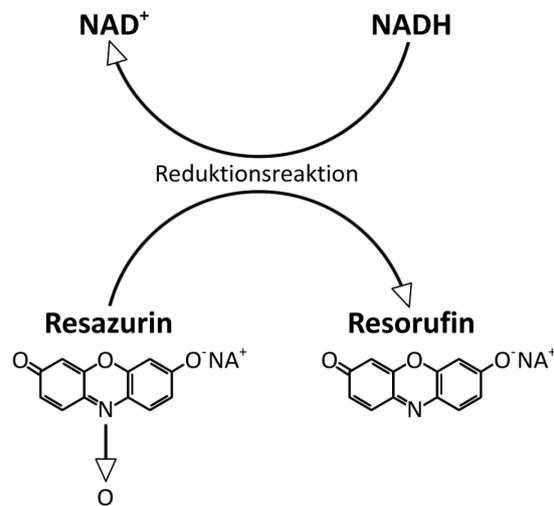


Abbildung 3.9: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin (Promega).

3.5.5.2 CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay

Eine starke Schädigung der Zelle führt zum Verlust der Integrität der Zellmembran, wodurch verschiedene Enzyme und Proteine wie z.B. die Laktatdehydrogenase (LDH) in den extrazellulären Raum gelangen können. LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat, dabei werden Reduktionsäquivalente auf NAD übertragen. Durch die Diaphorase werden die Reduktionsäquivalente auf Resazurin übertragen, welches zu Resorufin reduziert wird. Die mit dieser Methode gemessene Fluoreszenz ist proportional zur vorhandenen Laktatdehydrogenase. Für die Durchführung dieses Assays wurde nach Ablauf der Behandlungszeit aus jeder Kammer 100 µl Überstand in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 100 µl des CytoTox-ONE Reagenz hinzugefügt und bei 37°C für vier Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben am Ascent Fluoroscan (540 Ex/590 Em) gemessen.

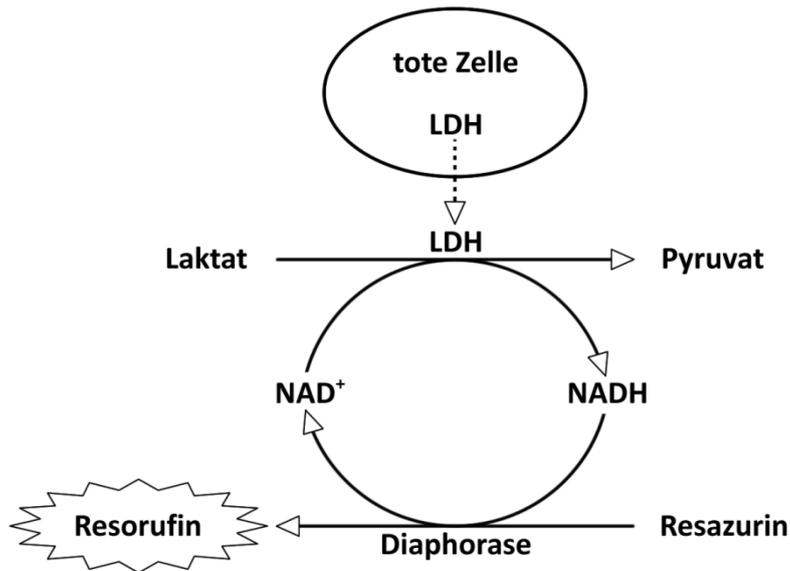


Abbildung 3.10: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch LDH (Promega).

3.5.6 Apoptosemessung

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der zum Zelltod führt. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Vorgang, der unter Energieverbrauch abläuft. Um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurden Enzymaktivitätsmessungen der Effektorcaspasen-3/7 durchgeführt sowie freie 3'OH-Enden der geschnittenen DNS in der späteren Apoptose durch den TUNEL-Assay identifiziert.

3.5.6.1 Apo One Homogeneous Caspase-3/7-Assay

Caspasen-abhängige Apoptose ist durch die Aktivierung der Effektorcaspasen-3/7 gekennzeichnet, welche mit diesem Assay gemessen werden kann. Für die Durchführung wird das Substrat ((Z-DEVD) 2-Rhodamin 110 Substrat), welches spezifisch durch die Caspase-3/7 geschnitten wird, 1:100 im Puffer verdünnt. Der verwendete Puffer dient zur Lyse der Zellen, wodurch die Caspasen ins Medium gelangen. Das Substrat-Puffer-Gemisch wird 1:2 zu den behandelten Zellen hinzupipetiert und mindestens eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit können die Proben am Fluoroscan (485 Ex/530 Em) gemessen werden. Das so erhaltende Fluoreszenzsignal ist proportional zur aktivierten Caspase-3/7.

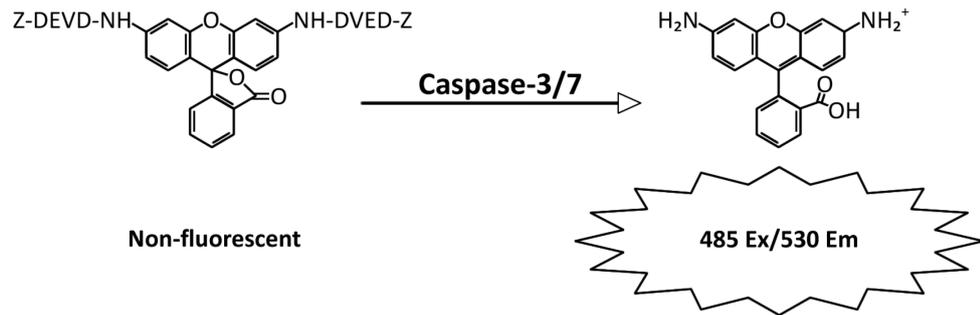


Abbildung 3.11: Spaltung des Caspase-Substrats Z-DEVD-R110 durch Caspase-3/7 (Promega).

3.5.6.2 TUNEL-Assay

Während der späten Apoptose wird der DNS-Strang durch die Enzymaktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die so entstehenden DNS-Bruchstücken werden mit Hilfe von dem Enzym Terminale desoxynukleotidyl Transferase (TdT) mit fluoreszierenden Nukleotiden am 3'-OH-Ende markiert und können so unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Für diesen Versuch wurden die Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern ausplattiert. Nach der jeweiligen Behandlungszeit wurde 250 µl 12% PFA in jedes Well pipettiert und im Wärmeschrank bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde der gesamte Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS für je fünf Minuten gewaschen. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit der TUNEL-Reaktionslösung. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS (je fünf Minuten) wurden die Deckgläschen mittels Vectashield auf den Objektträger eingebettet und anschließend mit Nagellack luftdicht versiegelt. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop, wobei die Aufnahmen mit einer Kamera aufgenommen wurden.

Tabelle 3.38: Zusammensetzung der TUNEL-Reaktionslösung

TUNEL-Reaktionslösung	
CoCl ₂	25 mM
TdT	25 mM
Fluorescin-12-dUTP	1 mM
5x Terminal Transferase Buffer	1:5
Triton-X100	0,1%
Hoechst	1%

3.6 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit dem Two-way RM ANOVA mit Bonferroni posttest und dem T-Test durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ gewählt wurde (Graph Pad Prism 5 Software).

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellmodells, welches Alterungsprozesse von NPC *in vitro* abbildet. In diesem Zellmodell sollten desweiteren die altersabhängige Veränderung der antioxidativen Kapazität sowie die Rolle des Masterregulators Nrf2 bei der NPC Alterung untersucht werden.

4.1 Die Etablierung von humanen NPCs als *in vitro* Alterungsmodell

Zur Entwicklung eines *in vitro* Alterungsmodells war es zum einen wichtig, primäre nicht-immortalisierte Zellen zu nutzen, zum anderen sollten sie den richtigen Zelltyp, nämlich NPC, wenn möglich vom Menschen, repräsentieren. Daher wurde für diese Arbeit auf humane NPC (hNPC) zurückgegriffen. Diese Zellen entstehen während der Organogenese, bringen Neurone sowie Gliazellen hervor und persistieren als adulte NPC bis ins hohe Alter im Gehirn des Menschen (Galvan und Jin, 2007).

Die NPC dieser Arbeit wurden aus einem Homogenat fötalen Kompletthirns gewonnen und als bereits propagierte NPC kommerziell erworben (Lonza, Verviers, Belgien). Diese als 3D Neurosphären wachsende Kultur wurde in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (EGF und FGF) im proliferierenden Zustand über Monate kultiviert (Abbildung 4.1), um zu untersuchen, ob solche *in vitro* gealterten Sphären -im Folgenden als alte Sphären bezeichnet- den Phänotyp *in situ* gealterter NPC widerspiegeln. Dazu wurde, wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich, in regelmäßigen Intervallen von 2 bis 3 Monaten die proliferative Kapazität sowie das Migrations- und Differenzierungsverhalten der alternden NPC untersucht. Von diesen Versuchen wurde erwartet, dass mit zunehmendem Alter die proliferative, migratorische sowie die Differenzierungsfähigkeit der NPCs abnimmt.

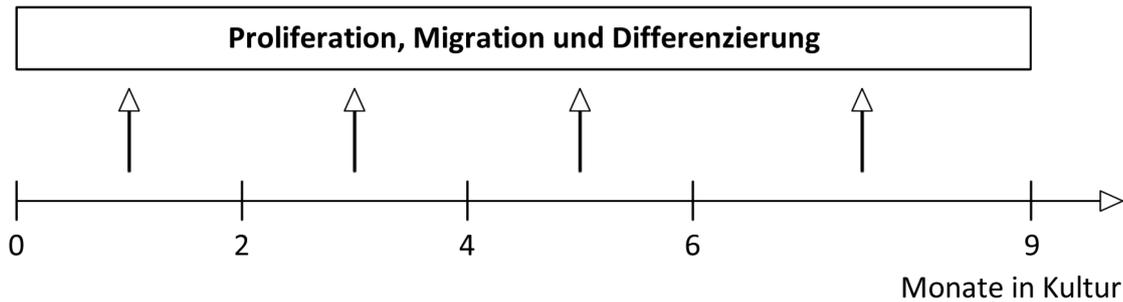


Abbildung 4.1: Die Kultur von *in vitro* gealterten hNPCs

Humane Neurosphären wurden über einen Zeitraum von neun Monaten unter proliferierenden Bedingungen kultiviert. Während dieser Zeit wurden die Endpunkte Proliferation, Migration und Differenzierung in den hNPCs nach 1-2, 3-4, 5-6 und 7-8 Monaten in Kultur untersucht.

4.1.1 Die Proliferationskapazität von *in vitro* gealterten hNPCs

Da es sich bei den hNPCs dieser Arbeit um dreidimensionale Sphärenkulturen handelt, gibt es mehrere Möglichkeiten, die Proliferation dieser Organoide zu bestimmen. Zum einen lässt sich die Zunahme des Sphärendurchmessers über die Zeit mikroskopisch vermessen. Diese Methode ist nicht-invasiv, relativ kostengünstig und lässt sich computerbasiert auswerten. Dabei werden über einen Zeitraum von 28 Tagen alle zwei bis drei Tage Phasenkontrastaufnahmen von einzelnen Sphären in einzelnen Wells einer 96-Well Platte aufgenommen und somit die Durchmesserzunahme über die Zeit bestimmt.

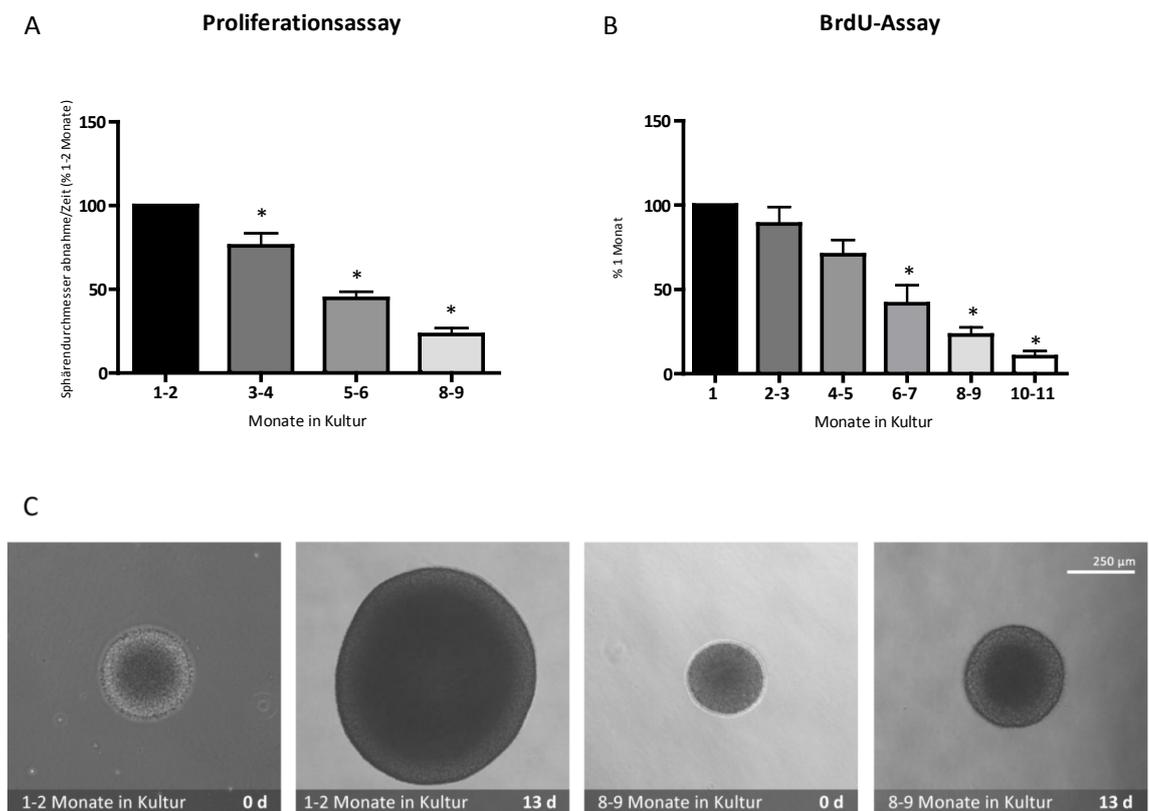


Abbildung 4.2: Die Proliferationskapazität von *in vitro* gealterten Sphären.

Die Sphären wurden vor dem Ausplattieren mechanisch auf eine Größe von 0,3 μ m zerkleinert. Für die verschiedenen Endpunkte wurden am darauf folgenden Tag gleichgroße Sphären herausgesucht und je eine Sphäre pro Well ausplattiert. (A) Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen verfolgt und ist als Mittelwert \pm SEM der Steigung der Ausgleichsgeraden des Sphärendurchmessers über diesen Zeitraum in Prozent der 1-2 Monate alten Sphären von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (zehn Sphären pro Versuch). (B) Proliferation wurde mit einem BrdU-ELISA (Roche) gemessen. Die Proliferation ist als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen in Prozent der einen Monat alten Sphären aufgetragen (sechs Sphären pro Versuch). (C) Phasenkontrastaufnahme von proliferierenden Sphären. Repräsentative Bilder junger (1-2 Monate) und alter (8-9 Monate) Sphären zu Beginn und 13 Tage nach Start des Assays (Maßstab 250 μ m, 100-fache Vergrößerung; * = $p < 0,05$).

Die mittels der Software MetaMorph durchgeführte Analyse ergab für die 3-4 Monate alten hNPCs eine Abnahme der Durchmesserzunahme von $24,04 \pm 7,51\%$, für die 5-6 Monate alten $55,45 \pm 4,05\%$ und für die 8-9 Monate alten $77,02 \pm 3,85\%$ im Vergleich zu den 1-2 Monate alten Sphären (Abbildung 4.2 A). Die Proliferationsrate nahm folglich mit dem Alter der Sphären in Kultur signifikant ab. Diese Daten wurden durch den auf Lumineszenz basierenden BrdU-Assay bestätigt (Abbildung 4.2 B) Der BrdU Einbau nahm in den 6-7 Monate alten Sphären um $58,49 \pm 10,94\%$, in den 8-9 Monate alten Sphären um $77,10 \pm 4,70\%$ und in den 10-11 Monate alten Sphären um $89,94 \pm 3,35\%$ im Vergleich zu einem Monat alten Sphären ab (Abbildung 4.2 B). Dabei lag das

Kulturalter, bei dem sich die Proliferation um 50% verringert hat, (inhibitorisches Alter $50 = IA_{50}$) bei beiden Messmethoden zwischen 5 und 6 Monaten. (Abbildung 4.2 A&B)

Die nächsten Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage, welche molekularen Parameter mit der proliferativen Seneszenz gealterter NPC assoziiert sind. Da aus der Literatur bekannt ist, dass EGF zu einer Stimulation der Proliferation in Zellen aus dem Gyrus dentatus *in vivo* und *in vitro* beiträgt (Enwere *et al.*, 2004; Gould und Tanapat, 1997a; Reynolds und Weiss, 1992) und unsere eigenen Arbeiten zeigten, dass die Durchmesserzunahme der Neurosphären über die Zeit von der EGF Konzentration im Medium abhängig ist (Moors *et al.*, 2009), wurde im nächsten Schritt die EGF-Rezeptor (EGF-R)-Expression in proliferierenden Neurosphären untersucht. Zu diesem Zweck wurden nach ein, drei, fünf und sieben Monaten der Sphären in Kultur quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen eine Korrelation zwischen der Abnahme der Proliferation und der Expression des EGF-Rezeptors, da die Expression des Rezeptors ebenfalls signifikant mit dem Alter abnimmt (3 Monate alte $49,85 \pm 15,58\%$, 5 Monate alte $34,91 \pm 9,81\%$ und 7 Monate alte Sphären $28,10 \pm 7,83\%$ der einen Monat alten Kontrolle; Abbildung 4.3 A). Zusätzlich zu der qRT-PCR wurden Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Expression des EGF-Rezeptors in denselben hNPCs durchgeführt. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinexpression ergab ebenfalls eine signifikante Abnahme des EGF-R mit dem Alter der Sphären (3 Monate alte $57,37 \pm 14,01\%$, 5 Monate alte $37,98 \pm 7,78\%$ und 7 Monate alte hNPC $16,01 \pm 3,39\%$ von der einen Monat alten Kultur) (Abbildung 4.3 B). Dabei korrelierte die Abnahme der EGF-R Genexpression sehr gut mit der Abnahme des EGF-R Proteins (Abbildung 4.3).

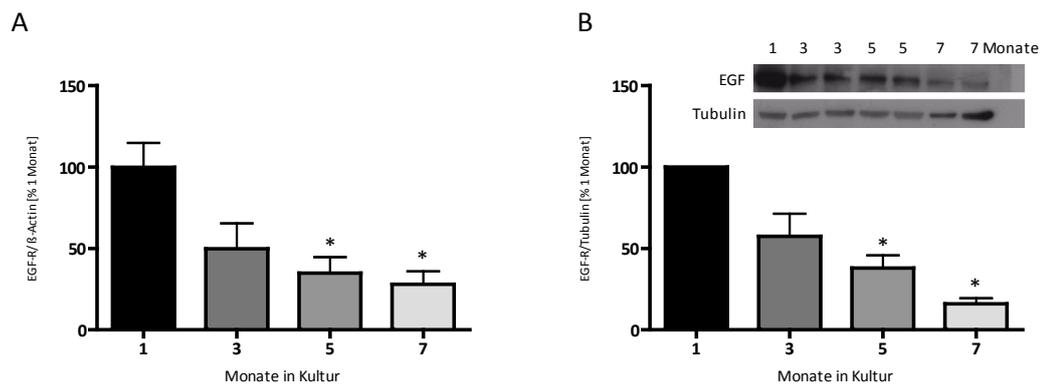


Abbildung 4.3: Die Expression des EGF-Rezeptors.

Neurosphären wurden über einen Zeitraum von 7 Monaten unter proliferierenden Bedingungen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und auf die Expression des EGF-Rezeptors hin untersucht. (A) Mittels qRT-PCR ermittelte EGFR-Expression wurde auf β -Aktin abgeglichen. (B) Das Gesamtprotein wurde mittels Western-Blot analysiert. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinexpression ist relativ zur 1 Monat alten Kultur aufgetragen, die EGFR-Expression ist auf Tubulin abgeglichen. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten und einen repräsentativen Western Blot (* = $p < 0,05$).

4.1.2 Untersuchungen zur Migration und zum Differenzierungsverhalten von *in vitro* gealterten Neurosphären

Um zu untersuchen, ob die Alterung *in vitro* die Migration von hNPCs beeinflusst, wurde ein Migrations-Assay durchgeführt. Dazu wurde die Migrationsstrecke der Neurosphären nach 1-2, 3-4, 5-6 und 8-9 Monaten in Kultur jeweils 48 Stunden nach Ausplattierung fotografiert und vermessen. Wie der Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, hat das Alter der Kultur keinen Einfluss auf das Migrationsvermögen der hNPCs, da die Migrationsstrecke für jedes Alter $850 \pm 86 \mu\text{m}$ beträgt.

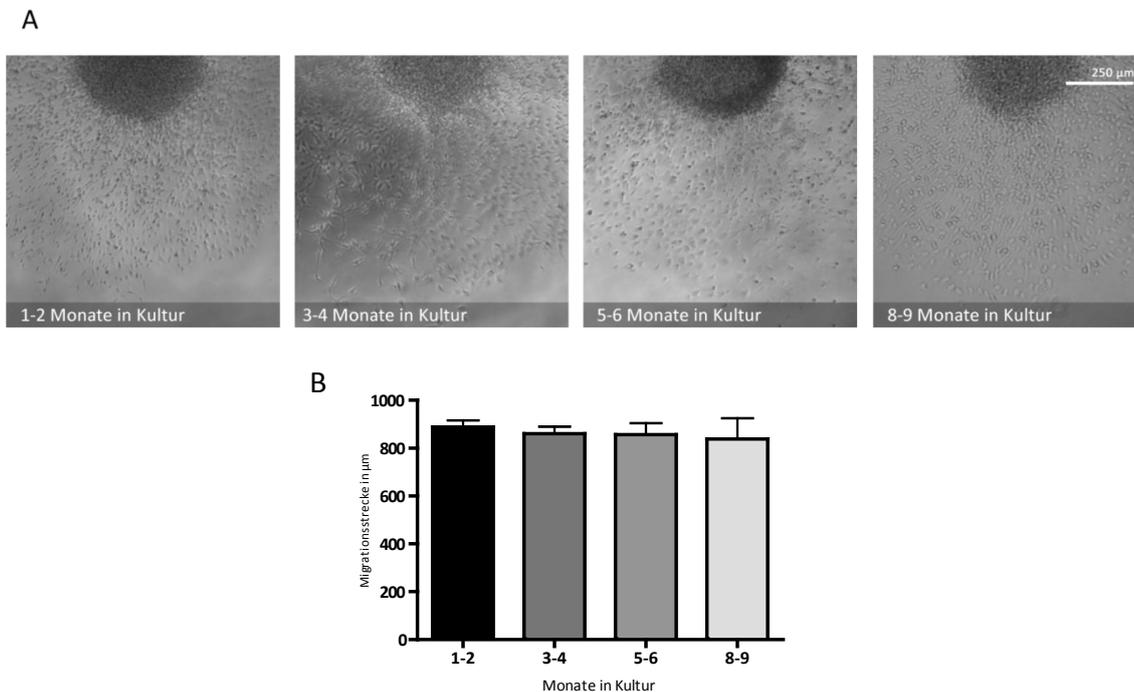


Abbildung 4.4: Das Migrationsverhalten von *in vitro* gealterten Neurosphären.

Neurosphären wurden in einen mit Poly-D-Lysin/Laminin-beschichteten 8-Kammer Objektträger ausplattiert. 48 Stunden nach Start der Migration/Differenzierung wurden sie fotografisch dokumentiert und die Migrationsstrecke mit dem Programm MetaMorph vermessen. (A) Repräsentative Bildausschnitte junger und alter differenzierender hNPCs im Phasenkontrast (Maßstab 250 µm, 100-fache Vergrößerung). (B) Dargestellt ist die Migrationsstrecke als Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Neurosphären.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass es während des Alterungsprozesses zum Verlust der Differenzierungskapazität der neuronalen Progenitorzellen kommt (Lichtenwalner *et al.*, 2001), wurde im nächsten Schritt, der Einfluss der Alterung auf die Differenzierung der *in vitro* gealterten hNPCs durch immunzytochemische Färbungen untersucht. Hierfür wurden 1-2, 3-4, 5-6 und 7-8 Monate in Kultur gealterte Neurosphären ausplattiert. Nach mehreren Tagen Differenzierung (fünf Tage für neuronale Differenzierung, 7 Tage für Oligodendrozytendifferenzierung) wurden die Sphären mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker β (III)-Tubulin und den Oligodendrozytenmarker O4 gefärbt.

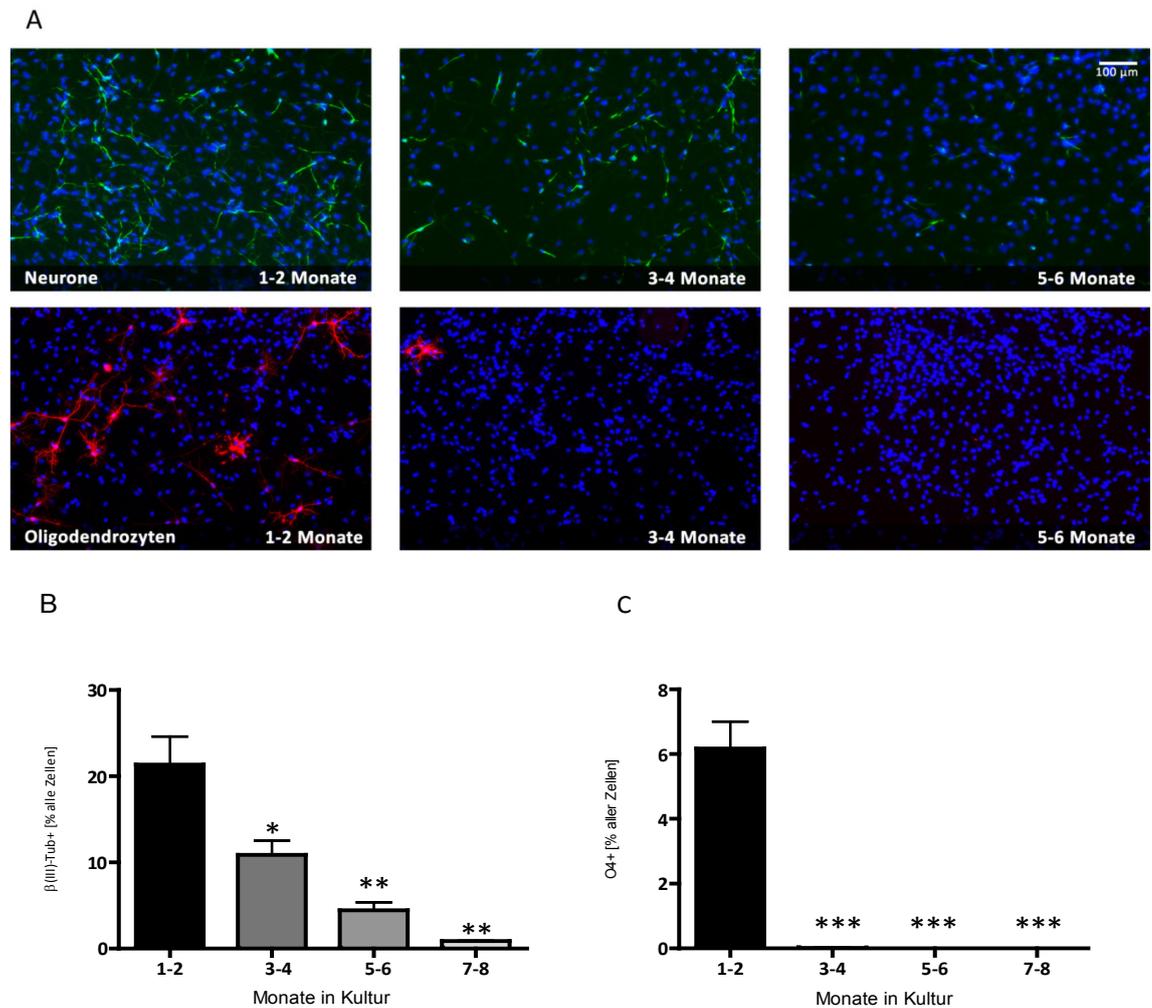


Abbildung 4.5: Die Differenzierungskapazität von *in vitro* gealterten hNPCs.

