

Aus dem
Institut für Neuropathologie des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Markus Glatzel

Untersuchungen zum Proteinabbau während der Differenzierung neuraler Stammzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jana Vogel
aus Bernburg

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 26.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: Prof. Dr. M. Rune

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. U. Bartsch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.1	Stammzellen	1
1.1.1	<i>Stammzellen allgemein</i>	1
1.1.2	<i>Neurale Stammzellen (NSC)</i>	3
1.1.3	<i>Ansätze zur Therapie neurologischer Erkrankungen mit Stammzellen</i>	4
1.2	Zellulärer Proteinabbau	8
1.2.1.	<i>Endoplasmatisches Retikulum (ER)</i>	8
1.2.2.	<i>UPR und ER-Stress</i>	9
1.2.3.	<i>Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System</i>	11
1.2.4.	<i>Autophagie</i>	11
1.2.5.	<i>Apoptose</i>	12
1.3	Stammzellen und Proteinabbau	13
II.	Arbeitshypothese und Fragestellung	15
III.	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	<i>Zellkultur</i>	16
3.1.2	<i>Proteinbestimmung, SDS-Page und Western Blot</i>	17
3.1.3	<i>Immunzytochemie</i>	19
3.1.4	<i>Geräte</i>	21
3.1.5	<i>Software-Programme</i>	21

Inhaltsverzeichnis

3.2 Methoden	22
3.2.1 Zellkulturarbeiten.....	22
3.2.2 Proteinanalytik.....	25
3.2.3 Immunzytochemie.....	29
3.2.4 Zytotoxizitätstest.....	32
IV. Ergebnisse	33
4.1 In vitro Charakterisierung der neuralen Stammzellen	33
4.1.1 Nachweis der Stammzeleigenschaft der undifferenzierten Zellen.....	35
4.1.2 Nachweis der Proliferationseigenschaften der neuralen Stammzellen.....	35
4.1.3 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Neuronen.....	35
4.1.4 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Astrozyten.....	36
4.1.5 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Oligodendrozyten.....	36
4.1.6 Nachweis der Apoptose-Aktivität während der Differenzierung.....	36
4.2 Western Blot Analyse der Proteinabbaumarke	38
4.2.1 ER-Stress Antwort.....	40
4.2.2 Apoptose.....	42
4.2.3 Autophagie.....	43
4.3 Einfluss der Proteinabbauaktivität auf die Differenzierung der neuralen Stammzellen	44
4.3.1 Hemmung des Proteasoms mittels UBB+1.....	44
4.3.2 Medikamentöse Beeinflussung der Proteinabbauwege.....	47

Inhaltsverzeichnis

V. Diskussion	54
5.1 Charakterisierung der neuralen Stammzellen	54
5.2 Western Blot Analyse der Proteinabbaumarke	56
5.3 Einfluss der Proteinabbauaktivität auf die Differenzierung der neuralen Stammzellen	62
VI. Zusammenfassung.....	69
VII. Literaturverzeichnis	71
VIII. Abkürzungsverzeichnis	83
IX. Abbildungsverzeichnis	85
Danksagung.....	87
Eidesstattliche Erklärung	88

I. Einleitung

1.1 Stammzellen

1.1.1 Stammzellen allgemein

Stammzellen sind vor allem durch zwei besondere Fähigkeiten charakterisiert. Sie sind zum einen in der Lage in unterschiedliche Zellarten zu differenzieren und besitzen zum anderen eine nahezu unbegrenzte Selbsterneuerungsfähigkeit (McKay 1997; van der Kooy and Weiss 2000).

Während der Embryonalentwicklung sowie im adulten Organismus gibt es verschiedene Arten von Stammzellen. Den pluripotenten embryonalen Stammzellen, den ersten während der Embryogenese angelegten Stammzellen, die zur Differenzierung in jede andere Körperzelle befähigt sind und aus denen während der Embryonalentwicklung die Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm, Ektoderm) hervorgehen, stehen die somatischen oder adulten Stammzellen gegenüber, die auch im erwachsenen Organismus in den entsprechenden Stammzellkompartimenten zu finden sind. Die adulten Stammzellen sind in ihrer Entwicklungspotenz gegenüber den embryonalen Stammzellen bereits eingeschränkt (multipotent).

Die embryonalen Stammzellen sind nur innerhalb der ersten Entwicklungswoche der Embryogenese im Organismus vorhanden. Sie entwickeln sich als sogenannter Embryoblast oder innere Zellmasse aus der Zygote und sind selbst noch vollständig identisch und undifferenziert. Sie bilden aber den Ausgangspunkt für alle Körperzellen, die sich im Anschluss während der folgenden Entwicklungsphasen durch Differenzierungsvorgänge entwickeln (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Sadler and Langman 2003).

Die adulten Stammzellen hingegen dienen in den unterschiedlichen Geweben und Organen als Regenerationspool, um untergegangene Zellen zu ersetzen. Sie können *in vitro* mit Hilfe von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung gebracht werden. Zu ihnen gehören unter anderem die im Knochenmark

Einleitung

liegenden hämatopoetischen Stammzellen, aus denen alle Blutzellen hervorgehen, die mesenchymalen Stammzellen (MSC), die zu Chondrozyten, Osteoblasten, Fettzellen, Myozyten und Enterozyten differenzieren können und die neuronalen Stammzellen (NSC). Diese sind in der Lage zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren (Abbildung I-1).

Potential Stem Cells with Neural Capability

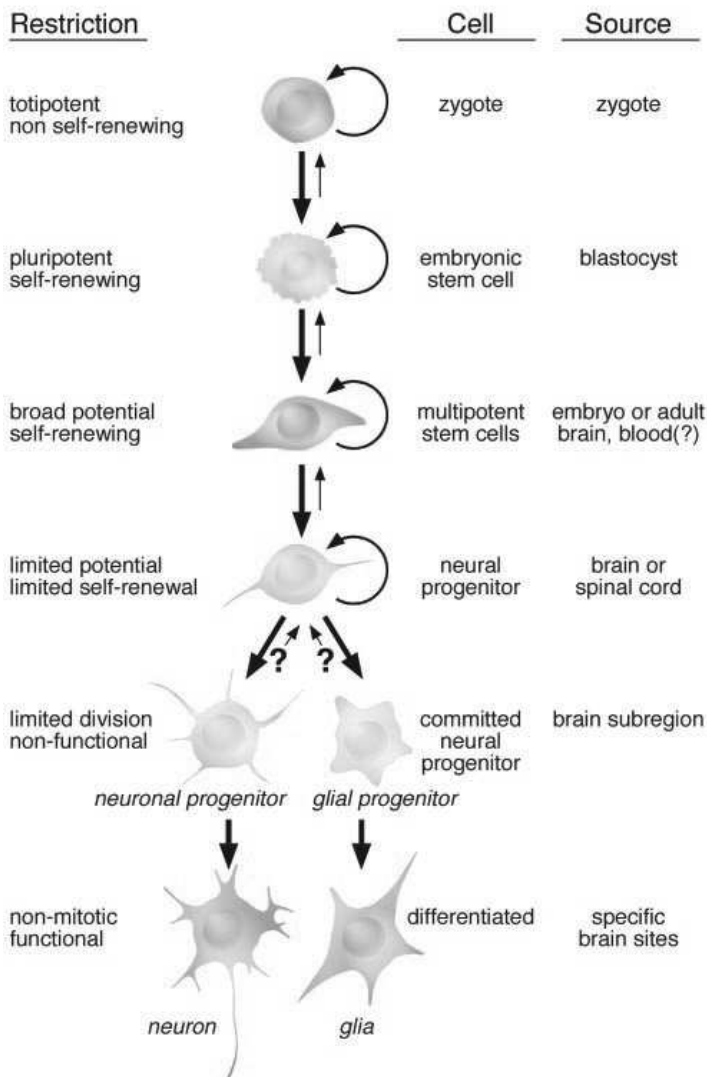


Abbildung I-1: Differenzierungsschema neuronaler und glialer Zellen. Entwicklung ausgehend von der Zygote bis zum vollständig differenzierten Neuron bzw. einer Gliazelle (Astrozyt, Oligodendrozyt) (Abbildung entnommen aus: (Gage 2000)

Die Fähigkeit der Stammzellen zur Selbstregeneration, das heißt der kontinuierlichen Entwicklung identischer undifferenzierter Tochterzellen einerseits, und der Bildung stärker differenzierter Zellen für den Zellersatz von Geweben und Organen andererseits, wird ermöglicht durch die sogenannte

Einleitung

symmetrische bzw. asymmetrische Zellteilung. Die symmetrische Zellteilung bezeichnet hierbei die Bildung zweier gleicher Tochterzellen zum Zweck der Selbstregeneration, die asymmetrische Zellteilung bringt hingegen durch eine polarisierte Ausrichtung der Zellen bei der Teilung eine Stammzelle und eine stärker differenzierte Tochterzelle hervor (Noctor, Martinez-Cerdeno et al. 2004; Zhong and Chia 2008).

Ein entscheidender Faktor für die Erhaltung ihrer biologischen Funktionen ist das physiologische Milieu in dem sich die Stammzellen befinden.

Vielfältige Einflussfaktoren, von den anatomischen Gegebenheiten bis hin zu Mediatorstoffen, über die die Zellen untereinander kommunizieren, ermöglichen die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Regeneration und Differenzierung, das an die Anforderungen der Umgebung angepasst ist. Dieses Konzept wird als Stammzellnische bezeichnet (Li and Xie 2005; Scadden 2006).

1.1.2 Neurale Stammzellen (NSC)

Neurale Stammzellen gehören zu den adulten Stammzellen und sind in ihrem Differenzierungspotential bereits beschränkt auf die Entwicklung von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Gage 2000). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde von Santiago Ramón y Cajal die Hypothese aufgestellt, es gäbe keine Neurogenese im adulten Gehirn und somit keine Grundlage für eine zelluläre Regeneration bei neuronalem Verlust. Dieses Dogma hielt sich über Jahrzehnte und wurde erst 1965 widerlegt, als erstmals neu gebildete Zellen im Hippocampus postnataler Ratten nachgewiesen wurden (Altman and Das 1965).

Anfang der 90er Jahre wurde es möglich, sich teilende Zellen auch *in vivo* zu untersuchen, zum einen durch eine retrovirale Markierung proliferierender Zellen und ihrer Abkömmlinge (van Praag, Schinder et al. 2002), zum anderen mittels einer Markierung mit Bromodesoxyuridin (BrdU), das an Stelle der Base Thymidin bei der Neusynthese der DNS in diese integriert wird und die Tochterzellen mittels Antikörpermarkierung bestimmbar macht (Miller and Nowakowski 1988).

Einleitung

Es zeigte sich im weiteren Forschungsverlauf, dass neurale Stammzellen vor allem an zwei Orten des Gehirns zu finden sind, im Gyrus dentatus des Hippocampus (Eriksson, Perfilieva et al. 1998) und in der Subventrikulären Zone (SVZ) direkt unterhalb des Ependyms der Seitenventrikel (Luskin 1993). Die in diesen Regionen gebildeten Zellen wandern von dort zu ihrem Bestimmungsort und differenzieren sich während der Migration weiter aus. Die Progenitorzellen der SVZ gelangen unter physiologischen Bedingungen entlang des sogenannten rostralen migratorischen Stroms zum olfaktorischen Bulbus, nach Gewebsschäden aber ebenfalls in geschädigtes Gewebe des benachbarten Striatums bzw. des Kortex (Arvidsson, Collin et al. 2002), vermutlich, um dort eine regenerative Aufgabe zu erfüllen. Die im Hippocampus gebildeten Progenitorzellen wandern in das hippocampale Stratum granulare ein. Fraglich ist bisher allerdings noch, in welchem Umfang die neu gebildeten Neurone in bestehende Kreisläufe integriert werden und zu einer funktionellen Regeneration des Gewebes beitragen.

Die Isolierung neuraler Stammzellen aus dem Gehirn 14 Tage alter embryonaler Mäuse, gelang erstmals 1992 (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992). Nach dem von Reynolds et al. entwickelten „Neurosphere assay“, einem serumfreien Kultursystem, konnten die entnommenen neuralen Stammzellen *in vitro* als kugelige Zellformationen, sogenannte Neurosphären, kultiviert und vermehrt werden (Rietze and Reynolds 2006). Die Möglichkeit sie bei Entzug von Wachstumsfaktoren in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren, belegte hierbei ihre neurale Stammzelleigenschaft (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992).

1.1.3 Ansätze zur Therapie neurologischer Erkrankungen mit Stammzellen

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es zwei unterschiedliche Ansätze, neurale Stammzellen therapeutisch zu nutzen. Zum einen durch eine intravenöse Applikation exogener Zellen bzw. ihre Transplantation in das betroffene Gewebe zum Zellersatz, zum anderen durch Stimulierung und Rekrutierung endogener Stammzellpopulationen (Lindvall, Kokaia et al. 2004; Lindvall and Kokaia 2006; Kim and de Vellis 2009).

Einleitung

Vor allem auf dem Gebiet der Transplantation wurden in Tiermodellen bereits seit den 80er Jahren zahlreiche Experimente mit unterschiedlich erfolgreichen Ergebnissen durchgeführt. Schwerpunkte bildeten vor allem die degenerativen und traumatischen neurologischen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson (Lindvall, Brundin et al. 1990; Takagi, Takahashi et al. 2005), Chorea Huntington (Ryu, Kim et al. 2004; Roberts, Price et al. 2006), Morbus Alzheimer (Tuszynski, Thal et al. 2005) und die Amyotrophe Lateralsklerose (Kerr, Llado et al. 2003; Harper, Krishnan et al. 2004), aber auch zur Therapie von Schlaganfall (Ikeda, Kurokawa et al. 2005; Thored, Arvidsson et al. 2006), Multipler Sklerose (Windrem, Nunes et al. 2004; Pluchino, Zanotti et al. 2005), Rückenmarksverletzungen (McDonald, Liu et al. 1999; Cummings, Uchida et al. 2005) und Hirntumoren (Aboody, Bush et al. 2006; Dickson, Hamner et al. 2007) wurden zahlreiche Experimente durchgeführt.

Es wurden hierbei nicht nur adulte neurale Stammzellen verwendet, sondern gerade zu Beginn der Untersuchungen vor allem fetale Stammzellen (Lindvall, Brundin et al. 1990) und später embryonale Stammzellen (ES) (Glaser, Perez-Bouza et al. 2005; Takagi, Takahashi et al. 2005) bzw. mesenchymale Stammzellen (MSC) (Akiyama, Radtke et al. 2002; Kurozumi, Nakamura et al. 2004). Während die embryonalen Stammzellen vor ihrer Transplantation zu neuronalen Stammzellen differenziert werden mussten, um eine Formation embryonaler Tumoren, sogenannter Teratome, zu verhindern, konnten die mesenchymalen Stammzellen direkt transplantiert werden.

Im Fall des Morbus Parkinson, der durch einen Dopaminmangel bei fortschreitendem Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra hervorgerufen wird und klinisch mit einem erhöhten Muskeltonus, Ruhetremor, Bewegungsarmut und Haltungsinstabilität einhergeht (Poeck and Hacke 2006), konnte im Mausversuch eine anhaltende Verbesserung der Symptomatik erreicht werden. Es wurden hierfür immortalisierte humane neurale Stammzellen (HB1.F3), die zusätzlich durch Transduktion zweier entsprechender Gene zur L-Dopa Produktion befähigt waren, in das Striatum der Mäuse transplantiert (Kim, Park et al. 2006). In anderen, teilweise bereits klinisch durchgeführten Versuchen, waren die Ergebnisse jedoch nicht

Einleitung

konsistent und stellten keine Verbesserung zur bestehenden medikamentösen Therapie dar.

Eine weitere, häufig schwerwiegende neurologische Erkrankung ist der Schlaganfall. Er entsteht in den meisten Fällen durch eine arterielle Durchblutungsstörung des Gehirns, mit daraus resultierendem Zelluntergang und führt, je nach Lokalisation des betroffenen Areals zu motorischen, sensorischen oder kognitiven Ausfällen.

Hinsichtlich der therapeutischen Möglichkeiten konnte in mehreren Untersuchungen mit unterschiedlichen Zellarten gezeigt werden, dass transplantierte Zellen in das geschädigte Gewebe einwandern (Kelly, Bliss et al. 2004), dort in Neurone und Gliazellen differenzieren, um dann mit den ortständigen Zellen zu interagieren (Hayashi, Takagi et al. 2006). In einigen Versuchen waren sie in der Lage, eine Verbesserung der motorischen Eigenschaften nach einer Schädigung herbeizuführen (Ikeda, Kurokawa et al. 2005). Insgesamt sind die gemessenen funktionellen Verbesserungen, gemessen am erlittenen Verlust, nach wie vor gering.

Von endogenen neuralen Stammzellen ist bekannt, dass sie nach einem Schlaganfall vermehrt gebildet werden und in das geschädigte Gewebe im Striatum und Kortex einwandern, dann aber innerhalb einiger Wochen in der Mehrzahl absterben und lediglich wenige der untergegangenen Neurone ersetzen können (Arvidsson, Collin et al. 2002; Thored, Arvidsson et al. 2006; Okano, Sakaguchi et al. 2007). Auch diesen Weg versucht man therapeutisch zu nutzen, indem Faktoren gesucht werden, die das Überleben der neugebildeten Zellen erhöhen (Hansel, Eipper et al. 2001; Chen, Zacharek et al. 2005; Curtis, Eriksson et al. 2007). Dies ist jedoch bisher ebenfalls noch ohne nennenswerte therapeutische Erfolge geblieben.

Bei Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer und Rückenmarksverletzungen wurde in verschiedenen Experimenten versucht, eine neuroprotektive Wirkung durch von den Stammzellen sezernierte Stoffe zu erzielen, um den Untergang der Wirtszellen zu vermindern (Kerr, Llado et al. 2003; Tuszynski, Thal et al. 2005).

Einleitung

Auch wenn bereits zahlreiche vielversprechende und interessante Therapieansätze zur Behandlung neurologischer Erkrankungen vorliegen, sind die momentanen Möglichkeiten einer Stammzell-basierten Therapie zur Behandlung von Patienten noch sehr gering.

Dies hängt mit unterschiedlichen Faktoren zusammen und wirft viele weitere Fragen bezüglich der biologischen Zusammenhänge bei der Zelldifferenzierung, der Regulation von Zellerhalt- und Zelluntergang sowie der Interaktion zwischen den Zellen in ihren jeweiligen biologischen Nischen auf.

Bei der Transplantation von Stammzellen ist die langfristige Überlebensrate der transplantierten Zellen noch recht niedrig und auch die Stabilität des gewünschten Phänotyps ist nicht immer gegeben (Kim and de Vellis 2009).

Andererseits besteht nach wie vor das Risiko der Entartung transplantierte Zellen, die nicht differenzieren und in der Folge im Empfängergewebe zu Tumorentstehung führen können.

Bezüglich der Aktivierung endogener neuraler Stammzellen, stellt sich außerdem die Frage, warum die endogene Regeneration, die im ZNS nachgewiesen ist, in ihrem Ergebnis letzten Endes so ineffektiv ist.

Das heißt, dass die Faktoren, die die Proliferation, Differenzierung und Integration der Zellen in bestehendes Gewebe regulieren, noch zu wenig verstanden sind um sie wirklich gezielt zu beeinflussen und so therapeutisch nutzbar zu machen.

Einleitung

1.2 Zellulärer Proteinabbau

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der verschiedenen intrazellulären Proteinabbauwege, die einer Zelle zur Verfügung stehen um ER-Stress zu bewältigen. Zusammenfassend sind dies die ER-Stress Antwort (UPR), die durch fehlgefaltete oder akkumulierte Proteine im Lumen des ER aktiviert wird und über verschiedene Reaktionskaskaden zu einer Reduzierung der Proteinbildung über eine modifizierte Transkription bzw. zu einer verbesserten Proteinfaltung mittels Chaperonen führt. Dem Proteinabbau dienen zum einen das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das im Zytosol lokalisiert ist und ausschließlich entfaltete Peptidketten aufspaltet, und zum anderen die Autophagie, die vor allem Proteinkonglomerate enzymatisch lysiert. Es wird außerdem die durch ER-Stress induzierte Apoptose betrachtet, da sie die letzte Möglichkeit einer Zelle darstellt, mit nicht anders zu bewältigendem ER-Stress umzugehen und daher im weitesten Sinne auch den Proteinabbauwegen zugerechnet werden kann.

1.2.1. *Endoplasmatisches Retikulum (ER)*

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist der zentrale Ort für den größten Teil der Proteinbiosynthese einer eukaryotischen Zelle. Hier werden vor allem Transmembranproteine und sekretorische Proteine gebildet (Koolman, Röhm et al. 2003). Unter enzymatischer Beteiligung werden im Lumen des ER die noch ungefalteten Peptidketten in ihre für die spätere biologische Funktion entscheidende sehr komplexe dreidimensionale Konformation der Proteine überführt. Dies geschieht unter Ausbildung von Disulfid-Brücken, Wasserstoff-Brückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen (Löffler and Petrides 2003). Es ist ein Prozess, der vor allem bezüglich des im ER herrschenden pH-Wertes, des Redox-Potentiales, der Kalzium-Homöostase und der Glucosebereitstellung sehr sensibel reagiert und Abweichungen zu einem Absinken der Effektivität der Faltung führen. Dies kann eine Ansammlung und Aggregation fehlgefalteter oder ungefalteter Proteine im Lumen des ER zur Folge haben (Szegezdi, Logue et al. 2006).