Neurosphären wurden über einen Zeitraum von mehreren Tagen unter differenzierenden Bedingungen kultiviert und anschließend immunzytochemisch gefärbt. (A) Repräsentative Bildausschnitte: $\beta(III)$ -Tubulin (Neurone, grün), O4 (Oligodendrozyten, rot) und Hoechst 33342 (Zellkerne, blau) (200-fache Vergrößerung). Quantitative Auswertung: dargestellt ist der prozentuale Anteil an $\beta(III)$ -Tubulin (B) und O4 (C) positiven Zellen zur Gesamtzellzahl von drei unabhängigen Experimenten (fünf Sphären pro Experiment; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die Differenzierungsanalysen ergaben, dass es mit zunehmendem Alter der hNPC Kultur zu einem Verlust der Differenzierungskapazität dieser Zellen kommt. So zeigen die Untersuchungen zu den $\beta(III)$ -Tubulin positiven Zellen, dass in der 1-2 Monate alten Kultur $21,35 \pm 3,25\%$ Neurone vorhanden sind, während in der 3-4 Monate alten Kultur mit $10,89 \pm 1,63\%$ bereits signifikant weniger Zellen $\beta(III)$ positiv sind. Dieser Trend setzt sich mit $4,44 \pm 0,93\%$ in der 5-6 Monate alten Kultur und $0,86 \pm 0,02\%$ Neurone in der 7-8 Monate alten Kultur mit dem Alter fort (Abbildung 4.5 B). Demzufolge kommt es zu einem signifikanten Verlust der Kapazität der NPC in Neurone zu differenzieren.

Die Differenzierung zu Oligodendrozyten (O4 positive Zellen) zeigt ein ähnliches Bild, hier sind bereits nach 3-4 Monaten in Kultur kaum noch O4 positive Zellen zu verzeichnen (Abbildung 4.5 C). Um Zelltod als einen möglichen Grund für den Verlust der Differenzierungskapazität auszuschließen, wurde ein Alamar Blue Assay zur Bestimmung der Zellviabilität der *in vitro* gealterten hNPCs durchgeführt. Dieser zeigte jedoch keine signifikante Veränderung der Viabilität der *in vitro* gealterten Sphäre (Abbildung 4.6). Diese Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass der Verlust der Differenzierung nicht auf verstärktem Zelltod der gealterten NPC beruht.

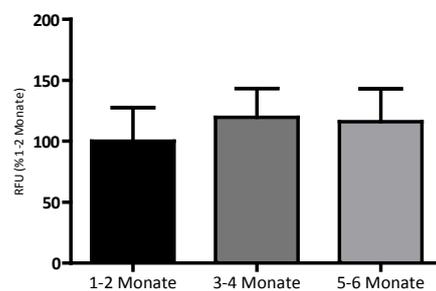


Abbildung 4.6: Viabilitätsmessung in jungen und alten hNPCs.

Neurosphären wurden in einer mit Poly-D-Lysin/Laminin-beschichteten Multiwell-Platte ausplattiert. Fünf Tage nach Beginn der Migration/Differenzierung wurde die Zellviabilität mittels CellTiter Blue Assay (Promega) gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwerte \pm SEM prozentual zu der 1-2 Monate alten Kultur.

4.1.3 Untersuchungen zur Expression von spezifischen Alterungsmarkern

Um auszuschließen, dass es sich bei der Reduktion der Proliferation und Differenzierungskapazität um Kulturartefakte und nicht um echte Alterseffekte handelt, wurden die etablierten Alterungsmarker $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ und β -Gal in den *in vitro* gealterten hNPCs untersucht.

$p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen und somit ein Zellzyklus-Regulator, der zum Arrest des Zellzyklus beiträgt (Sherr und Roberts, 1995). Überexpression von $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ führt in verschiedenen Zelllinien zur proliferativen Seneszenz, beziehungsweise kann durch Inaktivierung des $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ der Zustand der Seneszenz verhindert werden (Vogt *et al.*, 1998; Noda *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997). Ob $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ auch in alternden NPC überrepräsentiert wird, wurde durch

Genexpressionsanalysen von $p21^{\text{Waf1/Cip1/Sdi1}}$ in ein, drei, fünf und sieben Monaten in Kultur gealterten NPC untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es mit zunehmendem Alter der Kultur basal zu einer vermehrten Expression der $p21^{\text{Waf1/Cip1/Sdi1}}$ mRNA Expression kommt, die in den fünf und sieben Monate alten Sphären Signifikanz erreicht (drei Monate alte $180,52 \pm 53,65\%$, fünf Monate alte $227,56 \pm 35,56\%$ und sieben Monate alte Sphären $257,31 \pm 33,42\%$ von der einen Monat alten Kultur; Abbildung 4.7)

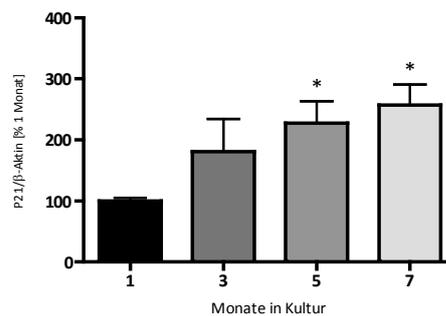


Abbildung 4.7: Die Expression von $P21^{\text{Waf1/Cip1/Sdi1}}$.

Neurosphären wurden über einen Zeitraum von bis zu sieben Monaten unter proliferierenden Bedingungen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und auf die Genexpression von $P21^{\text{Waf1/Cip1/Sdi1}}$ mittels qRT-PCR untersucht. Die ermittelten Werte wurden auf β -Aktin abgeglichen und sind als Prozent 1 Monate alter hNPC aufgetragen. Aufgetragen sind die Daten von drei unabhängigen Versuchen \pm SEM (* = $p < 0,05$).

Ein weiterer etablierter Seneszenzmarker ist die vermehrte β -Galaktosidase-Aktivität, die über X-Gal-Spaltung durch die β -Galaktosidase (β -Gal), welche zu einer Blaufärbung führt, nachgewiesen wird (Dimri *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2008). Diese Vermehrung der β -Gal-Aktivität in gealterten Zellen beruht auf einer Altersabhängigen Zunahme der Lysosomen, in denen die β -Galaktosidase lokalisiert ist (Kurz *et al.*, 2000). Wie Abbildung 4.8 zeigt, findet sich eine vermehrte β -Gal-Aktivität in den in Kultur gealterten hNPC (5-6 Monate in Kultur) im Vergleich zu den jungen hNPCs (1-2 Monate in Kultur). Sowohl die vermehrte $p21^{\text{Waf1/Cip1/Sdi1}}$ Expression als auch die gesteigerte β -Gal-Aktivität lassen somit auf eine Alterung der Zellen in Kultur schließen.

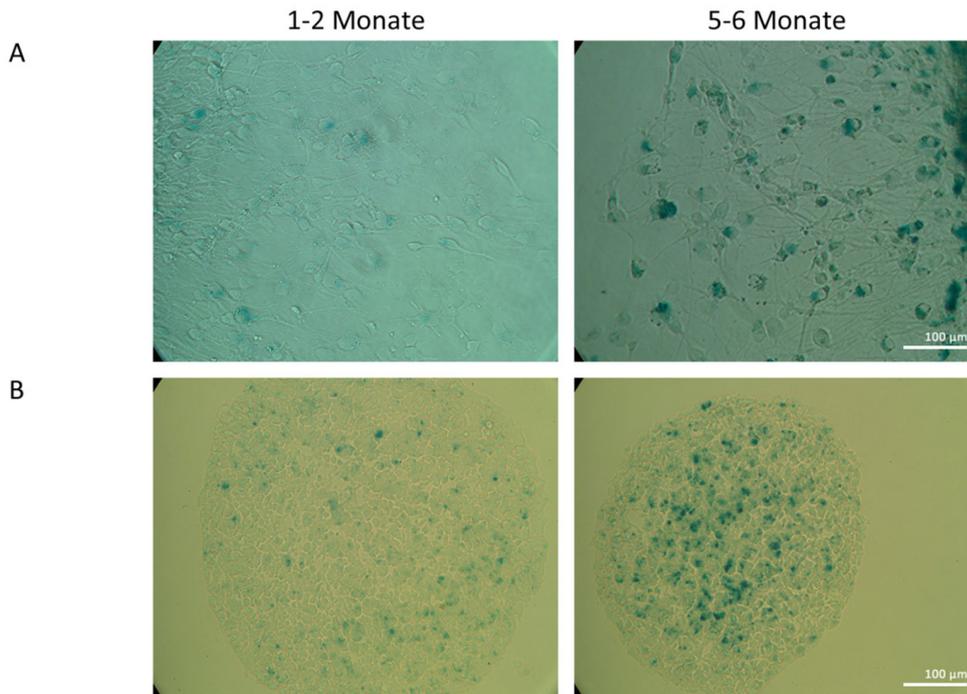


Abbildung 4.8: Die Färbung der β -Galaktosidase in jungen und alten hNPCs.

Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität als Alterungsmarker wurden 1-2 und 5-6 Monate alte Neurosphären nach 72 Stunden Differenzierung mit einer Formaldehyd-Lösung fixiert, anschließend mit einer XGal-Substratlösung überschichtet und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. (A) Phasenkontrastaufnahme der Migrationsfläche (B) Phasenkontrastaufnahme der Sphäre. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte (100-fache Vergrößerung).

Da in der Literatur beschrieben wurde, dass eine Lang-Zeit-Kultivierung von Maus-Sphären zu einer chromosomalen Instabilität führt (Vukicevic *et al.*, 2010), wurden im nächsten Schritt zytogenetische Untersuchungen an den *in vitro* gealterten Sphären durchgeführt. Es konnte bei den 2, 4, 6 und 8 Monate alten Sphären ein numerischer und strukturell unauffälliger männlicher Karyotyp bestimmt werden.

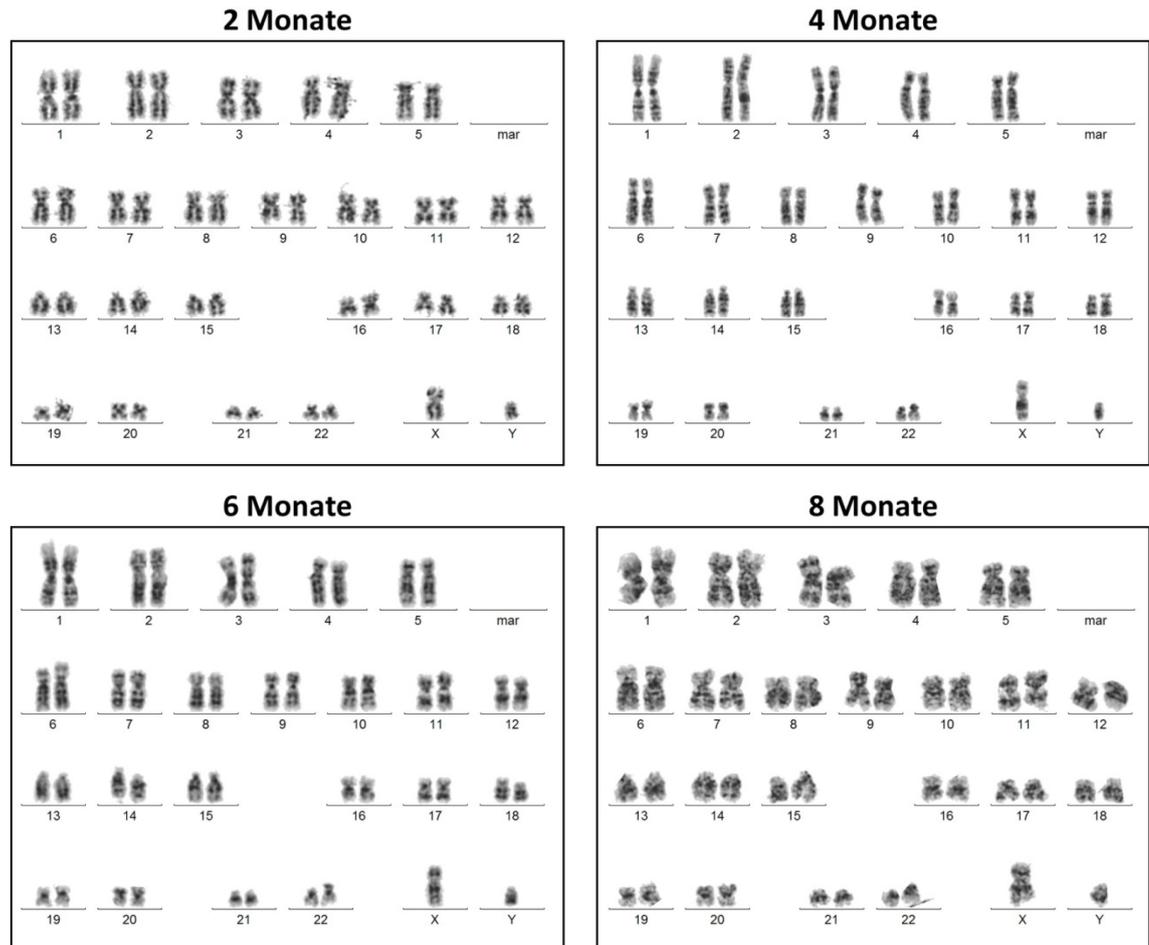


Abbildung 4.9: Karyotypisierung von *in vitro* gealterten hNPCs.

Repräsentatives Karyogramm von mindestens 8 Metaphaseplatten von 2, 4, 6 und 8 Monate alten Neurosphären.

4.2 Das antioxidative Potential von hNPCs

Die schon 1956 veröffentlichte ‚Free Radical Theory of Aging‘ besagt, dass oxidativer Stress ursächlich an zellulären Alterungsprozessen beteiligt ist (Harman, 1956; Harman, 2006; Lee *et al.*, 2012). Ob auch bei der NPC Alterung oxidative Prozesse eine ursächliche Rolle spielen wurde hier untersucht, indem die Expression sowie die Induzierbarkeit von CAT, SOD und GPx in alternden NPC analysiert wurde. Diese Untersuchungen beruhten auf den Beobachtungen, dass kultivierte Ratten-Astrozyten mit dem Alter zunehmend empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren (Papadopoulos *et al.*, 1998) und es mit dem Alter zu einem Verlust der für die antioxidative Abwehr

verantwortlichen Enzyme wie der CAT, SOD und GPx in Nagern kommt (Liu und Mori, 1999; Serrano und Klann, 2004)

4.2.1 Effekte von H₂O₂ auf hNPCs und SH-SY5Y-Zellen

Um die antioxidative Kapazität von NPCs zu überprüfen, wurden die Zellen mit H₂O₂ belastet und nach 24 Stunden der Zelltod über die Freisetzung der LDH ins Medium gemessen. Da eine große Menge von Studien die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Toxizitätstestungen verwendet, wurden diese Zellen zum Vergleich in die Untersuchungen mit einbezogen. Die LDH-Konzentrationen im Überstand zeigten, dass sowohl H₂O₂ als auch Staurosporin, welches als Zelltodkontrolle mitgeführt wurde, konzentrationsabhängig den Zelltod herbeiführen (Abbildung 4.10). Allerdings reagieren die SH-SY5Y-Zellen wesentlich sensitiver auf die Behandlung mit H₂O₂ (0,1 mM H₂O₂: 58 % LDH-Freisetzung) und Staurosporin (0,05 µM Staurosporin: 69 % LDH-Freisetzung) als die Neurosphären (0,1 mM H₂O₂: 6 % LDH Freisetzung; 0,05 µM Staurosporin: 44 %; Abbildung 4.10 B). Diese Daten konnten durch mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen bestätigt werden. Während bereits 0,1 mM H₂O₂ zu morphologischen Veränderungen, wie etwa abgerundeten und angeschwollenen Zellen der SH-SY5Y-Zellen führen, treten bei den hNPCs solche Veränderungen erst bei 1 mM H₂O₂ auf (Abbildung 4.10 A).

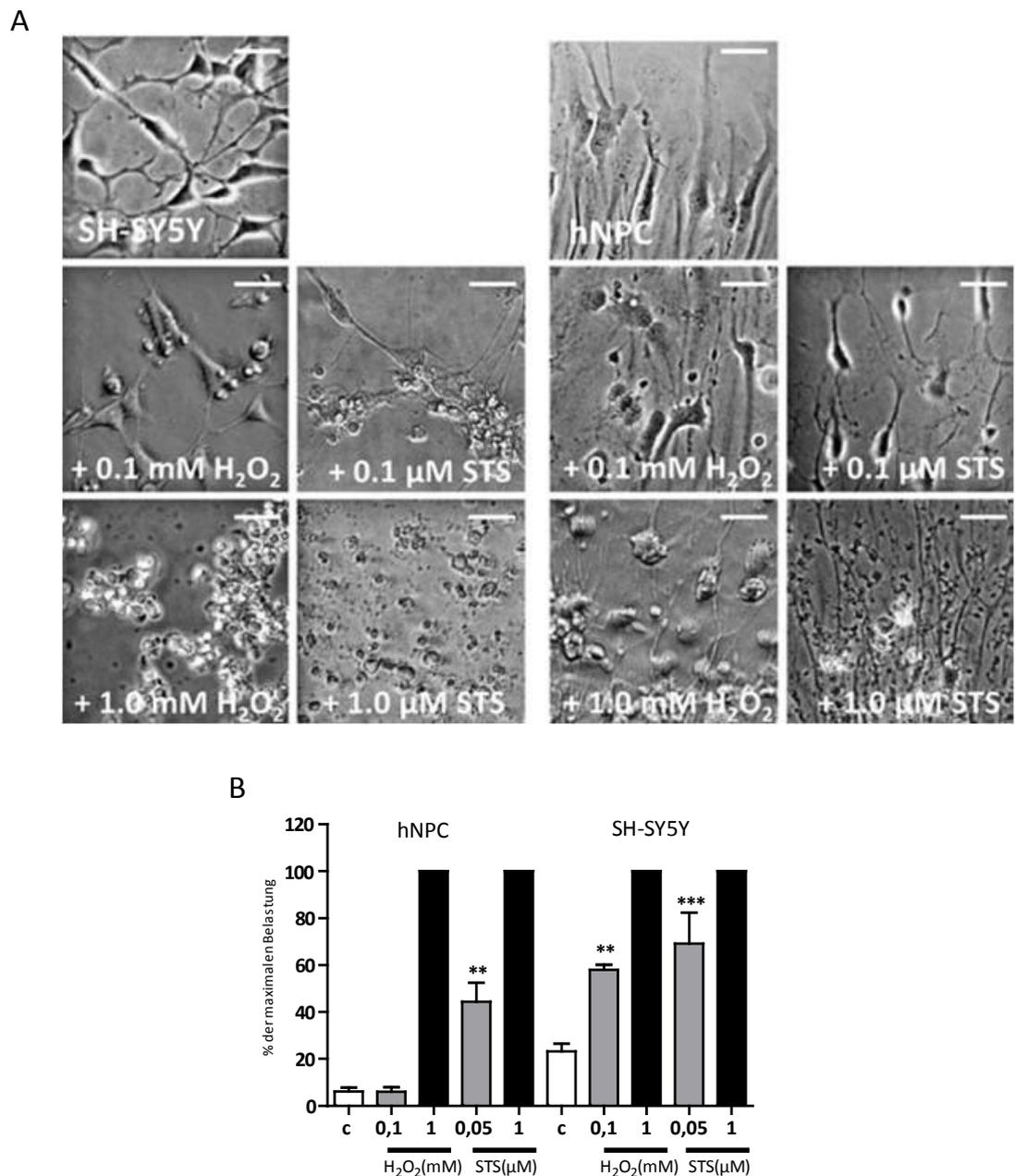


Abbildung 4.10: H₂O₂ beeinflusst die Zellvitalität von hNPCs und SH-SY5Y-Zellen.

Differenzierende Neurosphären und SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 mM und 0,1 mM H₂O₂ bzw. Staurosporin (STS) belastet. Anschließend wurde die Zytotoxizität mittels des CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay gemessen. Dargestellt sind (A) repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen (400fache Vergrößerung, der Größenbalken repräsentiert 20 μm) und (B) die Zytotoxizität aufgetragen in % der maximalen Belastung. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Versuchen; c = Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob H₂O₂ einen nekrotischen oder apoptotischen Zelltod auslöst, wurde als nächstes ein TUNEL-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1 mM H₂O₂ sowie für zwölf Stunden mit 1 μM Staurosporin belastet. Wie

die Mikroskopaufnahmen zeigen, führen sowohl die H₂O₂- als auch die Staurosporin-Behandlungen in beiden Zelltypen (hNPC und SH-SY5Y) zu TUNEL-positiven Zellen, welches einem apoptotischen Zelltod entspricht (Abbildung 4.11 A+B). Desweiteren zeigen die durchgeführten Kontrollen, dass es sich bei den TUNEL-positiven Zellen nicht um unspezifische Bindungen handelt, da in der Negativkontrolle (Färbung ohne TdT) sowie in den unbehandelten Proben keine Färbung vorhanden ist.

Desweiteren wurde untersucht, ob die eingeleitete Apoptose Caspase-abhängig oder -unabhängig ist. Wie Abbildung 4.11 C erkennen lässt, induziert Staurosporin in den hNPCs die Effektor-Caspase-3/7-Aktivität signifikant auf $431,5 \pm 65,5\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigen die mit H₂O₂ belasteten Neurosphären keine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität. Daraus folgert, dass H₂O₂ in hNPCs Caspase-unabhängig Apoptose induziert. Ähnlich verhält es sich auch in SH-SY5Y-Zellen. Hier wird die Caspase-3/7-Aktivität durch Staurosporin (1 µM) nach neun Stunden um 170 %, nach zwölf Stunden um 180 % und nach 24 Stunden noch um 80 % gegenüber der Kontrolle induziert. Desweiteren reduziert 1 mM H₂O₂ die Caspase-3/7-Aktivität nach zwölf Stunden um 70 % im Verhältnis zur Kontrolle. Eine Exposition gegenüber 0,1 mM H₂O₂ zeigte keine signifikante Veränderung in der Caspase-Aktivität (Abbildung 4.11 D). Demzufolge wird auch in SH-SY5Y-Zellen durch H₂O₂ eine Caspase-unabhängige Apoptose induziert (Teile der Ergebnisse wurden in Moors *et al.*, 2009 publiziert).

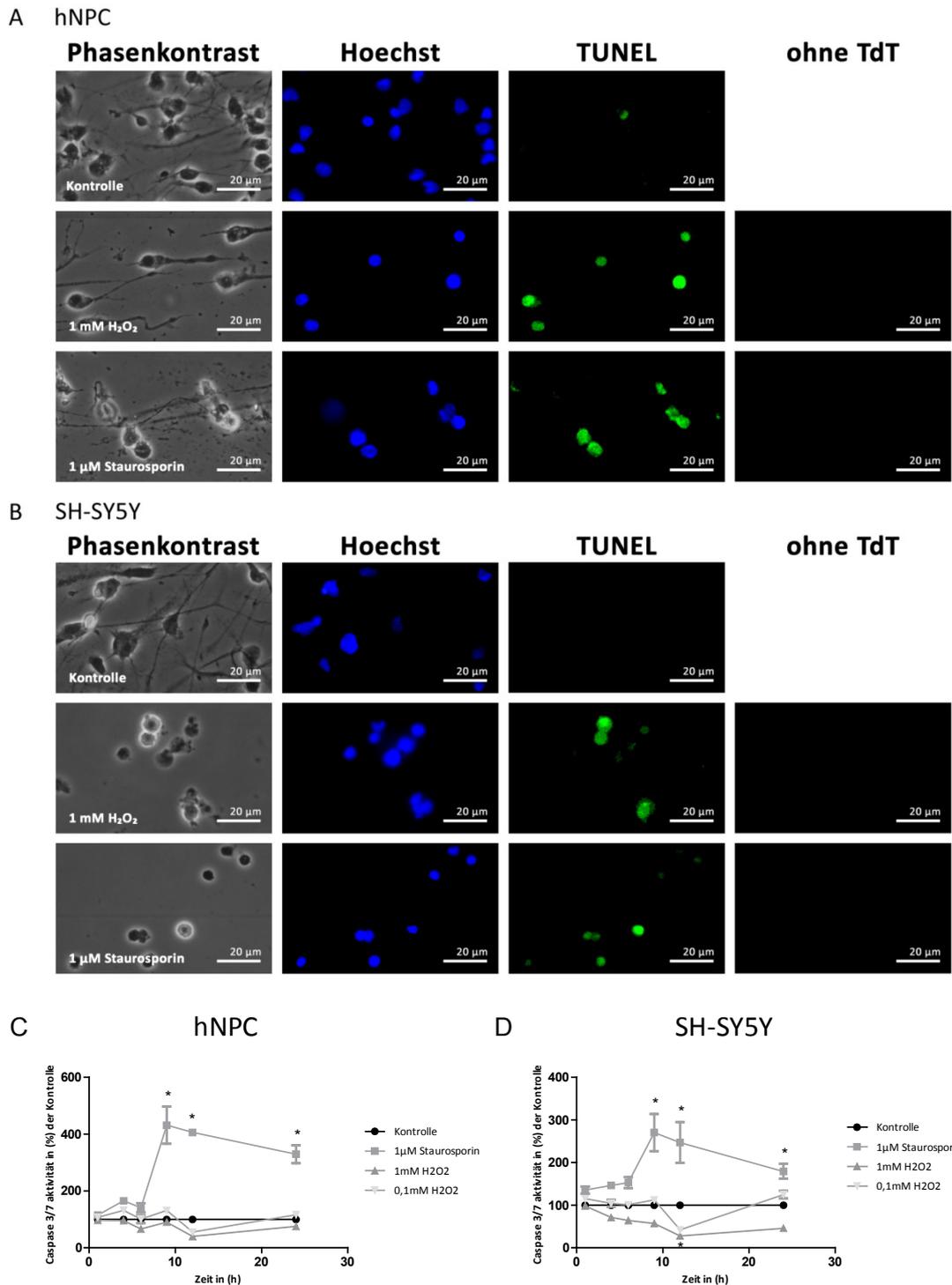


Abbildung 4.11: H₂O₂-induziert Caspase-unabhängige Apoptose.

(A) Differenzierende hNPC und (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1 mM H₂O₂ oder 1 μM Staurosporin belastet. Nach zwölfstündiger Staurosporin- und 24-stündiger H₂O₂-Belastung wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und mittels TUNEL-Assay-Reagenz sowie Hoechst gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte (Maßstab 20 μm, 400-fache Vergrößerung). (C+D) Die (C) hNPC und (D) SH-SY5Y-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen mit 0,1 mM und 1 mM H₂O₂ sowie 1 μM Staurosporin belastet. Eine Caspase-3/7-Aktivitätsmessung erfolgte jeweils zu den Zeitpunkten 1, 4, 9, 12 und 24 Stunden nach Belastung. Die auf die Kontrolle normierte Caspase-3/7-Aktivität ist als Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Belastungen gezeigt (* = p < 0,05).

4.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Genexpression von CAT, GPx und SOD

Aufgrund der unterschiedlichen Sensibilität der untersuchten Zellen gegenüber oxidativem Stress wurde im nächsten Schritt die Genexpression einiger an antioxidativen Schutzmechanismen beteiligten Gene in Neurosphären und SH-SY5Y-Zellen untersucht. Diese Analysen wurden in differenzierten hNPC und SH-SY5Y durchgeführt. Die Differenzierung der hNPC wurden unter 4.1. bereits ausreichend beschrieben. Die Differenzierungskontrolle der mit Retinsäure differenzierten SH-SY5Y-Zellen (Pahlman *et al.*, 1984; Sidell, 1982) geschah mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot Analysen. Als Marker für neuronale Differenzierung diente β (III)-Tubulin und als Marker für undifferenzierte neurale Vorläuferzellen wurde Nestin verwendet. Als Kontrolle dienten proliferierende SH-SY5Y-Zellen, welche ohne Retinsäure kultiviert wurden. 7 Tage nach Differenzierungsbeginn fand sich eine deutliche Zunahme der β (III)-Tubulin Expression und eine ebenso klare Abnahme des Nestin Proteins. Beide Proteine deuten darauf hin, dass erst nach 7 Tage Differenzierung im Beisein von Retinsäure eine ausreichende Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen erreicht ist (Abbildung 4.12), sodass für alle weiteren Experimente mit SH-SY5Y-Zellen dieser Zeitpunkt gewählt wurde.

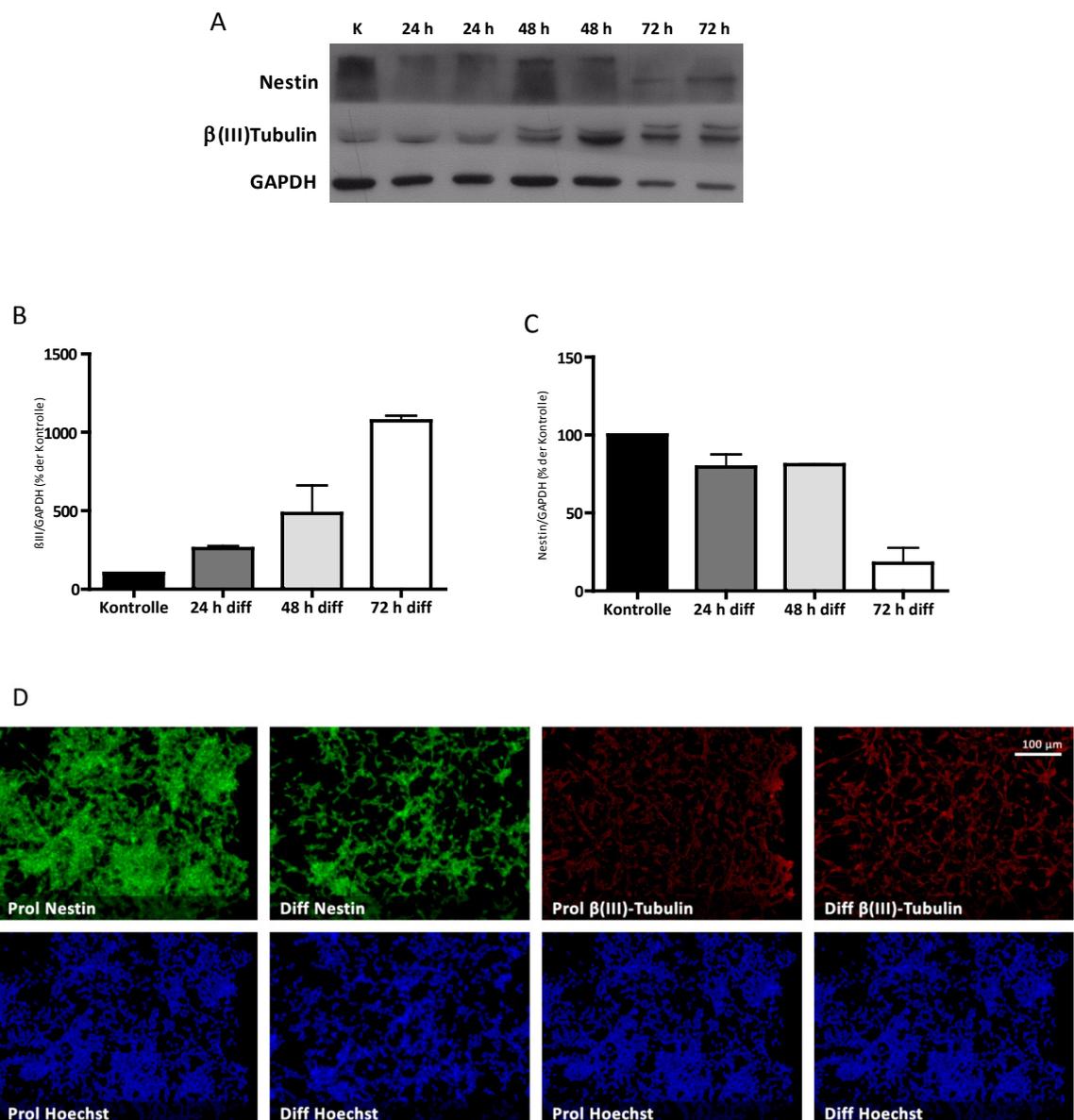


Abbildung 4.12: Die Kontrolle des Differenzierungsstatus von SH-SY5Y-Zellen.

SH-SY5Y-Zellen wurden über einen Zeitraum von 5, 6 und 7 Tagen unter differenzierenden Bedingungen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Differenzierungsstatus der Zellen mittels Immunzytochemie und Western-Blot Analysen der Proteine β (III)-Tubulin und Nestin kontrolliert. Als Kontrolle dienten undifferenzierte Zellen. (A) Repräsentativer Western-Blot von β (III)-Tubulin und Nestin; (B+C) densitometrische Quantifizierung von A relativ zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Min/Max in Prozent der Kontrolle von zwei unabhängigen Experimenten. (D) Repräsentative immunzytochemische Aufnahmen nach 72 Stunden (Maßstab 100 μ m; 100-fache Vergrößerung), β (III)-Tubulin (rot), Nestin (grün) und Hoechst 33342 (Zellkerne, blau).

Nun konnte in den differenzierenden Zellen untersucht werden, inwieweit sich die basale Expression der an antioxidativen Schutzmechanismen beteiligten Gene SOD, GPx und CAT der hNPCs von denen der SH-SY5Y-Zellen unterscheidet. Dafür wurde eine qrtRT-PCR zunächst mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Wie der Abbildung 4.13

zu entnehmen ist, haben SH-SY5Y-Zellen in allen untersuchten Genen eine wesentlich geringere Expression als die hNPCs, das Verhältnis der Enzyme zueinander ist jedoch in hNPCs und SH-SY5Y-Zellen sehr ähnlich: Am höchsten ist GPx exprimiert (hNPC: 3990 Kopien/10000 Kopien β -Aktin, SH-SY5Y: 560 Kopien/10000 Kopien β -Aktin), gefolgt von CAT (hNPC: 1842 Kopien/10000 Kopien β -Aktin, SH-SY5Y: 390 Kopien/10000 Kopien β -Aktin) und die geringste Expression zeigte die SOD (hNPC: 1013 Kopien/10000 Kopien β -Aktin, SH-SY5Y: 49 Kopien/10000 Kopien β -Aktin).

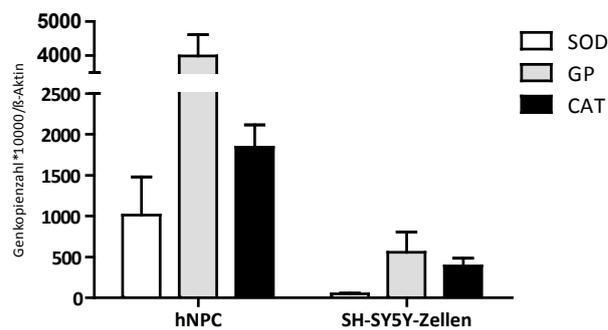


Abbildung 4.13: Die basale Genexpression der antioxidativen Enzyme in hNPCs und SH-SY5Y-Zellen.

hNPCs sowie SH-SY5Y-Zellen wurden ausplattiert und nach 48 Stunden ohne Belastung geerntet. Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde mittels qRT-PCR ermittelt und auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Um die Adaptationsfähigkeit auf oxidativen Stress der Zellsysteme vergleichend zu untersuchen, wurden qrtRT-PCRs von Zellen durchgeführt, welche für acht Stunden mit 0,1 mM H_2O_2 belastet wurden. Da in den Vorversuchen die Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen bei dieser Konzentration bereits beeinträchtigt war (Abbildung 4.10 B), wurden diese ebenfalls noch mit einer niedrigeren H_2O_2 -Konzentration für denselben Zeitraum belastet. Wie in Abbildung 4.14 A zu erkennen ist, führte eine achtstündige Behandlung der differenzierenden Neurosphären mit 0,1 mM H_2O_2 zu einer Induktion der Genexpression der an der antioxidativen Abwehr beteiligten Gene. Die Expression der SOD erhöht sich dabei signifikant auf $285,06 \pm 45,54\%$, die der GPx auf $339,94 \pm 40,54\%$ und die der CAT auf $296,86 \pm 37,98\%$ der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit H_2O_2 führte hingegen nicht zu einer Induktion der untersuchten Gene (Abbildung 4.14 B). Diese Daten liefern somit eine Erklärung für die höhere Empfindlichkeit von SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu hNPC gegenüber oxida-

tivem Stress-induzierten Zelltod: die an der Detoxifizierung von ROS beteiligten Genprodukte sind bereits basal in SH-SY5Y-Zellen niedriger exprimiert als in hNPC und lassen sich durch H_2O_2 auch nur in hNPC, nicht aber in SH-SY5Y-Zellen ca. dreifach aufregulieren.

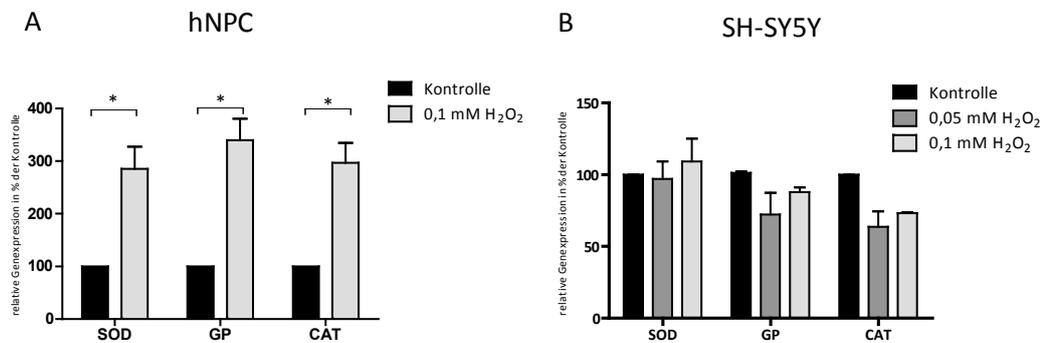


Abbildung 4.14: Der Einfluss von H_2O_2 auf die Genexpression von SOD, GPx und CAT.

(A) Neurosphären wurden während der Differenzierung mit 0,1 mM H_2O_2 und (B) differenzierte SH-SY5Y-Zellen mit 0,05 und 0,1 mM H_2O_2 belastet. Nach einer 8-stündigen Belastung wurden die Zellen geerntet und mittels qRT-PCR die Expression von CAT, GPx und SOD ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM abgeglichen auf das Haushaltsgen β -Aktin und bezogen auf die jeweilige Kontrolle in Prozent (* = $p < 0,05$).

4.2.3 Antwort auf oxidativen Stress in jungen versus alten Neurosphären

Die vergleichenden Ergebnisse zur antioxidativen Abwehr sowie zur Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress in hNPC versus SH-SY5Y-Zellen zeigen, dass eine niedrige Expression sowie fehlende Regulation der antioxidativen Genprodukte von SOD, GPx und CAT die Empfindlichkeit gegenüber ROS-induziertem Zelltod erhöht. Daher war es eine Hypothese, dass auch in alternden hNPC *in vitro* möglicherweise eine Dysregulation dieser Abwehrmaßnahmen vorliegt. Um diese Hypothese zu testen, wurden zunächst junge (1-2 Monate alte), ältere (3-4 Monate alte) und alte (5-6 Monate alte) hNPC mit den oxidativen Stressoren Tetrachlorhydrochinon (TCHQ) und H_2O_2 belastet (Murphy *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2000). Bei den hohen Konzentrationen H_2O_2 (1 mM) und TCHQ (0,1 mM) gab es nach der 16-stündigen Belastung keine Unterschiede in der Viabilität zwischen den jungen und alten Sphären. Bei den physiologisch relevanteren Konzentrationen im mittleren bis niedrigen Konzentrationsbereich sind jedoch signifikante, altersabhängige Unterschiede in der Viabilität im Vergleich zur unbe-

handelten Kontrolle zu verzeichnen (0,1 mM H₂O₂: 2 Monate 71,20 ± 2,64 %, 5 Monate 53,15 ± 2,46 % und 7 Monate 44,51 ± 1,54 %; 0,01mM TCHQ: 2 Monate 66,79 ± 2,70 %, 5 Monate 41,37 ± 0,99 % und 7 Monate 35,99 ± 4,20 % der Kontrolle; Abbildung 4.15). Diese altersabhängigen Unterschiede in der Viabilität nach oxidativem Stress werden auch in den EC₅₀-Werten offensichtlich. Für H₂O₂ liegt der EC₅₀-Wert für die jungen, 2 Monate kultivierten hNPC bei 0,150 mM und für die alten, 7 Monate kultivierten Zellen bei 0,081 mM, was ungefähr einer Verdopplung des EC₅₀ entspricht (Tabelle 4.2). Für TCHQ liegt der EC₅₀-Wert für die jungen, 2 Monate kultivierten hNPC bei 0,015 und für die alten, 7 Monate kultivierten Zellen bei 0,0067 mM, was ebenfalls einer etwaigen Verdopplung des EC₅₀ entspricht (Tabelle 4.1).

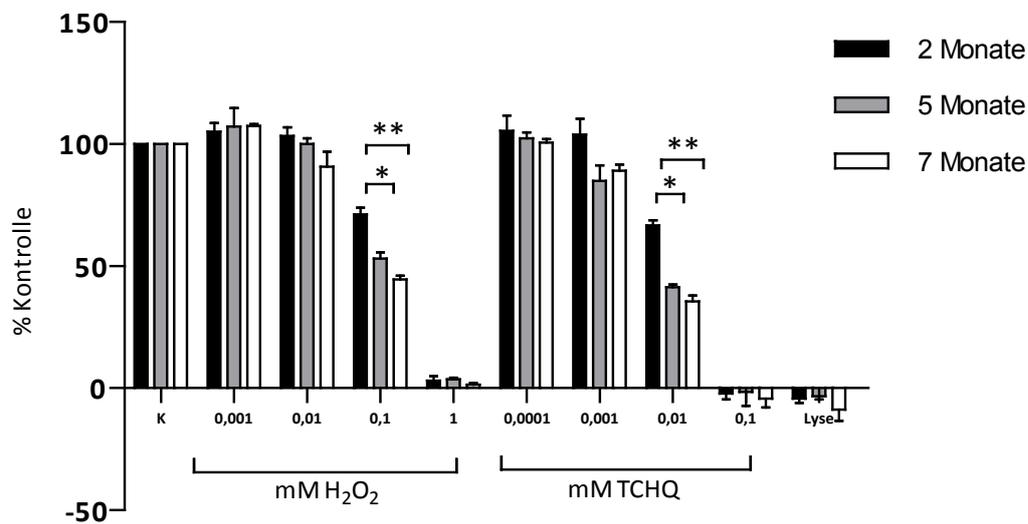


Abbildung 4.15: Alte hNPCs sind sensitiver gegenüber oxidativem Stress als junge.

Verschiedene Alter der Neurosphären (2, 5 und 7 Monate in Kultur) wurden während der Differenzierung mit den angegebenen Konzentrationen von H₂O₂ und TCHQ belastet (neue Lösungen). Die Zellviabilität wurde nach 16-stündiger Belastung mit dem CellTiter-Blue-Assay (Promega) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der jeweiligen Kontrolle (* = p < 0,05; ** = p < 0,01).

Tabelle 4.1: EC₅₀-Werte für TCHQ

Angegeben sind die EC₅₀- und die dazugehörigen R²-Werte von 2, 5 und 7 Monate alten hNPCs.

	2 Monate	5 Monate	7 Monate
EC ₅₀	0,0150 mM	0,0071 mM	0,0067 mM
R ²	0,9758	0,9650	0,9776

Tabelle 4.2: EC₅₀-Werte für H₂O₂

Angegeben sind die EC₅₀- und die dazugehörigen R²-Werte von 2, 5 und 7 Monate alten hNPCs.

	2 Monate	5 Monate	7 Monate
EC ₅₀	0,1503 mM	0,1247 mM	0,08181 mM
R ²	0,9788	0,9757	0,9813

Da die vorhandenen TCHQ- und H₂O₂-Lösungen im Laufe dieser Dissertation erschöpft waren, mussten beide Substanzen neu erworben werden. Während Vorversuchen zu diesen oben gezeigten EC₅₀-Wert Bestimmungen fiel auf, dass die neuen Substanzen im Vergleich zu den zuvor verwendeten Substanzen eine höhere Zytotoxizität aufwiesen. Nachdem durch eine LDH-Analyse bestimmt werden konnte, dass die neuen Substanzen um das Hundertfache toxischer waren als die alten Chemikalien (Abbildung 4.16), wurden die verwendeten Konzentrationen für die mit den neuen Substanzen durchgeführten Versuche entsprechend nach unten korrigiert.

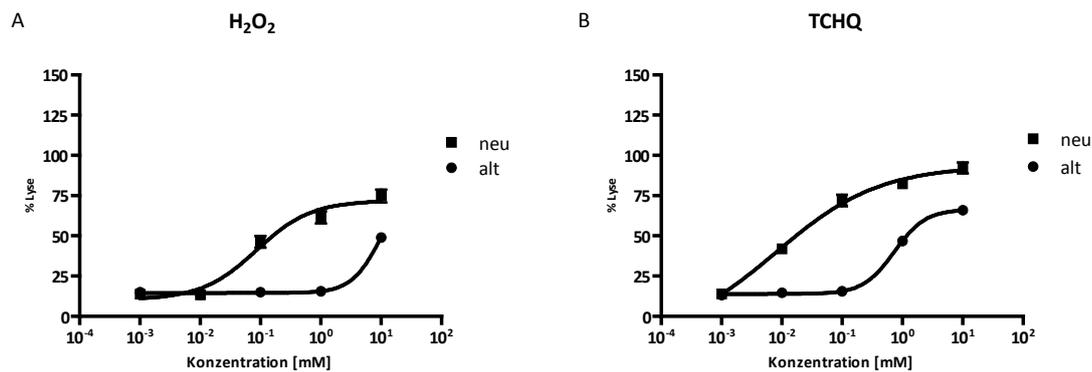


Abbildung 4.16: Die Testung der Zytotoxizität von neuer *versus* alter H₂O₂- und TCHQ-Stocklösung.

24 Stunden nach dem Ausplattieren wurden NCTC-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen für weiter 24 Stunden mit (A) H₂O₂ und (B) TCHQ belastete. Die LDH-Aktivität wurde mit Hilfe des Cytotox One Assays (Promega) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von einer Vierfachbestimmung in Prozent der Zellyse-Kontrolle (Triton X).

Nachdem nun die gealterten Zellen eine geringere Toleranz gegenüber oxidativem Stress haben als junge hNPC (Abbildung 4.15, Tabelle 4.1, Tabelle 4.2) stellte sich als nächstes die Frage nach den zu Grunde liegenden Mechanismen. Daher wurden die basalen sowie die durch H₂O₂ und TCHQ induzierbaren Expressionen der SOD, CAT und GPx mittels qRT-PCR von hNPC unterschiedlichen Alters (1-2 Monate, 3-4 Monate und 5-6 Monate in Kultur) gemessen. Wie der Abbildung 4.17 zu entnehmen ist, liegen die basalen Kopienzahlen der jungen hNPC für CAT und SOD1 zwischen 1000 und 2000 Genkopien/10.000 Kopien β-Aktin, während von der GPx ca. 4000 Genkopien/10.000 Kopien β-Aktin vorliegen. In den 5-6 Monate in Kultur gealterten Sphären ist die Kopienzahl der CAT um die Hälfte und die der SOD und GPx um jeweils ein Drittel und ein Viertel reduziert. Das bedeutet, dass auch gealterte hNPC noch eine substantielle Transkription dieser Genprodukte besitzen und erklärt, dass auch gealterte Zellen noch in einem gewissen Umfang ROS detoxifizieren können (0,01 mM H₂O₂ und 0,001 mM TCHQ; Abbildung 4.15). Allerdings induzieren H₂O₂ und TCHQ die Genexpression von CAT, SOD und GPx nur in jungen Neurosphären um das 2,85- und 4,46-fache (SOD1), 2,96- und 4,57- fache (CAT) und 3,39- und 4,13-fache (GP), während in Kultur gealterte Neurosphären diese Enzyme nach H₂O₂- und TCHQ-Behandlung nicht aufregulieren (Abbildung 4.17). Diese Beobachtung erklärt die fehlende Adaptation der gealterten hNPC gegenüber Konzentrationen von H₂O₂ und TCHQ (0,1 und 0,01 mM), die im EC₅₀-Bereich der jungen Sphären liegen.

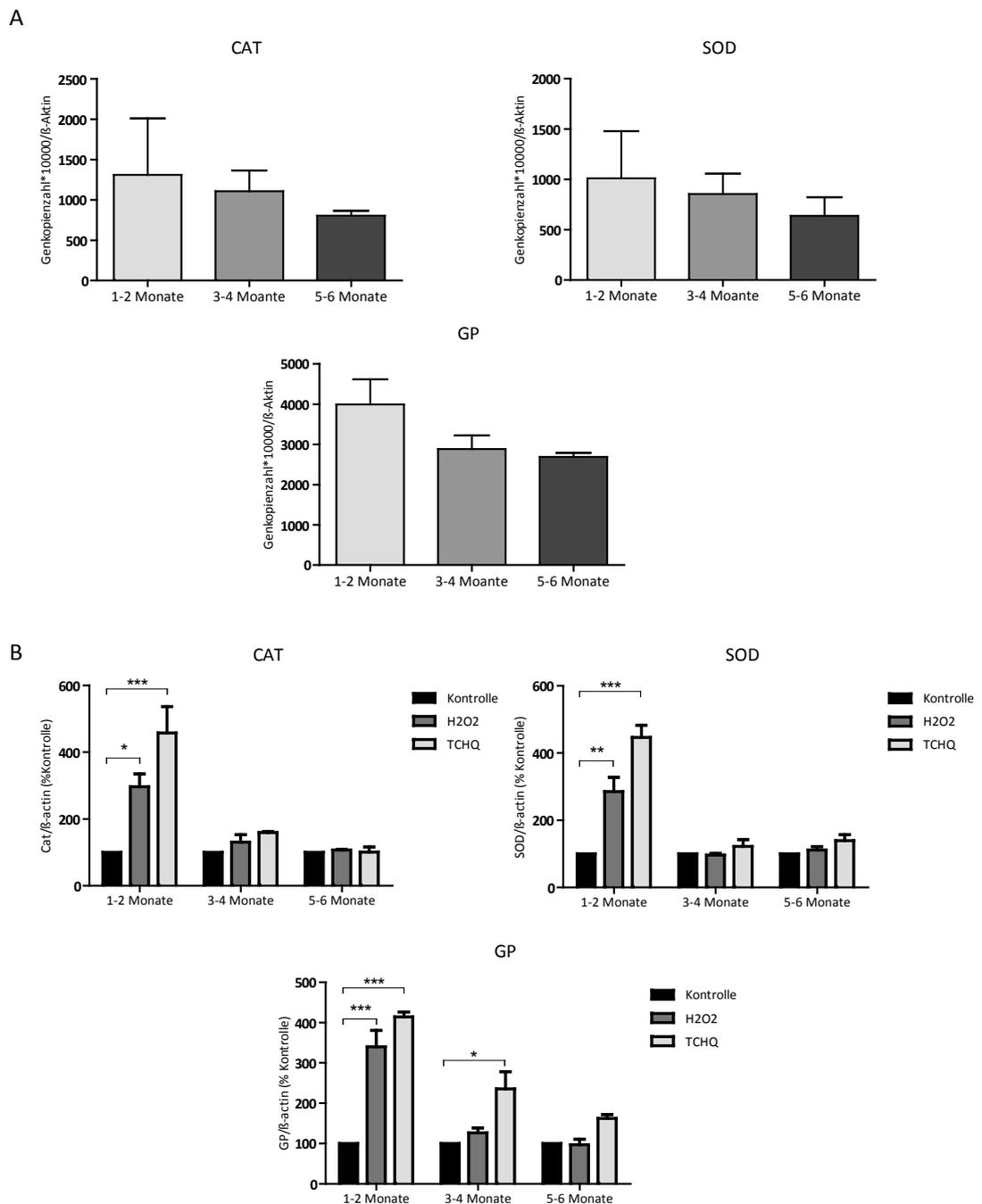


Abbildung 4.17 Die Genexpression von antioxidativ wirkenden Enzymen in verschieden alten hNPC-Kulturen.

(A) Verschieden Alte Neurosphären wurden ausplattiert und nach fünf Tagen ohne Belastung geerntet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von CAT, SOD und GP ermittelt und auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM (B) Neurosphären unterschiedlichen Alters (1-2, 3-4 und 5-6 Monaten) wurden während der Differenzierung (5 Tage) für 8 Std. mit 0,01 mM H_2O_2 bzw. 0,001 mM TCHQ belastet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von CAT, SOD und GPx, ermittelt und auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der jeweiligen Kontrolle (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Durchführung der Experimente mit den alten Lösungen.