Einleitung

Eine Störung der ER-Funktion wird als ER-Stress bezeichnet und ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Menge an gebildetem fehlgefaltetem oder ungefaltetem Protein und der dem ER zur Verfügung stehenden Kapazität zu dessen Bewältigung (Ron and Walter 2007).

Der intrazelluläre Signalweg, der als Messfühler für auftretenden ER-Stress im Lumen des ER existiert, wird als Unfolded Protein Response (UPR) bzw. ER-Stress-Antwort, bezeichnet. Sie wird durch eine Proteinüberladung des ER aktiviert und setzt über unterschiedliche Reaktionskaskaden alle weiteren Reaktionswege zur Beseitigung des ER-Stresses in Gang (Wu and Kaufman 2006; Zhang and Kaufman 2006; Ron and Walter 2007).

Im Allgemeinen hat die Zelle nun drei unterschiedliche Möglichkeiten dem ER-Stress zu begegnen (Ron and Walter 2007):

- 1) Es wird die in das ER gelangende Proteinmenge reduziert, indem durch eine Hemmung der Transkription im Zellkern die Syntheserate der Proteine herabgesetzt wird.
- 2) Es kann die ER-Kapazität verbessert werden, fehlgefaltete Proteine zu beseitigen, indem zum einen die Transkription von Genen, die für Chaperone kodieren, aktiviert wird, um die Proteinfaltung enzymatisch zu unterstützen und es können zum zweiten unterschiedliche Wege des Proteinabbaus aktiviert werden.
- 3) Bei länger bestehendem ER-Stress, der mit diesen Maßnahmen nicht zu beseitigen ist, wird als Ultima Ratio die Apoptose induziert.

1.2.2. UPR und ER-Stress

Wie bereits erwähnt, stellt die ER-Stress Antwort (UPR), einen intrazellulären Signalweg dar, um den im Lumen des ER anfallenden fehlgefalteten Proteinen zu begegnen. Drei verschiedene Transmembranproteine des ER, ATF6, IRE1 und PERK, funktionieren hierbei als Rezeptoren für ER-Stress (s. Abb. 2) (Schroder and Kaufman 2005). Das im Lumen des ER befindliche BiP agiert zum einen als ein Chaperon und katalysiert die Faltung un- bzw. fehlgefalteter Proteine, zum anderen ist es der Hauptregulator für die Aktivierung der UPR,

Einleitung

indem es die drei Transmembranproteine ATF6, IRE1 und PERK durch Bindung von luminaler Seite im inaktiven Zustand hält. (Flynn, Pohl et al. 1991; Bertolotti, Zhang et al. 2000). Je stärker fehlgefaltete Proteine nun im ER akkumulieren, umso mehr wird BiP aus der Bindung mit den Transmembranproteinen gelöst und aktiviert sie auf diesem Wege.

PERK ist hierbei der erste Rezeptor, der aktiviert wird und leitet über eine Phosphorylierung von eIF2 α zu Phos-eIF2 α , das wiederum den Transkriptionsfaktor ATF4 aktiviert, eine allgemeine Hemmung der Proteinbiosynthese über eine Blockierung der Transkription im Zellkern ein (Harding, Zhang et al. 1999; Harding, Zhang et al. 2003).

IRE1 wird als letzter Rezeptor aktiviert und trägt über Aktivierung des Transkriptionsfaktors XBP1 ebenfalls zu einer Anpassung der Transkription bei (Yoshida, Matsui et al. 2001).

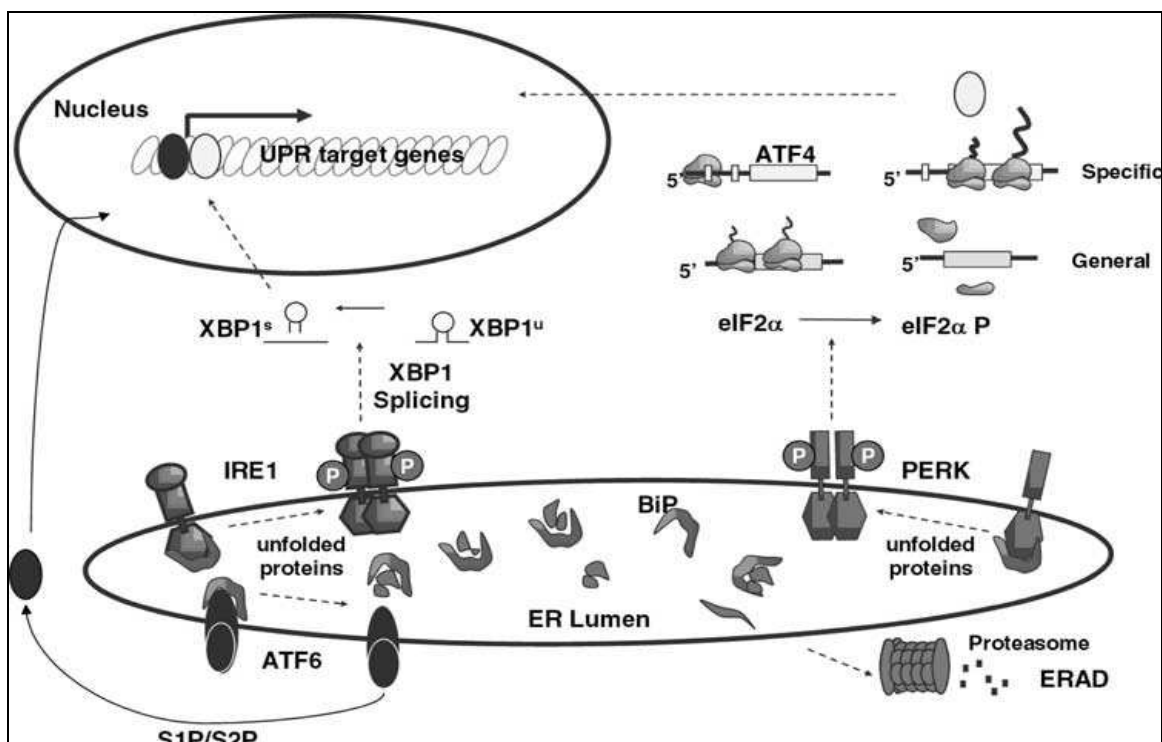


Abbildung I-2: Unfolded Protein Response mit Darstellung der ER-Stress Rezeptoren und der von ihnen aktivierten Reaktionswege bis hin zur Beeinflussung der Transkription im Zellkern (Abb. entnommen aus: (Wu and Kaufman 2006))

ATF6 wird durch eine proteolytische Spaltung aktiviert und agiert direkt als Transkriptionsfaktor im Zellkern (Haze, Yoshida et al. 1999; Yoshida, Okada et al. 2001). Es steigert unter anderem die Transkription von Genen, die für Chaperone kodieren. Dies sind Enzyme, die die Proteinfaltung katalysieren. Zu

Einleitung

ihnen gehören unter anderem BiP und die beiden Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90. Während BiP besonders bei ER-Stress mittels Aktivierung der UPR vermehrt gebildet wird, werden die beiden Hitzeschockproteine auch bei Stresssituationen, die den zytoplasmatischen Raum betreffen und dort zu Proteinfehlfaltungen führen, induziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle drei Chaperone als Indikatorproteine für Stress bestimmt.

1.2.3. *Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System*

ERAD (ER-associated degradation) bezeichnet einen Proteinabbauweg des ER, der bei ER-Stress durch fehlgefaltete Proteine aktiviert wird (Vembar and Brodsky 2008). Er wird von verschiedenen Faktoren der UPR induziert (s. Abbildung I-2). Der Proteinabbau erfolgt hierbei nach Translokation der ungefalteten Proteine in das Zytosol und findet im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) statt, das ebenfalls für den Abbau zytoplasmatischer Proteine verantwortlich ist (Glickman and Ciechanover 2002; Naujokat and Saric 2007). Fehlgefaltete Proteine im Lumen des ER werden von einem Qualitäts-Kontroll-System erkannt und vollständig entfaltet. Durch Ubiquitinierung, das heißt Bindung mehrerer Ubiquitin-Moleküle an die Proteine, werden sie für den Abbau im Proteasom markiert und über Translokation zurück ins Zytoplasma transportiert, wo der Abbau der Polypeptidkette stattfindet. Das Proteasom selbst ist ein Protease-Komplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht.

1.2.4. *Autophagie*

Proteinaggregate, die vom UPS nicht abgebaut werden können, werden durch Autophagie beseitigt. Hierbei werden die Aggregate von einer Doppelmembran eingeschlossen, dem sogenannten Autophagosom, und verschmelzen mit einem Lysosom, das mit proteolytischen Enzymen gefüllt ist, zu einem Autophagolysosom. Hier findet der proteolytische Abbau der Proteine statt (Eskelinen 2005; Yorimitsu and Klionsky 2005; Mizushima, Levine et al. 2008). In der Membran des Autophagosoms befindet sich das Protein LC3-II, das als Markerprotein für Autophagie im Immunoblot genutzt wird, da seine Menge mit

Einleitung

der Anzahl der Autophagosomen einer Zelle korreliert (Mizushima and Yoshimori 2007; Klionsky, Abeliovich et al. 2008).

1.2.5. Apoptose

Stellt sich heraus, dass der ER-Stress über die genannten Wege nicht beseitigt werden kann, so wird in der Zelle die Apoptose induziert. Drei bekannte Initiatoren für die ER-Stress induzierte Apoptose sind IRE1 (Han, Lerner et al. 2009), PERK/CHOP (Ma, Brewer et al. 2002) und Caspase12 (Rao, Hermel et al. 2001) (Abbildung I-3).

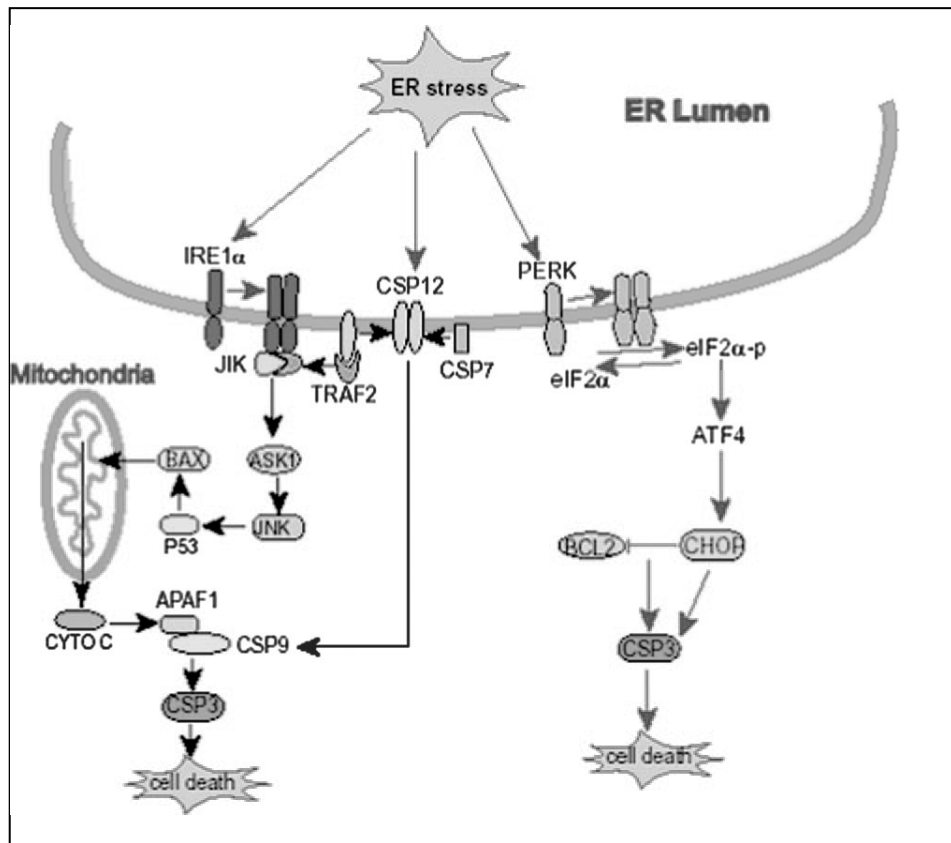


Abbildung I-3: Durch ER-Stress induzierte Apoptose. IRE1, PERK und Caspase12 befinden sich in der Membran des ERs. Bei ER-Stress werden sie aktiviert und können über mehrere Reaktionswege zur Induktion der Apoptose führen. CSP12: Caspase12 (entnommen aus: (Zhang and Kaufman 2006)

In der vorliegenden Arbeit wurde Caspase12 als Markerprotein für ER-Stress induzierte Apoptose verwendet. Es ist ein ER-Transmembranprotein, das durch ER-Stress aktiviert wird und in der Folge über Aktivierung von Caspase9 die Kaskade der Caspasen startet. So wird über mehrere Reaktionsschritte die

Einleitung

Apoptose eingeleitet (Morishima, Nakanishi et al. 2002). Von Caspase12-defizienten Zellen ist bekannt, dass sie resistent gegenüber ER-Stress als Induktor der Apoptose sind, nicht aber gegenüber anderen Auslösern (Nakagawa, Zhu et al. 2000).

1.3 Stammzellen und Proteinabbau

Es ist bekannt, dass ein großer Anteil transplantierte Stammzellen, vor allem nach der Transplantation in das zentrale Nervensystem, stirbt. Weniger bekannt sind bisher die genauen Gründe hierfür. Eine Rolle spielt vermutlich die meist recht unwirtliche Umgebung, in die die Zellen hinein transplantiert werden. Dies betrifft vor allem Transplantationen in Gebiete mit ausgedehntem Zelluntergang, wie er beispielsweise nach einem Schlaganfall oder bei Rückenmarksverletzungen häufig anzutreffen ist.

Bei Untersuchungen der Embryogenese konnte gezeigt werden, dass ER-Chaperone wie BiP eine wesentliche Funktion bei der Entwicklung der embryonalen Zellen haben. Ihre Bildung wird in der inneren Zellmasse des Embryoblasten hochreguliert und bei einem BiP-Defizit konnten Proliferationsstörungen und eine massive Apoptose der Zellen beobachtet werden (Luo, Mao et al. 2006).

Auch bei der embryonalen Herzentwicklung konnte eine Aktivierung von BiP nachgewiesen werden (Mao, Tai et al. 2006).

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen ein erhöhtes ER-Stress-Niveau aufweisen. Die Ursache hierfür ist jedoch bisher nicht sicher geklärt. Es könnte mit ihrer erhöhten Proliferationsrate oder ihrer vermehrten Proteinsekretion zusammenhängen.

Ebenso wird vermutet, dass das Ubiquitin-Proteasom-System einen Einfluss auf Proliferation, Entwicklung und Differenzierung von Zellen haben könnte und es wurden bereits Untersuchungen an verschiedenen Stamm- und Progenitorzellen in dieser Richtung durchgeführt (Naujokat and Saric 2007).

Einleitung

Wie oben bereits beschrieben, kann erhöhter ER-Stress in Zellen zur Induktion der Apoptose und dem Zelltod führen. Dies ist bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen belegt (Ciechanover and Brundin 2003; Rubinsztein 2006). So kommt es beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung (Maccioni, Munoz et al. 2001) und bei der Parkinson Erkrankung (Giasson and Lee 2003) aus unterschiedlichen Ursachen zur intrazellulären Ansammlung und Aggregation von Proteinen, die von den zellulären Proteinabbauwegen nicht bewältigt werden können und in letzter Konsequenz zum neuronalen Zelluntergang führen.

II. Arbeitshypothese und Fragestellung

Zusammen betrachtet scheint ein funktionierendes Fließgleichgewicht zwischen Proteinbildung und Proteinabbau in einer Zelle ein wesentlicher Faktor für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion und für ihre Überlebensfähigkeit zu sein. Dieser Prozess ist jedoch sehr anfällig für Störungen der Zell-Homöostase. Gerade das ER reagiert sensibel auf Veränderungen der zellulären Energiezufuhr, des Redox-Potentials, des pH-Wertes und der Kalzium-Konzentration, da diese Faktoren Einfluss auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung der unterschiedlichen Bindungen innerhalb eines Proteins haben. Das heißt, wenn sie sich nicht im optimalen Bereich befinden, wird die Proteinfaltung im ER erschwert und es entstehen vermehrt un- oder fehlgefaltete Proteine, das heißt ER-Stress. Außerdem hängt auch die Funktion der Enzyme, die an der Aufrechterhaltung des Proteinhaushalts beteiligt sind, wie beispielsweise der Chaperone und der Enzyme des Proteinabbaus, stark von optimalen Bedingungen in dieser Hinsicht ab.

Bezogen auf die Stammzellen, stellt sich die Frage, ob sie nicht möglicherweise bereits unter optimalen Entwicklungsbedingungen ein erhöhtes ER-Stress-Niveau, im Vergleich zu differenzierten Zellen zeigen.

Die zu Grunde liegende Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet also, ob neurale Stammzellen, im Vergleich zu den weiter differenzierten Zellen, einem erhöhten ER-Stress unterliegen bzw. ob durch die Induktion der Differenzierung neuraler Stammzellen spezifische Proteinabbauwege aktiviert bzw. gehemmt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Modifikationen in der Funktion der unterschiedlichen Proteinabbauwege einen Einfluss auf die Differenzierung neuraler Stammzellen *in vitro* haben.

Diese Untersuchungen stellen eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen dar, in denen später die nach Transplantation neuraler Stammzellen in das zentrale Nervensystem in den transplantierten Zellen aktivierten Proteinabbauwege untersucht werden sollen mit dem Ziel, das Überleben der transplantierten Zellen durch genetische oder medikamentöse Modifikation des Proteinabbaus bzw. ER-Stresses zu verbessern.

III. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkultur

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Accutase	PAA
B27 serumfreies Supplement	Gibco
bFGF-basic	Peprotech
DMEM/F12 (1:1)	Gibco
EGF-basic	Peprotech
Glucose-Lösung 10%	Sigma
HEPES Puffer 1M	Sigma
L-Glutamin	Gibco
MTT-Test	Promega
Natriumbikarbonat 7,5%	Gibco
PBS-Puffer	Sigma
Penicillin/Streptomycin (1%)	PAA
Poly-L-Ornithin	Sigma

Zellkulturmedien:

Differenzierungsmedium:

- 500 ml DMEM/F12 (1:1)
- 15 ml 10%ige Glucose-Lösung
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%)
- 10ml L-Glutamin-Lösung (200mM)
- 2,5ml 1M HEPES
- 1,67ml 7,5%ige Natriumbikarbonat-Lösung
- 10ml B27

Material und Methoden

Proliferationsmedium:

- Gleiche Grundzusammensetzung wie Differenzierungsmedium
- 20ng/ml EGF-basic
- 20ng/ml bFGF-basic

Hemmstoffe	Hersteller
Chloroquin	Sigma
MG132	Enzo Life Science
Tunicamycin	Sigma-Aldrich

3.1.2 Proteinbestimmung, SDS-Page und Western Blot

Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad
2-Propanol	Roth
Acrylamid-Bis (37,5:1)	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Complete Proteaseinhibitor Cocktail	Roche
Ethanol	J.T.Baker
Magermilchpulver	Frema
Methanol	J.T.Baker
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (Nr. SM 0671)
PVDF-Membran	Bio Rad
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tris	Fluka
Triton X 100	Roth
Tween 20	Roth
West Femto	Thermo Scientific
West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Whatman 3mm	Schleicher & Schuell

Material und Methoden

Puffer für Proteinanalyse

<u>Lyse-Puffer:</u>	50mM Tris pH 8,0 150mM NaCl 0,5% Natriumdesoxycholat 0,5% Triton X 100 Protease Inhibitor
<u>PBS 10x (pH 6,9)</u>	80g NaCl 2g KCl 11,5g Natriumhydrogenphosphat- dihydrat 2g Kaliumhydrogenphosphat
<u>Auftragspuffer 10x für SDS-PAGE:</u>	250mM Tris pH 6,8 10% SDS 15% Sucrose 1% Bromphenolblau 40% β -Mercaptoethanol
<u>SDS-PAGE Elektrophoresepuffer 10x:</u>	250 mM Tris 192 mM Glycin 1% SDS
<u>Western Blot Transfer-Puffer:</u>	
Proteine < 40 kDa	25 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,1 % SDS 20% Methanol
Proteine > 40 kDa	25 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,2 % SDS 10% Methanol

Material und Methoden

PBST 1x PBS
0,1 % Tween 20

Block-Puffer für Membran: 1x PBST
5% Magermilchpulver

Antikörper im Western Blot

Primär-Antikörper	Hersteller	Spezifikation	Verd.
Aktin	Sigma-Aldrich	Kaninchen, monoklonal, IgG	1/1000
BiP/GRP 78	BD Biosciences	Maus, monoklonal, IgG	1/1000
Caspase 12	BD Biosciences	Kaninchen, polyklonal IgG	1/1000
eIF2 α	Cell Signaling	Kaninchen, polyklonal, IgG	1/1000
HSP 70	BD Biosciences	Maus, monoklonal, IgG	1/1000
HSP 90	BD Biosciences	Maus, monoklonal, IgG	1/1000
LC 3	nano Tools	Maus, monoklonal, IgG	1/200
Phospho-eIF2 α	Cell Signaling	Kaninchen, monoklonal, IgG	1/500
Sekundär-Antikörper	Hersteller	Spezifikation	Verd.
Anti-Maus HRP	Promega	Esel	1/5000
Anti-Kaninchen HRP	Promega	Esel	1/5000

3.1.3 Immunzytochemie

Chemikalien / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eselserum	Jackson Immuno Research Lab.
Fluoromount G	Southern Biotec
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Paraformaldehyd 3,5%	BÜFA Chemikalien GmbH & Co KG
Triton-X100	Roth

Material und Methoden

Antikörper in der Immunfluoreszenz-Färbung

Primär- Antikörper	Hersteller	Spezifikation	Verd.
Caspase 3	Promega	Kaninchen, monoklonal	1/250
CNPase	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1/100
GFAP	Dako Cytomation	Kaninchen, polyklonal	1/500
Ki67	Thermo Scientific	Kaninchen, monoklonal IgG	1/100
Nestin	Developmental Studies Hybridoma Bank	Ratte, monoklonal IgG	1/50
β-Tubulin III	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1/200
Sekundär- Antikörper	Hersteller	Spezifikation	Verd.
Anti-Maus HRP rot	Invitrogen	Ziege	1/5000
Anti-Kaninchen HRP, rot	Invitrogen		1/5000
Anti-Maus HRP grün	Invitrogen		1/5000
Anti-Kaninchen HRP, grün	Invitrogen		1/5000
DAPI	Roche	5 mg/ml	1/500

Material und Methoden

3.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Entwickler Universal Hood II	Bio Rad Laboratories
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Scientific
Lichtmikroskop Eclipse TS 100	Nikon
Mikrotiterplattenlesegerät μ Quant	Bio-Tek
Tank Blot	Bio Rad
Zellkultur Bank Hera Safe	Thermo Electron Corporation
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

3.1.5 Software-Programme

Programm	Hersteller
Quantity One	Bio Rad
Photoshop CS2	Adobe Systems
μ Quant	Bio Rad
Axio Vision 4.7.2	Zeiss

Material und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturarbeiten

a. Gewinnung der neuralen Stammzellen

Für die vorliegende Arbeit wurden neurale Stammzellen der Maus vom Wildtyp verwendet. Hierfür wurden Zellen aus dem Striatum von Mausembryonen des 14. Embryonaltages (E14) verwendet. Das Muttertier wurde in terminaler Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden die Uteri aseptisch entnommen und erst in 70%igem Alkohol und PBS gewaschen und anschließend in eisgekühltes PBS und Penicillin/Streptomycin gegeben. Die Uteri wurden eröffnet und das unreife Striatum unter dem Mikroskop mit Hilfe von Pinzette und Skalpell freipräpariert und entnommen. Im Anschluss wurde das Striatum in serumfreies Medium überführt und mechanisch mittels Pipette zu einer Zellsuspension zerkleinert. Die hierdurch gewonnenen Zellen wurden daraufhin *in vitro* in Proliferationsmedium im Inkubator weiterkultiviert.

Für alle durchgeführten Versuche wurden Zellen der 3. bis maximal 18. Passage verwendet.

Alle Zellkulturarbeiten wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt.

Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37° C und einer mit Wasserdampf gesättigten 5%igen CO₂ Atmosphäre im Inkubator gehalten.

b. Kultivierung

Die verwendeten Zellen wurden einerseits zur Untersuchung der Proliferation als undifferenzierte Neurosphären kultiviert und für die Untersuchung der Differenzierung als undifferenzierte oder differenzierende Einzelzellen in adhärenter Zellkultur.

Die Differenzierung der neuralen Stammzellen in Neurone und Gliazellen wurde durch den Entzug der Wachstumsfaktoren EGF (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992) und FGF (Davis and Temple 1994) eingeleitet.

Material und Methoden

Proliferationskultur

Die undifferenzierten Neurosphären konnten unter proliferativen Bedingungen über bis zu 20 Passagen, d.h. 3-4 Monate lang kultiviert werden. Jeweils nach 4-5 Tagen, abhängig von der Größe der Neurosphären, wurden die Zellen passagiert, um ihre weitere Proliferation zu gewährleisten und Einzelzellen für die Experimente zu gewinnen. Nach jeder Passage wurden 2 Mio. Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche unter Zugabe von 20 ml Proliferationsmedium weiterkultiviert. Die Weiterkultur der Stammzellen in undifferenziertem Zustand wurde ermöglicht durch die Zugabe der beiden Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor (EGF) und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) zum Kulturmedium, jeweils in einer Konzentration von 20ng/ml.

Passagieren der Stammzellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen unter Zugabe von 20 ml Kulturmedium. Nach jeder Passage wurden 2 Mio. Zellen pro Flasche weiterkultiviert. Da die undifferenzierten neuronalen Stammzellen in Neurosphären wachsen, wurden sie für die Weiterkultur und die folgenden Experimente alle 4-5 Tage passagiert und zu Einzelzellen resuspendiert. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Tube überführt und für 2 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpallet in 1ml Accutase resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und zweimaliger erneuter Resuspendierung nach 8 min und nach 15 min zu einer möglichst homogenen Suspension, wurden die Zellen 5 min bei 900 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen nun in 1-3 ml Proliferationsmedium resuspendiert, als Ausgangssuspension für eine erneute Weiterkultur bzw. zur Differenzierung, hierfür wurde die Suspension jeweils, wie oben beschrieben, weiter verdünnt.

Material und Methoden

Zellzählung

Zur Bestimmung der vorhandenen Zellzahl in der Zellsuspension erfolgte eine Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde hierfür in die Zählkammer pipettiert und am Lichtmikroskop die Menge der Zellen in einem Großquadrat ausgezählt. Die in 1 ml der Zellsuspension enthaltene Zellzahl errechnet sich nun aus der gezählten Zellzahl multipliziert mit 10.000.

Ausdifferenzierung der Zellen

Die Ausdifferenzierung der Zellen fand, je nach Experiment in 75 cm² Zellkulturflaschen, 24-Well-Platten oder 96-Well-Platten statt.

Um das Anhaften der Zellen am Boden der verwendeten Gefäße zu ermöglichen, wurden sie zur Beschichtung mit einer Poly-L-Ornithin-Lösung behandelt. Nach dreimaligem Waschen der Gefäße mit PBS, wurden die Zellen ausgesät. Nach einer Proliferationsphase von 3-7 Tagen in undifferenziertem Zustand, das heißt, bis der Zellrasen die ausreichende Dichte aufwies, wurde die Differenzierung eingeleitet. Dies geschah durch Entzug der beiden Wachstumsfaktoren. Die Zusammensetzung des Kulturmediums blieb darüber hinaus unverändert. Sowohl bei der differenzierten, als auch bei der undifferenzierten Kultur, wurde alle 2 Tage das Nährmedium gewechselt.

Ernte und Aufbereitung der Zellen für die Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse wurden Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Ziel war es, die Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien zu untersuchen. Daher wurden für jedes Experiment 4 Zellkulturflaschen angelegt. Die Zellen der ersten Flasche wurden bereits im undifferenzierten Zustand geerntet, die folgenden nach 24h Differenzierung, dann nach 72h und die letzten nach 7 Tagen. Für die Ernte der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen dann 3 Mal mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums und noch haftende tote Zellen zu entfernen. Der Zellrasen wurde nun mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in einem Eppendorftube

Material und Methoden

aufgenommen. Nach Zentrifugierung für 5 min bei 13.000 U/min wurde der Überstand verworfen und das Pallet anschließend abgewogen. Das Zellresiduum wurde entsprechend seiner Masse in der 10-fachen Menge an Lyse-Puffer resuspendiert.

3.2.2 Proteinanalytik

Proteinisolation

Für die vollständige Lyse der Zellen wurden die Proben für 15 min im eisgekühlten Ultraschallbad behandelt und daraufhin erneut zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde isoliert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert um einen weiteren proteolytischen Abbau zu verhindern. Die Pellets wurden verworfen.

Quantifizierung des Proteingehalts im Zelllysats

Die photometrische Bestimmung des Proteingehalts im Lysat erfolgte nach der Methode von Smith (Smith, Krohn et al. 1985) in 96-Well-Mikrotiterplatten. Sie basiert auf der sogenannten Biuretreaktion, bei der im Reagenz enthaltene Kupfer(II)- Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden und auf einer nachfolgenden Komplexbildung der Kupfer(I)- Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA). Der resultierende Farbumschlag nach Rot, kann photometrisch bei 570 nm quantitativ bestimmt werden.

Für die Durchführung wurden 5µl des Proteinlysats unverdünnt und in einer 1:2 oder 1:5 Verdünnung eingesetzt. Jeder Ansatz wurde dreifach in eine 96-Well-Platte pipettiert und je mit 245 µl BCA-Reagenz (A:B im Verhältnis 50:1) versetzt. Parallel hierzu wurde eine Standardreihe mit BSA in definiertem Proteingehalt, ebenfalls in dreifacher Bestimmung, mitgeführt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dann die Absorption in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 570 nm gemessen. Für die Analyse wurde das Programm µ Quant verwendet.

Die Quantifizierung wurde durchgeführt mit einer linearen Regressionsanalyse gegen die Eichkurve.

Material und Methoden

Für die folgenden Experimente wurde jeweils der Mittelwert der drei Bestimmungen eines Ansatzes verwendet.

Western Blot Analyse

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Beim Western Blot Verfahren werden Proteine mit immunchemischen Methoden detektiert (Towbin, Staehelin et al. 1979). Hierzu werden die Zellen lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Membran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Für die Gelelektrophorese wurden, abhängig vom zu bestimmenden Protein entweder 10µg (HSP90, HSP70) oder 20µg (Caspase12, Phospho eIF2α, eIF2α, LC3, BiP/GRP78) Protein je Probe aufgetragen und zuvor durch Zugabe von Lyse-Puffer auf ein einheitliches Volumen gebracht. Es wurde jeweils in 1:10 Verdünnung ein Auftragspuffer in oben beschriebener Zusammensetzung hinzugefügt.

Die verwendeten Trenn- und Sammelgele bestanden aus folgender Zusammensetzung:

Chemikalie	8% 1,5 mm	12% 1,5 mm	15% 1,5 mm	Sammelgel
Acrylamid-Bis 30% (ml)	5,6	5,6	9,4	1,3
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8 (ml)	5,25	3,5	5,25	/
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8 (ml)	/	/	/	2,5
SDS 10% (ml)	1	0,7	1	0,5
H ₂ O dest. (ml)	6,7	6,7	2,9	6
TEMED (µl)	14	9,3	14	20
Ammoniumpersulfat 10% (µl)	140	93	140	200

Material und Methoden

Der Einsatz von Trenngelen unterschiedlicher Zusammensetzung wurde aufgrund der unterschiedlichen Größen der zu trennenden Proteine benötigt.

8% Trenngel: HSP90, HSP70, BiP/GRP78, Caspase12

12% Trenngel: Phospho eIF2 α , eIF2 α

15% Trenngel: LC3

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt, um den enzymatischen Abbau der Proteine zu verlangsamen. Die Proben wurden nach der Zugabe des Auftragspuffers für 5 min bei 97°C denaturiert und schließlich zusammen mit einem Protein Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder) auf das Gel geladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V bis die Proteine das Sammelgel durchlaufen hatten und wurde dann bei 130 V fortgeführt.

Proteinquantifizierung mittels Western Blot Analyse

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte unter Verwendung einer Tank Blot-Apparatur. Um die Bindung der Proteine an die Membran zu ermöglichen, wurde diese zunächst für 1 min in Methanol und anschließend eine weitere Minute in Transferpuffer inkubiert. Whatmanpapiere und Gel wurden ebenfalls kurz in Transferpuffer inkubiert.

Es wurde für 90 min bei einer Stromstärke von 400 mA geblottet.

Die mit Protein beladenen Membranen wurden dann, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, 60 Minuten lang in Blockpuffer unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Inkubation der Membran mit den entsprechenden Erst-Antikörpern wurde über mindestens eine Nacht bei 4°C ebenfalls unter konstantem Schütteln durchgeführt.

Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Membran 3 Mal je 10 min mit PBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Membran mehrmals mit PBST über 90 min gewaschen, um einen

Material und Methoden

Überschuss an Sekundärantikörper zu entfernen. Alle beschriebenen Arbeitsgänge fanden auf dem Schüttler statt.

Detektion

Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Nachweises. Hierfür wurden unterschiedliche Reagenzien verwendet, abhängig von der Stärke des zu messenden Signals. Die Membran wurde 5 min in 1 ml des Reagenz inkubiert. Nach der Entfernung der überschüssigen Chemilumineszenz-Lösung, wurde die Membran beidseits von einer Kunststoffolie bedeckt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

Die Aufnahmen des Chemilumineszenzsignals erfolgten im Entwickler, wobei die Signalintensitäten der Banden mit dem Programm „Quantity One“ ausgewertet wurden. Die Signalintensitäten der zu bestimmenden Markerproteine wurde hierbei auf den zu ihnen gehörenden Aktin-Wert normalisiert, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Werte untereinander zu gewährleisten. Aktin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorhandenes Strukturprotein. Seine Menge ist ungefähr proportional zur Zellmasse einer bestimmten Zellart.

Nach der Messung wurden die Membranen 60 min mit PBST gewaschen und entweder erneut mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert, oder an der Luft getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angewendet wurde.

Material und Methoden

3.2.3 Immunzytochemie

Kultivierung

Zur Züchtung der Zellen für die immunzytochemische Färbung wurden 24-Well-Platten mit Deckgläsern versehen und wie oben beschrieben, mit Poly-L-Ornithin behandelt, um die Zelladhäsion zu erleichtern.

Es wurden 75.000 Zellen pro Kammer ausgesät und in undifferenziertem Zustand unter oben genannten Standardkulturbedingungen gehalten, bis eine ausreichende Zelldichte für weitere Versuche erreicht war. Anschließend wurde das Proliferationsmedium abgesaugt und durch das Differenzierungsmedium ersetzt. Das Medium wurde alle 1-2 Tage gewechselt um abgestorbene Zellen von den Deckgläsern zu entfernen. Die Differenzierung der Zellen wurde über maximal 7 Tage durchgeführt.

Fixierung der Zellen

Für die Immunzytochemie wurden die Zellen zu den beschriebenen Zeitpunkten fixiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in den Kammern dreimalig mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände und abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 20 min lang in 4%igem Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3 Mal mit PBS gewaschen, wobei die letzte Füllung mit 500µl PBS in den Kammern verblieb.

Die so fixierten Zellen konnten dann in den 24-Well-Platten bei 4°C bis zu ihrer immunzytochemischen Färbung über mehrere Wochen bis Monate aufbewahrt werden.

Immunzytochemische Färbung

Für die Färbung wurden die Deckgläser mit den fixierten Zellen mit einer Pinzette aus den 24-Well-Platten entnommen. Es schloss sich ein 15 minütiger Waschgang in einer Waschkammer mit PBS/ 0,1% Triton X-100 an, um die Zellen für die Färbung zu permeabilisieren.

Material und Methoden

Nach dem Waschen wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit einer 1:50 Verdünnung von Eserum in PBS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Hierfür wurden Deckgläser mit der nach unten gerichteten Zellseite auf einen 50 µl umfassenden Tropfen auf Parafilm platziert. Als nächstes wurde in gleicher Weise die Inkubation mit dem Primärantikörper in der jeweils oben beschriebenen Konzentration, in einer 1:50 Verdünnung mit Eserum in PBS, durchgeführt.

Die Inkubationszeit betrug entweder 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Deckgläser für 15 min mit PBS/ 0,1% Triton X-100 gewaschen und 30 min bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Da es sich bei dem Sekundärantikörper um einen mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörper handelte, mussten ab diesem Schritt alle weiteren unter Meidung längerer Lichtexposition durchgeführt werden, um einen Verlust der Fluoreszenzstärke zu vermeiden.

Schließlich wurde erneut 15 min lang gewaschen, wobei der Waschlösung im Anschluss für weitere 5 Min DAPI zum Anfärben der Zellkerne hinzugefügt wurde.

Zur Einbettung wurde ein Tropfen Paramount G auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt und getrocknet.

Die Objektträger wurden dann zur Aufbewahrung bei 4°C gelagert.

Mikroskopie

Die Analyse der Präparate wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde das Programm Axio Vision 4.7.2 verwendet.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlen und -Relationen wurden bestimmt durch die Anfertigung von Reihenaufnahmen der Präparate und ihre spätere Auswertung am PC. Hierfür

Material und Methoden

wurden zum einen die Zellkerne aller lebenden Zellen in den Färbungen gezählt, und zum anderen die Zahl der für einen Zelltyp-spezifischen Marker positiven Zellen bestimmt.

Hieraus wurden dann die prozentualen Anteile der verschiedenen Marker-positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen errechnet.

Hemmstoffkonzentrationen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss die Manipulation unterschiedlicher Proteinabbauwege auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen hat. Für diesen Zweck wurden drei unterschiedliche Substanzen verwendet. Tunicamycin zur Induktion von ER-Stress, Chloroquin zur Hemmung der Autophagie und MG 132 zur Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus.

Zunächst sollte die für die neuralen Stammzellen gerade nicht mehr letale Konzentration jeder Substanz ermittelt werden, die später bei der Testung des Einflusses der Hemmstoffe auf die Differenzierung der Stammzellen verwendet werden sollte. Hierfür kam ein MTT-Test zur Bestimmung der Zell-Viabilität zur Anwendung. Die verwendeten Konzentrationen sind orientiert an bestehender Literatur für die einzelnen Hemmstoffe.

Tunicamycin: (Fontanier-Razzaq, Hay et al. 1999; Chen, Fan et al. 2007; Anantharam, Kanthasamy et al. 2008; Concannon, Ward et al. 2008)

MG132: (Lee and Goldberg 1998; Zavrski, Naujokat et al. 2003; Ding, Dimayuga et al. 2006; Middeldorp, Kamphuis et al. 2009)

Chloroquin: (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2003; Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Ramser, Kokot et al. 2009)

Material und Methoden

3.2.4 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität der drei Substanzen auf die differenzierenden neuronalen Stammzellen zu untersuchen, wurde ein MTT-Test angewandt (Mosmann 1983). Dieser bestimmt die Anzahl der lebenden Zellen einer Suspension, basierend auf der Messung ihrer metabolischen Aktivität. Er beruht auf der intrazellulären Reduktion einer gelben wasserlöslichen Tetrazoliumverbindung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem unlöslichen, blauvioletten Formazan, mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm. Die entstehende Menge an Formazan ist hierbei proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Undifferenzierte neurale Stammzellen wurden in 96-Well-Platten, zu 40.000 Zellen pro Kammer, ausgesät. Mit Beginn der Ausdifferenzierung der Zellen, d.h. dem Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Hemmstoffe inkubiert, die dem Differenzierungsmedium zugesetzt wurden. Zu den unten beschriebenen Zeitpunkten der Behandlung wurde der MTT-Test durchgeführt. Hierfür wurden 15 µl der MTT-Färbelösung zu den in jeder Kammer verbliebenen 50 µl des Mediums gegeben. Die Platte wurde daraufhin für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeder Kammer 100 µl der MTT-Stopp-Lösung hinzugefügt und es wurde erneut bei 37°C für eine weitere Stunde inkubiert. Um die Kristalle in den Proben vollständig aufzulösen, wurden die Platten auf einem Schüttler für ca. 20 min geschüttelt. Die Absorption wurde dann bei 570 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes und der Software µQuant gemessen.

IV. Ergebnisse

4.1 In vitro Charakterisierung der neuralen Stammzellen

Zur Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten neuralen Stammzellen wurden zunächst immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis der Stammzeleigenschaften, zur Proliferation, Differenzierung und Apoptose unbehandelter neuraler Stammzellen durchgeführt. Die neuralen Stammzellen wurden hierzu aus 14 Tage alten Mausembryonen entnommen und wie oben beschrieben zunächst als Neurosphären (s. Abbildung IV-1) in Suspensionskultur bzw. in adhärenter Zellkultur kultiviert.