Wenn die antioxidative Abwehr in den gealterten hNPC beeinträchtigt ist, müssten auch höhere ROS Konzentrationen in den Zellen zu messen sein. Daher wurden die intrazellulären ROS-Konzentrationen in den verschiedenen alten Sphären mittels DCF-Assay analysiert. In den in Kultur gealterten Sphären (4-5 und 6-7 Monate) fand sich eine signifikante Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration nach TCHQ-Belastung im Vergleich zu den jungen hNPCs. So wird in den 1-2 Monate alten Sphären die intrazelluläre ROS-Konzentration durch 0,001 mM TCHQ um das 2,24-fache im Vergleich zum Basalwert der unbehandelten Kontrolle induziert. In 4-5 Monate alten Sphären fand sich das 2,83-fache und in 6-7 Monate alten Sphären das 5,89-fache der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4.18). Diese Messdaten belegen die physiologische Relevanz der fehlenden Aufregulation der antioxidativen Abwehr in den gealterten hNPCs.

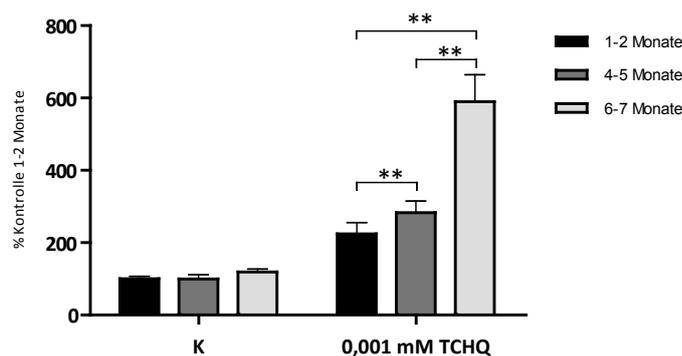


Abbildung 4.18: Messung von intrazellulären ROS in jungen versus alten hNPC.

Neurosphären verschiedenen Alters wurden während der Differenzierung (5 Tage) mit 0,001 mM TCHQ belastet (neue Lösung). Nach achtstündiger Belastung wurde die DCF-Fluoreszenz am Fluorocan (475 Ex/525 Em) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten (** = $p < 0,01$).

4.3 Die Rolle von Nrf2 während der Alterung

Die in dieser Arbeit untersuchten Genprodukte der Enzyme CAT, SOD und GPx werden transkriptionell durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 über *Antioxidants-Response-Elements* (AREs) in den jeweiligen Promoterregionen reguliert (Kanninen *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2003). Daher wurde Nrf2 in den letzten Jahren als zentrales Molekül in der antioxidativen Abwehr von Zellen identifiziert (Kanninen *et al.*, 2011; Lee *et al.*,

2003b; Lee *et al.*, 2003a). Da im Rahmen dieser Dissertation altersabhängige Veränderungen der Genexpressionen von Nrf2-Zielgenen identifiziert wurden, kristallisierte sich Nrf2 als interessantes Protein heraus, das möglicherweise an den Alterungsprozessen, die in hNPCs beobachtet wurden, beteiligt ist.

4.3.1 Die Funktion von Nrf2 in jungen *versus* alten NPCs

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Nrf2-Induktion mit zunehmendem Alter der hNPCs verändert, welches eine Erklärungsmöglichkeit für den Verlust der Induktion der antioxidativen Enzyme (Abbildung 4.17) in den gealterten hNPCs bieten könnte.

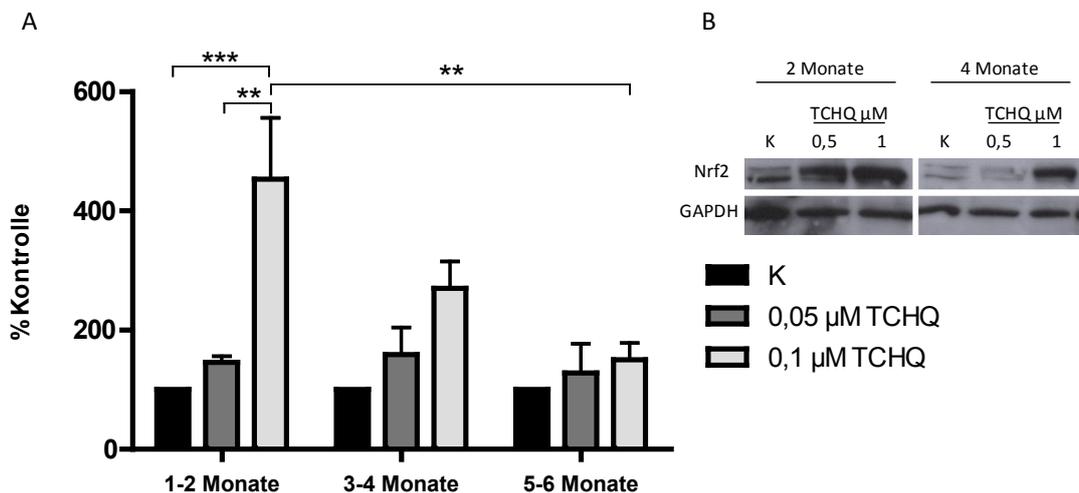


Abbildung 4.19: Western-Blot-Analysen zur Nrf2-Expression in verschiedenen alten hNPCs.

Verschiedene Alter der Neurosphären (1-2, 3-4 und 5-6 Monate) wurden während der Differenzierung mit 0,5 und 1 μM TCHQ für acht Stunden belastet. Nach der Belastungszeit wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression von Nrf2 hin untersucht. (A) Die densitometrische Quantifizierung der Nrf2-Proteinexpression ist auf GAPDH abgeglichen und in Prozent der jeweiligen Kontrolle von drei unabhängigen Versuchen aufgetragen (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (B) Zeigt einen repräsentativen Western-Blot. Durchführung der Experimente mit der alten Lösung.

Zu diesem Zweck wurde die Nrf2-Expression mittels Western-Blot-Analysen in Sphären verschieden Alters (1-2, 3-4 und 5-6 Monate in Kultur) untersucht. Tatsächlich zeigten diese, dass acht Stunden nach Belastung 1 μM TCHQ in jungen Sphären (1-2 Monate) die Nrf2 Proteinexpression 4,53-fach induziert (Abbildung 4.19). Mit zunehmendem Alter der Kultur nimmt die Induktion von Nrf2 als Antwort auf den oxidativen Stress ab. So ist bei den 3-4 Monate alten Sphären nur noch eine 2,7-fache und bei den 5-6 Monate alten hNPCs gar keine Induktion mehr vorhanden (Abbildung 4.19).

Diese Daten konnten mit einer immunzytochemischen Färbung von Nrf2 bestätigt werden. Differenzierte, junge hNPC, die für 30 min mit 0,001 mM TCHQ belastet wurden, lassen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz erkennen, während die gleiche Konzentration in den 3-4 Monate gealterten hNPC ein sichtbar schwächeres Nrf2 Signal auslöst (Abbildung 4.20).

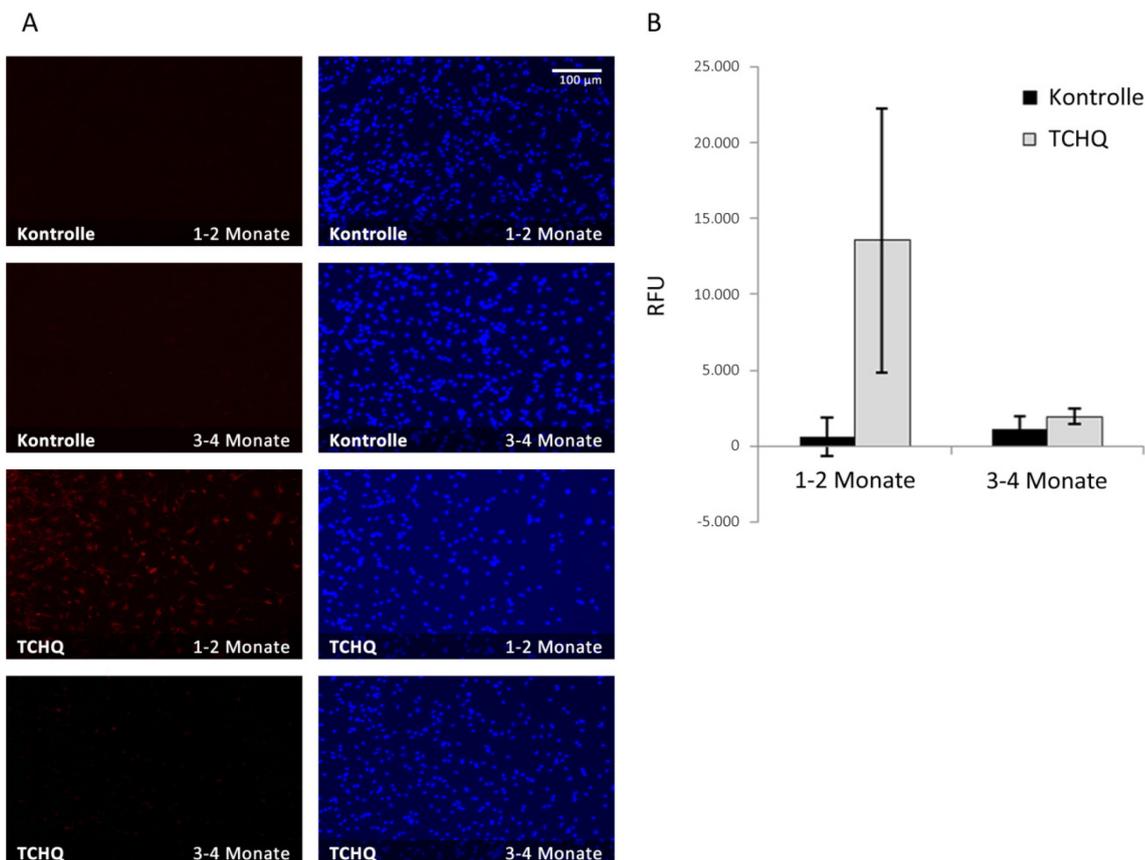


Abbildung 4.20: Die Abnahme der Nrf2-Expression mit zunehmendem Alter der hNPC-Kultur nach TCHQ-Belastung.

1-2 Monate und 3-4 Monate alte Neurosphären wurden in einen mit PDL/Laminin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger ausplattiert. Fünf Tage nach Start der Differenzierung wurden die Sphären für 30 Minuten mit 0,001 mM TCHQ belastet. Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gegen Nrf2 (rot) und Hoechst 33342 (Zellkerne, blau) gefärbt. (A) Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte der Nrf2-Färbung und die dazugehörige Zellkernfärbung (100-fache Vergrößerung). (B) Quantitative Auswertung der Nrf2-Expression (RFU = relative Fluoreszenz-Einheiten).

Beobachtungen einzelner Zellen bei höherer Vergrößerung zeigten jedoch, dass die Nrf2 Translokation in den Zellkern nach Stimulus mit oxidativem Stress auch in den gealterten Sphären noch funktionell ist. Die Aufnahmen wurden alle mit derselben Belichtungszeit aufgenommen und es gab ca. gleich viele positive Kerne bei den alten und jungen NPCs. Daher deutet die Abnahme der Proteinexpression von Nrf2 nach oxidativem Stress mit zunehmendem Kulturalter der Zellen (Abbildung 4.19, Abbildung

4.20) entweder auf eine altersabhängige Änderung der transkriptionellen oder der posttranskriptionellen Regulation hin.

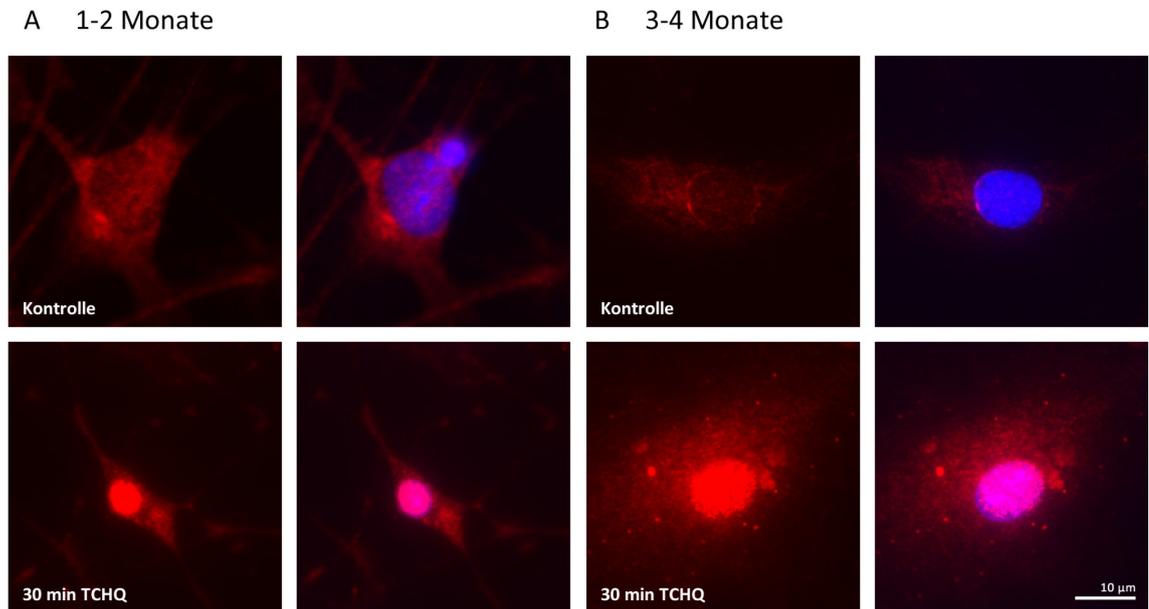


Abbildung 4.21: Die Aktivierung von Nrf2 durch Translokation in den Zellkern in jungen versus alten hNPCs.

(A) 1-2 Monate und (B) 3-4 Monate alte Neurosphären wurden fünf Tage nach dem Ausplattieren für 30 Minuten mit 0,001 mM TCHQ belastet, anschließend fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen Nrf2 (rot) gefärbt. Links sind jeweils repräsentative Bilder der Nrf2-Färbung gezeigt und rechts Kombinationsbilder der Nrf2- und Zellkernfärbung (Hoechst, blau). Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten (400-fache Vergrößerung).

Altersabhängige transkriptionelle Effekte konnten jedoch ausgeschlossen werden, da Untersuchungen zur mRNA Expression von Nrf2 und Keap1 demonstrierten, dass sich die Transkriptmenge dieser zwei Gene über das Alter nicht verändert (Abbildung 4.22).

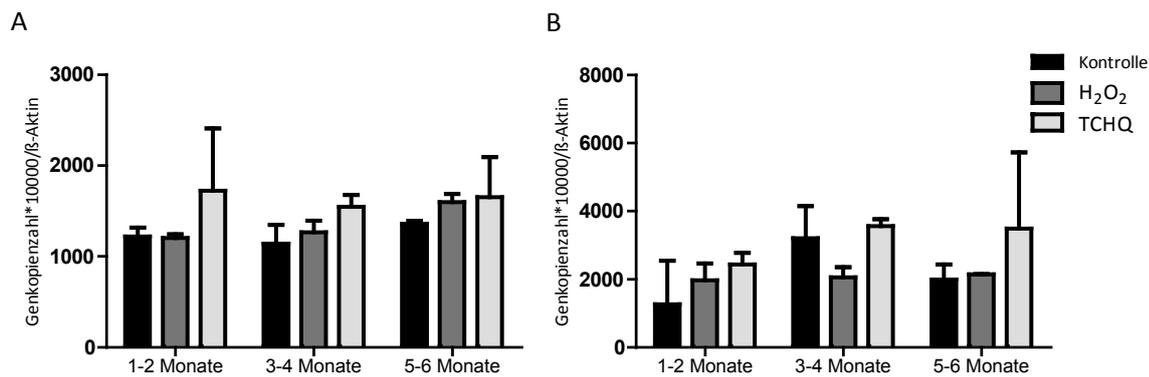


Abbildung 4.22: Die Genexpression von Nrf2 in verschiedenen alten hNPCs.

Verschieden Alte Neurosphären wurden während der Differenzierung mit H₂O₂ und TCHQ belastet. Nach einer achtstündigen Belastung wurden die Zellen geerntet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von (A) Nrf2 und (B) Keap1 ermittelt und auf das Haushaltsgen β-Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM oder Min/Max.

4.3.2 Lentiviraler Gen-Knockdown von Nrf2

Um zu untersuchen, inwieweit Nrf2 kausal an der verminderten Proliferationsrate und eingeschränkten Differenzierungskapazität gealterter hNPC verantwortlich ist, wurde Nrf2 durch shRNS basierten, lentiviralen Gen-*Knockdown* herunterreguliert. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Neurosphären war es dafür zunächst erforderlich, die lentivirale Transduktion in diesem Zellmodell zu etablieren. Für diese in Zusammenarbeit mit Susanne Giersiefer durchgeführten Arbeiten wurde der Lentivirus SEW-GFP verwendet. Der GFP-Vektor ermöglichte es, die Transduktionseffizienz anhand der Rate der fluoreszierenden Zellen zu bestimmen (Abbildung 4.23). Die Analyse der Transduktionseffizienz ergab, dass ein Virus Titer (TU) von 1.000 für eine hohe Transduktionsrate bei den Neurosphären notwendig ist. Dieser TU wurde daher für alle weiteren Versuche verwendet.

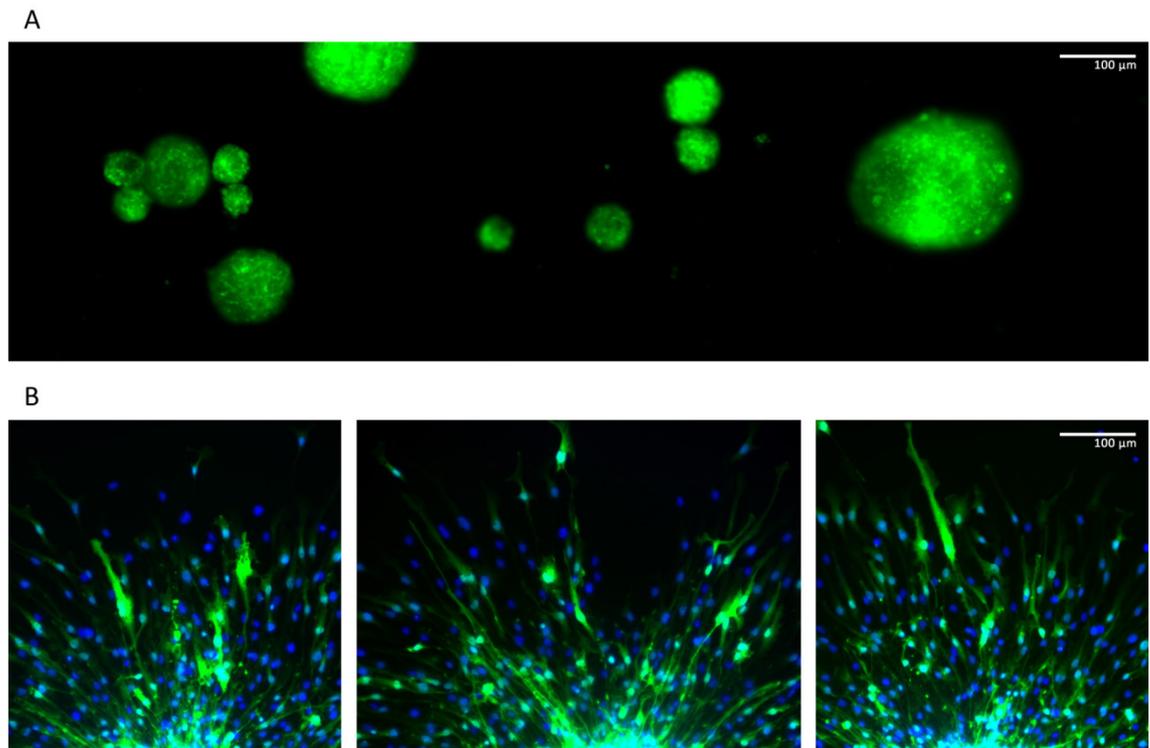


Abbildung 4.23: SEW-GFP transduzierte hNPCs.

Proliferierende Neurosphären wurden mit dem Lentivirus SEW-GFP transduziert und (A) nach 48 Stunden unterm Fluoreszenz-Mikroskop kontrolliert. (B) Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Sphären auf einem mit PDL/Laminin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger ausplattiert und nach weiteren zwei Tagen wurde die GFP-positiven Zellen in der Migrationsstrecke am Fluoreszenz-Mikroskop fotografisch dokumentiert (200-fache Vergrößerung).

Für den tatsächlichen *Nrf2-Knockdown* wurden kommerziell erhältliche shRNS gegen *Nrf2* von Open Biosystems erworben. Um einen möglichst hohen *Nrf2-Knockdown* in den Neurosphären zu erzielen, wurden die fünf erworbenen, verschiedene shRNS in HEK293FT-Zellen auf ihre *Knockdown*-Effizienz getestet. Als Kontrolle wurde in allen durchgeführten Versuchen der Kontroll-Vektor (cv) verwendet und auf 100 % gesetzt. Die Daten zeigten, dass alle fünf shRNS zu einer Herunterregulierung der basalen *Nrf2*-Expression in den HEK293-Zellen führten (shRNS1: $68,43 \pm 14,57$ %; shRNS2: $58,72 \pm 9,23$ %; shRNS3: $46,42 \pm 2,47$ %; shRNS4: $42,28 \pm 14,99$ %; shRNS5: $59,14 \pm 2,34$; Abbildung 4.24). Da shRNS1 mit ca. 70 % die höchste *Knockdown*-Effizienz aufwies, wurde diese für alle weiteren Versuche zum lentiviralen *Knockdown* in hNPCs verwendet.

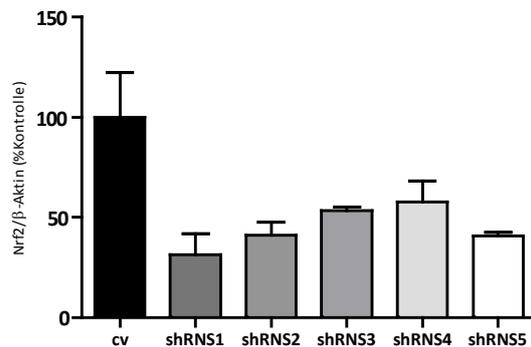


Abbildung 4.24: Die Knockdown-Effizienz von verschiedenen shRNS gegen Nrf2 in HEK293FT-Zellen.

HEK293FT-Zellen wurden 48 Stunden nach transients Transfektion (Lipofektamin und PLUS Reagenz von Invitrogene) mit fünf verschiedenen Nrf2-shRNS lysiert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von Nrf2 ermittelt und auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse in Prozent des Kontroll-Vektors (cv) von einer Doppelbestimmung als Mittelwert \pm Min/Max.

Für den Nrf2-*Knockdown* in humanen Sphären wurden diese wie unter 3.4.2.2 beschrieben mit der lentiviralen Nrf2-shRNS1s bzw. dem Kontrollvektor (cv) transduziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transduktion wurde der Nrf2-*Knockdown* mittels qRT-PCR kontrolliert und zeigte eine Herunterregulierung von Nrf2 um $58,97 \pm 3,92\%$ im Vergleich zum Kontrollvektor (Abbildung 4.25 A).

Da nun Nrf2 über ein ARE in der Promoterregion die Genexpression der antioxidativen Enzyme SOD, CAT und GPx reguliert, sollten diese bei einem effizienten Nrf2-*Knockdown* ebenfalls herunterreguliert sein. Aus diesem Grund wurde die basale Expression dieser Gene in den so generierten Nrf2-defizienten hNPC mittels qRT-PCR untersucht. Tatsächlich führt der *Knockdown* von Nrf2 zu einer signifikanten Herunterregulierung der basalen CAT-Expression um $51,34 \pm 12,32\%$, der SOD-Expression um $44,76 \pm 5,23\%$ und der GP-Expression um $49,99 \pm 0,85\%$ (Abbildung 4.25 B-C).

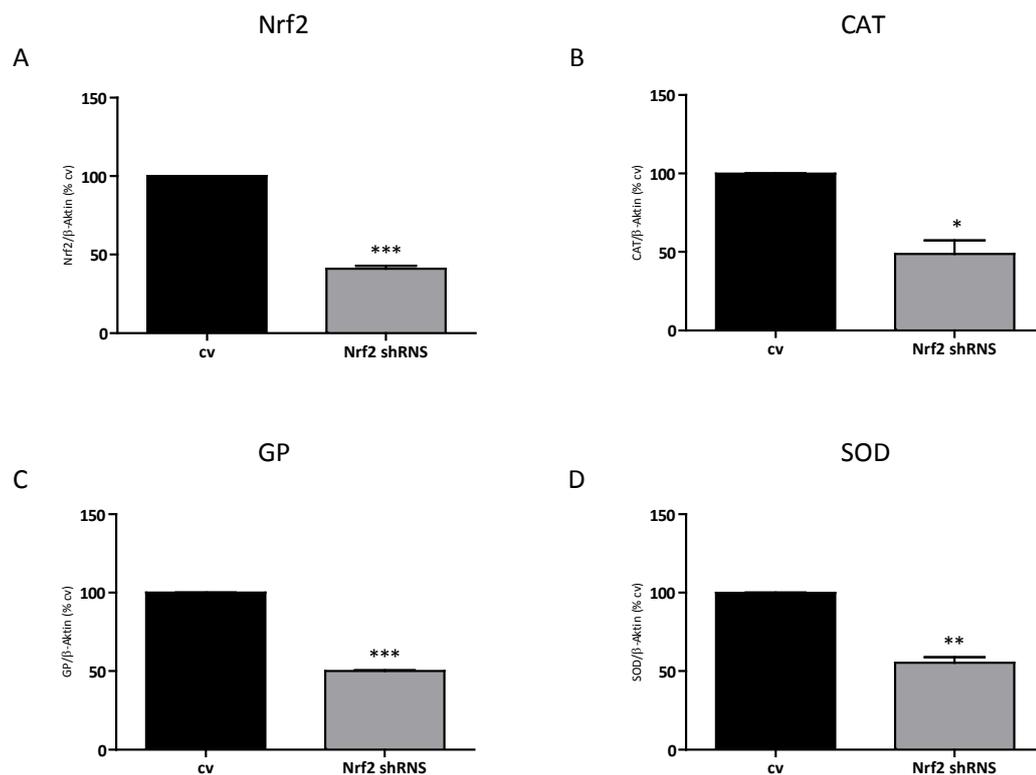


Abbildung 4.25: Die basale Genexpression von Nrf2, CAT, GPx und SOD in hNPCs nach lentiviralem Nrf2-Knockdown.

48 Stunden nach der lentiviralen Transduktion wurden proliferierenden Sphären lysiert, mittels qRT-PCR die Expression von (A) Nrf2, (B) CAT, (C) GPx und (D) SOD ermittelt und auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse in Prozent des Kontroll-Vektors (cv) Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Um die Rolle von Nrf2 an den Alterungsphänotypen der *in vitro* gealterten hNPCs, welche im Abschnitt 4.1 beschrieben sind, zu analysieren, wurden in den *Knockdown*-Sphären die Effekte der Nrf2-Defizienz auf die wichtigsten zellbiologischen Endpunkte (Proliferation, Differenzierung und Migration) untersucht.