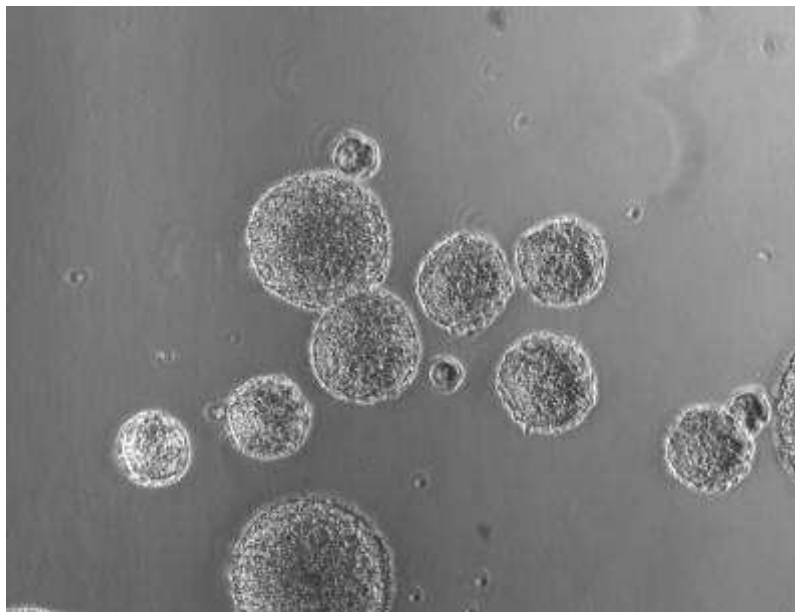


Abbildung IV-1: Neurosphären, bestehend aus einzelnen neuralen Stammzellen und Vorläuferzellen in Suspensionskultur unter dem Lichtmikroskop

Die Immunfluoreszenzfärbungen der unbehandelten neuralen Stammzellen wurden in unterschiedlichen Differenzierungsstadien angefertigt. Hierbei wurde die erste Färbung mit undifferenzierten neuralen Stammzellen durchgeführt, im Verlauf als d0 bezeichnet. Ab diesem Tag wurden den verbliebenen Zellen die Wachstumsfaktoren EGF und FGF entzogen und auf diese Weise die Differenzierung der Zellen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten eingeleitet. Die folgenden Färbungen fanden nach einem Tag (d1), nach 3 Tagen (d3) und nach 7 Tagen (d7) der Differenzierung statt.

Ergebnisse

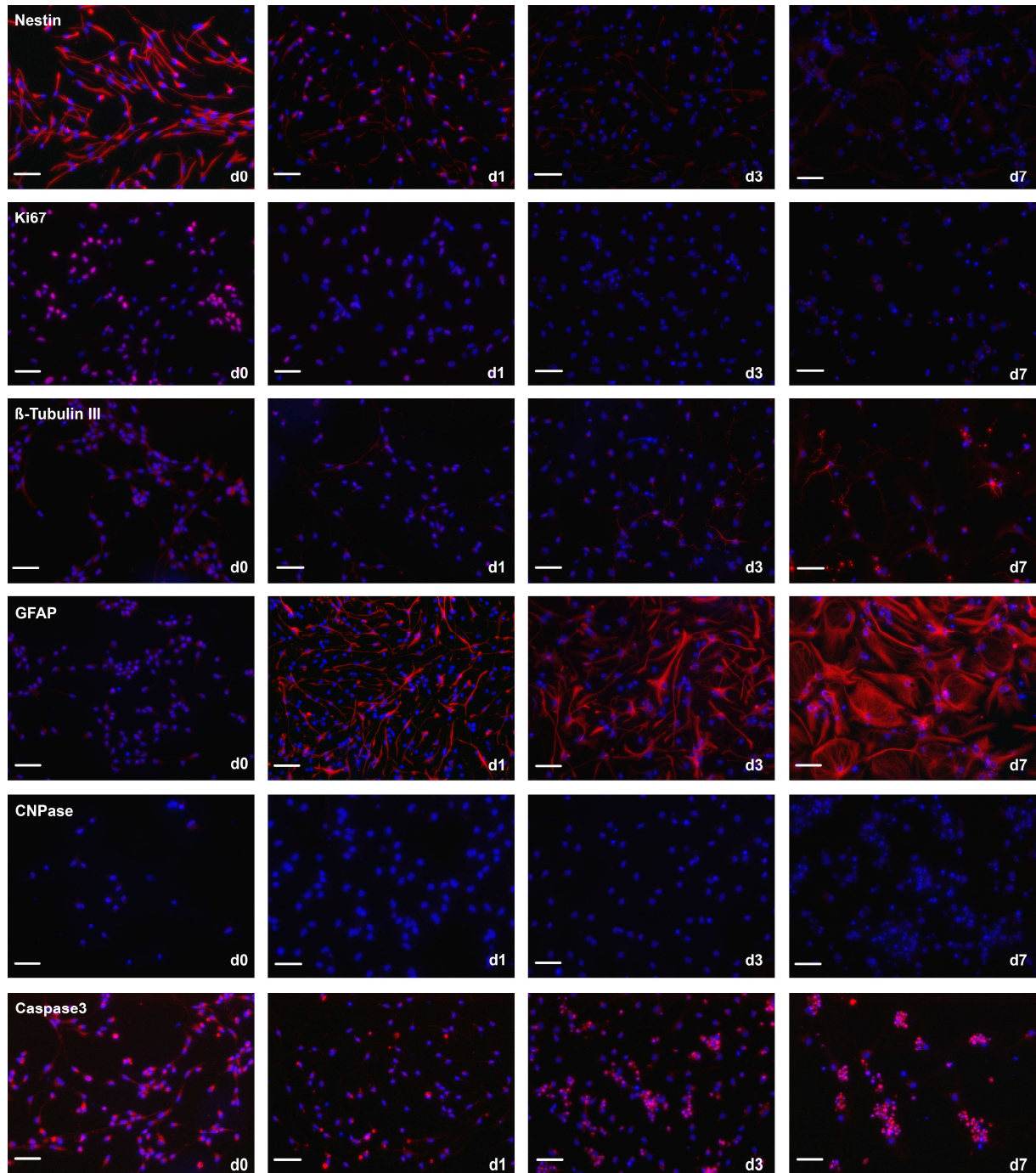


Abbildung IV-2: Immunzytochemische Untersuchung der Markerexpression der differenzierenden neuralen Stammzellen. Immunzytochemische Färbungen von undifferenzierten neuralen Stammzellen (d0) sowie von Zellen einen Tag (d1), 3 Tage (d3) und 7 Tage (d7) nach Induktion der Differenzierung durch Entzug der Wachstumsfaktoren.

Die einzelnen Färbungen zeigen: Nestin: undifferenzierte neuronale Stammzellen; Ki 67: proliferierende Zellen; β -Tubulin III: Neurone; GFAP: Astrozyten; CNPase: Oligodendrozyten; Caspase 3: Zellen, in denen die Apoptose induziert ist.

Rot ist der jeweils genannte Marker angefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 50 μ m.

Ergebnisse

4.1.1 Nachweis der Stammzeleigenschaft der undifferenzierten Zellen

Zum Nachweis des undifferenzierten Zustandes der neuralen Stammzellen vor der Induktion der Differenzierung, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Nestin zum Zeitpunkt d0 durchgeführt. Nestin ist ein Markerprotein für undifferenzierte neurale Progenitorzellen (Kawaguchi, Miyata et al. 2001), das in späteren differenzierten Zellformen kaum noch nachweisbar ist. In der Immunfluoreszenzfärbung zum Zeitpunkt d0 zeigten 100% der Zellen ein Nestin-positives Signal, was ihren Status als undifferenzierte Stammzellen belegt. Am Zeitpunkt d1 der Differenzierung war hingegen nur noch eine geringe Menge an Nestin nachweisbar, die dann über d3 weiter abnahm bis am Zeitpunkt d7 keine Nestin positiven Zellen mehr nachweisbar waren (0%) (s. Abbildung IV-2, Nestin).

4.1.2 Nachweis der Proliferationseigenschaften der neuralen Stammzellen

Ki67 ist ein im Kern exprimiertes Markerprotein für die Zellzyklusaktivität. Es ist in allen proliferierenden Zellen nachweisbar, sowohl in der späten G1, S und G2 als auch in den Mitose-Phasen (Endl and Gerdes 2000). In ruhenden Zellen (G0) wird Ki67 nicht gebildet. Die immunzytochemische Analyse mit Antikörpern gegen Ki67 zeigte, dass am Tag d0 65,4% der noch undifferenzierten neuralen Stammzellen eine proliferative Aktivität aufwiesen, während am Tag d7 der Differenzierung nur noch 0,8% Ki67-positive Zellen nachweisbar waren (s. Abbildung IV-2, Ki67).

4.1.3 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Neuronen

Die Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des prozentualen Anteils der Neurone an den differenzierenden Zellen wurde mit Antikörpern gegen das Neuronenspezifische Strukturprotein β -Tubulin III durchgeführt, das Bestandteil der Mikrotubuli ist. Bei den undifferenzierten Zellen am Zeitpunkt d0 waren wie erwartet keine Neurone nachweisbar, während bereits am Zeitpunkt d1 und stärker noch am Zeitpunkt d3 neuronale Zellen zu finden waren. Nach 7 Tagen der Differenzierung

Ergebnisse

belief sich der prozentuale Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl auf 6,1% (s. Abbildung IV-2, β -Tubulin III).

4.1.4 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Astrozyten

Als Markerprotein für Astrozyten wurde GFAP (Glial fibrillary acidic protein) verwendet. Dies ist ein Intermediärfilament, das im Zytoplasma von Gliazellen des ZNS nachweisbar ist (Reeves, Helman et al. 1989).

Am Zeitpunkt d0 waren 0% Astrozyten nachweisbar, aber bereits am Zeitpunkt d1 der Differenzierung waren feine, jedoch gut erkennbare Fortsätze zu erkennen. Im Verlauf zeigte sich dann eine sich immer weiter erstreckende Expansion und Dichte der Zellfortsätze. Zahlenmäßig stellen die Astrozyten am Tag 7 mit 95% den größten Anteil der differenzierten Zellen dar (s. Abbildung IV-2, GFAP).

4.1.5 Nachweis der Differenzierung neuraler Stammzellen zu Oligodendrozyten

Nach den Astrozyten sind die Oligodendrozyten die zweithäufigsten Gliazellen im zentralen Nervensystem. Für ihren Nachweis wurde ein Antikörper gegen das Enzym CNPase verwendet, das in reifen Oligodendrozyten vorhanden ist und sich an der Myelinisierung der Axone beteiligt (Knapp, Skoff et al. 1988).

Bei der Untersuchung der Ausdifferenzierung der neuralen Stammzellen zeigte sich jedoch, dass weder im undifferenzierten Zustand (0%) noch nach 7-tägiger Differenzierung (0%) eine signifikante Anzahl an Oligodendrozyten nachweisbar war. Lediglich ganz vereinzelt wurden positive Zellen beobachtet (s. Abbildung IV-2, CNPase).

4.1.6 Nachweis der Apoptose-Aktivität während der Differenzierung

Zuletzt sollte die Apoptoserate, der neuralen Stammzellen gemessen werden.

Dies geschah mit Hilfe eines Antikörpers gegen aktivierte Caspase 3.

Sie gehört zu den spät aktivierten Caspasen und ist immunzytochemisch ubiquitär im Zytoplasma und Nucleus aller apoptotisch sterbenden Zellen detektierbar. Während im

Ergebnisse

undifferenzierten Zustand 3,3% der Zellen eine Aktivierung der Apoptose zeigten, war eine Bestimmung der apoptotischen Zellen am Zeitpunkt d7 nicht möglich. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich größere Mengen abgestorbener Zellen im Präparat, die immer noch eine sehr hohe Intensität des Markers zeigten und damit das Erkennen, der noch lebenden oder gerade sterbenden markierten Zellen unmöglich machten. Allerdings entstand bei der optischen Beurteilung der Zellen, ohne sie zu zählen, der Eindruck einer stärkeren Induktion der Apoptose am Zeitpunkt d0, die dann sukzessiv abnahm bis zum Zeitpunkt d7. Am Beginn der Differenzierung konnte in nahezu allen Zellkörpern ein erhöhtes positives Signal wahrgenommen werden (s. Abbildung IV-2, Caspase 3).

Ergebnisse

4.2 Western Blot Analyse der Proteinabbaumarker

Zunächst sollte untersucht werden, ob es während der Ausdifferenzierung der neuronalen Stammzellen innerhalb der ersten 7 Tage zur Aktivierung von Proteinabbauprozessen kommt. Hierfür wurden erneut die 4 bereits bekannten Bestimmungszeitpunkte gewählt, d.h. Tag 0 (d0), kennzeichnend für die undifferenzierten neuronalen Stammzellen einerseits, und Tag 1 (d1), Tag 3 (d3) und Tag 7 (d7) als Zeitpunkte der Ausdifferenzierung andererseits.

Für die Versuche wurden die Zellen als Monolayer kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach einer Proteinbestimmung wurde für alle Versuche und alle Proben eines Markerproteins die gleiche Proteinmenge für die SDS-PAGE verwendet und jeweils mit einer Pufferlösung auf das gleiche Volumen gebracht. Mit Hilfe der Markerproteine sollten 3 unterschiedliche Abbauwege untersucht werden. Dies sind im Einzelnen:

- ER-Stress Antwort
- Autophagie
- Apoptose

In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils die Western Blot Ergebnisse für das Markerprotein sowie für Aktin, das zur Normalisierung diente, dargestellt. Zur Verdeutlichung der Lokalisation des jeweiligen Markerproteins in der Zelle, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung angefertigt. Die Messergebnisse sind im Anschluss in einem Balkendiagramm dargestellt.

Es sind jeweils die im Western Blot Verfahren dargestellten Banden des betreffenden Markers und von Aktin dargestellt. Alle photometrisch gemessenen Werte der Markerproteine wurden auf den entsprechenden Aktin-Wert normalisiert, um sie untereinander vergleichbar zu machen. Jeder Versuch wurde mindestens 6 Mal wiederholt. Die Balken zeigen hierbei den Mittelwert aus allen Versuchen mit ihrer Standardabweichung.

Ergebnisse

Immunzytochemische Darstellung der Proteinabbaumarker

Alle im Western Blot verwendeten Proteinabbaumarker wurden zum Nachweis ihrer intrazellulären Lokalisation immunzytochemisch angefärbt (s. Abbildung IV-3).

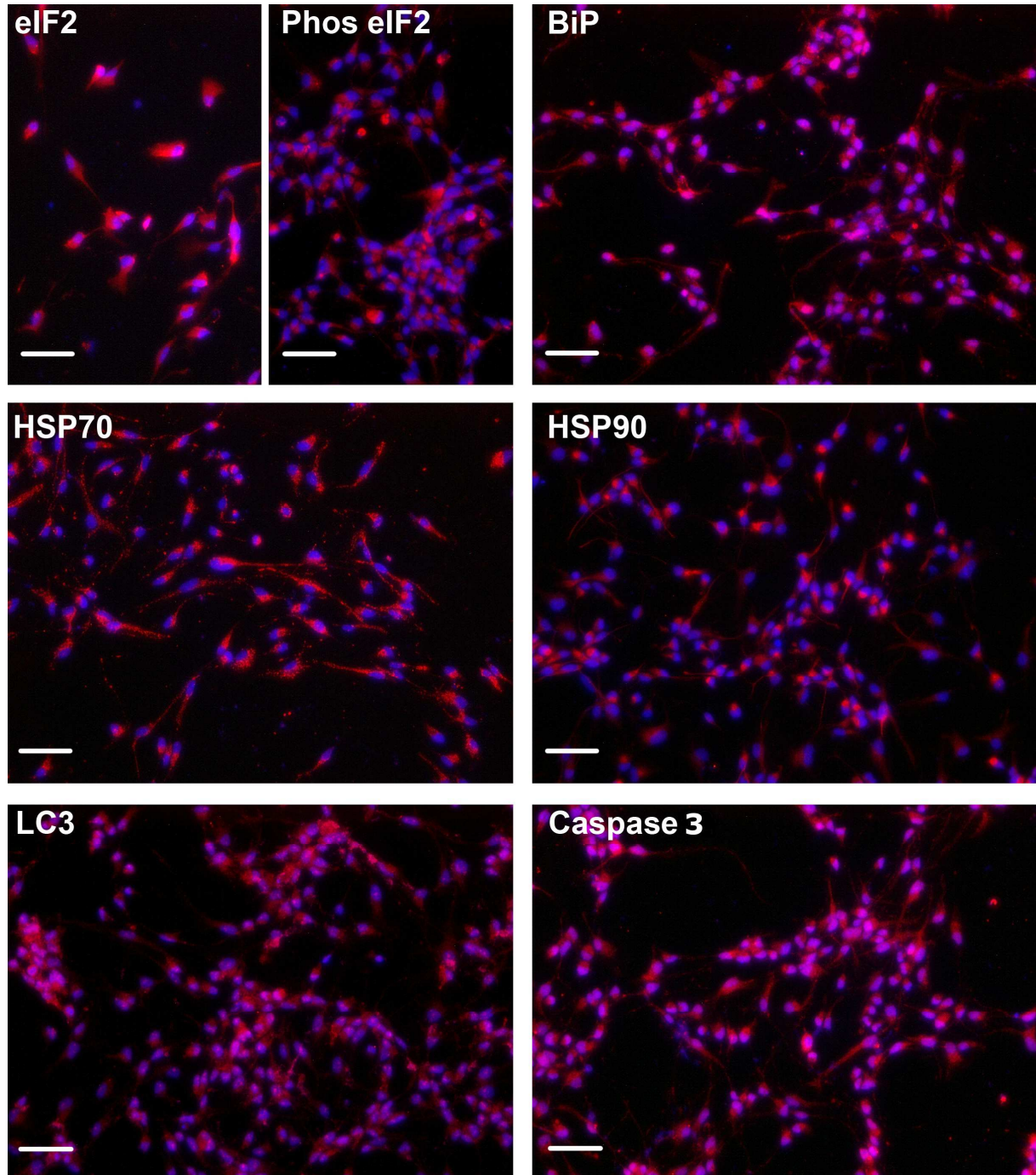


Abbildung IV-3: Immunzytochemische Darstellung der Markerproteine in undifferenzierten neuronalen Stammzellen zum Nachweis ihrer Lokalisation in der Zelle.

ER-Stress: eIF2 α , Phospho eIF2 α , BiP, HSP70, HSP90; Autophagie: LC3; Apoptose: Caspase3

Die genannten Marker sind jeweils rot angefärbt, die Zellkerne blau (DAPI)

Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 50 μ m.

Ergebnisse

Hierfür wurden undifferenzierte neurale Stammzellen (d0) verwendet, da sich im Verlauf der Western Blot Untersuchungen zeigte, dass die Marker zu diesem Zeitpunkt in der Regel am stärksten exprimiert wurden und ihre Darstellung somit erleichtert wurde.

4.2.1 ER-Stress Antwort

Zur Untersuchung des Zellstress wurden als Markerproteine Phospho eIF2 α , eIF2 α , HSP70, HSP90 und BiP/GRP78 detektiert.

Phospho eIF2 α ist ein Transkriptionsfaktor der bei erhöhtem Zellstress durch Phosphorylierung der inaktiven Form eIF2 α im Endoplasmatischen Retikulum gebildet wird. Außerdem wurden die beiden Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 und das Chaperon BiP/GRP78 untersucht, deren Konzentrationen bei erhöhtem Zellstress zunehmen. Die Ergebnisse sind in folgenden Diagrammen dargestellt.

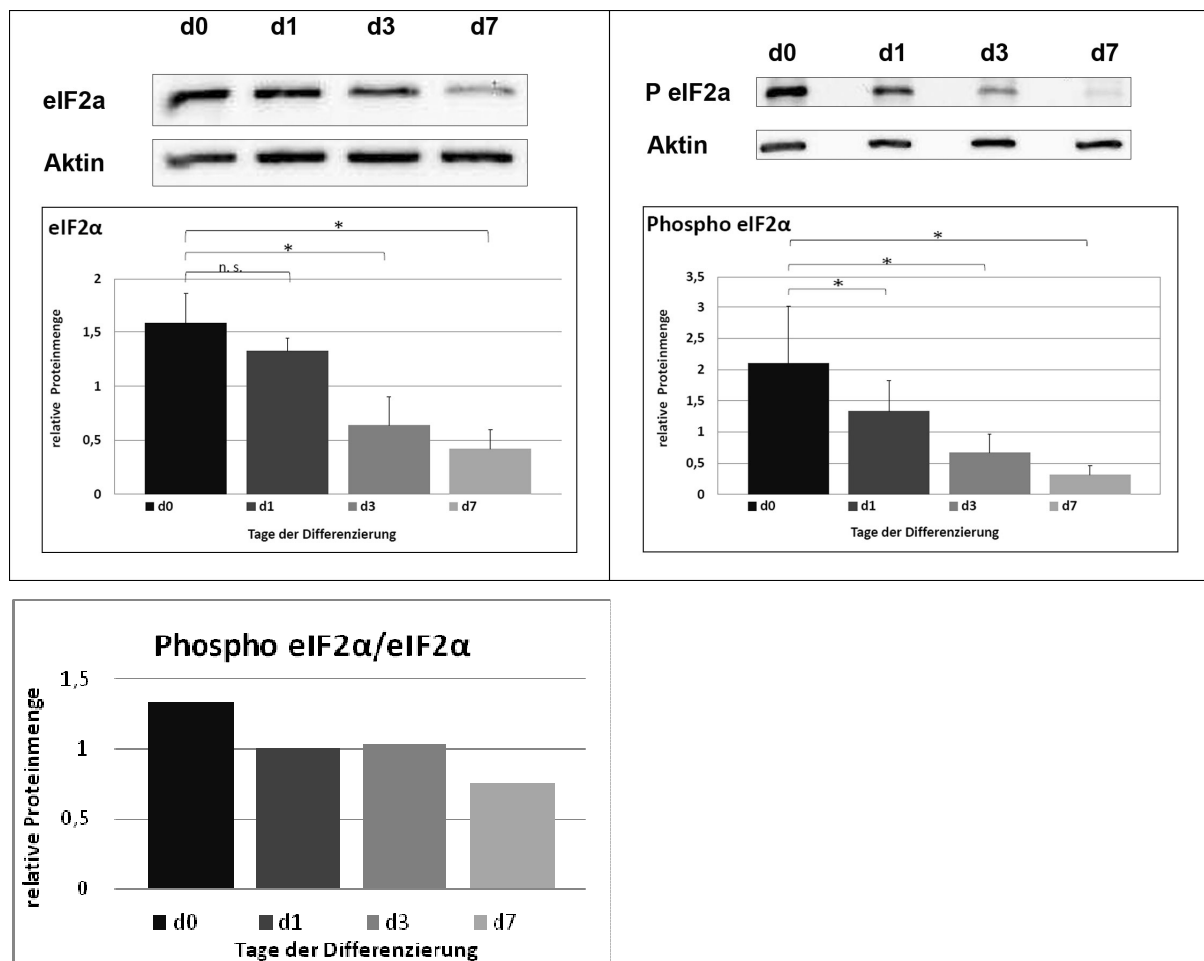


Abbildung IV-4: Western Blot Analyse der inaktiven Form eIF2 α und seiner aktivierten phosphorylierten Form Phospho eIF2 α und graphische Darstellung ihrer relativen gemessenen Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung.