In Abbildung 4.26 wird deutlich, dass der Nrf2-Knockdown die Proliferation (Abbildung 4.26 C) und die Differenzierung (Abbildung 4.26 B) jeweils um etwa 50 % hemmt und somit einen ähnlichen Phänotyp produziert wie die *in vitro* gealterten hNPCs (Abbildung 4.2, Abbildung 4.5). Ähnlich der *in vitro* gealterten Sphären sind auch beim Nrf2-Knockdown lediglich die Proliferation und die Differenzierung betroffen, während die Migration unbeeinflusst blieb (Abbildung 4.26 A, Abbildung 4.4). Diese Daten legen nahe, dass Nrf2 an den Alterungsphänotypen der *in vitro* gealterten hNPCs beteiligt ist.

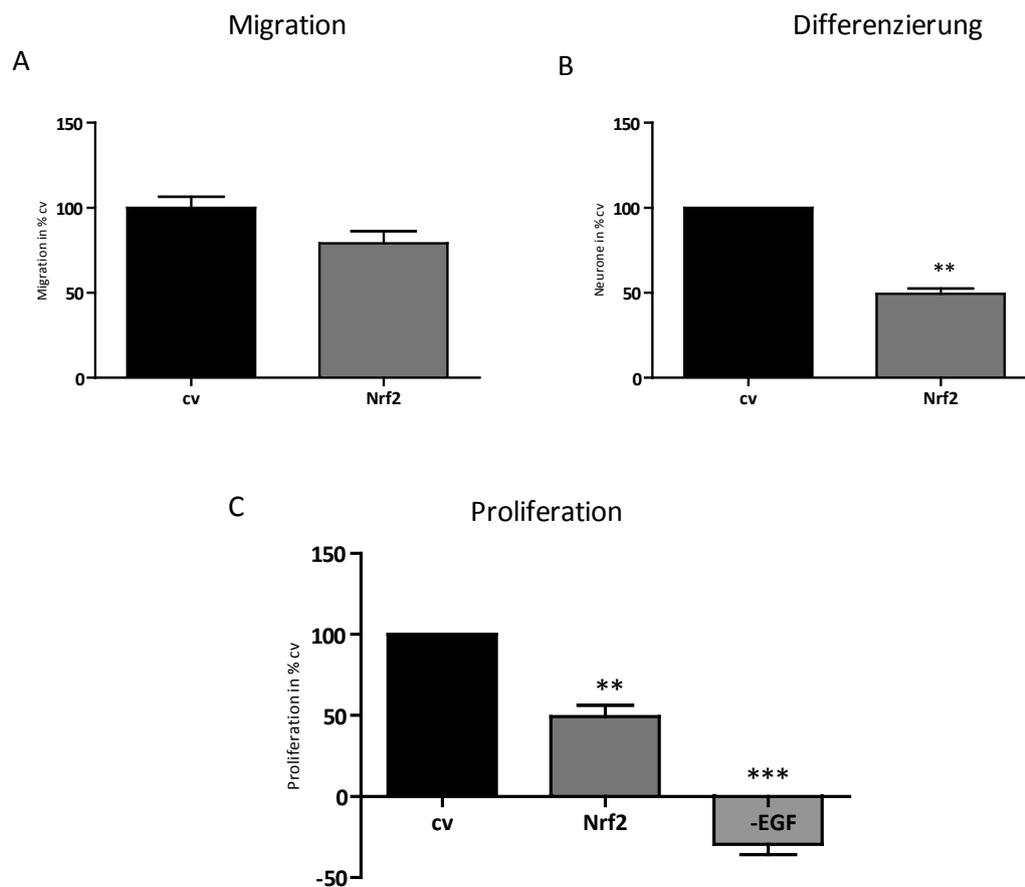


Abbildung 4.26: Die Analyse der Proliferations-, Migrations- und Differenzierungskapazität in Nrf2-Knockdown-Sphären.

Die Nrf2-Knockdown-Sphären wurden (A+B) in einem mit Poly-D-Lysin/Laminin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger ausplattiert. (A) 48 Stunden nach Start der Migration/Differenzierung wurden die hNPCs fotografisch dokumentiert und die Migrationsstrecke mit dem Programm MetaMorph vermessen. Dargestellt ist die Migrationsstrecke als Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gegen β (III)-Tubulin (Neurone) und Hoechst 33342 (Zellkerne) gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an β (III)-Tubulin-positiven Zellen in Prozent der Kontrolle von vier unabhängigen Experimenten. (C) Für den Proliferationsassay wurden gleichgroße Sphären in einer 96-Well-Platte ausplattiert, je eine Sphäre pro Well. Die Proliferation wurde über sieben Tagen verfolgt und ist als Mittelwert \pm SEM der Steigung der Ausgleichsgeraden des Sphärendurchmessers über diesen Zeitraum in Prozent des Kontroll-Vektors (cv) von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt; (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.4 Etablierung der automatischen Sortierung und Ausplattierung von Neurosphären

Da im Rahmen dieser Arbeit die Neurosphärenkultur als *in vitro* Alterungsmodell etabliert wurde und ein Signalweg identifiziert wurde, der maßgeblich an den *in vivo* und *in vitro* beobachteten Alterssphänotypen beteiligt ist, war der nächste geplante Schritt Substanzen zu identifizieren, die diesen Alterssphänotyp verhindern oder revertieren können. Dazu sollen in der Zukunft Substanzscreenings mit zum Beispiel Naturstoffbibliotheken durchgeführt werden. Da allerdings diese Testmethode bei manueller Durchführung mit einem relativ hohem Zeitaufwand verbunden ist und für ein Substanzscreening ein möglichst hoher Durchsatz an Experimenten erforderlich ist, wurde die automatische Sortier- und Ausplattierungsmaschine COPASTM (*Complex Object Parametric Analyzer and Sorter*, von Union Biometrica Inc.) auf die Fähigkeit hin getestet, Neurosphären einer bestimmten Größe auszuplattieren und damit den Probendurchsatz zu erhöhen.

In einem ersten Schritt war es notwendig, die Einstellung des COPAS Geräts an die Sphärenkultur anzupassen. Hierfür wurden manuell vorsortierte Sphären mit einem Durchmesser von 100-450 µm durch die COPASTM-Maschine ausplattiert. Die Neurosphärengröße wird von der COPASTM Software als ‚*time of flight*‘ (TOF) ausgedrückt, welcher die Sphärengröße durch optische Parameter bestimmt. Um diesen Wert mit dem Durchmesser der Neurosphären korrelieren zu können, wurde der Durchmesser mikroskopisch bestimmt und dem jeweiligen TOF-Wert zugeordnet. Somit war es möglich, für die Folgeexperimente TOF-Einstellungen zu wählen, welche einem Sphärendurchmesser von 200-400 µm entsprachen, da in Vorarbeiten der AG Fritsche gezeigt werden konnte, dass bei diesem Durchmesser Nährstoffe, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren noch bis zur Sphärenmitte durchdringen können (Moors *et al.*, 2009).

Um sicherzustellen, dass das COPASTM in der Lage ist, den Sphärendurchmesser mit derselben Genauigkeit zu bestimmen, wie es durch manuelle Sortierung möglich ist, wurden parallel Sphären manuell sowie durch das COPASTM ausplattiert und die jeweiligen Durchmesser anschließend mikroskopisch bestimmt. In Abbildung 4.27 wird

deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Sphärengröße zwischen den beiden Techniken gibt (Gassmann^{*}, Schuwald^{*} *et al.*, 2012).

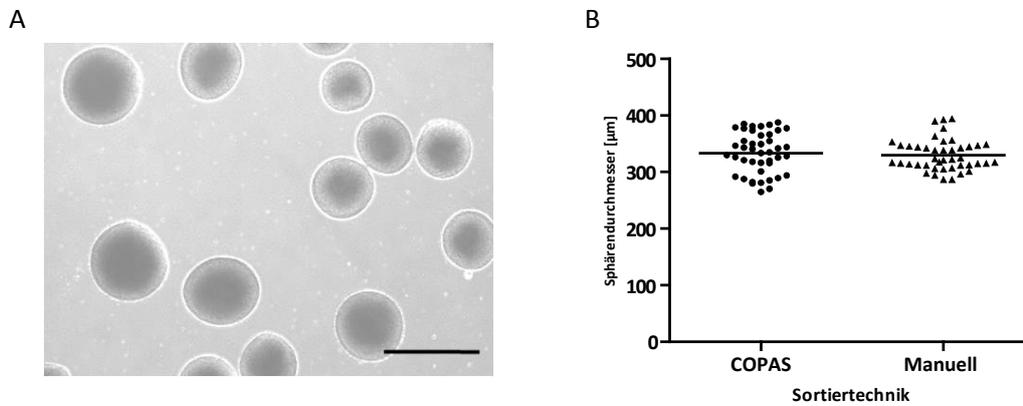


Abbildung 4.27: Der Vergleich der Ausplattiergenauigkeit des COPAS™ versus manuelle Selektion

(A) Mikroskopische Aufnahme der humanen Neurosphären Kultur vor dem Sortieren. Maßstab 500 µm. (B) 40 bis 50 Sphären wurden durch das COPAS™ und unter einem Mikroskop manuell sortiert. Der Durchmesser wurde mit Hilfe des MetaMorph Programms analysiert. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt (Gassmann^{*}, Schuwald^{*} *et al.*, 2012).

Im nächsten Schritt musste ausgeschlossen werden, dass die mechanische Manipulation der Sphären durch das COPAS™ zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität führt. Zu diesem Zweck wurden in proliferierenden Sphären nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden (i) die metabolische Aktivität gemessen (CTB, Promega) und (ii) die LDH-Freisetzung ins Medium untersucht (Cytotox One, Promega). Die Stoffwechselaktivität schwankte bei beiden Techniken zwischen 80 und 120% über die Zeit (Abbildung 4.28 A), es ergab sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den manuell und automatisch sortierten Sphären. Ähnlich verhielt es sich mit der LDH-Messung, welche zu allen Zeitpunkten mit 2-10% der Lysiskontrolle gering war (Abbildung 4.28 B).

^{*} gleichberechtigte Erstautorenschaft

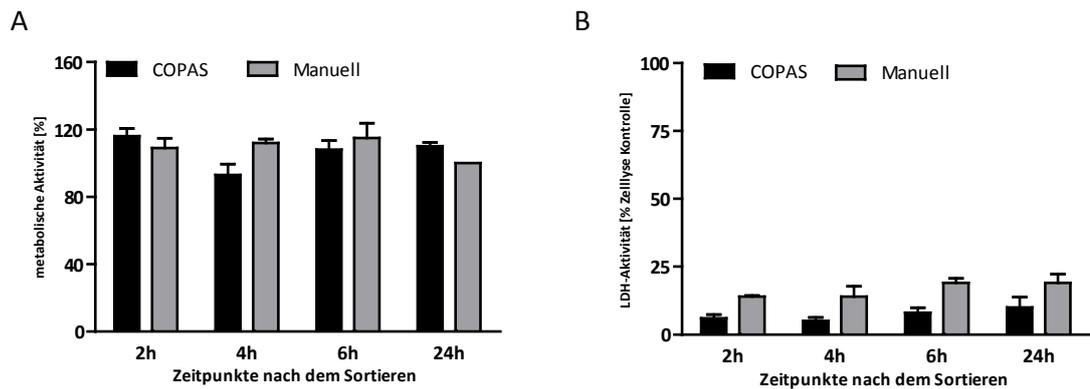


Abbildung 4.28: Vergleich der Viabilität und Zytotoxizität: COPAS™ versus manuelle Selektion.

Neurosphären der gleichen Größe wurden durch die COPAS™ (schwarze Balken) und manuell unter einem Mikroskop (graue Balken) sortiert und in einer 96-Well-Platte (eine Sphäre pro Well) ausplattiert. (A) Die metabolische Aktivität wurde 2, 4, 6 und 24 Stunden nach dem Ausplattieren mit dem CellTiter-Blue-Assay (Promega) gemessen (B) und die LDH-Aktivität als Zytotoxizität durch den Cytotox One Assay (Promega) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Prozent der 24 Stunden manuell ausplattierten Sphären beim CellTiter-Blue-Assay und in Prozent der Zellyse Kontrolle (Triton X) beim Cytotox One Assay (Gassmann*, Schuwald* *et al.*, 2012).

Neben der Zellviabilität ist die Proliferationskapazität der NPCs ein wichtiger funktioneller Endpunkt der Neurosphäre. Deshalb wurde die Proliferation der durch das COPAS™ und der manuell ausplattierten Sphären mit Hilfe des BrdU-Assays im B27-Proliferationsmedium mit und ohne EGF bestimmt. Es zeigt sich, dass es keinen Unterschied in der Proliferationsrate zwischen den manuell (184599 ± 9246 RLU) und COPAS™ (154867 ± 13726 RLU) ausplattierten Sphären gibt (Abbildung 4.29). Die Abwesenheit von EGF führt zu einer Reduktion der Proliferation bei beiden Methoden (Abbildung 4.29).

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

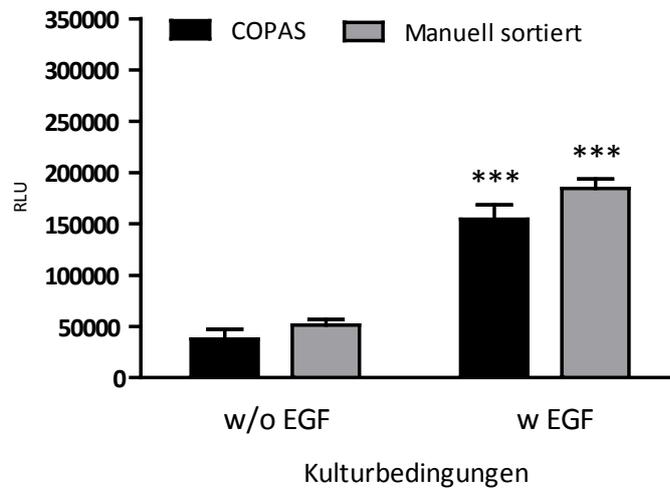


Abbildung 4.29: Der Vergleich der Proliferationskapazität von COPAS™ versus manueller Selektion.

Neurosphären der gleichen Größe wurden durch das COPAS™ (schwarze Balken) und manuell unter einem Mikroskop (graue Balken) sortiert und in einer 96-Well-Platte ausplattiert (eine Sphäre pro Well). Nach einer 48-stündigen Kultivierung im Proliferationsmedium B27 mit und ohne EGF, wurde BrdU hinzugegeben und der BrdU-Einbau nach 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind je die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten mit sechs Sphären pro Exposition; (***) = $p < 0,001$) (Gassmann*, Schuwald* *et al.*, 2012).

Weitere wichtige Endpunkte des Neurosphärenassays sind die Fähigkeiten der NPCs zu migrieren und zu differenzieren. Wie schon beschrieben (Abschnitt 4.1) sind NPCs in der Lage nach Entzug von Wachstumsfaktoren auf einer PDL/Laminin-Matrix radial aus der Sphäre zu migrieren. Um wiederum sicherzustellen, dass die mechanische Manipulation durch das COPAS™ diese Eigenschaften der Sphären nicht beeinträchtigt, wurde die Migrationsstrecke nach 48 Stunden vermessen. Beide Techniken führten zu einer sehr ähnlichen Migrationsstrecke von ca. 840 μm (Abbildung 4.30 A).

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

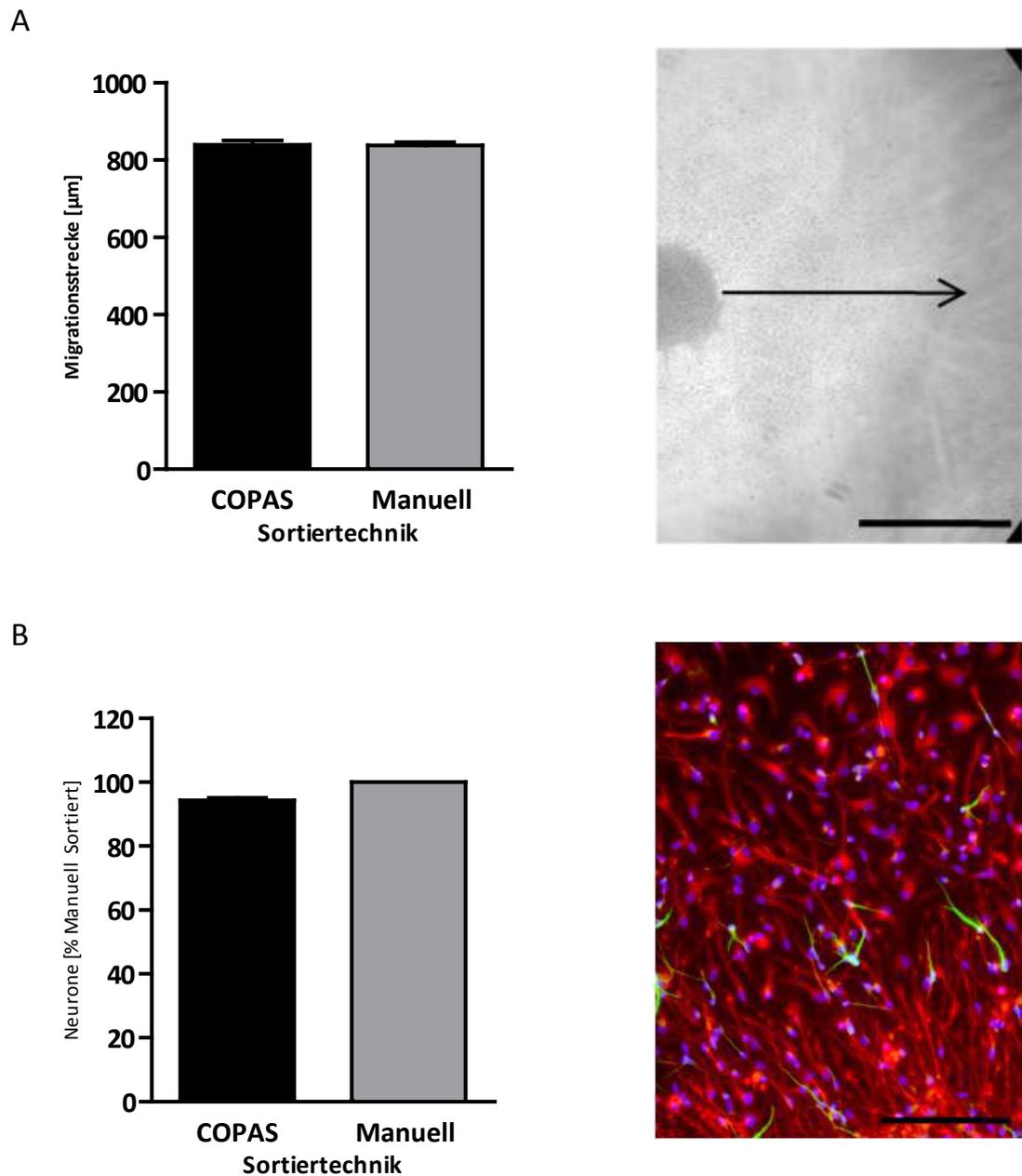


Abbildung 4.30: Der Vergleich von Migration- und Differenzierungsvermögen von COPASTM versus manueller Selektion.

Neurosphären der gleichen Größe wurden durch das COPASTM (schwarze Balken) und manuell unter einem Mikroskop (graue Balken) sortiert und in einem mit PDL/Laminin beschichteten 8-Kammer-Objektträger ausplattiert. (A) Nach 48 Stunden wurde die Migrationsstrecke vermessen (Pfeil; Maßstab = 500 μm). (B) Nach 72 Stunden Differenzierung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen β (III)-Tubulin (grün, Neurone) und GFAP (rot, Astrozyten) eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt (Maßstab 100 μm , 200-fache Vergrößerung). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Um weiterhin zu testen, ob das automatische Ausplattieren mit dem COPASTM Einfluss auf den Differenzierungsstatus der NPCs hat, wurde nach 72 Stunden eine immun-

zytochemische Färbung durchgeführt. Die Analyse der β (III)-Tubulin-positiven, neuronalen Zellen wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den manuell und automatisch ausplattierten Sphären auf (

Abbildung 4.30 B).

Da aus der Literatur bekannt ist, dass Scherspannung, wie sie durch das automatische Sortieren der Sphären mit der COPASTM-Maschine auftreten können, im zellulärem System ROS induzieren kann (Matlung *et al.*, 2009) und ROS Einfluss auf Alterungsprozesse zu haben scheint (Abbildung 4.15; Abbildung 4.17 - 4.22), wurde als letzter Parameter der intrazelluläre ROS-Gehalt der Zellen mit Hilfe der DCF-Methode analysiert. Als positive Kontrolle wurden manuell sortierte Sphären für eine Stunde mit 100 μ M TCHQ behandelt, da TCHQ intrazellulär oxidativen Stress induziert (Zhu *et al.*, 2000). FACS-Analysen von Einzelzellsuspensionen, welche aus manuell und COPASTM sortierten Sphären hergestellt wurden, weisen basal geringe ROS-Konzentration auf: human $7,9 \pm 2,1$ % (COPASTM) und $5,9 \pm 0,2$ % (manuell), Ratte $11,3 \pm 2,4$ % (COPASTM) und $10,4 \pm 1$ % (manuell) und Maus $0,46 \pm 0,15$ % (COPASTM) und $0,1 \pm 0,02$ % (manuell) (Abbildung 4.31). TCHQ hingegen ruft eine deutliche Induktion von oxidativem Stress in den Zellen hervor (Abbildung 4.31: human: $39,9 \pm 6,4$ %, Ratte: $48,0 \pm 3,8$ %, Maus: $28,3 \pm 0,4$ %). Anhand dieser Daten ist davon auszugehen, dass durch das automatische Sortieren in den Zellen kein zusätzlicher oxidativer Stress entsteht. Das bedeutet, dass der COPAS Sorter zum Sortieren und Ausplattieren von Neurosphären genutzt werden kann, ohne einen Bias in die Untersuchungen einzubringen.

Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kathrin Gassmann, Jenny Baumann und Susanne Giersiefer erhoben und sind bereits publiziert (Gassmann^{*}, Schuwald^{*} *et al.*, 2012).

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

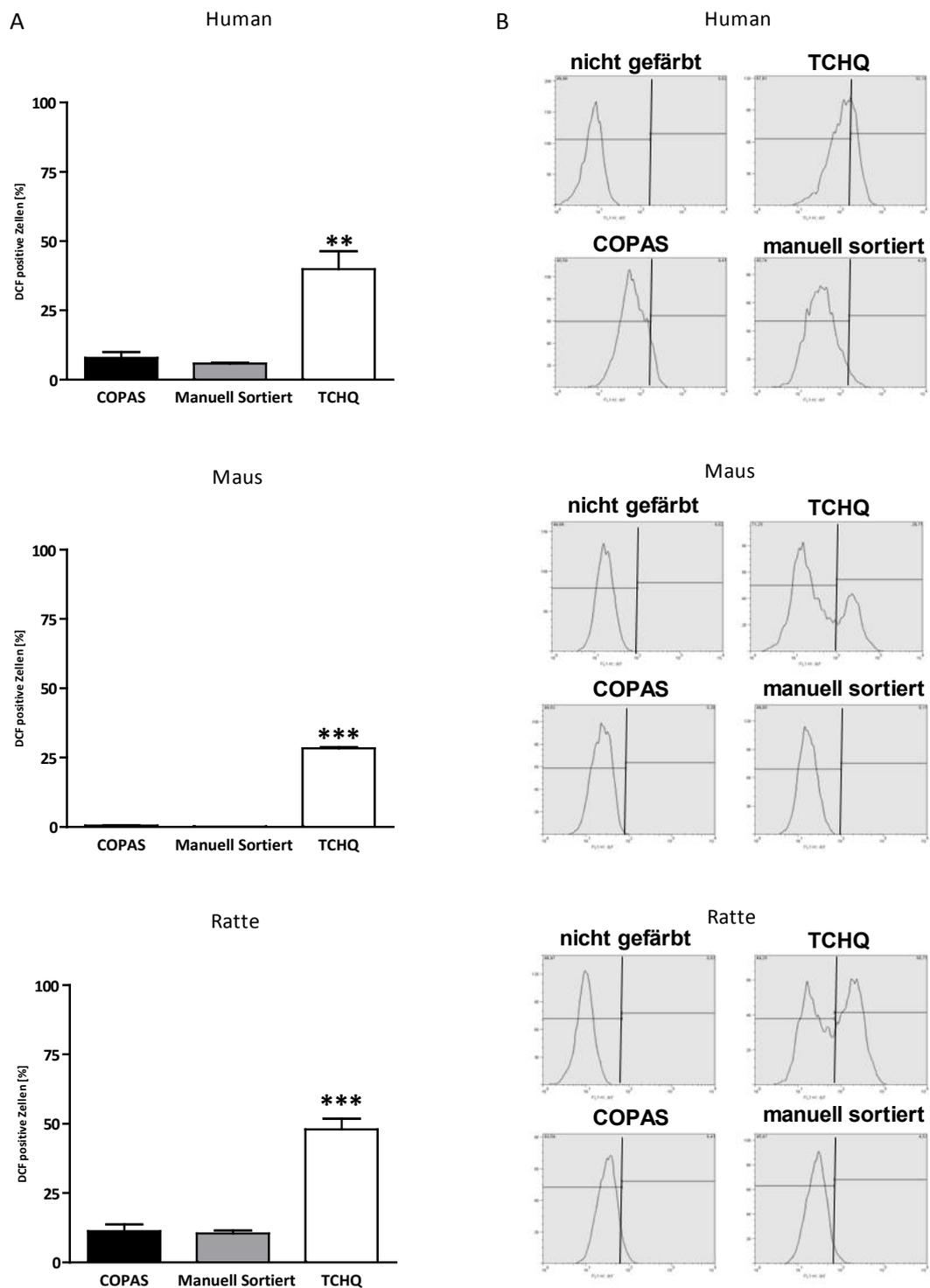


Abbildung 4.31: Der Vergleich der Bildung von intrazellulärem ROS in COPAS™ versus manuell sortierten humanen und Nager Sphären

Neurosphären der gleichen Größe wurden durch das COPAS™ (schwarze Balken) und manuell unter einem Mikroskop (graue Balken) sortiert. Als positive Kontrolle wurden manuell sortierte Sphären mit 100 μm TCHQ für eine Stunde behandelt (weiße Balken). Nach Vereinzelung der sortierten Sphären wurde die DCF-Fluoreszenz durch FACS-Analyse ermittelt. (A) Dargestellt sind je die Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten (20 Sphären pro Experiment) in Prozent der DCF-positiven Zellen; (**= $p < 0,005$; *** = $p < 0,0002$). (B) Repräsentative Histogramme der DCF-Fluoreszenz der NPCs nach den verschiedenen Behandlungen.