Unten: Verhältnis von Phospho eIF2 α zu eIF2 α ;

*= $p < 0,05$; n. s. = nicht signifikant

Ergebnisse

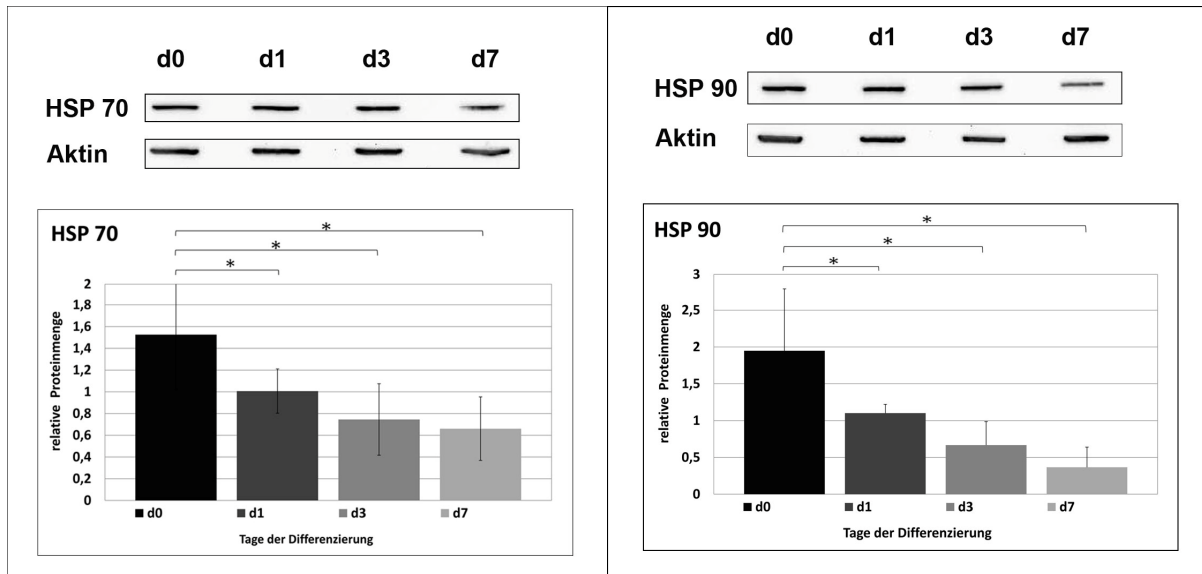


Abbildung IV-5: Western Blot Analyse der beiden Hitzeschockproteine HSP 70 und HSP 90 und graphische Darstellung ihrer relativen Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung.

*= $p < 0,05$

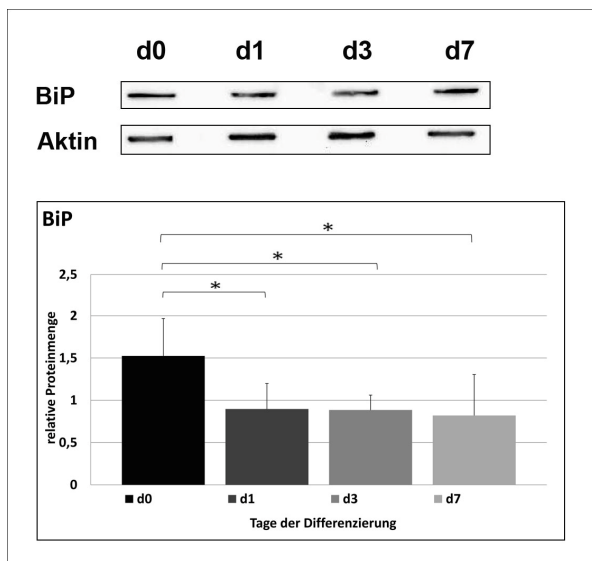


Abbildung IV-6: Western Blot Analyse von BiP und graphische Darstellung seiner relativen Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung.

*= $p < 0,05$

Bei allen Markern, die zur Bestimmung des Zellstresses bestimmt wurden, zeigte sich eine Abnahme ihrer Konzentrationen während der Ausdifferenzierung in den Zellen. Dies war am deutlichsten bei eIF2 α bzw. Phospho eIF2 α (s. Abbildung IV-4), HSP90 und etwas weniger bei HSP70 nachweisbar (s. Abbildung IV-5). Bei der Bestimmung von BiP fiel hierbei auf, dass seine Konzentration vor allem innerhalb

Ergebnisse

des ersten Tages der Differenzierung abfiel und im weiteren Verlauf konstant blieb (s. Abbildung IV-6). Die statistische Auswertung zeigte bei allen untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Abfall der Markerproteine im Verlauf der Differenzierung ($p < 0,05$) mit Ausnahme des ersten Differenzierungstages von eIF2 α . Zusammengefasst scheint der ER-Stress den die neuronalen Stammzellen während der ersten Tage ihrer Differenzierung zeigen, deutlich abzunehmen.

4.2.2 Apoptose

Das Markerprotein ProCaspase12 führt bei seiner Aktivierung zum Start einer Reaktionskaskade die zur Apoptose der Zelle führt.

Bei seiner Untersuchung im Western Blot Verfahren zeigte sich eine deutliche und konstante Abnahme der inaktiven Form Procaspase12, begleitet von einem Anstieg der aktiven Caspase12 im Verlauf der Differenzierung (s. Abbildung IV-7), was darauf schließen lässt, dass während der Differenzierung die durch Caspase12 induzierte Apoptose herauf reguliert wird.

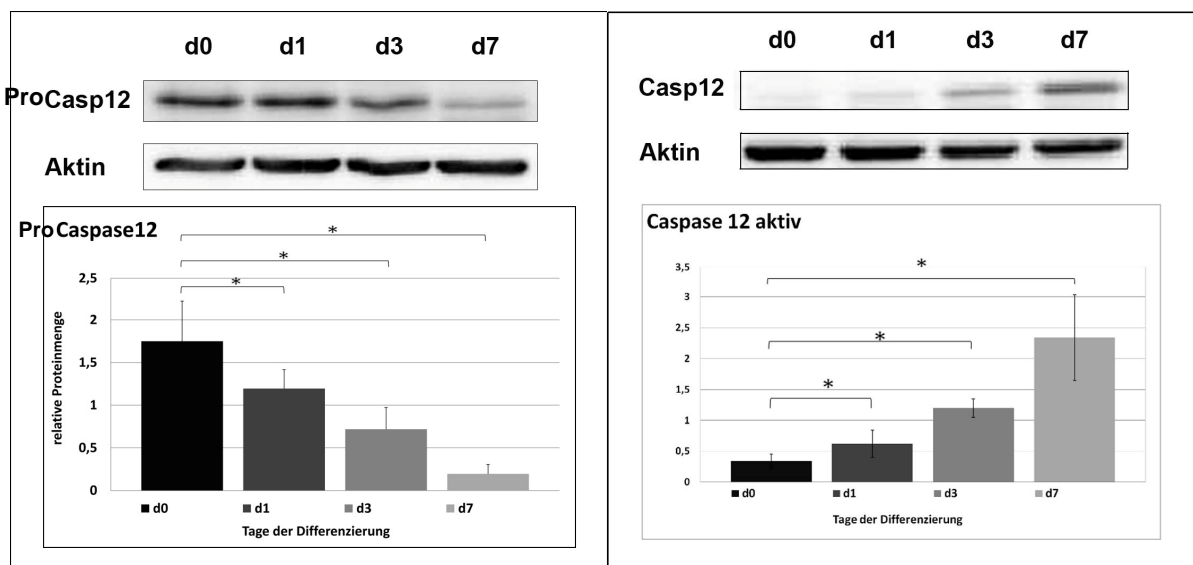


Abbildung IV-7: Western Blot Analyse des Apoptose-Markerproteins ProCaspase12 links und graphische Darstellung seiner relativen Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung im Vergleich zu seiner aktivierten Form auf der rechten Seite.

*= $p < 0,05$

Ergebnisse

4.2.3 Autophagie

Die Aktivierung der Autophagie in den Zellen wurde mit Hilfe des Markerproteins LC3 bestimmt. Dieses Protein liegt in der Zelle in zwei unterschiedlichen Formen vor, zum einen als frei im Zytoplasma lokalisiertes LC3 I und zum anderen als membrangebundenes Protein des Autophagosoms. Für die vorliegenden Messungen wurde hierbei ausschließlich die LC3 II-Unterform berücksichtigt und für das Ergebnis auf Aktin normalisiert.

Im Gegensatz zu den Markern des ER-Stresses zeigt LC3 einen moderaten Anstieg im Verlauf der Differenzierung (s. Abbildung IV-8). Dieser ist allerdings erst am Tag 7 der Differenzierung signifikant. Die Autophagie scheint also im Rahmen der Differenzierung neuraler Stammzellen im Verlauf zuzunehmen.

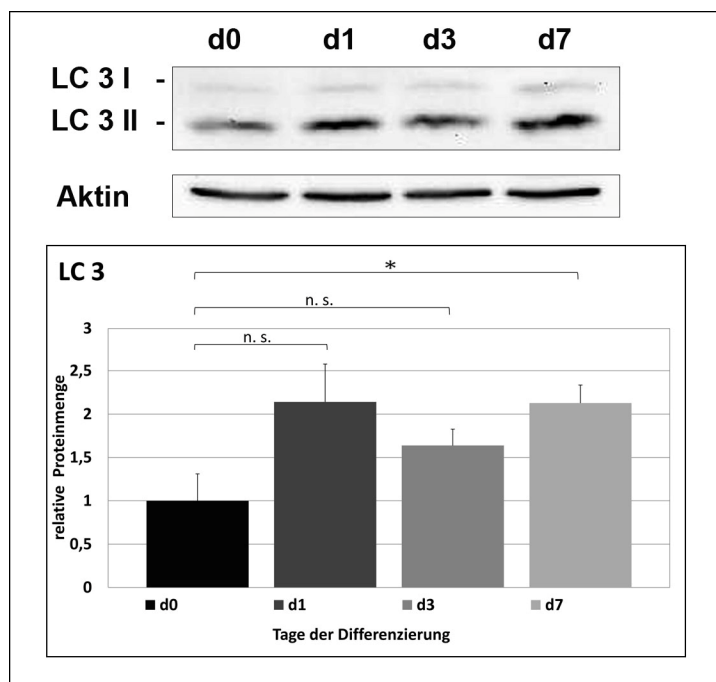


Abbildung IV-8: Western Blot Analyse des Autophagie-Markerproteins LC3 und graphische Darstellung seiner relativen Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung. Grundlage der dargestellten Werte im Diagramm ist das Verhältnis von LC3 II zu Aktin.

*= $p < 0,05$; n. s. = nicht signifikant

Ergebnisse

4.3 Einfluss der Proteinabbauaktivität auf die Differenzierung der neuralen Stammzellen

Es sollte in diesem Abschnitt untersucht werden, ob eine Beeinflussung der Proteinabbauwege eine Auswirkung auf die Differenzierung der neuralen Stammzellen, d.h. auf die relativen Zahlenverhältnisse von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten nach der Ausdifferenzierung, hat.

Es wurden zu diesem Zweck zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkung die Hemmung des Proteasoms durch Überexpression eines mutierten Proteins in einem transgenen Mausmodell auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen hat.

Als zweiter Ansatz diente eine medikamentöse Beeinflussung der verschiedenen Proteinabbauwege. Hier wurde MG 132 als Hemmstoff für das Proteasom, Tunicamycin als Induktor zellulären Stresses und Chloroquin als Hemmstoff der Autophagie eingesetzt.

In beiden Fällen wurden die Ergebnisse immunzytologisch ausgewertet.

Interessant war an dieser Stelle besonders die Beeinflussung des Proteasoms, da der proteasomale Proteinabbau nicht im Western Blot Verfahren untersucht werden konnte.

4.3.1 Hemmung des Proteasoms mittels UBB+1

In diesem Versuch wurden neurale Stammzellen, die aus transgenen Mäusen mit UBB+1 Gen (Fischer, van Dijk et al. 2009), in denen der proteasomale Proteinabbau beeinträchtigt ist, bezüglich ihrer Differenzierung in Neurone und ihrer Proliferationsrate immunzytochemisch mit neuralen Stammzellen aus nicht mutierten Geschwistertieren verglichen. Das Genprodukt UBB+1, ist eine veränderte pathologische Variante des physiologischen Ubiquitin (UBB) -Proteins. Es fungiert in der Zelle sowohl als Substrat, als auch als ein Hemmstoff des Proteasoms, ohne jedoch selbst noch zur Ubiquitinierung anderer Proteine fähig zu sein. Es tritt vermehrt in Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer und den Tauopathien auf (Fischer, De Vos et al. 2003). Seine zytotoxische Wirkung erhält es durch die Hemmung des Proteasoms und seine Ablagerung in Neuronen und Gliazellen (Tan, Sun et al. 2007; Tank and True 2009).

Ergebnisse

Für die Beurteilung der neuronalen Differenzierung wurden jeweils Zellen verwendet, die über 7 Tage differenzierten (s. Abbildung IV-9). Die Proliferationsbestimmung wurde mit undifferenzierten neuronalen Stammzellen durchgeführt (s. Abbildung IV-10).

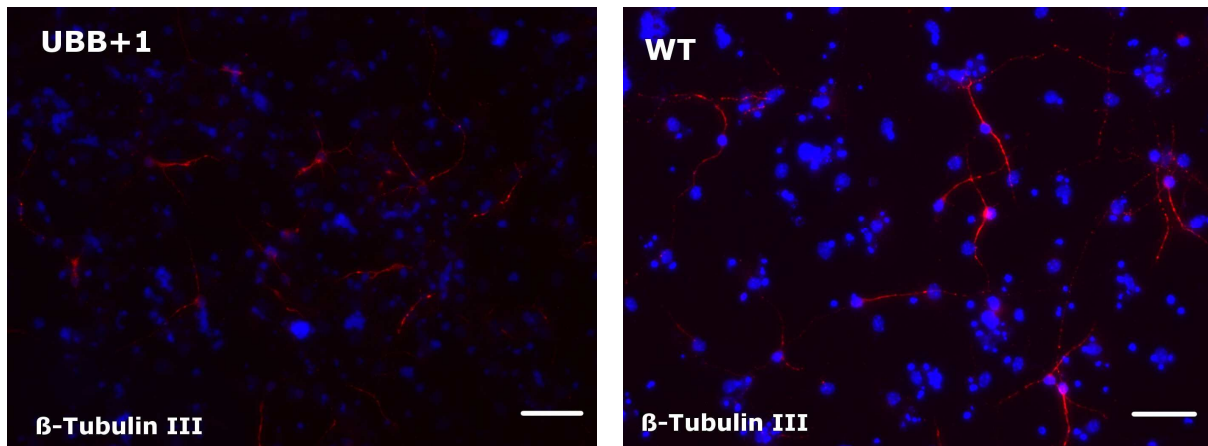


Abbildung IV-9: Immunzytologische Darstellung der neuronalen Differenzierung von 7 Tage differenzierten Zellen unter Hemmung des Proteasoms. Links: UBB+1 positive Zellen; rechts: ungehemmte Zellen vom Wildtyp. Rot dargestellt sind die β -Tubulin III-positiven Neurone und blau die Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

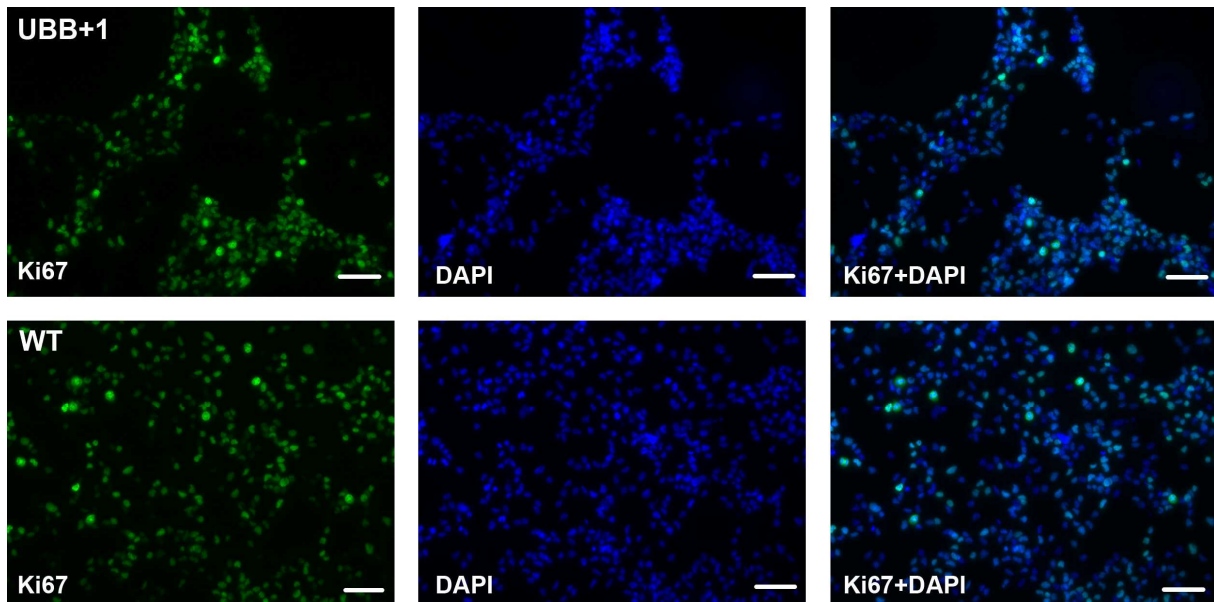


Abbildung IV-10: Darstellung des Proliferationsverhaltens unter Hemmung des Proteasoms. Die oberen Bilder zeigen die UBB+1 positiven Zellen mit beeinträchtigtiger Funktion des Proteasoms und die unteren die Wildtyp-Zellen. Die grüne Färbung zeigt proliferierende Zellen (Ki67), die Zellkerne sind blau angefärbt (DAPI), rechts jeweils eine Überlagerung beider Bilder. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Ergebnisse

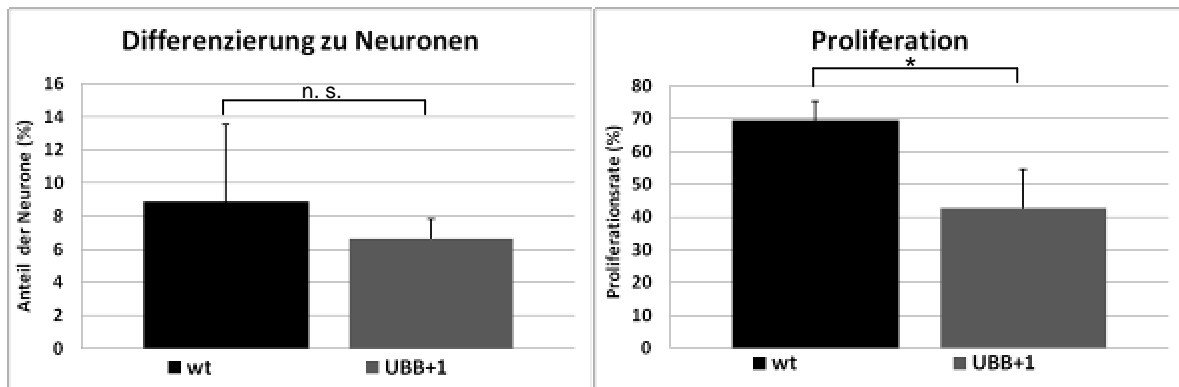


Abbildung IV-11: Vergleich der neuronalen Differenzierungsrate (Anteil β -Tubulin III-positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen) und der Proliferationsrate (Anteil Ki67-positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen) zwischen neuronalen Stammzellen des Wildtyps und der UBB+1-Mutante.

* = $p < 0,05$; n. s. = nicht signifikant

Es zeigte sich bezüglich der Differenzierung in Neurone, dass bei einem Anteil von 6,7% Neurone in der Mutante und 8,95% Neurone im Wildtyp an der Gesamtzellzahl, der Unterschied zwischen beiden Zelllinien nicht signifikant war ($p=0,257$) (s. Abbildung IV-11links).

Beim Vergleich der Proliferationsraten ergab sich jedoch bei der Mutante mit 46,6% proliferierender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl, eine signifikante Erniedrigung ($P=0,017$) im Vergleich zum Wildtyp, der 68,7% proliferierende Zellen aufwies (s. Abbildung IV-11rechts).

Ergebnisse

4.3.2 Medikamentöse Beeinflussung der Proteinabbauwege

In einem zweiten Ansatz sollte eine Hemmung bzw. Induktion der unterschiedlichen Proteinabbauwege auf medikamentösem Wege vorgenommen werden. Zur Induktion von ER-Stress fand eine Behandlung der Zellen mit Tunicamycin statt, eine Hemmung des Proteasoms wurde mit dem Proteasomhemmstoff MG 132 durchgeführt und eine Hemmung der Autophagie mit Chloroquin.

Um die subtoxische Konzentration einer jeden Substanz herauszufinden, bei der die Substanzen zwar eine Wirkung auf den Zellstoffwechsel entfalteteten, diese sich jedoch auf die Zelle nicht letal auswirkten, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Pro Substanz wurde für je zwei auf diese Weise ermittelte Konzentrationen die Differenzierung der neuralen Stammzellen immunzytochemisch untersucht.

A) Zytotoxizitätstest

Um die Konzentration jeder der drei Substanzen zu ermitteln, bei der noch kein toxisch bedingtes, vermehrtes Zellsterben auftritt, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Die Induktion der Differenzierung durch den Entzug von EGF und FGF und die Inkubation mit den Substanzen wurden zum selben Zeitpunkt begonnen, sodass die Zellen ab dem Beginn ihrer Differenzierung der Wirkung der Substanzen ausgesetzt waren. Die Behandlung der Zellen und die Auswertung ihrer Viabilität, wurden in 4 unterschiedlichen Gruppen durchgeführt. Die erste Gruppe wurde 24 h behandelt und die zweite Gruppe 72 h lang und anschließend detektiert. Die dritte Gruppe wurde ebenfalls 72 h lang mit den Substanzen behandelt und dann für weitere 4 Tage mit reinem Differenzierungsmedium ohne Substanzen weiterkultiviert, während die vierte Gruppe über die gesamten 7 Tage der Differenzierung mit den Substanzen inkubiert wurde. Es gab für jede Gruppe und jede Substanz eine unbehandelte Kontrollgruppe. Orientiert an bestehender Literatur, wurden von Tunicamycin und Chloroquin 5 verschiedene Konzentrationen und von MG 132 4 verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Es fand eine Verdünnung der jeweils eingesetzten Lösung zur nächsten Stufe um den Faktor 10 statt.

Die dargestellten Diagramme zeigen jeweils den Mittelwert aus 6 Proben, normalisiert auf den Mittelwert der unbehandelten Probe, die zum Vergleichszweck als 100% gesetzt wurde.

Ergebnisse

Die Zellen der Gruppe 3 wurden zusätzlich am Tag 7 vor ihrer Auswertung mittels MTT-Test mikroskopisch beurteilt.

Differenzierung über 7d unter ER-Stress durch Tunicamycin

Bei der Behandlung der Zellen mit Tunicamycin zeigte sich nach Inkubation für 24 h, unabhängig von der Konzentration, kaum ein Einfluss auf die Viabilität der Zellen, wohingegen nach 72 h ab einer Konzentration von 0,01 μM bereits eine erhebliche Abnahme lebender Zellen zu verzeichnen war (s. Abbildung IV-12). Interessanterweise schien in den folgenden beiden Gruppen, d.h. bei den Zellen, die über 72h Stunden mit Tunicamycin inkubiert wurden und sofort geerntet wurden und den Zellen die im Anschluss an die 72 stündige Inkubation mit Tunicamycin für 4 weitere Tage in unbehandeltem Medium inkubiert wurden, die Zellviabilität bei niedriger Tunicamycin-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe eher zuzunehmen. Dies könnte möglicherweise durch eine erhöhte Stoffwechselleistung der Zelle zu erklären sein, da die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs im MTT-Test der Glykolyserate der Zellen entspricht.

Für die anschließenden immunzytochemischen Untersuchungen der Differenzierung neuraler Stammzellen unter Einfluss von Tunicamycin wurde eine Konzentration von 1nM gewählt, da ab einer Konzentration von 0,01 μM keine Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mehr zu verzeichnen war.

Ergebnisse

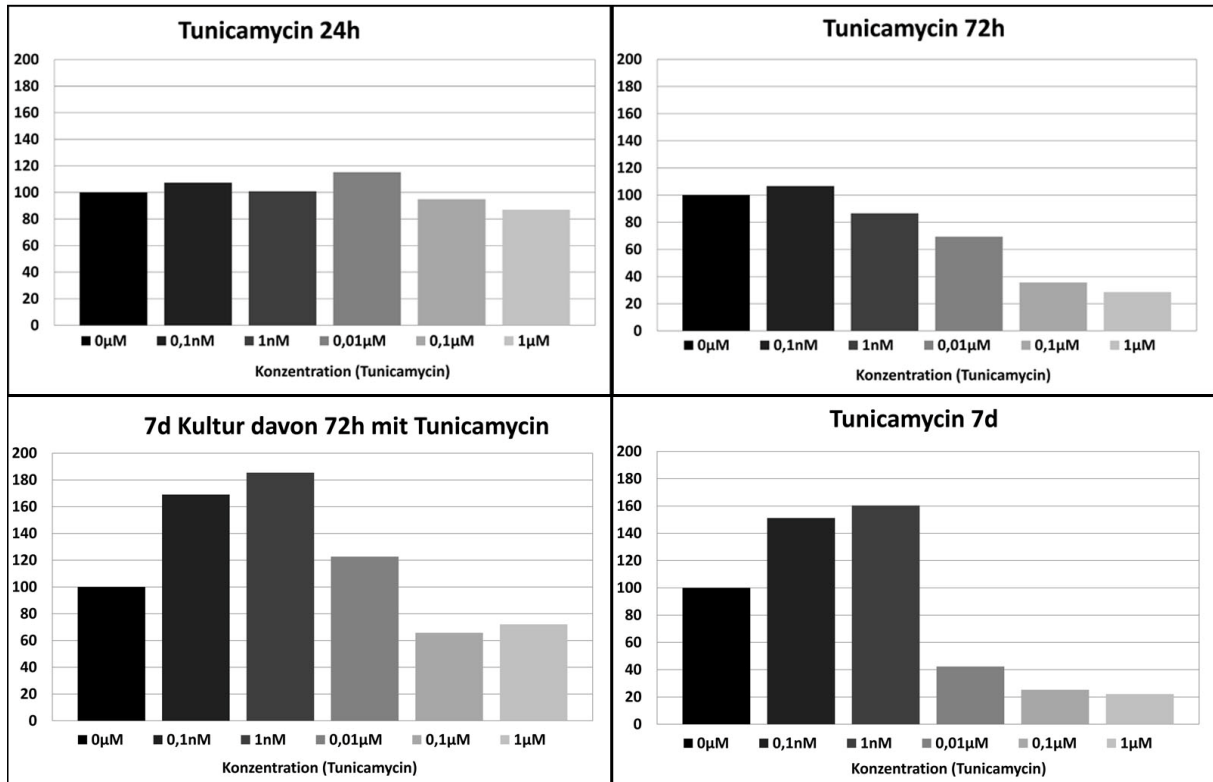


Abbildung IV-12: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tunicamycin, eines Induktors von ER Stress. Gezeigt sind 4 verschiedene Behandlungsgruppen mit unterschiedlicher Dauer der Tunicamycin-Behandlung und unterschiedlichen Überlebenszeiten. Alle Ergebnisse innerhalb einer Gruppe sind normalisiert auf den Wert der unbehandelten Zellen (0µM), der auf 100 gesetzt wurde.

Differenzierung über 7d unter Inhibition der Autophagie durch Chloroquin

Bei der Behandlung der Zellen mit Chloroquin war nach 24 h nur bei einer Konzentration von 100 µM eine zytotoxische Wirkung nachweisbar, ähnlich verhielt es sich bei einer Inkubation von 72 h mit nachfolgender Ernte der Zellen (s. Abbildung IV-13). Nach 7 Tagen durchgängiger Behandlung mit Chloroquin fand bei 10 µM ein ausgeprägtes Zellsterben statt, so dass für die weiteren Versuche eine Konzentration von 1µM gewählt wurde, zumal in der mikroskopischen Beurteilung der Zellen der Gruppe 3 am Tag 7, die mit 10 µM behandelten Zellen ein erheblich geschädigtes Aussehen aufwiesen, trotz ihrer augenscheinlich normalen Ergebnisse im MTT-Test bei dieser Konzentration.

Ergebnisse

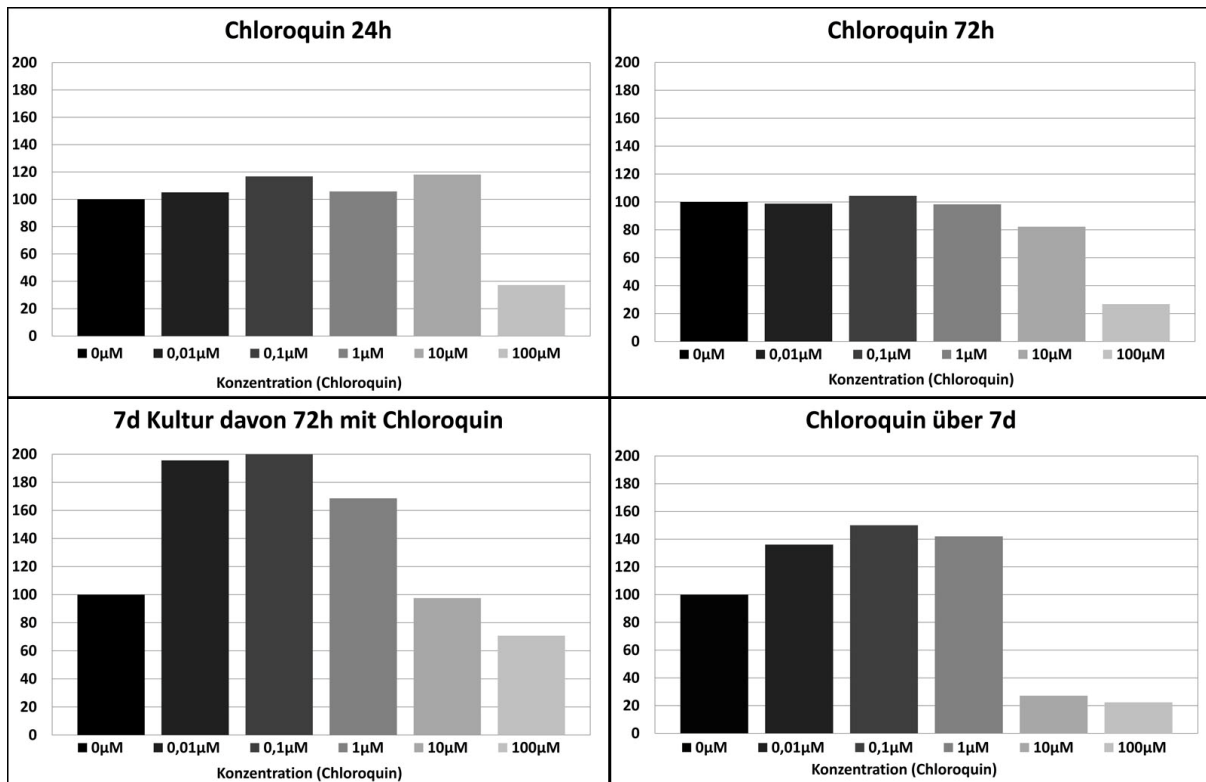


Abbildung IV-13: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Autophagie-Hemmstoffes Chloroquin für verschiedene Zeiträume nach Beginn der Differenzierung und mit unterschiedlichen Überlebenszeiträumen. Gezeigt sind 4 verschiedene Behandlungsgruppen mit unterschiedlicher Dauer der Chloroquin-Behandlung und unterschiedlichen Überlebenszeiten. Alle Ergebnisse innerhalb einer Gruppe sind normalisiert auf den Wert der unbehandelten Zellen (0 μM), der auf 100 gesetzt wurde.

Differenzierung über 7d unter Hemmung des Proteasoms durch MG 132

Im Unterschied zu der Behandlung mit Tunicamycin und Chloroquin wurde bei der MG 132-Behandlung in den ersten drei Behandlungsgruppen kaum ein Effekt auf die Viabilität der Zellen erzielt (s. Abbildung IV-14). Erst in der Gruppe 4, d.h. der Gruppe, die über die gesamten 7 Tage mit MG132 inkubiert wurde, nimmt die Viabilität bei der höchsten Konzentration um die Hälfte ab. Dies deckte sich jedoch nicht mit der mikroskopischen Beurteilung der Zellen der Gruppe 3 am Tag 7, d.h. der Gruppe, die 72h Stunden mit MG132 und im Anschluss daran 4 weitere Tage in unbehandeltem Medium inkubiert wurde. Diese Zellen zeigten im Diagramm zwar eine sehr hohe Viabilität bei 0,1 μM, in der mikroskopischen Beurteilung schienen sie jedoch bereits deutlich geschädigt zu sein. Aus diesem Grund wurde für die

Ergebnisse

immunzytochemische Untersuchung der Differenzierung neuraler Stammzellen unter dem Einfluss von MG 132 eine Konzentration von 0,01 μ M gewählt.

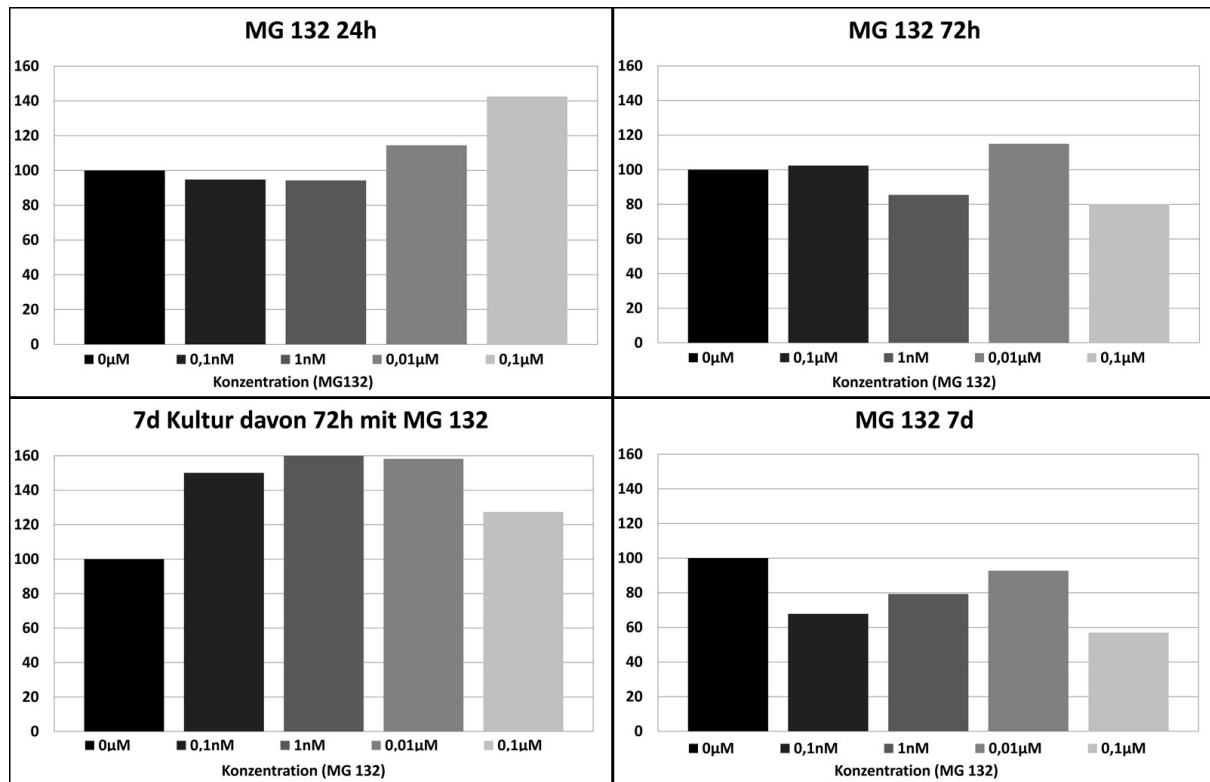


Abbildung IV-14: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteasom-Hemmstoffes MG132. Gezeigt sind 4 verschiedene Behandlungsgruppen mit unterschiedlicher Dauer der MG132-Behandlung und unterschiedlichen Überlebenszeiten. Alle Ergebnisse innerhalb einer Gruppe sind normalisiert auf den Wert der unbehandelten Zellen (0 μ M), der auf 100 gesetzt wurde.

B) Immunzytochemie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde für die Behandlung mit den Hemmstoffen für jeden von ihnen die im Vorversuch als am geeignetsten ermittelte Konzentration verwendet. Mit dem Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF am Tag 0 wurde dem Kulturmedium die entsprechende Menge an Hemmstoff zugesetzt, d.h. 0,01 μ M MG 132, 1nM Tunicamycin bzw. 1 μ M Chloroquin. Als Kontrollgruppe wurde eine unbehandelte Zellfraktion mitgeführt. Die Inkubation mit den Hemmstoffen fand über 72 h statt, danach erhielten alle Zellen für weitere 4 Tage hemmstoffreies Kulturmedium.

Ein Bild nach jeweils 7 tägiger Differenzierung ist unten abgebildet (s. Abbildung IV-15).

Ergebnisse

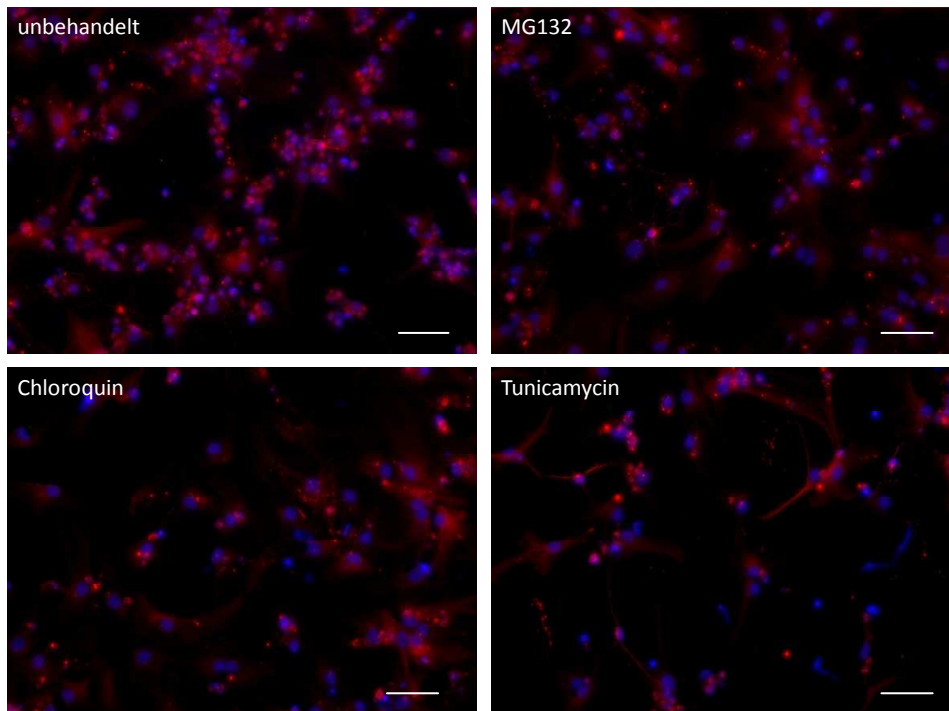


Abbildung IV-15: Immunzytochemische Darstellung mit Antikörpern gegen β -Tubulin III zur Markierung der Neurone (rot) und DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (blau) 7 Tage nach Induktion der Differenzierung, wobei die Zellen während der ersten drei Tage mit dem entsprechenden Hemmstoff behandelt wurden. Der Maßstab beträgt 50 μ m.

Da für die Auswertung der Differenzierung im Wesentlichen die Entwicklung der Neurone von Interesse ist, wurde lediglich ihr prozentualer Anteil ermittelt.