5 Diskussion

Da die Lebensspanne der Bevölkerung westlicher Industrienationen immer länger wird, ist in diesen Kulturen auch eine Zunahme des Auftretens altersassoziierter Verschlechterungen von Organfunktionen zu verzeichnen. So reduziert sich z.B. auch die Leistung des Gehirns, was mit vermehrter Vergesslichkeit, verminderter Lernfähigkeit sowie verschlechterter zeitlicher und räumlicher Orientierung einhergeht. Dieser Zustand umschreibt den Prozess der ‚normalen‘ oder physiologischen Hirnalterung (Yankner *et al.*, 2008; Toescu, 2005). Die Mechanismen, die solch einer normalen Gehirnalterung zu Grunde liegen, sind jedoch weitestgehend unbekannt (Toescu, 2005). Eine der am stärksten vertretenen Theorien bezüglich der Ursachen von Alterungsprozessen ist die ‚Free Radical Theory of Aging‘ (Harman, 1956). Diese besagt, dass oxidative Schäden in Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen ROS und Antioxidantien im Organismus entstehen, welche im Folgenden durch ROS-geschädigte dysfunktionelle Mitochondrien begünstigt werden und im Weiteren über einen ‚Circulus Vitiosus‘ zur zusätzlich gesteigerten ROS Akkumulation und finalen Funktionsstörung der Zellen führen (Schroeder *et al.*, 2008; Finkel und Holbrook, 2000). Dieser Mechanismus scheint an der Entstehung verschiedenster neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer, Huntington und multipler Sklerose beteiligt zu sein (Butterfield und Kanski, 2001; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 1997; Fahn und Cohen, 1992; Frautschy *et al.*, 1991). Ob auch die Prozesse der physiologischen Gehirnalterung durch ROS ausgelöst werden, ist bisher nicht bekannt.

Um zu untersuchen, ob oxidativer Stress zu neuronaler Dysfunktion führt, werden Modellsysteme wie Zellkulturen und Versuchstiere eingesetzt. Da Tierversuche zeitaufwendig und teuer sind, sind sie nur eingeschränkt für mechanistische Untersuchungen geeignet und auch die Physiologie des Menschen nur eingeschränkt widerspiegeln, rückt derzeit die *in vitro* Toxikologie mehr und mehr in den Vordergrund. Durch die Weiterentwicklung der Zellkultur in den letzten Jahrzehnten ist es nun sogar möglich, die Prozesse der physiologischen Gehirnalterung in der Kulturschale zu untersuchen. Dazu wurden bisher Langzeit-Primärkulturen fetaler Neurone des Nagers genutzt

(Aksenova *et al.*, 2005). Diese haben den Vorteil, dass für mechanistische Studien auch transgene Tiermodelle verwendet werden können. Diese Arbeiten haben sich im Wesentlichen mit dem Altern bereits differenzierter Neurone beschäftigt. So weisen Neurone in der Kultur mit zunehmendem Alter vermehrt oxidative Schäden auf. Ferner kommt es mit dem Alter der Kultur zu Veränderungen in der Vitalität von Neuronen: nach 60 Tagen in Kultur sind ca. 85% der Neurone nicht mehr vital (Aksenova *et al.*, 1999). Die Befunde der letzten Jahre zeigten jedoch, dass physiologische Hirnalterung unter anderem eine Abnahme der regenerativen Kapazität, also dem Funktionsverlust neuraler Vorläuferzellen zu Grunde liegt (Ming und Song, 2005). Somit ist es zur Untersuchung der Mechanismen, die zum Funktionsverlust der alternden NPC führen, notwendig, ein *in vitro* Alterungszellmodell zu besitzen, welches regenerative Prozesse des Gehirns *in vitro* abbilden kann. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Dissertation das bereits für Entwicklungsneurotoxizitäts-Testung etablierte als Neurosphären wachsende hNPC-Modell (Fritsche *et al.*, 2005; Fritsche *et al.*, 2011; Gassmann *et al.*, 2010; Moors *et al.*, 2007; Moors *et al.*, 2009; Schreiber *et al.*, 2010) als *in vitro* Modell der physiologischen Hirnalterung aufgebaut.

5.1 hNPCs als *in vitro* Modell für Alterungsprozesse

Als Neurosphären wachsende hNPC sind komplexe dreidimensionale Strukturen humaner neuraler fetaler Progenitorzellen, welche Basisprozesse der Neurogenese, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose *in vitro* abbilden und somit als organotypische Kulturen einen Teil der Physiologie des Gehirns repräsentieren (Moors *et al.*, 2009). Solche Prozesse finden sich nicht nur während der Entwicklung, sondern sind auch Teil der regenerativen Kapazität adulter Stammzellnischen des Menschen (Eriksson *et al.*, 1998b; Ming und Song, 2005).

Neurosphären differenzieren unter Wachstumsfaktorentzug zu Neuronen und zu Gliazellen (Astrozyten/Oligodendrozyten) und bilden die phänotypischen Marker dieser Zelltypen aus (Fritsche *et al.*, 2005; Lobo *et al.*, 2003; Piper *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2001; Breier *et al.*, 2010). Es handelt sich also um eine organotypische Mischkultur der häufigsten Zelltypen im ZNS (Chvatal *et al.*, 1995; Liu und Rao, 2004; Ullian *et al.*,

2001). Dies ist vor allem deshalb von großer Bedeutung, da mittlerweile unumstritten ist, dass die Interaktion dieser Zelltypen essenziell für die adulte Neurogenese ist. Beispielsweise induzieren Astrozyten die Differenzierung zu Neuronen aus adulten Stammzellen (Lim und Alvarez-Buylla, 1999; Song *et al.*, 2002). Solche Neurosphären wurden hier über mehrere Monate in Kultur gehalten und alle 1-2 Monate wurden zum einen NPC-Funktionen, wie die Fähigkeit zur Proliferation, Migration, Neuro- und Gliogenese, sowie altersassoziierte molekulare Parameter untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Reduktion der adulten Neurogenese kommt (Cameron und McKay, 1998; Galvan und Jin, 2007; Kempermann *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 1996; McDonald und Wojtowicz, 2005; Seki und Arai, 1995), was unter anderem auf eine verminderte Proliferationsrate zurückzuführen ist (Artegiani und Calegari, 2012). Analysen an verschiedenen Nagerstämmen zeigten, dass es während des Alterns in den regenerativen Hirnarealen wie der subventriculären Zone (SVZ) zu einer ca. 80-prozentigen altersabhängigen Proliferationsabnahme der NPCs kommt (Jin *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 1998; Nacher *et al.*, 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsanalysen der jungen *versus* alten Neurosphären zeigten ebenfalls eine altersabhängige Verringerung der Proliferation von ca. 80-90% (Abbildung 4.2) was für eine proliferative Seneszenz der NPCs auch *in vitro* spricht. NPC-Proliferation *in vivo* und *in vitro* ist unter anderem abhängig von EGF (Enwere *et al.*, 2004; Gould und Tanapat, 1997b; Reynolds und Weiss, 1992). Während des Alterns wurde eine Abnahme von EGF-Rezeptoren in der SVZ von Mäusen beobachtet, welche für die verminderte Proliferation von NPC im Alter mitverantwortlich gemacht wird (Enwere *et al.*, 2004). Diese Annahme wird von der Beobachtung unterstützt, dass eine Infusion von EGF in den Gyrus Dentatus zu einer erhöhten Proliferation von NPCs führt. Auch in *in vitro* gealterten hNPCs fand sich eine verringerte EGF-R-Expression (Abbildung 4.3), was die publizierten *in vivo* Daten *in vitro* widerspiegelt.

Um auszuschließen, dass es sich bei den Veränderungen um Kulturartefakte handelt, wurden die etablierten Alterungsmarker β -Galaktosidase und $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ untersucht, sowie der Karyotyp der Zellen bestimmt. Eine Überexpression von $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ führt zu einem Zellzyklusarrest (Niculescu, III *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1997), da es in der Lage ist, die CDK-Komplexe zu hemmen und somit die Proliferation

zu verlangsamen oder zu inhibieren (Sherr und Roberts, 1995). In verschiedenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} und der Alterung von Zellen gezeigt werden (Vogt *et al.*, 1998; Noda *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997). Die vermehrte Expression von p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} in gealterten Neurosphären (Abbildung 4.7) bestätigt den bereits publizierten Alterungsphänotyp in diesem *in vitro* Alterungsmodell. Diese Beobachtungen wurden durch die vermehrte Präsenz des Alterungsmarkers β -Galaktosidase in *in vitro* gealterten NPCs unterstützt (Abbildung 4.8). Dabei ist die Färbung der Zellen mittels X-Gal-Spaltung durch die β -Galaktosidase ein etablierter Nachweis für zelluläre Seneszenz (Dimri *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2008), denn nach gängiger Auffassung kommt es zu einer Zunahme der Lysosomen in gealterten Zellen, in welchen die β -Galaktosidase lokalisiert ist (Kurz *et al.*, 2000). Kürzlich etablierten Vukicevic *et al.* (2010) ein auf Maus-Neurosphären basierendes *in vitro* Alterungsmodell. Langzeitkulturen dieser murinen Sphären bewirkten eine Abnahme der Proliferations- und Differenzierungskapazitäten. Diese mNPC-Funktionsverluste gingen jedoch mit einer chromosomalen Instabilität der NPCs einher und sind daher kritisch zu bewerten (Vukicevic *et al.*, 2010). Um eine genetische Instabilität der hNPCs für die mit dem Alter eintretenden Veränderungen auszuschließen, wurde in den *in vitro* gealterten Sphären zytogenetische Begutachtungen durchgeführt. Sowohl die jungen als auch die *in vitro* gealterten Sphären haben im Gegensatz zu den gealterten mNPC einen numerisch und strukturell unauffälligen Karyotyp (Abbildung 4.19).

In Gegenwart einer PDL/Laminin-Matrix und dem Entzug von Wachstumsfaktoren beginnen die Zellen aus der Neurosphäre in einer kreisrunden Migrationsfläche heraus zu migrieren, was die radiale Migration während der Gehirnentwicklung abbildet (Baumann und Pham-Dinh, 2001). In den durchgeführten Migrationsassays in dieser Arbeit wurden keine Unterschiede zwischen den jungen und alten hNPCs festgestellt (Abbildung 4.3). Jedoch war die Migration neuraler Zellen in gealterten Ratten *in vivo* reduziert (Heine *et al.*, 2004). Aus der Literatur ist bekannt dass die Migration durch die extrazelluläre Matrix (EZM) determiniert wird (zusammengefasst in Bandtlow und Zimmermann, 2000; Oohira *et al.*, 2000). Daher ist es möglich, dass Migrationsverlust im Alter durch altersabhängige Veränderungen der extrazellulären Matrix vermittelt wird (Chautard *et al.*, 2010). Dies kann mit diesem hNPC-Zellmodell nicht untersucht

werden, da durch die Beschichtung der Platten und Objektträger mit Laminin die EZM, die für die Migration notwendig ist, bereits vorhanden ist.

Die Zusammensetzung der differenzierenden Zellen innerhalb der Migrationsfläche *in vitro* ist der *in vivo* Situation ähnlich: Die Migrationsfläche besteht nach mehreren Tagen Differenzierung aus β III-Tubulin-(Neurone), O4-(Oligodendrozyten) und GFAP-(Astrozyten) positiven Zellen (Fritsche *et al.*, 2005; Moors *et al.*, 2009). Mit dem Alter der Kultur kommt es zu einer Veränderung des Differenzierungsverhaltens der hNPCs. Nach bereits drei Monaten in Kultur verringert sich die Anzahl der zu Neuronen differenzierten Zellen um ca. 50% und eine Differenzierung in Oligodendrozyten ist nicht mehr möglich (Abbildung 4.5). Diese Situation gibt die *in vivo* Situation wieder, wo ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Differenzierung zu Neuronen und Oligodendrozyten mit dem Alter abnimmt (Heine *et al.*, 2004; Lichtenwalner *et al.*, 2001; Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002; Gage, 2002; Luo *et al.*, 2006; Shruster *et al.*, 2010b; Bouab *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2008; Leuner *et al.*, 2007). Auch die zu Grunde liegenden Mechanismen wurden bereits diskutiert. Dabei könnten mögliche Ursachen (i) eine Verlängerung des Zellzyklus oder Zellzyklusarrests und damit eine Abnahme der proliferativen Kapazität der NPCs, (ii) eine Veränderung des Zellschicksals (iii) eine erhöhte Apoptose in den NPCs und/oder (iv) erhöhte Apoptose in den neu differenzierten Neuronen (zusammengefasst in Artegiani und Calegari 2012; Abbildung 5.1) und Oligodendrozyten sein (Kiatipaattanasakul *et al.*, 1996). Die reduzierte Proliferation, welche in letzter Konsequenz auch zu einer verminderten Neurogenese führt, ist in den *in vitro* gealterten hNPCs wahrscheinlich auf eine Verlängerung des Zellzyklus bzw. auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen, da gealterte NPCs den Zellzyklus-Regulator p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} überexprimieren (Abbildung 4.7). Ob eine Veränderung des Zellschicksals vorliegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und ist Gegenstand weiterer Studien. Die Möglichkeit, dass über den Mash1-Hes1-Signalweg in alternden NPCs die Astroglionese bevorzugt wird, ist jedoch eine Möglichkeit, die es zu untersuchen gilt (Prozorovski *et al.*, 2008). Ob akzelerierter Zelltod an dem Verlust der Neuronen und Oligodendrozyten in gealterten Kulturen beteiligt ist, ist unwahrscheinlich, da es keine Veränderung der Viabilität zwischen den jungen und alten hNPCs gab (Abbildung 4.6). Es ist jedoch möglich, dass Neurone und Oligodendrozyten früh (z.B. an Tag eins der Differenzierung) den Zelltod beschritten

haben, was nach fünf Tagen Differenzierung im Zellviabilitätsassay nicht mehr sichtbar wäre. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass *in vitro* gealterte hNPCs ein geeignetes Zellmodell darstellen, um die Mechanismen der physiologischen Hirnalterung, die auf Reduktion der regenerativen Kapazitäten des Gehirns fußen, zu untersuchen.

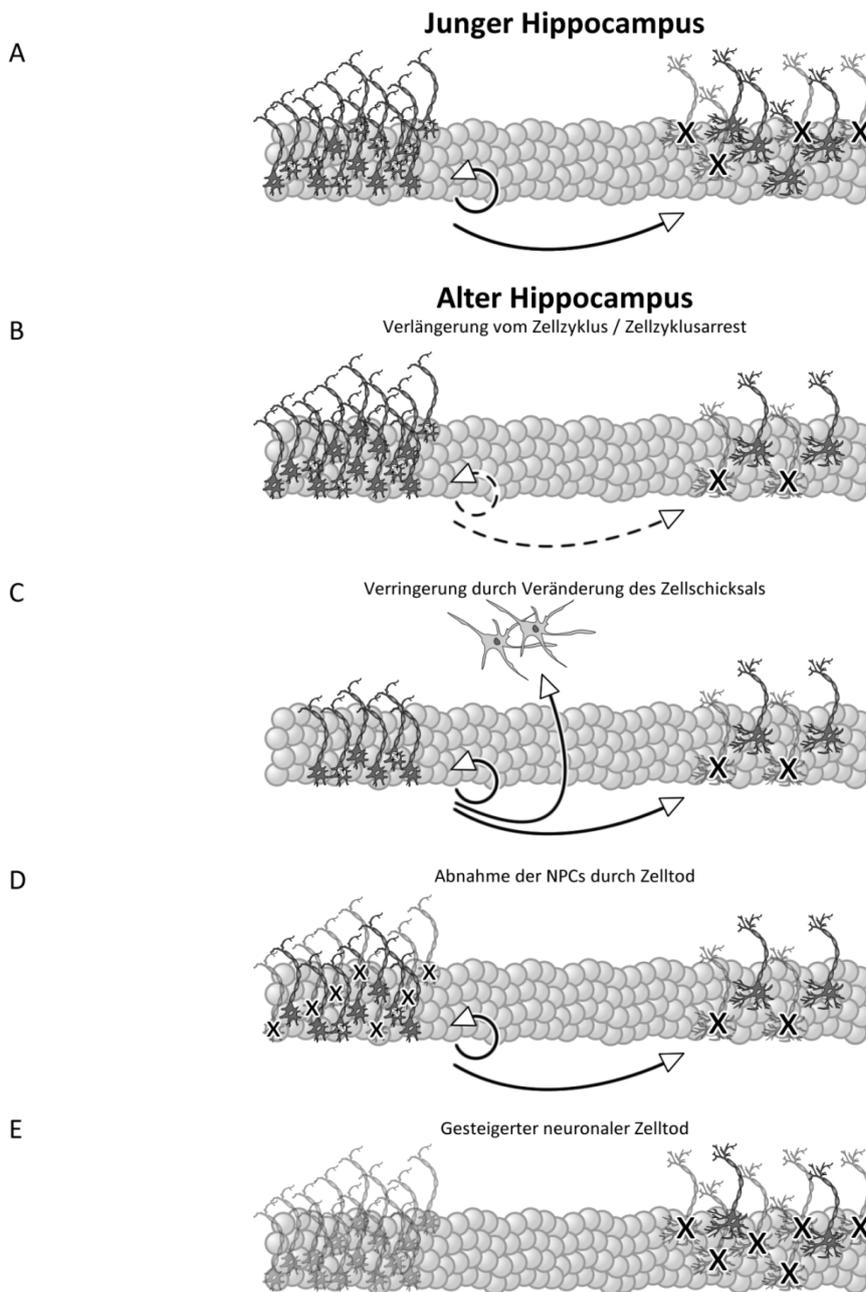


Abbildung 5.1: Potenzielle Mechanismen für den altersbedingten Rückgang der Neurogenese

(A-E) Schematische Darstellungen der adulten Neurogenese im (A) jungen oder (B-E) seneszenten Hippocampus. Proliferierende und nicht teilende NPCs (Links) sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein oder fehlen von mitotischen Spindeln. Die Pfeile kennzeichnen die Teilung oder Differenzierung der NPCs. Während der Reifung wird in vielen Neuronen der programmierte Zelltod eingeleitet (Kreuze) (Modifiziert nach Artegiani und Calegari 2012).

5.2 Der Verlust der antioxidativen Abwehr im Alter

Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigen die Arbeiten Anderer bezüglich des Verlustes von NPC Proliferation und Differenzierung während der physiologischen Alterungsprozesse des Gehirns. Ob ROS an diesen Prozessen beteiligt ist, wurde Desweiteren in diesem *in vitro* hNPC Alterungsmodell untersucht. Dazu wurden junge sowie gealterte hNPC durch eine Exposition mit H₂O₂ und Tetrachlorohydrochinon (TCHQ) oxidativem Stress ausgesetzt. Die Eignung von H₂O₂ und TCHQ als Induktoren von oxidativem Stress ist *in vitro* durch experimentelle Befunde belegt (Murphy *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2000). Da eine große Menge von Studien die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Toxizitätstestungen verwendet, wurden diese Zellen zum Vergleich in die Untersuchungen mit einbezogen. H₂O₂ führt in hNPCs und SH-SY5Y-Zellen konzentrationsabhängig über die Zeit zum Zelltod (Abbildung 4.10), wobei SH-SY5Y-Zellen sensibler auf H₂O₂ reagieren als hNPCs (Abbildung 4.10). Diese Daten werden durch Beobachtungen aus anderen Studien unterstützt, in welchen beschrieben ist, dass Krebszellen gegenüber oxidativen Stress sensibler reagieren als normale Zellen (Aykin-Burns *et al.*, 2009; Hileman *et al.*, 2004). Diese höhere oxidative Stressresistenz von hNPCs ist dadurch begründet, dass die antioxidativ wirkenden und ROS detoxifizierenden Enzyme CAT, SOD und GPx durch ROS induziert werden (Abbildung 4.14). Im Gegensatz dazu sind diese Genprodukte in SH-SY5Y-Zellen basal 5-10-fach niedriger exprimiert als in hNPC und werden durch ROS auch nicht induziert (Abbildung 4.13; 4.14).

Zusammenfassend zeigen die vergleichenden Ergebnisse zur antioxidativen Abwehr sowie zur Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress in hNPC versus SH-SY5Y-Zellen, dass eine niedrige Expression sowie fehlende Regulation der antioxidativen Genprodukte von SOD, GPx und CAT die Empfindlichkeit gegenüber ROS-induziertem Zelltod erhöhen. Basierend auf diesen Ergebnissen und der ‚Free Radical Theory of Aging‘ (Harman, 1956; Harman, 2006; Lee *et al.*, 2012) entstand die Hypothese, dass auch in alternden hNPCs *in vitro* möglicherweise eine Dysregulation dieser Abwehrmaßnahmen vorliegt. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Befunde, dass Tiere mit einem relativ hohen Sauerstoffverbrauch eine kürzere Lebenserwartung haben als

Tiere mit einem geringeren Umsatz (Valko *et al.*, 2007). Ein weiterer Faktor, der die Lebensdauer beeinflusst, ist die unterschiedliche Produktionsrate von ROS zwischen verschiedenen Spezies. So haben Ratten und Tauben eine ähnliche Stoffwechselrate aber unterschiedlich lange Lebensspannen. Dieser Unterschied wird dadurch begründet, dass die Mitochondrien der Tiere ROS unterschiedlich schnell generieren (zusammengefasst in Valko *et al.*, 2007). Um nun zu untersuchen, ob eine in gealterten NPCs dysfunktionale ROS-Detoxifizierung möglicherweise kausal an den Alterungsprozessen beteiligt ist, wurden zunächst junge und alte hNPCs mit TCHQ oder H₂O₂ belastet. Dabei zeigte sich, dass junge NPCs resistenter gegenüber ROS-induziertem Zelltod sind als alte NPCs (Abbildung 4.15). Zudem findet sich in TCHQ-behandelten alten NPCs ca. dreimal so viel ROS wie in den jungen Sphären (Abbildung 4.18), was auf eine altersabhängige Verminderung der ROS-Detoxifizierung hindeutet. mRNA-Expressionsanalysen bestätigten diese Hypothese, da im Gegensatz zu jungen hNPCs gealterte Zellen nicht mehr in der Lage sind, bei oxidativem Stress die antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx zu induzieren (Abbildung 4.17). Dass verminderte ROS-Detoxifizierung auch *in vivo* mit vermehrtem Zelltod einhergeht zeigen Studien an GPx-Knockout-Mäusen, in denen die LD₅₀-Werte nach Belastung mit Substanzen, welche oxidativen Stress hervorrufen, erniedrigt waren (Brigelius-Flohe, 1999). Ob CAT, SOD und GPx auch in alternden Gehirnen vermindert exprimiert sind, ist derzeit umstritten. So zeigen zwar einige Studien eine Korrelation zwischen der Akkumulation der oxidativen Schäden und der Reduktion der antioxidativen Abwehr in alten Zellen (Devi und Kiran, 2004; O'Donnell *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1990; Semsei *et al.*, 1991), allerdings sind auch Arbeiten zu finden, welche diese Korrelation nicht finden können (Hamilton *et al.*, 2001b; Hussain *et al.*, 1995; Sohal *et al.*, 1994). Gründe für diese gegensätzlichen Befunde könnten speziesspezifische Unterschiede im Verlauf der Alterungsprozesse oder die verschiedenen Alter der Tiere sein (Serrano und Klann, 2004), da Rao *et al.* in seiner Studie Ratten im Alter von 5-37 Monaten untersuchte (Rao *et al.*, 1990), wohingegen Hamilton *et al.* Untersuchungen an Mäusen im Alter von 6-26 Monaten durchführte (Hamilton *et al.*, 2001b). Zudem haben alle diese Studien die Enzyme in Gesamthirnen untersucht. Die antioxidative Situation spezifisch in alternden NPCs wurde meines Wissens nach bisher nicht geprüft. Zudem handelt es sich um Gehirne

des Nagers, welche nicht notwendigerweise die gleichen Alternsmerkmale aufweisen müssen wie Zellen des Menschen.

Ob die verminderte Proliferation gealterter hNPC auf diese verringerte antioxidative Abwehr zurückzuführen ist, ist nicht bekannt. In der Maus führt jedoch eine Überexpression der SOD1 in alten Mäusen zur Zunahme der Proliferation der NPCs (Takemura *et al.*, 2006), was diese Hypothese untermauert.

Aus den Befunden, dass gealterte hNPCs verminderte ROS-Detoxifizierungskapazitäten haben, ergab sich die Frage, ob diese ROS-Akkumulation auch an der verminderten hNPC-Differenzierung beteiligt sein könnte. Mechanistisch könnte man dies entweder über eine verminderte Differenzierung in Neuronen/Oligodendrozyten -Linien oder über einen vermehrten Zelltod junger, neu gebildeter Neurone/Oligodendrozyten erklären. Neueste Studien belegen, dass während der Neurogenese in neuralen Progenitorzellen oxidativer Stress entsteht (Walton *et al.*, 2012). Dies gepaart mit dem hier (Abbildung 4.17) und auch in einigen Studien *in vivo* gezeigtem Verlust der für die antioxidative Abwehr verantwortlichen Enzyme im Alter (Devi und Kiran, 2004; O'Donnell *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1990; Semsei *et al.*, 1991) lässt die Hypothese zu, dass ROS möglicherweise an dem Verlust von Differenzierungsprozessen im Alter beteiligt ist. Der Verlust der neuronalen Differenzierung könnte dabei über eine Redox-abhängige Verschiebung der Mash1-Signaltransduktion geschehen (Prozorovski *et al.*, 2008). Alternativ könnte jedoch auch Zelltod junger, neu gebildeter Zellen zu dem Differenzierungsverlust führen, da Neurone wie auch Oligodendrozyten besonders empfindlich auf oxidativen Stress reagieren (Back *et al.*, 1998; Buckman *et al.*, 1993; Dringen, 2000; Husain und Juurlink, 1995; Richter-Landsberg und Vollgraf, 1998; They *et al.*, 1991) (Abbildung 4.4). Allerdings scheinen die *in vitro* aus hNPCs gebildeten Oligodendrozyten sensitiver auf oxidativen Stress zu reagieren als die Neurone, da schon nach drei Monaten in Kultur nach hNPC-Differenzierung keine Oligodendrozyten mehr gefunden werden (Abbildung 4.5). Dies fällt zeitlich mit der fehlenden Regulation von SOD und CAT und der verminderten Induktion der GPx durch oxidativen Stress zusammen, was ein Hinweis auf einen Kausalzusammenhang sein könnte (Abbildung 4.16 B). Im Gegensatz dazu sind nach drei Monaten in Kultur in den differenzierenden hNPCs zwar weniger, aber durchaus noch Neurone zu finden, was auf eine erhöhte Empfindlichkeit der Oligodendrozyten im Vergleich zu den Neuronen hinweist. Dass

Oligodendrozyten sensitiver auf oxidativen Stress reagieren als Neurone konnte auch schon in Ratten-Neuronen- und Oligodendrozyten-Kulturen beobachtet werden (Ibarretxe *et al.*, 2006). Gründe hierfür könnten in dem zellulären Aufbau der Oligodendrozyten liegen. Die Lipidmembran der Oligodendrozyten ist ein gutes Ziel für Lipidperoxidation, welche im Folgenden zum Funktionsverlust dieser Zellen führt (Bongarzone *et al.*, 1995). Auch haben Oligodendrozyten einen hohen Eisengehalt, welcher die Fenton-Reaktion katalysiert und somit zu vermehrtem oxidativen Stress beiträgt (Liochev und Fridovich, 1999).

5.3 Die Rolle von Nrf2 in der Alterung von NPCs

Da gealterte hNPCs antioxidative Enzyme auf mRNA-Ebene vermindert exprimieren, wurde als nächstes der diese Gentranskription regulierende Transkriptionsfaktor Nrf2 untersucht (Kanninen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2003b; Lee *et al.*, 2003a). Dabei zeigte sich in Western-Blot-Analysen sowie in der Immunzytochemie, dass gealterte hNPC eine eingeschränkte Nrf2 Funktion haben, da nach Belastung mit H₂O₂ oder TCHQ das Protein eingeschränkt bzw. gar nicht mehr sichtbar wird (Abbildung 4.19). Das bedeutet, dass der proteasomale Abbau von Nrf2 durch oxidativen Stress nicht mehr blockiert wird, da die Nrf2 und Keap1 mRNA-Expression auch in gealterten hNPCs mit oder ohne oxidativen Stress unverändert bleibt (Abbildung 4.22). Um zu untersuchen, ob Nrf2 an den beobachteten Funktionsverlusten von hNPCs beteiligt ist, habe ich Nrf2 durch lentiviralen Gen-*Knockdown* (Nrf2-KO) in hNPCs ausgeschaltet. Dieser Nrf2-KO resultierte – wie erwartet – in einer Verringerung der basalen Expression der Zielgene GPx, SOD und CAT (Abbildung 4.25), was neben der Nrf2-mRNA-Expression der Kontrolle des *Knockdowns* diene. Untersuchungen der Proliferations- sowie der Differenzierungskapazitäten der Nrf2-KO versus der Leervektorkontrollen zeigten eindrucksvoll, dass – ähnlich der in Kultur gealterten NPCs – reduziertes Nrf2 zu einer verminderten Proliferation sowie gehemmten neuronalen Differenzierung führt (Abbildung 4.26). Daraus lässt sich schließen, dass Nrf2 an dem hNPC-Funktionsverlust während der physiologischen Hirnalterung beteiligt ist.

Auch *in vivo* gibt es bereits Hinweise über eine Mitwirkung von Nrf2 an zellulären Alterungsprozessen. So zeigen z.B. Nrf2-defiziente Mäuse im Alter vermehrte neurodegenerative Veränderungen des ZNS (Nguyen *et al.*, 2009). Andererseits nimmt auch die Expression von Nrf2 im Gehirn und in der Leber mit dem Alter ab (Li *et al.*, 2012; Shih und Yen, 2007; Suh *et al.*, 2004). Die genauen molekularen Signalwege, über die Nrf2-Verlust zu verminderter hNPC-Proliferation und gestörter Differenzierung führt, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Untersuchungen in SH-SY5Y-Zellen sowie in *ex vivo* Kulturen aus Nrf2-defizienten Mäusen zeigten jedoch, dass Nrf2 an der Expression der neuronalen Markerproteine MAP2 und NF-M beteiligt ist (Zhao *et al.*, 2009). Inwieweit dieser Signalweg auch bei den hNPCs eine Rolle spielt, bzw. bei den beobachteten Alterungsprozessen gestört ist, muss noch geklärt werden. Ein weiterer möglicher Signalweg ist die Steuerung der Proliferation über das Nrf2-abhängige Gen Prx-I. Eine Überexpression von Prx-I in Lymphom-Zellen führte zu einer gesteigerten Proliferationsrate, da es unter physiologischen Bedingungen mit den Zellzyklus-Kontrollgenen c-Myc und c-Abl interagiert (zusammengefasst in Immenschuh und Baumgart-Vogt, 2005).

Desweiteren bleibt die Frage offen, warum Nrf2 in der alternden Zelle nicht mehr in vollem Umfang posttranslational reguliert wird. Da die Regulierung von Nrf2 von vielen Molekülen und Signalwegen gesteuert wird, sind all diese mögliche Ursachen des alternsassozierten Nrf2-Verlusts und sollen hier kurz diskutiert werden. So ist Nrf2 unter basalen Bedingungen an seinen zytoplasmatischen Inhibitor Keap1 gebunden (Itoh *et al.*, 1999; Sykiotis und Bohmann, 2008a; Zhang, 2006) und hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten, da es durch die Keap1 gesteuerte Ubiquitinierung proteasomal abgebaut wird (Buckley *et al.*, 2003; Cullinan *et al.*, 2004; Furukawa und Xiong, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). Durch oxidativen Stress kommt es zu einer Konformationsänderung von Keap1, wodurch dieses dissoziiert und Nrf2 in den Zellkern transloziert (Kobayashi *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 2004; Zhang und Hannink, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Ein weiterer Faktor, der eine Rolle bei der Aktivierung von Nrf2 spielt, ist die posttranslationale Modifizierung von Nrf2 durch verschiedene Proteinkinasen wie PKC, MAPK, PERK, AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) (Cullinan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2002; Jain und Jaiswal, 2007; Keum *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2008;

Salazar *et al.*, 2006; Salminen und Kaarniranta, 2012; van Weeren *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1999). Welche dieser Mechanismen für die Inaktivierung von Nrf2 in alten Zellen verantwortlich sind, wird Gegenstand folgender Versuche sein. Mögliche Kandidaten dafür sind die Proteinkinasen. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass AMPK mit dem Alter der Zellen abnimmt (Salminen und Kaarniranta, 2012). Die Kinase GSK-3 β könnte ebenfalls eine Rolle beim Verlust der Nrf2-Aktivität im Alter spielen. So reguliert GSK-3 β den Abtransport von Nrf2 aus dem Zellkern (Salazar *et al.*, 2006). Neuste Daten deuten darauf hin, dass PI3K/Akt durch Phosphorylierung GSK-3 β inaktiviert und somit den Abtransport aus dem Zellkern verhindert (Rojo *et al.*, 2008; van Weeren *et al.*, 1998). SA-Mäuse (*Senescence-accelerated mouse*), welche prä-matur altern, zeigen in einem Alter von zehn Monaten einen Rückgang von phosphoryliertem GSK-3 β in der Leber (Tomobe *et al.*, 2012). Dies könnte zu einem gesteigerten Abtransport von Nrf2 aus dem Zellkern, akzeleriertem proteasomalem Abbau von Nrf2 und somit zu einer verminderten Transkription der antioxidativen Enzyme führen. Desweiteren wurde bei diesen Tieren auch eine Verminderung der MAPK gemessen (Shih *et al.*, 2010). Ein weiterer Weg, der zu altersbedingter Inaktivierung von Nrf2 führen könnte, läuft über Komponenten des Transkriptionsfaktors Nuklear-Faktor- κ B (NF- κ B). So konnte in verschiedenen Studien in unterschiedlichen Geweben von Nagern, wie Gehirn, Leber und Milz, eine Hochregulierung der Bindungskapazität von NF- κ B mit dem Alter verifiziert werden (Helenius *et al.*, 2001; Korhonen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997; Toliver-Kinsky *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe um Helenius zeigen, dass diese altersbedingte Veränderung von NF- κ B in Zusammenhang mit dem erhöhten Proteinlevel von p52 und p65 steht (Helenius *et al.*, 2001). Aktuelle Untersuchungen belegen, dass p65 in der Lage ist, die Nrf2-Aktivierung zu unterdrücken (Liu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011).

Inwieweit diese Signalmoleküle für den Nrf2 Funktionsverlust von hNPCs verantwortlich sind, ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.4 Abschließende Bewertung der hNPCs als *in vitro* Alterungsmodell und deren Einsatz in Substanztestungen

Die Etablierung der Neurosphären als *in vitro* Alterungsmodell konnte im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen werden. So zeigen die in Kultur gealterten hNPCs denselben Alterungsphänotyp, welcher auch *in vivo* beobachtet wird, nämlich proliferative Seneszenz und verminderte Neurogenese. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 maßgeblich an diesen Veränderungen beteiligt ist. Da eine große Menge an Substanzen, wie z.B. Naturstoffe, aber auch Pharmaka die Nrf2-Aktivität beeinflussen können (Collins *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2009; Habeos *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Noyan-Ashraf *et al.*, 2008; Papandreou *et al.*, 2011; Sykiotis und Bohmann, 2010), ist es nun möglich, mit diesem Zellmodell Substanzscreenings durchzuführen. Diese dienen dem Ziel, Substanzen zu identifizieren, welche die Nrf2-Funktion beeinflussen und somit möglicherweise die Alterung der hNPCs verlangsamen könnten. Da allerdings diese Testmethode bei manueller Durchführung mit einem großen Zeitaufwand verbunden ist und für ein Substanzscreening ein hoher Probendurchsatz erforderlich ist, wurde die automatische Sortier- und Ausplattierungsmaschine COPASTM (*Complex Object Parametric Analyzer and Sorter*, von Union Biometrica Inc.) auf die Fähigkeit hin getestet, Neurosphären einer bestimmten Größe auszuplattieren und damit den Probendurchsatz zu erhöhen. Die durchgeführten Arbeiten (Abbildung 4.27- 4.31) zeigten, dass sich die COPASTM-Maschine zum Sortieren und Ausplattieren von Neurosphären in 96-Well-Platten eignet. Keine der Parameter, die mit COPASTM im Vergleich zu manuell ausplattierten Sphären getestet wurden, wurde durch das mechanische Ausplattieren beeinflusst. Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass durch das COPASTM das Sortieren und Ausplattieren der Sphären automatisiert und dadurch ein höherer Probendurchsatz mit dem Neurosphären-Modell realisiert werden kann, was ein Substanzscreening in diesem Zellmodell zukünftig möglich macht.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden humane Neurosphären als *in vitro* Alterungsmodell etabliert, da sie die *in vivo* im Alter beobachtete Reduktion der NPC-Proliferation wie auch der adulten Neurogenese widerspiegeln. Ferner wurde ein Funktionsverlust von Nrf2 als zu Grunde liegender Mechanismus der NPC-Alterung identifiziert. Jedoch blieben bei dieser Arbeit die folgenden Fragen offen: (i) Warum verlieren *in vitro* gealterte hNPCs die Kapazität auf oxidativen Stress zu reagieren und welche Mechanismen sind daran beteiligt? (ii) Weshalb kommt es durch die reduzierte Nrf2-Aktivität zum Verlust der Differenzierungskapazität und zu einer verringerten Proliferation? (iii) Kann eine Langzeit-Exposition mit chemischen Substanzen (niedrige Dosis) zu vorzeitigen Alterungsprozessen durch Störung des Nrf2-Signalwegs in hNPCs führen? Diese Fragen werden in einem Anschlussprojekt geklärt.

Zudem werden aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden in den Alterungsprozessen die Ergebnisse der humanen NPCs auf Nager-NPCs ausgeweitet. Damit wird die Möglichkeit eröffnet, Neurosphären aus Nrf2-defizienten Tieren zu präparieren und die daraus resultierenden Daten mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Dissertation angefertigt wurden, zu vergleichen. Dies eröffnet dann im Sinne des Parallelogramm-Ansatzes die Möglichkeit innerhalb des Nagers *in vivo* mit *in vitro* Daten zu vergleichen und zusätzlich über die *in vitro* Versuche den Speziesvergleich zwischen Maus und Mensch durchzuführen. Dieser Gesamtansatz wird die Bedeutung der Maus *in vivo* Daten für den Menschen hervorbringen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die basale Genexpression der Gene CAT, GP und SOD in den SH-SY5Y-Zellen deutlich geringer ist als bei den hNPCs und dass diese Gene in den SH-SY5Y-Zellen nicht induzierbar sind. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse ebenfalls, dass H₂O₂ Caspase-unabhängige Apoptose in hNPCs sowie in SH-SY5Y-Zellen induziert. Welche Signalwege die Caspase-unabhängige Apoptose nach einer H₂O₂-Exposition in den hNPCs verursachen ist nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung

Eine wahrscheinliche Ursache der ‚normalen‘, physiologischen Alterung des Gehirns ist der Funktionsverlust neuraler Progenitorzellen (NPC) im adulten Gehirn, der mit reduzierter NPC-Proliferation sowie verminderter Neurogenese einhergeht. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass diese verminderte regenerative Kapazität des Gehirns zur Beeinträchtigung von kognitiven Funktionen führt, die auch beim Menschen im Alter beobachtet werden. Im Einklang mit der bereits 1956 veröffentlichten ‚Free Radical Theory of Aging‘, welche postuliert, dass oxidativer Stress ursächlich an zellulären Alterungsprozessen beteiligt ist, entwickelte sich so die Hypothese, dass auch die Alterung von NPCs des Menschen durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) getriggert wird. Die molekularen Mechanismen, die solch einer NPC-Alterung zu Grunde liegen, sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Daher waren es die Ziele der vorliegenden Dissertation, (i) ein humanes Zellmodell zu etablieren, welches Alterungsprozesse von NPCs *in vitro* abbildet, (ii) in diesem Zellsystem die antioxidativen Kapazitäten junger versus gealterter humaner NPCs zu untersuchen und (iii) die Rolle des Transkriptionsfaktors und Masterregulators der antioxidativen Abwehr Nrf2 bei der Alterung humaner NPCs aufzuklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Kultur gealterte hNPCs einen Alterungsphänotyp aufweisen, welcher auch *in vivo* in gealterten Gehirnen beobachtet wird und mit der Akkumulation von β -Galaktosidase, einem etablierten Alterungsmarker, einhergeht. So haben gealterte NPCs eine verminderte Proliferationsrate, die von einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21 sowie einer verringerten Expression des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors begleitet wird. Zudem ist die Differenzierungskapazität von gealterten NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten reduziert. Diese gealterten NPCs waren zudem deutlich sensibler gegenüber durch H_2O_2 und Tetrachlorhydrochinon (TCHQ) generiertem oxidativen Stress als junge NPCs, da sie bei niedrigeren Konzentrationen dieser Substanzen an Viabilität verloren. Real-Time-PCR-Analysen von jungen und gealterten NPCs, die mit nicht zytotoxischen Konzentrationen von H_2O_2 und TCHQ belastet wurden, ergaben, dass in den gealterten Zellen Genprodukte der antioxidativen Abwehr, nämlich der Superoxiddismutase (SOD1), Catalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) nicht induziert werden. Dies entspricht der Reaktion der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, welche auch nicht mit einer vermehrten Transkription dieser Genprodukte auf ROS reagiert und bereits bei niedrigeren Konzentrationen als junge NPCs den Weg des Zelltods beschreitet. Untersuchungen zur Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors und Masterregulators der antioxidativen Abwehr Nrf2, welcher die Expression von SOD1, CAT und GPx reguliert, bestätigten das Vorhandensein von Nrf2 in jungen und gealterten NPCs. Allerdings verloren die alten NPCs die Fähigkeit Nrf2 nach oxidativem Stress zu stabilisieren und somit dem proteasomalen Abbau zu entziehen. Dieser Verlust der posttranslationalen Regulation von Nrf2 ist zum Einen für die mangelnde Adaptation humaner NPCs gegenüber oxidativem Stress verantwortlich, zum Anderen vermittelt er auch den Funktionsverlust der NPCs, da ein Nrf2-Gen-Knockdown die Proliferation und die neuronale Differenzierung reduziert und somit den Alterungsphänotyp reproduziert.

Die Daten dieser Arbeit zeigen also, dass (i) hNPCs *in vitro* altern und somit ein geeignetes Zellmodell darstellen, um molekulare Mechanismen von Alterungsprozessen zu untersuchen, (ii) gealterte hNPCs ROS-detoxifizierende Kapazitäten verlieren und (iii) der Funktionsverlust der Nrf2-Regulation an der Alterung humaner NPCs beteiligt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Neurosphärenmodell ein vielversprechendes *in vitro* Alterungsmodell ist, welches klare Vorteile gegenüber anderen verfügbaren Modellen aufweist.

Abstract

A probable reason of ‚normal‘ physiological brain aging is the loss of function of neural progenitor cells (NPC) in the adult brain, which is attended by a reduced NPC proliferation as well as a reduced neurogenesis. Animal experimental studies demonstrated that this reduced regenerative capacity of the brain leads to an impairment of cognitive functions, which is also observed in aged humans. In accordance with the 1956 published „Free Radical Theory of Aging“ asserting that oxidative stress is causatively involved in cellular aging processes, the hypothesis evolved that the aging of the humans NPC is triggered by increased reactive oxygen species (ROS) as well. However, the molecular mechanisms that underlie this NPC aging are mainly unknown.

Therefore the aims of this dissertation were to (i) establish a human cell model which mimics aging processes of NPC *in vitro*, (ii) to analyze the antioxidant capacities of young versus aged human NPC in this cell system and (iii) to elucidate the role of Nrf2, a transcription factor and master regulator of the antioxidant resistance, in the aging of human NPC.

The results of this thesis demonstrate that hNPC aged in culture possess an aging phenotype that is also visible *in vivo* in aged brains and that is associated by the accumulation of β -galaktosidase, an established aging marker. Thus, aged NPC have a reduced proliferation rate accompanied by an increased expression of the cell cycle inhibitor p21 as well as a reduced expression of the epidermal growth factor receptor. Furthermore the differentiation capacity of aged NPC to neurons and oligodendrocytes is reduced. In addition these aged NPC were significantly more sensitive to oxidative stress generated by H₂O₂ and tetrachlorohydrochinon (TCHQ) as young NPC as they showed a loss of cell viability at lower concentrations of these substances than the young ones. Real-Time-PCR-analyses of young and aged NPC exposed to non-cytotoxic concentrations of H₂O₂ and TCHQ revealed that gene products of the antioxidant defence, namely of superoxide dismutase (SOD1), catalase (CAT) and glutathion peroxidase (GPx), are not induced in aged NPCs. This correlates with the reaction of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y which also does not react with an increased transcription of these genes after ROS and already undergoes apoptosis at even lower concentrations than the young NPC. Studies about the expression and function of the transcription factor and master regulator of the antioxidant defence Nrf2 that regulates the expression of SOD1, CAT and GPx, confirm the existence of Nrf2 in young and aged NPC. However, the old NPCs lost their capability to stabilize Nrf2 after oxidative stress and consequently to withdraw it from proteasomal degradation. This loss of the posttranslational regulation of Nrf2 is on the one hand responsible for the inadequate adaption of human NPC to oxidative stress and on the other hand it mediates the functional loss of the NPC as a Nrf2 gene knockdown reduces the proliferation and the neuronal differentiation of NPC and hence reproduces the aging phenotype.

Thus, the data of this thesis demonstrate that (i) hNPC age *in vitro* and therefore are a suitable cell model to research molecular mechanism of aging processes, (ii) that aged hNPC lose ROS detoxification capacity and (iii) that the functional loss of the Nrf2 regulation is involved in the aging of human NPCs.

In conclusion, it can be stated that the neurosphere model is a promising *in vitro* aging model that features clear advantages compared to other available models.

Literaturverzeichnis

- 1 Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z: Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29:4408-4419 (2009).
- 2 Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM: Cell culture models of oxidative stress and injury in the central nervous system. *Curr Neurovasc Res* 2:73-89 (2005).
- 3 Aksenova MV, Aksenov MY, Markesbery WR, Butterfield DA: Aging in a dish: age-dependent changes of neuronal survival, protein oxidation, and creatine kinase BB expression in long-term hippocampal cell culture. *J Neurosci Res* 58:308-317 (1999).
- 4 Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634 (2002).
- 5 Artegiani B, Calegari F: Age-related cognitive decline: can neural stem cells help us? *Aging (Albany NY)* 4:176-186 (2012).
- 6 Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR: Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J* 418:29-37 (2009).
- 7 Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ: Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 18:6241-6253 (1998).
- 8 Bains JS, Shaw CA: Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* 25:335-358 (1997).
- 9 Ballal A, Manna AC: Regulation of superoxide dismutase (sod) genes by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 191:3301-3310 (2009).
- 10 Bandtlow CE, Zimmermann DR: Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267-1290 (2000).

- 11 Barja G: The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34:227-233 (2002).
- 12 Baumann N, Pham-Dinh D: Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927 (2001).
- 13 Biedler JL, Helson L, Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-2652 (1973).
- 14 Biswal S., Butland S.L., Harvey C.J.: NFE2L2 Transcription Factor Encyclopedia 2012).
- 15 Bongarzone ER, Pasquini JM, Soto EF: Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 41:213-221 (1995).
- 16 Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Berard K, Fernandes KJ: Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173:135-149 (2011).
- 17 Brannen CL, Sugaya K: In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium. *Neuroreport* 11:1123-1128 (2000).
- 18 Breier JM, Gassmann K, Kayser R, Stegeman H, De GD, Fritsche E, Shafer TJ: Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: state of the science. *Neurotoxicol Teratol* 32:4-15 (2010).
- 19 Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H: Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 26:256-267 (2005).
- 20 Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K: Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 273:5279-5287 (1998).

-
- 21 Brigelius-Flohe R: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951-965 (1999).
 - 22 Brown JP, Wei W, Sedivy JM: Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277:831-834 (1997).
 - 23 Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF: Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646-653 (1997).
 - 24 Buckley BJ, Marshall ZM, Whorton AR: Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 307:973-979 (2003).
 - 25 Buckman TD, Sutphin MS, Mitrovic B: Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. *J Neurochem* 60:2046-2058 (1993).
 - 26 Butterfield DA, Kanski J: Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 122:945-962 (2001).
 - 27 Cadenas E, Davies KJ: Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230 (2000).
 - 28 Cameron HA, McKay R: Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 8:677-680 (1998).
 - 29 Cejkova J, Vejrazka M, Platenik J, Stipek S: Age-related changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase activities in the rabbit cornea. *Exp Gerontol* 39:1537-1543 (2004).
 - 30 Chan JY, Kwong M: Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1517:19-26 (2000).
 - 31 Chautard E, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S: Interaction networks as a tool to investigate the mechanisms of aging. *Biogerontology* 11:463-473 (2010).

- 32 Choksi KB, Roberts LJ, DeFord JH, Rabek JP, Papaconstantinou J: Lower levels of F2-isoprostanes in serum and livers of long-lived Ames dwarf mice. *Biochem Biophys Res Commun* 364:761-764 (2007).
- 33 Chung HY, Song SH, Kim HJ, Ikeno Y, Yu BP: Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation. *J Nutr Health Aging* 3:19-23 (1999).
- 34 Chung S, Shin BS, Hwang M, Lardaro T, Kang UJ, Isacson O, Kim KS: Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* 24:1583-1593 (2006).
- 35 Chvatal A, Pastor A, Mauch M, Sykova E, Kettenmann H: Distinct populations of identified glial cells in the developing rat spinal cord slice: ion channel properties and cell morphology. *Eur J Neurosci* 7:129-142 (1995).
- 36 Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA: Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res* 104:e42-e54 (2009).
- 37 Craik FI, Byrd M, Swanson JM: Patterns of memory loss in three elderly samples. *Psychol Aging* 2:79-86 (1987).
- 38 Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA: The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24:8477-8486 (2004).
- 39 Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA: Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23:7198-7209 (2003).
- 40 de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I: Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 273:22528-22536 (1998).
- 41 Desagher S, Glowinski J, Premont J: Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16:2553-2562 (1996).

-
- 42 Devi SA, Kiran TR: Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging* 25:501-508 (2004).
 - 43 Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, .: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367 (1995).
 - 44 Dringen R: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671 (2000).
 - 45 Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95 (2002).
 - 46 Duan W, Zhang R, Guo Y, Jiang Y, Huang Y, Jiang H, Li C: Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45:388-397 (2009).
 - 47 Düzel S: *Gesundes Altern und Gedechnis: Der Einfluss neuromodulatorischer und psychosozialer Faktoren* 2010).
 - 48 Egger AL, Gay KA, Mesecar AD: Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1:S84-S94 (2008).
 - 49 Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M: High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59:169-177 (2001).
 - 50 Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S: Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365 (2004).
 - 51 Erickson CA, Barnes CA: The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38:61-69 (2003).

- 52 Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317 (1998a).
- 53 Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317 (1998b).
- 54 Fahn S, Cohen G: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32:804-812 (1992).
- 55 Favreau LV, Pickett CB: Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *J Biol Chem* 268:19875-19881 (1993).
- 56 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413-7417 (1987).
- 57 Fillit HM, Butler RN, O'Connell AW, Albert MS, Birren JE, Cotman CW, Greenough WT, Gold PE, Kramer AF, Kuller LH, Perls TT, Sahagan BG, Tully T: Achieving and maintaining cognitive vitality with aging. *Mayo Clin Proc* 77:681-696 (2002).
- 58 Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247 (2000).
- 59 Frautschy SA, Baird A, Cole GM: Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8362-8366 (1991).
- 60 Freeman TC, Lee K, Richardson PJ: Analysis of gene expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol* 10:579-582 (1999).
- 61 Fritsche E, Cline JE, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J: Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ Health Perspect* 113:871-876 (2005).

-
- 62 Fritsche E, Gassmann K, Schreiber T: Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing. *Methods Mol Biol* 758:99-114 (2011).
- 63 Furukawa M, Xiong Y: BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* 25:162-171 (2005).
- 64 Gage FH: Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438 (2000).
- 65 Gage FH: Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612-613 (2002).
- 66 Galvan V, Jin K: Neurogenesis in the aging brain. *Clin Interv Aging* 2:605-610 (2007).
- 67 Gassmann K: Nahrungsmittelbestandteile als Modulatoren der neuronalen Entwicklung: Rolle des AhR 2009).
- 68 Gassmann K, Abel J, Bothe H, Haarmann-Stemmann T, Merk HF, Quasthoff KN, Rockel TD, Schreiber T, Fritsche E: Species-specific differential AhR expression protects human neural progenitor cells against developmental neurotoxicity of PAHs. *Environ Health Perspect* 118:1571-1577 (2010).
- 69 Gassmann K, Baumann J, Giersiefer S, Schuwald J, Schreiber T, Merk HF, Fritsche E: Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D in vitro applications. *Toxicol In Vitro* 26:993-1000 (2012).
- 70 Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D: Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:959-975 (2001).
- 71 Giudice A, Montella M: Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays* 28:169-181 (2006).
- 72 Gould E, Tanapat P: Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436 (1997a).
- 73 Gould E, Tanapat P: Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436 (1997b).

- 74 Grazioli V, Schiavo R, Casari E, Marzatico F, Baena R, Gaetani P: Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* 431:149-153 (1998).
- 75 Habeos IG, Ziros PG, Chartoumpekis D, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG: Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med (Berl)* 86:1279-1285 (2008).
- 76 Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF: Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37:529-534 (2001a).
- 77 Hamilton ML, Van RH, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A: Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10469-10474 (2001b).
- 78 Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300 (1956).
- 79 Harman D: Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067:10-21 (2006).
- 80 He X, Lin GX, Chen MG, Zhang JX, Ma Q: Protection against chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis by Nrf2. Recruiting Nrf2 into the nucleus and disrupting the nuclear Nrf2/Keap1 association. *Toxicol Sci* 98:298-309 (2007).
- 81 Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ: Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging* 25:361-375 (2004).
- 82 Helenius M, Kyrylenko S, Vehvilainen P, Salminen A: Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity. *Antioxid Redox Signal* 3:147-156 (2001).
- 83 Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P: Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 53:209-219 (2004).

-
- 84 Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv I, Melamed E, Offen D: Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem* 71:741-748 (1998).
- 85 Huang HC, Nguyen T, Pickett CB: Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769-42774 (2002).
- 86 Husain J, Juurlink BH: Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain Res* 698:86-94 (1995).
- 87 Hussain S, Slikker W, Jr., Ali SF: Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 13:811-817 (1995).
- 88 Ibarretxe G, Sanchez-Gomez MV, Campos-Esparza MR, Alberdi E, Matute C: Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glia* 53:201-211 (2006).
- 89 Immenschuh S, Baumgart-Vogt E: Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal* 7:768-777 (2005).
- 90 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y: An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236:313-322 (1997).
- 91 Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13:76-86 (1999).
- 92 Jacobson BS, Branton D: Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science* 195:302-304 (1977).
- 93 Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK: Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* 280:29158-29168 (2005).