Nach doppelter Durchführung jedes Versuchs mit immunzytochemischer Anfärbung mit Antikörpern gegen β -Tubulin III und Auszählung der Zellen, wurde für jede Gruppe der Mittelwert errechnet. Die unbehandelte Kontrollgruppe wies hierbei 5,3% Neurone auf. Das Ergebnis der mit Hemmstoffen bzw. Induktoren behandelten Zellen wurde jeweils mit dem der unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt um die Signifikanz des Ergebnisses zu überprüfen (Abbildung IV-16)

Nach der Behandlung mit 1nM Tunicamycin konnten 8,5% Neurone gezählt werden, dies entspricht einem signifikanten Anstieg ($p=0,02$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit dem Proteasomhemmstoff MG 132 führte zu einem Neuronenanteil von 7,3%. Dieses Ergebnis liegt zwar oberhalb der Werte der Kontrollgruppe, stellt aber noch keine signifikante Veränderung dar ($p=0,08$).

Die Behandlung mit Chloroquin hingegen führte zu einer starken Abnahme der Neuronenfraktion. Hier konnten nur noch 1,82 % Neurone ermittelt werden, was einer signifikanten Verringerung entspricht ($p=0,0001$).

Ergebnisse

	% Neurone	TTest (p)
Unbehandelt	5,3%	
Chloroquin	1,8%	0,0001
Tunicamycin	8,5%	0,02
MG 132	7,3%	0,08

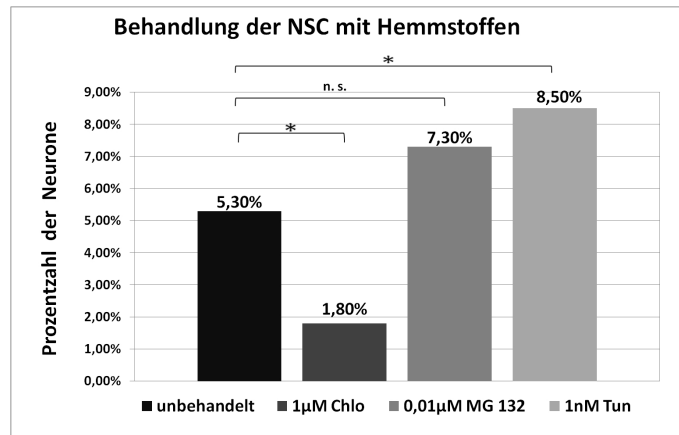


Abbildung IV-16: Ermittelter Anteil der Neurone einer unbehandelten sieben Tage differenzierten Kontrollgruppe neuraler Stammzellen und Vergleich mit während der ersten drei Tage der Differenzierung mit Chloroquin, Tunicamycin oder MG132 behandelten Zellen mit nachfolgender weiterer Differenzierung für vier Tage in normalem Differenzierungsmedium.

* signifikant ($p < 0,05$)

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

V. Diskussion

Aktuell werden große Hoffnungen in einen möglichen therapeutischen Einsatz von Stammzellen zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen gelegt. Im neurologischen Bereich betrifft dies vor allem Erkrankungen, die mit einem neuronalen Zelluntergang einhergehen, wie es z.B. bei den neurodegenerativen Erkrankungen, beim Schlaganfall und bei Rückenmarkstraumen der Fall ist.

Bisher bestehen allerdings noch zahlreiche Hürden, die einem klinischen Einsatz im Wege stehen. So weisen neurale Stammzellen nach ihrer Transplantation in das Empfängergewebe eine sehr hohe Sterblichkeit auf, was ihre Behandlungseffizienz stark herabsetzt. Zum anderen ist bekannt, dass die unterschiedlichen Wege des zellulären Proteinabbaus im Rahmen des Zellstoffwechsels Einfluss auf die Überlebensfähigkeit einer Zelle haben, insbesondere unter Bedingungen, die als Stress auf eine Zelle einwirken.

Von dieser Problematik geleitet, sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen die Frage untersucht werden, ob das Aktivitätsniveau der verschiedenen Proteinabbauwege während der Differenzierung der neuralen Stammzellen variiert und zum anderen, ob eine Beeinflussung der Proteinabbauwege ihrerseits einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen hat.

5.1 Charakterisierung der neuralen Stammzellen

Vor Verwendung in den oben beschriebenen Versuchen sollten die verwendeten neuralen Stammzellen charakterisiert werden. Anhand immunzytochemischer Untersuchungen sollten die Stammzeleigenschaften bezüglich ihres Differenzierungsverhaltens in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten bestimmt werden, sowie ihr Proliferationsverhalten und die Apoptoserate im Verlauf der Differenzierung. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um ein genaueres Bild der Zeleigenschaften zu erhalten, da sehr viele Faktoren Einfluss auf die genannten Parameter haben. Die Angaben in der Literatur bezüglich der Differenzierung neuraler Stammzellen in die verschiedenen neuralen Subpopulationen variieren, abhängig von der Art und des Alters der kultivierten neuralen Stammzellen sowie den Kulturbedingungen.

Diskussion

Zum Nachweis des undifferenzierten Stammzellstatus der verwendeten Zellen wurde eine Nestin-Färbung angefertigt. Hier zeigten nahezu 100% der Zellen am Tag 0 (d0) ein positives Signal. Dies ist ähnlich den Ergebnissen von Molina-Hernandez et al. (Molina-Hernandez and Velasco 2008), die einen Wert von 97% an Nestin positiven Zellen angeben. Die Proliferationsrate betrug am Tag 0 65%. Verglichen mit Angaben aus der Literatur ist es ein recht hoher Anteil. So nennt Zhang et al. (Zhang, Huang et al. 2009) eine Proliferationsrate von 50%, jedoch wird häufig mit anderen Methoden gemessen, mit dem MTT-Test oder mittels Markierung neu gebildeter DNA mit BrdU. In diesen Versuchen dürften die Werte schon deshalb niedriger liegen, da die Rate der bereits neu gebildeten Zellen bestimmt wird, während die immunzytochemische Markierung mit Ki67 in mehreren Phasen des Zellzyklus einer sich teilenden Zelle positiv ausfällt. Nach Differenzierung der neuralen Stammzellen für 7 Tage wurde im Rahmen dieser Arbeit ein prozentualer Anteil der Neurone von 6% bestimmt. Der Anteil der Neurone, die durch Differenzierung aus neuralen Stammzellen hervorgegangen sind, variiert in anderen Arbeiten von 8% bis 25% (Liao, Huang et al. 2008; Molina-Hernandez and Velasco 2008; Huang, Cheng et al. 2009; Wang, Gao et al. 2009). Der hier ermittelte Neuronenanteil von 6% liegt somit im unteren Bereich. Der Astrozytenanteil, der mit 95% an der Gesamtzellzahl in dieser Arbeit sehr hoch war, ist in der Literatur mit 40 bis 85% angegeben (Liao, Huang et al. 2008; Molina-Hernandez and Velasco 2008). Während der Anteil der Oligodendrozyten in der Literatur bei 3 bis 6 % liegt (Liao, Huang et al. 2008; Huang, Cheng et al. 2009), konnten im Rahmen dieser Arbeit nur ganz vereinzelt Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Eine Apoptoseaktivität der undifferenzierten neuralen Stammzellen wurde hier bei 3,3% der Zellen ermittelt. In der Literatur sind 2,8 bis 10,5% beschrieben (Molina-Hernandez and Velasco 2008; Zhang, Huang et al. 2009), das heißt die vorliegenden Ergebnisse liegen hier im Rahmen.

Zusammen betrachtet ist das Differenzierungsverhalten der verwendeten Stammzellen im Vergleich zu Angaben in der Literatur zwar etwas zu Gunsten der Astrozyten verschoben mit einer verminderten Neuronenzahl, es handelt sich jedoch um multipotente proliferierende Zellen die alle Voraussetzungen für die folgenden Experimente erfüllen. Eine Abnahme der Neuronenzahl, kann beispielsweise bei

Diskussion

zunehmender Passagezahl auftreten. Da die verwendeten Zellen zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens jedoch bereits nach ihrer fünften Passage untersucht wurden, ist dies als Ursache auszuschließen. Des Weiteren kommen die Form der Kultivierung der Stammzellen, das heißt ob sie als adhärenente oder als frei flottierende Neurosphärenkultur gezüchtet werden, und die Zusammensetzung des Kulturmediums als Ursachen in Frage. Auch ist immer mit interindividuellen Unterschieden bei der Beurteilung immunzytochemischer Färbungen zu rechnen.

5.2 Western Blot Analyse der Proteinabbaumarke

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, anhand einer Western Blot Analyse die Expression verschiedener Markerproteine für die ER-Stress Antwort, Autophagie und Apoptose zu bestimmen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich während der Differenzierung der neuralen Stammzellen eine Veränderung des Aktivierungsniveaus dieser Prozesse nachweisen lässt.

Die Untersuchungen zur ER-Stress Antwort zeigten hierbei eine erhöhte Aktivität in den undifferenzierten neuralen Stammzellen, die dann im Laufe der Differenzierung abnahm. BiP zeigte als einziger Marker nur eine Abnahme innerhalb des ersten Tages der Differenzierung, über die restlichen 6 Tage hinweg blieb seine Aktivität auf dem gleichen Niveau stabil. Im Rahmen der ER-Stress Antwort ist BiP ein Protein mit vielfältigen Aufgaben, so agiert es im ER sowohl als Chaperon zur Vermittlung der Proteinfaltung als auch bei ER-Stress als zentraler Aktivator der weiteren Reaktionswege der UPR (Schroder and Kaufman 2005; Wu and Kaufman 2006). Alle weiteren Markerproteine des ER-Stresses, sowohl eIF2 α einschließlich seiner aktivierten Form Phospho eIF2 α , und die beiden Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90, nahmen über die gesamten 7 Tage der Differenzierung gleichmäßig ab und erreichten am letzten Tag, das heißt bei am weitesten fortgeschrittener Differenzierung, ihr niedrigstes Niveau.

Bei der Untersuchung der Caspase12 zeigte sich, dass seine inaktive Form die Procaspase12 im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich abnahm, während die Konzentration seiner aktiven Form in gleichem Maße zunahm. Dies lässt auf eine erhöhte Aktivierung der Apoptose im Verlauf der Differenzierung schließen.

Interessant hieran ist, dass die über die Caspase12 vermittelte Apoptose gelegentlich als ER-Stress induziert beschrieben ist, sie jedoch in den vorliegenden

Diskussion

Untersuchungen während des Differenzierungsprozesses zunimmt, während der ER-Stress abnimmt. Es bestünde also ein Widerspruch, wenn die Apoptose als Folge des ER-Stresses gedeutet werden soll. Allerdings wird eine Beteiligung der Caspase 12 an der ER Stress induzierten Apoptose in der Literatur konträr diskutiert. So wurde eine nicht-apoptotische Funktion der Caspase 12 im Rahmen von Entzündungsreaktionen nachgewiesen (Martinon and Tschopp 2007; Scott and Saleh 2007), sowie eine Beteiligung der Gruppe der Caspasen an Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen (Schwerk and Schulze-Osthoff 2003; Lamkanfi, Festjens et al. 2007; Martinon and Tschopp 2007). Es kann daher auch eine andere Ursache als ER Stress als Auslöser für die Aktivierung der Caspase12 angenommen werden, möglicherweise im Rahmen der Differenzierung der Zellen.

Auch das LC3 als Markerprotein für Autophagie veränderte seine Aktivität in gegenläufiger Richtung. Es zeigte ein niedriges Aktivitätsniveau in den undifferenzierten neuralen Stammzellen und stieg dann während der Differenzierung an. Allerdings war der Anstieg erst am letzten Differenzierungstag statistisch signifikant.

Bereits in anderen Stammzellarten wurden Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung durchgeführt. Es lohnt sich daher ein Vergleich mit vorliegenden Ergebnissen. Recht gut untersucht ist beispielsweise die Embryogenese des Herzens (Barnes and Smoak 2000; Mao, Tai et al. 2006; Papp, Zhang et al. 2008). Barnes und Smoak zeigten hier in einer Reihenuntersuchung von embryonalem und fetalem Herzgewebe der Maus eine fortlaufende Abnahme von BiP im Verlauf der Entwicklung, mit seiner höchsten Aktivität während der frühen Organogenese und der niedrigsten im fetalen Stadium (Barnes and Smoak 2000). Andere untersuchte ER-Stress Markerproteine, wie ATF6 und XBP1, waren in allen Untersuchungen nicht erhöht (Mao, Tai et al. 2006; Papp, Zhang et al. 2008).

Es wurde spekuliert, warum gerade für BiP erhöhte Werte in embryonalem Gewebe gemessen wurden. Möglicherweise hat es eine wichtige Bedeutung für das embryonale Zellwachstum und Überleben pluripotenter Zellen.

So zeigten Versuche mit BiP Knock-Out Mäusen, dass die embryonalen Zellen bereits während der Implantationphase des Embryos sterben, Proliferationsdefekte und eine stark erhöhte Apoptoserate aufweisen (Luo, Mao et al. 2006).

Diskussion

Auch neurale Stamm- oder Progenitorzellen wurden bereits auf eine Aktivierung der ER-Stress Antwort hin untersucht. Es wurden fetale Progenitorzellen des Kortex (Yoon Mi Cho 2007) bzw. neuronal induzierte embryonale Stammzellen der Maus und neuronal induzierte mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks der Ratte untersucht (Yoon Mi Cho 2009). Im Vergleich mit diesen Arbeiten ergeben sich sowohl einige Unterschiede, als auch Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen. In der Arbeit von 2007 wurde in fetalen kortikalen Progenitorzellen der Ratte mittels PCR ein Anstieg von BiP über einen Differenzierungszeitraum von 7 Tagen gemessen, während Phospho eIF2 α , im Western Blot-Verfahren bestimmt, sein Maximum am Tag 3 der Differenzierung zeigte und im Anschluss wieder abfiel. BiP zeigt also ein genau entgegengesetztes Verhalten zu unseren Ergebnissen, während Phospho eIF2 α zwar mit Zeitverzögerung, aber gleichsinnig wie in dieser Arbeit reagiert. Es wird in der Arbeit von 2007 insgesamt eine Zunahme des ER-Stresses während der Differenzierung vermutet. Die zweite Arbeit von 2007 zeigt bei der Untersuchung der mesenchymalen Stammzellen, die neuronal über 72 h differenziert wurden, in der PCR eine Zunahme von BiP, während im Western Blot Verfahren Phospho eIF2 α ein Maximum bei 12 Stunden zeigte und dann abfiel. Es wurden in diesem Fall jedoch rein neuronal differenzierte Zellen verwendet, ohne Astrozytenanteil, was aus diesem Grunde und aufgrund der unterschiedlichen Ausgangszellarten sicherlich die Vergleichbarkeit mit unseren Ergebnissen einschränkt. Die neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen, die wie bei uns ebenfalls über 7 Tage durchgeführt wurde, zeigte wie unsere Ergebnisse auch einen Abfall von BiP, der jedoch erst am zweiten Differenzierungstag einsetzte und nicht wie in unserer Arbeit bereits zu Beginn der Differenzierung.

Zusammenfassend sind also bezüglich des Differenzierungsverhaltens neuraler bzw. neural induzierter anderer Stammzellen recht unterschiedliche Ergebnisse zu verzeichnen.

Bei Untersuchungen zur neuronalen Embryogenese, zeigte sich außerdem, dass der ER-Stress Marker eIF2 α und seine aktivierte phosphorylierte Form Phospho eIF2 α , im embryonalen Maushirn stärker exprimiert wurden, als in adultem Gewebe (Zhang, Szabo et al. 2007). Hier gibt es offenbar einen Unterschied zwischen dem ER Stress-Niveau des embryonalen Herz- und Hirngewebes. Die Entwicklungstendenz bei den Untersuchungen zur neuralen Embryogenese bestätigen jedoch eher die hier

Diskussion

gefundene Abnahme der Stress Marker im Zuge der Differenzierung, wobei die Untersuchung des gesamten Hirns eher zellunspezifisch ist und nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf das Verhalten der Neurone und Astrozyten zulässt.

Die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 sind Chaperone, die in allen Zellen vorkommen und vor allem im Zytoplasma lokalisiert sind. Im Rahmen ihrer Funktion für die Proteinfaltung, haben sie eine große Bedeutung für das Überleben von Zellen, indem sie die Aktivität ihrer Substratproteine fördern und eine Proteinaggregation verhindern (Wegele, Muller et al. 2004; Daugaard, Rohde et al. 2007). Auch unter physiologischen Bedingungen werden sie stets exprimiert, jedoch steigt ihre Konzentration bei Auftreten verschiedener Formen des Zellstress stark an (Mestril, Chi et al. 1994; Bellmann, Jaattela et al. 1996; Chong, Lai et al. 1998). Dies vor allem, da viele Arten des Zellstress zu einer Fehlfaltung von zellulären Proteinen führen, die aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Konformation sehr anfällig für Veränderungen des umgebenden Milieus sind. Dies wird beispielsweise bei der Entstehung vieler neurodegenerativer Erkrankungen deutlich (Sherman and Goldberg 2001; Muchowski and Wacker 2005).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Induktion von HSP70 bei der Differenzierung von Neuroblastomzellen abnimmt, ihre Vulnerabilität gegenüber stressinduziertem (z.B. durch oxidativen Stress) Zelltod jedoch gleichzeitig zunimmt (Oza, Yang et al. 2008; Yang, Oza et al. 2008). Differenzierte Neurone sind in diesem Zusammenhang stresssensibler als Astrozyten oder Oligodendrozyten (Marcuccilli, Mathur et al. 1996). Offenbar wirkt HSP70 auch direkt zytoprotektiv, da es beispielsweise durch Blockierung der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und durch die Hemmung der Aktivierung von Caspase3 aktiv die stressinduzierte Apoptose unterdrücken kann (Mosser, Caron et al. 2000; Gabai and Sherman 2002).

Passend zu diesen Ergebnissen, konnte auch in dieser Arbeit eine wesentlich stärkere Induktion von HSP70 und HSP90 in den undifferenzierten Zellen gezeigt werden, die im Verlauf der Differenzierung der neuralen Stammzellen deutlich abnahm.

Chaperone wie BiP, HSP70 und HSP90 sind in neuralen Stammzellen stärker exprimiert, als in differenzierten Zellen. Wie bereits beschrieben, scheinen Chaperone einen großen Anteil an der Überlebensfähigkeit von unterschiedlichen

Diskussion

Arten von Stammzellen und anderen stark proliferierenden Zellen zu haben. Es ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, warum dies so ist. Ob die in proliferierenden Zellen erhöhte Proteinbiosyntheserate eine Erhöhung der Chaperonkonzentration erfordert, um mit den gesteigerten Faltungsanforderungen zurechtzukommen, oder ob einige Proteine der UPR zusätzlich eine weitere Funktion in der Differenzierung der Zellen erfüllen, ist bisher nicht bekannt. Man weiß jedoch von sekretorischen Zellen, wie beispielsweise Plasmazellen und Hepatozyten, dass eine erhöhte Proteinbiosyntheserate zu einem Anstieg des ER-Stresses in einer Zelle führt (Wu and Kaufman 2006). Ein Hinweis darauf, dass bei den neuronalen Stammzellen ebenfalls die erhöhte Proteinsyntheserate ursächlich für eine Induktion der Chaperone sein könnte, liefert die gleichzeitig gemessene Erhöhung des phosphorylierten sowie des unphosphorylierten eIF2 α , die dann im Verlauf der Differenzierung herab reguliert wird. eIF2 α wird vor allem bei einer erhöhten Proteinbiosynthese gebildet und bewirkt mittels Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF4 und der konsekutiven Hemmung der Transkription im Zellkern eine allgemeine Hemmung der Proteinbiosynthese (Wu and Kaufman 2006).

Autophagie dient in Zellen zum Abbau von größeren zytoplasmatischen Bestandteilen wie Proteinaggregaten oder ganzen Organellen, die die Kapazität des Ubiquitin-Proteasom-Systems übersteigen. Durch Umschließen der entsprechenden Strukturen mit einer Doppelmembran und der anschließenden Fusion mit einem Lysosom wird der autosomale Abbau initiiert. Der Autophagie werden mehrere unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Sie dient in Zeiten des zellulären Glucose-Mangels der Energiebereitstellung durch Selbstverdauung (Young, Martinez et al. 2009), sie ist an zellulären Umbau- und Anpassungsprozessen beteiligt (Klionsky and Emr 2000) und wie erwähnt am Abbau überschüssigen Zellmaterials. Zum anderen ist sie in der Lage den Zelltod zu induzieren (Tsujimoto and Shimizu 2005; Maiuri, Zalckvar et al. 2007).

Eine wichtige Rolle scheint Autophagie außerdem bei der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass ein Funktionsverlust der Autophagie zur Ansammlung Ubiquitin-positiver Einschlüsse in Zellen führt, die auch bei neurodegenerativen Erkrankungen entstehen und sich bei ihrer vermehrten Ansammlung neurotoxisch auswirken (Hara, Nakamura et al. 2006; Komatsu, Kominami et al. 2006).