- 94 Jain AK, Jaiswal AK: GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem* 282:16502-16510 (2007).
- 95 Jesberger JA, Richardson JS: Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci* 57:1-17 (1991).
- 96 Jin K, Sun Y, Xie L, Batteur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA: Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2:175-183 (2003).
- 97 Jodar L, Mercken EM, Ariza J, Younts C, Gonzalez-Reyes JA, Alcain FJ, Buron I, de CR, Villalba JM: Genetic deletion of Nrf2 promotes immortalization and decreases life span of murine embryonic fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66:247-256 (2011).
- 98 Kanninen K, White AR, Koistinaho J, Malm T: Targeting Glycogen Synthase Kinase-3beta for Therapeutic Benefit against Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Involvement of the Nrf2-ARE Pathway. *Int J Alzheimers Dis* 2011:985085 (2011).
- 99 Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22:287-294 (2001).
- 100 Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212 (1998).
- 101 Keum YS, Owuor ED, Kim BR, Hu R, Kong AN: Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharm Res* 20:1351-1356 (2003).
- 102 Kim HJ, Barajas B, Wang M, Nel AE: Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 121:1255-1261 (2008).
- 103 Kim HJ, Vaziri ND: Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F662-F671 (2010).

-
- 104 Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M: Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26:221-229 (2006).
- 105 Kohle C, Bock KW: Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 72:795-805 (2006).
- 106 Korhonen P, Helenius M, Salminen A: Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci Lett* 225:61-64 (1997).
- 107 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* 16:2027-2033 (1996).
- 108 Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD: Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 20):3613-3622 (2000).
- 109 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970).
- 110 Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA: Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 278:12029-12038 (2003a).
- 111 Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA: Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276:20011-20016 (2001).
- 112 Lee JM, Shih AY, Murphy TH, Johnson JA: NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 278:37948-37956 (2003b).
- 113 Lee WH, Kumar A, Rani A, Herrera J, Xu J, Someya S, Foster TC: Influence of viral vector-mediated delivery of superoxide dismutase and catalase to the hippocampus on spatial learning and memory during aging. *Antioxid Redox Signal* 16:339-350 (2012).

- 114 Lehr U: Alterung der Bevölkerung 2007).
- 115 Leuner B, Kozorovitskiy Y, Gross CG, Gould E: Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17169-17173 (2007).
- 116 Li Q, Harvey LM, McNeil B: Oxidative stress in industrial fungi. *Crit Rev Biotechnol* 29:199-213 (2009).
- 117 Li W, Jain MR, Chen C, Yue X, Hebbar V, Zhou R, Kong AN: Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem* 280:28430-28438 (2005).
- 118 Li W, Yu SW, Kong AN: Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* 281:27251-27263 (2006).
- 119 Li XH, Li CY, Lu JM, Tian RB, Wei J: Allicin ameliorates cognitive deficits ageing-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways. *Neurosci Lett* 514:46-50 (2012).
- 120 Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR: Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107:603-613 (2001).
- 121 Lim DA, Alvarez-Buylla A: Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7526-7531 (1999).
- 122 Lindenberger U, Nagel IE, Chicherio C, Li SC, Heekeren HR, Backman L: Age-related decline in brain resources modulates genetic effects on cognitive functioning. *Front Neurosci* 2:234-244 (2008).
- 123 Liochev SI, Fridovich I: Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* 48:157-161 (1999).
- 124 Liu GH, Qu J, Shen X: NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta* 1783:713-727 (2008).

-
- 125 Liu J, Mori A: Stress, aging, and brain oxidative damage. *Neurochem Res* 24:1479-1497 (1999).
- 126 Liu Y, Rao MS: Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell* 96:279-290 (2004).
- 127 Liu Z, Martin LJ: Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 459:368-391 (2003).
- 128 Lobo MV, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paino CL, Reimers D, Bazan E: Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *J Histochem Cytochem* 51:89-103 (2003).
- 129 LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275 (1951).
- 130 Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC: The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139-152 (2006).
- 131 Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32:367-381 (2001).
- 132 Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJ: Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 62:45-53 (1994).
- 133 Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P: Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827:65-75 (2005).
- 134 Marini MG, Chan K, Casula L, Kan YW, Cao A, Moi P: hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2. *J Biol Chem* 272:16490-16497 (1997).
- 135 Marlatt M, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X: Sources and mechanisms of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:81-87 (2004).

- 136 Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez dC, I: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603 (1999).
- 137 Matlung HL, Bakker EN, Vanbavel E: Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxid Redox Signal* 11:1699-1709 (2009).
- 138 McDonald HY, Wojtowicz JM: Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385:70-75 (2005).
- 139 McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71 (1997).
- 140 Miguel F, Augusto AC, Gurgueira SA: Effect of acute vs chronic H₂O₂-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free Radic Res* 43:340-347 (2009).
- 141 Ming GL, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250 (2005).
- 142 Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9926-9930 (1994).
- 143 Monje M: Cranial radiation therapy and damage to hippocampal neurogenesis. *Dev Disabil Res Rev* 14:238-242 (2008).
- 144 Monje M, Dietrich J: Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behav Brain Res* 227:376-379 (2012).
- 145 Moors M, Cline JE, Abel J, Fritsche E: ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:57-67 (2007).
- 146 Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, Schuwald J, Weinmann N, Fritsche E: Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect* 117:1131-1138 (2009).

-
- 147 Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962 (1998).
- 148 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* 13:1071-1082 (1994).
- 149 Mülhardt C: Expressionssysteme: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics, pp 235-242 2006a).
- 150 Mülhardt C: Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäure-lösung: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics, pp 41-45 2006b).
- 151 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273 (1986).
- 152 Murakami S, Salmon A, Miller RA: Multiplex stress resistance in cells from long-lived dwarf mice. *FASEB J* 17:1565-1566 (2003).
- 153 Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuen WJ, Uozumi T, Matsui T, Miyoshi Y, Date I: Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* 108:149-159 (2008).
- 154 Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT: Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2:1547-1558 (1989).
- 155 Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell DR, McEwen BS: NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 24:273-284 (2003).
- 156 Nguyen T, Nioi P, Pickett CB: The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284:13291-13295 (2009).

- 157 Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB: Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:233-260 (2003).
- 158 Niculescu AB, III, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18:629-643 (1998).
- 159 Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211:90-98 (1994).
- 160 Noyan-Ashraf MH, Sadeghinejad Z, Davies GF, Ross AR, Saucier D, Harkness TA, Juurlink BH: Phase 2 protein inducers in the diet promote healthier aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63:1168-1176 (2008).
- 161 O'Donnell E, Vereker E, Lynch MA: Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci* 12:345-352 (2000).
- 162 Ogryzko VV, Wong P, Howard BH: WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17:4877-4882 (1997).
- 163 Okano H: Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J Med* 51:115-128 (2002).
- 164 Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S: Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys* 374:24-34 (2000).
- 165 Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T: Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14:135-144 (1984).
- 166 Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG: Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience* 82:915-925 (1998).

-
- 167 Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M: Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* 219:197-204 (2011).
- 168 Park SK, Tedesco PM, Johnson TE: Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell* 8:258-269 (2009).
- 169 Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E: Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-308 (1999).
- 170 Piper DR, Mujtaba T, Rao MS, Lucero MT: Immunocytochemical and physiological characterization of a population of cultured human neural precursors. *J Neurophysiol* 84:534-548 (2000).
- 171 Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schroter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brustle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O: Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 10:385-394 (2008).
- 172 Rao G, Xia E, Richardson A: Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech Ageing Dev* 53:49-60 (1990).
- 173 Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T: Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:1134-1140 (2001).
- 174 Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710 (1992).
- 175 Richter-Landsberg C, Vollgraf U: Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 244:218-229 (1998).
- 176 Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A: GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105:192-202 (2008).

- 177 Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB: The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266:11632-11639 (1991).
- 178 Rushmore TH, Pickett CB: Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 265:14648-14653 (1990).
- 179 Sagara JI, Miura K, Bannai S: Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 61:1672-1676 (1993).
- 180 Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A: Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281:14841-14851 (2006).
- 181 Salinovich O, Montelaro RC: Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156:341-347 (1986).
- 182 Salminen A, Kaarniranta K: AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* 11:230-241 (2012).
- 183 Salmon AB, Murakami S, Bartke A, Kopchick J, Yasumura K, Miller RA: Fibroblast cell lines from young adult mice of long-lived mutant strains are resistant to multiple forms of stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E23-E29 (2005).
- 184 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989).
- 185 Sawada M, Carlson JC: Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev* 41:125-137 (1987).
- 186 Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J: UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* 378:1247-1257 (1997).

-
- 187 Schreiber T, Gassmann K, Gotz C, Hubenthal U, Moors M, Krause G, Merk HF, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J, Rose CR, Fritsche E: Polybrominated diphenyl ethers induce developmental neurotoxicity in a human in vitro model: evidence for endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 118:572-578 (2010).
- 188 Schroeder P, Gremmel T, Berneburg M, Krutmann J: Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. *J Invest Dermatol* 128:2297-2303 (2008).
- 189 Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T: Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10:1115-1126 (2008).
- 190 Seaberg RM, van der Kooy D: Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 22:1784-1793 (2002).
- 191 Seki T, Arai Y: Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482 (1995).
- 192 Semsei I, Rao G, Richardson A: Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev* 58:13-19 (1991).
- 193 Serrano F, Klann E: Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3:431-443 (2004).
- 194 Shen S, Liu A, Li J, Wolubah C, Casaccia-Bonnel P: Epigenetic memory loss in aging oligodendrocytes in the corpus callosum. *Neurobiol Aging* 29:452-463 (2008).
- 195 Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163 (1995).
- 196 Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC: Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 21:598-605 (2010).

- 197 Shih PH, Yen GC: Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology* 8:71-80 (2007).
- 198 Shruster A, Melamed E, Offen D: Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. *Apoptosis* 15:1415-1421 (2010a).
- 199 Shruster A, Melamed E, Offen D: Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. *Apoptosis* 15:1415-1421 (2010b).
- 200 Sidell N: Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68:589-596 (1982).
- 201 Sies H, Cadenas E: Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311:617-631 (1985).
- 202 Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H: Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 74:121-133 (1994).
- 203 Song H, Stevens CF, Gage FH: Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44 (2002).
- 204 Spencer NF, Poynter ME, Im SY, Daynes RA: Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. *Int Immunol* 9:1581-1588 (1997).
- 205 Squier TC: Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 36:1539-1550 (2001).
- 206 Statistisches Bundesamt Deutschland: Bevölkerungsvorausberechnung 2009).
- 207 Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM: Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3381-3386 (2004).

-
- 208 Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch CM, Zhang DD: KPNA6 (Importin α 7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol Cell Biol* 31:1800-1811 (2011).
- 209 Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD: Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* 27:6334-6349 (2007).
- 210 Sütterlin S: Demenz in Deutschland, Österreich und der Schweiz 2011).
- 211 Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T, Caldwell MA: A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 85:141-152 (1998).
- 212 Sykiotis GP, Bohmann D: Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 14:76-85 (2008a).
- 213 Sykiotis GP, Bohmann D: Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 14:76-85 (2008b).
- 214 Sykiotis GP, Bohmann D: Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 3:re3 (2010).
- 215 Takemura S, Kayama T, Kuge A, Ali H, Kokubo Y, Sato S, Kamii H, Goto K, Yoshimoto T: Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging and following focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 104:129-136 (2006).
- 216 Tanaka J, Toku K, Zhang B, Ishihara K, Sakanaka M, Maeda N: Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species. *Glia* 28:85-96 (1999).
- 217 Tegenge MA, Rockel TD, Fritsche E, Bicker G: Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 68:2089-2099 (2011).
- 218 Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F, Arinze IJ: Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 283:8984-8994 (2008).

- 219 Thery C, Chamak B, Mallat M: Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *Eur J Neurosci* 3:1155-1164 (1991).
- 220 Toescu EC: Normal brain ageing: models and mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2347-2354 (2005).
- 221 Toliver-Kinsky T, Papaconstantinou J, Perez-Polo JR: Age-associated alterations in hippocampal and basal forebrain nuclear factor kappa B activity. *J Neurosci Res* 48:580-587 (1997).
- 222 Tomobe K, Shinozuka T, Kuroiwa M, Nomura Y: Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3beta in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Arch Gerontol Geriatr* 54:e1-e7 (2012).
- 223 Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M: Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 387:1311-1320 (2006).
- 224 Trachootham D, Alexandre J, Huang P: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8:579-591 (2009).
- 225 Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P: Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10:1343-1374 (2008).
- 226 Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R, Blackwell TK: Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132:1025-1038 (2008).
- 227 Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA: Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661 (2001).
- 228 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84 (2007).
- 229 van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van LJ, Burgering BM: Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* 273:13150-13156 (1998).

-
- 230 van HJ, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE: Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1812:141-150 (2011).
- 231 Van RH, Williams MD, Guo Z, Estlack L, Yang H, Carlson EJ, Epstein CJ, Huang TT, Richardson A: Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1422-H1432 (2001).
- 232 Velichkova M, Hasson T: Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol* 25:4501-4513 (2005).
- 233 Vivar C, Potter MC, van PH: All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci* (2012).
- 234 Vogel C, Donat S, Dohr O, Kremer J, Esser C, Roller M, Abel J: Effect of subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on immune system and target gene responses in mice: calculation of benchmark doses for CYP1A1 and CYP1A2 related enzyme activities. *Arch Toxicol* 71:372-382 (1997).
- 235 Vogt M, Haggblom C, Yeargin J, Christiansen-Weber T, Haas M: Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 9:139-146 (1998).
- 236 Vukicevic V, Jauch A, Dinger TC, Gebauer L, Hornich V, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Muller AM: Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mech Ageing Dev* 131:124-132 (2010).
- 237 Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD: Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3:e2213 (2008).
- 238 Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2040-2045 (2004).

- 239 Walker TL, White A, Black DM, Wallace RH, Sah P, Bartlett PF: Latent stem and progenitor cells in the hippocampus are activated by neural excitation. *J Neurosci* 28:5240-5247 (2008).
- 240 Walton NM, Shin R, Tajinda K, Heusner CL, Kogan JH, Miyake S, Chen Q, Tamura K, Matsumoto M: Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. *PLoS One* 7:e35264 (2012).
- 241 Xu C, Li CY, Kong AN: Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28:249-268 (2005).
- 242 Xu C, Yuan X, Pan Z, Shen G, Kim JH, Yu S, Khor TO, Li W, Ma J, Kong AN: Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* 5:1918-1926 (2006).
- 243 Yankner BA, Lu T, Loerch P: The aging brain. *Annu Rev Pathol* 3:41-66 (2008).
- 244 Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, Yuan Y, Zhan Y, Xu W, Li W, Chen H, Ge C, Wang J, Yang X: Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal* 23:883-892 (2011).
- 245 Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AN: Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 274:27545-27552 (1999).
- 246 Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens* 22:2025-2033 (2004).
- 247 Zhang DD: Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38:769-789 (2006).
- 248 Zhang DD, Hannink M: Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23:8137-8151 (2003).

-
- 249 Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M: Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 24:10941-10953 (2004).
- 250 Zhao F, Wu T, Lau A, Jiang T, Huang Z, Wang XJ, Chen W, Wong PK, Zhang DD: Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radic Biol Med* 47:867-879 (2009).
- 251 Zhu BZ, Kitrossky N, Chevion M: Evidence for production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide: A metal-independent organic Fenton reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 270:942-946 (2000).

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer-Krankheit
A. dest.	Destilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
B27	Proliferationsmedium
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CAT	Katalase
cDNA	komplementäre DNA
cm²	Quadratzentimeter
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl₂	Carbonylchlorid
CTO	CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay
Cv	Kontrollvektor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxidd
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	Emission
Eppi	Ependorfgefäße
et al.	Und andere („et alii“)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktion
F12	Ham's Nut Mix F12
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
FW	Forward Primer
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GP	Glutathionperoxidase
GS	Goat Serum
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
hNPC	Zellen Normale Humane Neurale Progenitorzellen

H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lsg.	Lösung
m	Meter, milli
M	Molar
Max	Maximal
β-ME	β-Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
μg	Mikrogramm
Min.	Minute(n)
Mind.	Mindestens
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNS	Boten-RNS
mtDNS	mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPC	Neurale Progenitor Zellen
O₂	Sauerstoff
O₂^{•-}	Superoxid-Anion
OH[•]	Hydroxyl-Radikal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin-Hydrobromid
PFA	Para-Formaldehyd
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PUFA	Polyungesättigten Fettsäuren
PVDF	(Polyvinyliden-Difluorid)-Membran
RIPA	radio-immuno-precipitation-assay
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RW	Reverse Primer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time PCR

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
Sec.	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
SVZ	Subventriculären Zone
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TdT	Terminale Deoxynucleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
(v/v)	Volumenprozent
WB	Western-Blot
Well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
(w/v)	Gewichtsprozent

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Anzahl Demenzkranker je 100.000 Einwohner 2008 bis 2060.....	1
Abbildung 1.2: Zeitabhängiger Verlust der kognitiven Funktion und Belastbarkeit des Gehirns.....	3
Abbildung 1.3: Das zelluläre Schicksal von ROS.....	7
Abbildung 1.4: Proteasomaler Abbau von Nrf2.....	8
Abbildung 1.5: Darstellung des Nrf2-Signalwegs.....	10
Abbildung 1.6: Transkription von ARE-abhängigen Genen.....	12
Abbildung 1.7: Das Prinzip der <i>in vitro</i> -Generierung von Neurosphären.....	14
Abbildung 2.1: Plasmidkarte pLKO.1.....	22
Abbildung 2.2: Plasmidkarte pCMVDR8.91.....	22
Abbildung 2.3: Plasmidkarte pMD2.G.....	23
Abbildung 3.1: Passagieren der humanen Sphären durch Choppen.....	29
Abbildung 3.2: 400-fache Vergrößerung der SH-SY5Y-Zellen.....	31
Abbildung 3.3: Grafische Darstellung eines BSA-Standards zur Berechnung des Proteingehaltes einer Probe.....	37
Abbildung 3.4: Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid.....	40
Abbildung 3.5: Aufbau einer Transfervorrichtung für einen Western-Blot.....	41
Abbildung 3.6: Eine mit Ponceau-S gefärbte PVDF-Membran	42
Abbildung 3.7: Chemische Grundlage der ECL-Plus-Reaktion (Amersham)	44
Abbildung 3.8: Migrationsstrecken-Vermessung.....	59
Abbildung 3.9: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin (Promega).	63
Abbildung 3.10: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch LDH (Promega).....	64
Abbildung 3.11: Spaltung des Caspase-Substrats Z-DEVD-R110 durch Caspase-3/7 (Promega).	65
Abbildung 4.1: Die Kultur von <i>in vitro</i> gealterten hNPCs.....	68
Abbildung 4.2: Die Proliferationskapazität von <i>in vitro</i> gealterten Sphären.....	69
Abbildung 4.3: Die Expression des EGF-Rezeptors.	71
Abbildung 4.4: Das Migrationsverhalten von <i>in vitro</i> gealterten Neurosphären.....	72

Abbildung 4.5: Die Differenzierungskapazität von <i>in vitro</i> gealterten hNPCs.....	73
Abbildung 4.6: Viabilitätsmessung in jungen und alten hNPCs.....	74
Abbildung 4.7: Die Expression von P21 ^{Waf1/Cip1/Sdi1}	75
Abbildung 4.8: Die Färbung der β -Galaktosidase in jungen und alten hNPCs.....	76
Abbildung 4.9: Karyotypisierung von <i>in vitro</i> gealterten hNPCs.	77
Abbildung 4.10: H ₂ O ₂ beeinflusst die Zellvitalität von hNPCs und SH-SY5Y-Zellen.....	79
Abbildung 4.11: H ₂ O ₂ -induziert Caspase-unabhängige Apoptose.....	81
Abbildung 4.12: Die Kontrolle des Differenzierungsstatus von SH-SY5Y-Zellen.....	83
Abbildung 4.13: Die basale Genexpression der antioxidativen Enzyme in hNPCs und SH-SY5Y-Zellen.	84
Abbildung 4.14: Der Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Genexpression von SOD, GPx und CAT. 85	
Abbildung 4.15: Alte hNPCs sind sensitiver gegenüber oxidativem Stress als junge.	86
Abbildung 4.16: Die Testung der Zytotoxizität von neuer <i>versus</i> alter H ₂ O ₂ - und TCHQ-Stocklösung.	88
Abbildung 4.17 Die Genexpression von antioxidativ wirkenden Enzymen in verschieden alten hNPC-Kulturen.	89
Abbildung 4.18: Messung von intrazellulären ROS in jungen <i>versus</i> alten hNPC.....	90
Abbildung 4.19: Western-Blot-Analysen zur Nrf2-Expression in verschiedenen alten hNPCs.....	91
Abbildung 4.20: Die Abnahme der Nrf2-Expression mit zunehmendem Alter der hNPC-Kultur nach TCHQ-Belastung.	92
Abbildung 4.21: Die Aktivierung von Nrf2 durch Translokation in den Zellkern in jungen <i>versus</i> alten hNPCs.	93
Abbildung 4.22: Die Genexpression von Nrf2 in verschiedenen alten hNPCs.....	94
Abbildung 4.23: SEW-GFP transduzierte hNPCs.	95
Abbildung 4.24: Die Knockdown-Effizienz von verschiedenen shRNS gegen Nrf2 in HEK293FT-Zellen.....	96
Abbildung 4.25: Die basale Genexpression von Nrf2, CAT, GPx und SOD in hNPCs nach lentiviralem Nrf2- <i>Knockdown</i>	97
Abbildung 4.26: Die Analyse der Proliferations-, Migrations- und Differenzierungskapazität in Nrf2- <i>Knockdown</i> -Sphären.....	98

Abbildung 4.27: Der Vergleich der Ausplattiergenauigkeit des COPAS TM <i>versus</i> manuelle Selektion	100
Abbildung 4.28: Vergleich der Viabilität und Zytotoxizität: COPAS TM <i>versus</i> manuelle Selektion.	101
Abbildung 4.29: Der Vergleich der Proliferationskapazität von COPAS TM <i>versus</i> manueller Selektion.....	102
Abbildung 4.30: Der Vergleich von Migration- und Differenzierungsvermögen von COPAS TM <i>versus</i> manueller Selektion.	103
Abbildung 4.31: Der Vergleich der Bildung von intrazellulärem ROS in COPAS TM <i>versus</i> manuell sortierten humanen und Nager Sphären	105
Abbildung 1.1: Potenzielle Mechanismen für den altersbedingten Rückgang der Neurogenese.....	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Bevölkerungsvorausberechnung.....	2
Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Proliferationsmedium B27	28
Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums N2.....	29
Tabelle 3.3: Pipettierschema der zu verwendenden Substanzen für die Plattenbeschichtung	30
Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Nährmediums für SH-SY5Y-Zellen	30
Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Nährmediums für HEK293FT -Zellen	31
Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums SH-SY5Y-Zellen.....	32
Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Einfriermediums	34
Tabelle 3.8: Zusammensetzung 2x RIPA-Puffer Stocklösung.....	35
Tabelle 3.9: Zusammensetzung 1x RIPA-Puffer Gebrauchslösung	36
Tabelle 3.10: Zusammensetzung Trenngel	38
Tabelle 3.11: Zusammensetzung Sammelgel.....	38
Tabelle 3.12: Zusammensetzung Laufpuffer.....	38
Tabelle 3.13: Herstellung vom 20% Ammoniumpersulfat (APS)	39
Tabelle 3.14: Sammelgelpuffer	39
Tabelle 3.15: Trenngelpuffer.....	39
Tabelle 3.16: 5x Auftragungspuffer für SDS-PAGE.....	39
Tabelle 3.17: 10x Transferpuffer nach Biorad Gebrauchsanweisung ohne SDS	41
Tabelle 3.18: 1x Transferpuffer.....	41
Tabelle 3.19: Zusammensetzung der Ponceau-S-Lösung	42
Tabelle 3.20: Zusammensetzung des 10x TBS-T-Puffer	43
Tabelle 3.21: Herstellung des Blockpuffers	43
Tabelle 3.22: Verdünnungen der verwendeten Antikörper	43
Tabelle 3.23: Verwendete Antikörper	45
Tabelle 3.24: RT-Primer Annealing Pipettierschema	48
Tabelle 3.25: Pipettierschema für den RT –Ansatz (Mastermix)	48
Tabelle 3.26: Übersicht der verwendeten Primerpaare	49

Tabelle 3.27: PCR-Bedingungen	50
Tabelle 3.28: Pipettierschema für den PCR-Ansatz	50
Tabelle 3.29: RTQ-PCR Bedingungen	52
Tabelle 3.30: Pipettierschema für den RTQ-PCR-Ansatz	52
Tabelle 3.31: Pipettierschema für den Restriktionsverdau	55
Tabelle 3.32: Pipettierschema	56
Tabelle 3.33: Pipettierschema	57
Tabelle 3.34: Darstellung der verwendeten Platten mit der entsprechenden Anzahl ausplattierter Zellen pro Well.....	58
Tabelle 3.35: X-Gal Puffer	61
Tabelle 3.36: X-Gal Stock Lösung	61
Tabelle 3.37: X-Gal Substratlösung	61
Tabelle 3.38: Zusammensetzung der TUNEL-Reaktionslösung.....	66
Tabelle 4.1: EC ₅₀ -Werte für TCHQ.....	87
Tabelle 4.2: EC ₅₀ -Werte für H ₂ O ₂	87

Formelverzeichnis

Formel 1.1: Fenton-Reaktion (Li <i>et al.</i> , 2009)	4
Formel 3.1: Berechnung der Zellzahl	33
Formel 3.2: Berechnung der RNS-Konzentration.....	47
Formel 3.3: Gleichung zur Berechnung der Kopiezahl der DNS-Fragmente.....	53

Veröffentlichungen

Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, Schuwald J, Weinmann N, Fritsche E. 2009. Human Neurospheres as Three-Dimensional Cellular Systems for Developmental Neurotoxicity Testing. Environ Health Perspect. 117(7):1131-8.

Gassmann K^{*}, Baumann J^{*}, Giersiefer S^{*}, Schuwald J^{*}, Schreiber T, Merk HF, Fritsche E. 2012. Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D in vitro applications. Toxicol In Vitro 26:993-1000

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

—

Janette Schuwald

Düsseldorf, Dezember 2012

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen zu bedanken, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Ellen Fritsche möchte ich für die umfassende Betreuung und Unterstützung danken (die weder Uhrzeit noch Urlaub kennt), ohne die dieses spannende Projekt und die daraus resultierende Dissertation nicht zustande gekommen wären.

Bei Frau Prof. Dr. Christine R. Rose möchte ich mich für die fakultätsübergreifende Betreuung bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Bei PD Dr. Joachim Altschmied und PD. Dr. Susanne Grether-Beck für die Möglichkeit in ihren S2-Laboren zu arbeiten.

Darüber hinaus danke ich allen Kooperationspartnern, sowie den Mitgliedern des GRK 1427 für die gute Zusammenarbeit.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern der AG Tox für eine wirklich nette und unterhaltsame Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfestellungen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Julia Tigges, Jenny Baumann, Dr. Kathrin Gaßmann, Ulrike Hübenthal und Susanne Giersiefer (wir haben es endlich geschafft).

Außerdem möchte ich allen Korrektoren danken, die sich die Zeit genommen haben, die Arbeit zu überprüfen, um Rechtschreib- und Grammatikfehler zu beseitigen.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meinem Freund Marius und meinen Freunden, die mich jederzeit mit viel Ruhe unterstützt und mir die nötige Kraft gegeben haben.

Vielen Dank