Diskussion

Neuerdings gibt es außerdem Hinweise, dass Autophagie möglicherweise eine besondere Bedeutung für die neuronale embryonale Entwicklung hat (Levine and Klionsky 2004; Cecconi and Levine 2008). Fimia et al. konnten zeigen, dass bei Ausfall von Ambra1, einem Protein, das an der Aktivierung der Autophagie beteiligt ist, schwere Neuralrohrdefekte, Proliferationsstörungen und eine stark erhöhte Apoptose in den Zellen der betroffenen Embryos auftreten (Fimia, Stoykova et al. 2007).

Wie oben erwähnt, war für das für Autophagie spezifische Markerprotein LC3 bei seiner Untersuchung während der Differenzierung ein moderater Anstieg zu verzeichnen. Aber bereits in den undifferenzierten neuralen Stammzellen war ein im Verhältnis zum letzten Tag der Differenzierung, relativ hohes Aktivitätsniveau vorhanden. Möglicherweise lassen sich diese Ergebnisse so deuten, dass die Autophagie bereits in der Proliferationsphase der Stammzellen eine wichtige Funktion hat, zum Beispiel im Rahmen der Umbauprozesse und ständigen intrazellulären Veränderungen z. B. im Rahmen asymmetrischer Zellteilungen, ihr aber in den ausdifferenzierten Neuronen und Astrozyten eine noch wichtigere Bedeutung zukommt, indem sie vermutlich die Zellen von anfallenden Proteinaggregaten und nicht benötigten Organellen befreit und so der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dient.

Interessant wäre an dieser Stelle zum Vergleich eine reine Neuronenkultur zu untersuchen, da wie beschrieben die hier untersuchten Zellen zum allergrößten Teil zu Astrozyten differenzierten.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, zumindest was die ER-Stress Antwort und allgemein die Zell-Stress Antwort betrifft, dass diese wesentlich stärker in neuralen Stammzellen aktiviert sind, als in ihren bereits weiter differenzierten Tochterzellen.

Das könnte bedeuten, dass die neuralen Stammzellen von ihrer Enzymausstattung her betrachtet auch unter ungünstigen Bedingungen lebensfähiger sein könnten als differenziertere Zellen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen bei Stammzellen nicht wie vielleicht erwartet, zu einer negativen Beeinträchtigung der Zellen führen, sondern im Gegenteil, ihre Proliferationsrate noch steigern (Burgers, Schelshorn et al. 2008; Horie, So et al. 2008). Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass sie auch unter physiologischen Bedingungen

Diskussion

dem Zellersatz von untergegangenen Gewebe dienen, sie also zum Beispiel in einem ischämischen Areal mit Zelluntergang nach einem Insult zur Zellregeneration angeregt werden.

Unter ischämischen Bedingungen wirken neben Hypoxie auch Hypoglykämie und oxidativer Stress auf die verbleibenden Zellen ein. Bezüglich der Hypoglykämie ist bekannt, dass vermehrt BiP (auch als GRP78 bezeichnet = Glucose reguliertes Protein 78) unter Bedingungen des Glucose-Mangels exprimiert wird, um dem durch diesen entstehenden ER-Stress entgegenzuwirken (Barnes and Smoak 2000; Kaufman, Scheuner et al. 2002). Wie oben beschrieben konnte in dieser Arbeit eine erhöhte BiP-Expression in den neuralen Stammzellen im Vergleich zu den differenzierten Zellen, gefunden werden. Dies könnte zum einen allein auf ihre erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen sein, es könnte aber auch ein Zeichen dafür sein, dass neurale Stammzellen unabhängig davon ein erhöhtes Basisniveau an protektiven Proteinen wie BiP und auch HSP70 und HSP90 aufweisen und auf diese Weise eine höhere Überlebensfähigkeit unter eingeschränkten Lebensbedingungen zeigen. Möglicherweise sterben transplantierte neurale Stammzellen unter diesen Voraussetzungen dann nicht im undifferenzierten Zustand, sondern erst, wenn ihre Differenzierung einsetzt, das heißt, wenn das sie umgebende Milieu ihnen einerseits noch keine optimalen Lebensbedingungen bieten kann, sie andererseits aber den Schutz durch diese protektiven Faktoren verlieren.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wie sich zum einen die Aktivitäten der Markerproteine unter hypoglykämischen Bedingungen oder auch Bedingungen des oxidativen Stresses verhalten. Zum zweiten könnte untersucht werden, ob diese Bedingungen ihrerseits eine Auswirkung auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen haben.

5.3 Einfluss der Proteinabbauaktivität auf die Differenzierung der neuralen Stammzellen

In den oben beschriebenen Versuchen wurden zum Proteinabbau zunächst lediglich die ER-Stress Antwort und die Autophagie untersucht. Ein weiterer wesentlicher Abbauweg, dessen Darstellung sich im Rahmen der Western Blot Analyse allerdings als problematisch erwies, ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Glickman and

Diskussion

Ciechanover 2002). Dessen Einfluss sollte daher in einem getrennten Versuch auf einem Umweg untersucht werden. Hierfür wurde das Proteasom gehemmt und im Anschluss beobachtet, welche Folgen dies auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen hat.

In der Literatur gibt es bereits verschiedene Untersuchungen an Stammzellen, die eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen nahelegen (Naujokat and Saric 2007).

Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor Oct4, der an der Aufrechterhaltung der Multipotentialität und Selbsterneuerungsfähigkeit von embryonalen Stammzellen beteiligt ist (Czyz, Wiese et al. 2003). Es wird vermutet, dass die zur Verfügung stehende Menge an Oct4 in der Zelle unter anderem durch seinen proteasomalen Abbau und durch Veränderung seiner Transkriptionsaktivität durch Ubiquitinierung, reguliert wird (Xu, Liao et al. 2004).

Auch für Ubiquitin selbst wurde eine direkte Beteiligung an der Differenzierung von embryonalen Stammzellen angenommen (Jian, Cheng et al. 2007). Das gleiche gilt für verschiedene andere Signalstoffe, die an der Regulierung von Multipotentialität und Selbsterneuerungsfähigkeit der embryonalen Stammzellen beteiligt sind und die durch Ubiquitinierung in ihrer Aktivität verändert oder durch proteasomalen Abbau deaktiviert werden (Daino, Matsumura et al. 2000; Lai 2002).

Mit neuralen Stammzellen wurden zu diesem Thema bisher vor allem Versuche mit Ubiquitin-Ligase-defizienten Tieren durchgeführt. Hier zeigten sich unter anderem Störungen in der Neurogenese (Koo, Lim et al. 2005; An, Seo et al. 2006).

Alle genannten Untersuchungen dieser Art sind jedoch eher indirekter Natur, das heißt die tatsächliche Wirkung des Proteasoms auf die Differenzierung und Proliferation, wie in unserem Fall durch seine Hemmung, wurden bisher noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurden hierfür zunächst neurale Stammzellen einer transgenen Maus verwendet, die dann mit Wildtypzellen verglichen wurden. Die Mutante zeichnete sich durch ein verändertes Ubiquitin-Gen, das sogenannte UBB+1-Gen, aus. Dieses führt zur Expression einer pathologisch veränderten Form des Ubiquitins, die neben fehlgefalteten anderen Proteinen in Neuronen und Gliazellen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen akkumuliert, wie zum Beispiel

Diskussion

Morbus Alzheimer und Chorea Huntington (de Pril, Fischer et al. 2006). Seine Pathogenität erhält es dadurch, dass es nicht mehr in der Lage ist andere Proteine zu ubiquitinieren und stattdessen einerseits selbst zum Substrat des Proteasoms wird und es andererseits in seiner Funktion hemmt (Fischer, van Dijk et al. 2009). Die Hemmung des Proteasoms war in diesem Fall die Eigenschaft, die für die vorliegende Untersuchung ausgenutzt werden sollte.

Mittels Immunzytochemie wurden die Proliferationsrate und die Differenzierungsfähigkeit zu Neuronen bestimmt. Während die Proliferationsrate in der Mutante im Verhältnis zum Wildtyp signifikant erniedrigt war, konnte bei der relativen Anzahl der Neurone zwischen Mutante und Wildtyp kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Das UBB+1 Gen wird im Mausgenom der Mutante allerdings unter der Kontrolle des Thy1.2 Promoters (Caroni 1997) exprimiert (Fischer, van Dijk et al. 2009). Thy1.2 wird selektiv in Neuronen aktiv, es ist aber nicht genau bekannt, zu welchem genauen Differenzierungszeitpunkt der neuralen Stammzellen sie aktiviert werden (Caroni 1997). Es ist also nicht eindeutig zu klären, ob entweder die Hemmung des Proteasoms durch UBB+1 keinen Einfluss auf die Differenzierung hat, oder ob die Bildung von UBB+1 während des Differenzierungsprozesses erst zu spät zum Tragen kommt, sodass die entscheidenden Schritte im Verlauf der Differenzierung, beim Einsetzen der Expression von UBB+1, bereits abgelaufen sind.

Einen Hinweis darauf, dass die Expression von UBB+1 möglicherweise doch bereits relativ früh einsetzt, kann in der differierenden Proliferationsrate beider Zelllinien gesehen werden.

Allgemein ist bezüglich der Proteasomhemmung auf das Proliferationsverhalten von Zellen zumindest bei malignen Zellen, die genau wie Stammzellen durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet sind, eine Proliferationshemmung gut belegt. So konnte für den Proteasomhemmstoff Bortezomib (vormals unter der Bezeichnung PS-341 bekannt), der ebenfalls die 26S Untereinheit des Proteasoms hemmt, eine Proliferationshemmung bis hin zur Apoptose nachgewiesen werden. Dieser ist bereits in der II. klinischen Phase, vor allem im Hinblick auf die Behandlung des multiplen Myeloms, getestet worden (Hideshima, Richardson et al. 2001; Ludwig, Khayat et al. 2005; Matta and Chaudhary 2005). Was Stammzellen angeht stehen hierfür die Untersuchungen bisher noch aus, es wäre allerdings aufgrund der hohen

Diskussion

Proliferationsrate bei sowohl malignen Zellen als auch Stammzellen, eine ähnliche Wirkung zu vermuten.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde versucht das Proteasom auf medikamentösem Wege mit Hilfe des Proteasomhemmstoffes MG132 zu hemmen. In gleicher Weise wurde in parallelen Versuchen, die Autophagie mit Chloroquin gehemmt und ER-Stress mittels Tunicamycin induziert. Dies geschah unter der gleichen Fragestellung wie zuvor, nämlich ob eine Beeinflussung einer dieser Wege eine Auswirkung auf das Differenzierungsverhalten der neuralen Stammzellen hat.

Es zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchungen, dass eine Hemmung des Proteasoms auch auf diesem Wege keine signifikante Veränderung in der Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Neuronen hervorbrachte. Der Neuronenanteil der mit MG132 behandelten Zellen war zwar im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe geringgradig erhöht, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Anders stellte es sich bei der Behandlung mit Chloroquin und Tunicamycin dar. Hier führte eine Induktion von ER-Stress zu einem signifikanten Anstieg des Neuronenanteils und eine Hemmung der Autophagie zu einem signifikanten Absinken des Neuronenanteils im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie im ersten Teil dieser Untersuchungsreihe ist also auch an dieser Stelle keine signifikante Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens der neuralen Stammzellen durch die Proteasomhemmung zu messen. In der Voruntersuchung fiel im Unterschied zu den anderen verwendeten Hemmstoffen allerdings auf, dass die Beurteilung der Viabilität der behandelten Zellen im MTT-Test deutlich positiver ausfiel, als ihre mikroskopische Beurteilung bei jeweils gleicher Hemmkonzentration. Möglicherweise wurde die Hemmwirkung auf diese Weise überschätzt und der Hemmstoff im Versuch zu niedrig dosiert, um eine aussagekräftige Wirkung auf das Proteasom zu erzielen.

Eine weitere Ursache könnte darin zu suchen sein, dass die Hemmung des Proteasoms mittels MG132 unter Umständen zu unspezifisch ist. Es ist beispielsweise bekannt, dass MG132, das zur Gruppe der Peptidaldehyde gehört, die 20S Untereinheit des Proteasoms hemmt, das heißt den zentralen Teil des Proteasoms, der für den Abbau eines Proteins zuständig ist. Es ist jedoch ein recht

Diskussion

unspezifischer Hemmstoff, sodass zusätzlich auch lysosomale Cysteinproteasen und Calpaine gehemmt werden (Lee and Goldberg 1998; Myung, Kim et al. 2001). Calpaine sind nicht-lysosomale zelluläre Cysteinproteasen, die an der Regulierung unterschiedlicher Zellprozesse wie zum Beispiel des Zellzyklus beteiligt sind (Sorimachi, Ishiura et al. 1997; Janossy, Ubezio et al. 2004; Suzuki, Hata et al. 2004). Als Folge könnten beispielsweise gegenläufige Prozesse gleichzeitig gehemmt werden und die Hemmwirkung auf diese Weise reduziert werden.

Es existieren jedoch alternativ andere Proteasomhemmstoffe, die eine spezifischere Hemmung des Proteasoms erlauben. Zu nennen sind hier u.a. Epoxomycin und Lactacystin, die spezifisch die 20S Untereinheit des Proteasoms hemmen (Fenteany and Schreiber 1998; Meng, Mohan et al. 1999), wobei bereits gezeigt wurde, dass auch Lactacystin nicht vollständig spezifisch ist (Ostrowska, Wojcik et al. 1997). Zur Beurteilung der Proteasomfunktion im Rahmen des neuronalen Differenzierungsverhaltens könnte also zusätzlich eine Untersuchung mit Epoxomycin oder Lactacystin durchgeführt werden.

Bezüglich der Differenzierung neuraler Stammzellen unter Induktion von ER-Stress ist bisher wenig bekannt. In Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen, deren Differenzierung in die neuronale Richtung induziert wurde, konnte mit den drei unterschiedlichen ER-Stress Induktoren, Thapsigargin, Tunicamycin und Brefeldin A, in Dosis abhängiger Weise eine verstärkte neuronale Differenzierung beobachtet werden (Yoon Mi Cho 2009). Dies stützt unsere Beobachtung der neuronalen Stammzellen, bei denen es unter Tunicamycin Behandlung von neuronalen Stammzellen ebenfalls zu verstärkter neuronaler Differenzierung kam.

Bezüglich der Autophagie vermuten Cecconi und Levine, dass in Zeiten der Proliferation, Differenzierung und anderen Phasen des zellulären Wandels, wirksame Werkzeuge in der Zelle benötigt werden, um ihre Ausstattung mit Organellen und ihrem Proteinhaushalt schnell grundlegend umbauen zu können. Neben dem Proteasom sei hier die Autophagie, gerade weil sie zum schnellen Abbau großer Proteinstrukturen und Organellen befähigt ist, eine gute Hilfe um einen schnellen grundlegenden Wandel des Zellinneren zu gewährleisten (Cecconi and Levine 2008). Bei der Untersuchung von Fettzellen konnten Singh et al. zeigen, dass der Verlust des an der Autophagie beteiligten Proteins ATG7 in Mäusen zu einer Verschiebung

Diskussion

des Differenzierungsverhältnisses von weißen und braunen Fettzellen zugunsten der braunen Fettzellen führte (Singh, Xiang et al. 2009).

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss der Autophagie auf die Zelldifferenzierung konnte von Zhao et al. erbracht werden. Sie untersuchten Tumorstammzellen aus Gliomen und konnten unter anderem nachweisen, dass unter Hemmung der Autophagie die Differenzierung der Zellen ebenfalls gehemmt wurde (Zhao, Huang et al. 2009).

Beide Arbeiten weisen in die gleiche Richtung wie die von uns ermittelten Ergebnisse, da auch bei uns eine signifikante Abnahme der Neuronenzahl durch die Hemmung der Autophagie gemessen werden konnte, das heißt eine Beeinflussung der Differenzierung durch die Autophagie prinzipiell möglich erscheint.

Es könnte also aus diesen Ergebnissen, zumindest was die ER-Stress Antwort und die Autophagie betrifft, auf eine relevante Beteiligung dieser Reaktionswege an der Differenzierung der neuralen Stammzellen geschlossen werden.

Andererseits kann bei allen durchgeführten Versuchen mit Hemmstoffen in letzter Konsequenz nicht ausgeschlossen werden, dass das Auftreten differierender Neuronenanteile nach der Differenzierung andere Ursachen hat. Es wurde zwar eine Toxizitätsuntersuchung mit den unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen im Vorfeld der Differenzierungsversuche durchgeführt, um die subletalen Konzentrationen zu ermitteln. Trotzdem könnte beispielsweise die jeweils stärker vertretene Zellfraktion resistenter gegenüber dem Hemmstoff sein und die vermindert exprimierte Zellfraktion möglicherweise in größerer Zahl zugrunde gegangen sein, was dann ebenfalls zu einer Verschiebung des Zellzahlverhältnisses führen würde.

Unklar ist außerdem, wenn man von einem Zusammenhang zwischen ER-Stress Antwort bzw. Autophagie und dem Differenzierungsverhalten von Zellen ausgeht, wie genau diese Wirkung in den Zellen zustande kommt und welche physiologischen Funktionen diese Wechselwirkungen erfüllen.

Therapeutisch könnten diese Effekte möglicherweise genutzt werden, um die gerichtete Differenzierung neuraler Stammzellen, die ja in gewissem Umfang methodisch bereits etabliert ist, zu unterstützen bzw. um das Überleben

Diskussion

transplantiertes neuronaler Stammzellen in Modellen neurodegenerativer Erkrankungen zu verbessern.

Fraglich ist hierbei allerdings, ob es zu diesem Zweck überhaupt möglich ist, in so zentrale Reaktionswege wie die ER-Stress Antwort und die Autophagie sie darstellen einzugreifen, ohne die gesamte Biologie der Zelle damit in schädlicher Weise zu beeinflussen.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Aktivitätsniveau unterschiedlicher Proteinabbauwege während der Differenzierung neuraler Stammzellen untersucht, sowie ihr jeweiliger Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von neuralen Stammzellen. Praktische Grundlage dieser Fragestellung ist erstens die Etablierung von Methoden, um in späteren Versuchen die Ursache der erhöhten Zellsterblichkeit bei der therapeutischen Transplantation neuraler Stammzellen auch im Tiermodell untersuchen zu können und zweitens einen möglichen Nutzen der Proteinabbauwege für eine gezielte Beeinflussung der Differenzierung oder einer Verbesserung des Überlebens neuraler Stammzellen zu prüfen.

Im ersten Teil der Untersuchung wurden im Western Blot Verfahren verschiedene Markerproteine aus undifferenzierten und differenzierenden neuralen Stammzellen an den Differenzierungstagen 1,3 und 7 bestimmt.

Es konnte im genannten zeitlichen Verlauf eine Herabregulation aller ER-Stress- bzw. Zellstressmarker, sowie ein Anstieg des Autophagiemarkers LC3 und der Caspase 12-Aktivität beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in neuralen Stammzellen ein erhöhtes ER-Stress Niveau besteht, das mit zunehmender Differenzierung abnimmt. Es kann des Weiteren eine Induktion der Autophagie und der Apoptose während der Differenzierung innerhalb dieses Zeitraums angenommen werden, wobei die Apoptose aufgrund des zeitlich versetzten Auftretens zum ER-Stress vermutlich in keiner Beziehung zu diesem steht.

Zur Untersuchung des Ubiquitin-Proteasom-Systems wurden 2 unterschiedliche Methoden angewandt. In einem transgenen Mausmodell mit UBB+1 Gen, das zu einer Beeinträchtigung der Proteasomfunktion führt, konnte keine signifikante Veränderung der Neuronenzahl im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Es zeigte sich aber eine signifikant reduzierte Proliferationsrate gegenüber dem Wildtyp. In einem zweiten Ansatz erfolgten immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen einer medikamentösen Beeinflussung der Proteinabbauwege. Hier konnte ein signifikanter Anstieg der Neuronenzahl unter Induktion von ER-Stress mittels Tunicamycin, sowie ein signifikanter Abfall der Neuronenzahl unter Hemmung der Autophagie mittels Chloroquin nachgewiesen werden. Unter der Hemmung des

Zusammenfassung

Proteasoms mit Hilfe von MG132 konnte keine signifikante Veränderung der Neuronenzahl festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit weist somit erstmals eine erhöhte ER-Stressaktivität in neuronalen Stammzellen zu Beginn der Differenzierung nach und liefert somit einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, speziell nach dem Zusammenhang mit der nachgewiesenen Induktion der Apoptose im Verlauf der Differenzierung. Des Weiteren konnte erstmals ein Einfluss von ER-Stress und Autophagie auf das Differenzierungsverhalten neuraler Stammzellen nachgewiesen werden.

VII. Literaturverzeichnis

- Aboudy, K. S., R. A. Bush, et al. (2006). "Development of a tumor-selective approach to treat metastatic cancer." PLoS One **1**: e23.
- Akiyama, Y., C. Radtke, et al. (2002). "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells." J Neurosci **22**(15): 6623-30.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-35.
- An, J. Y., J. W. Seo, et al. (2006). "Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6212-7.
- Anantharam, V., A. Kanthasamy, et al. (2008). "Opposing roles of prion protein in oxidative stress- and ER stress-induced apoptotic signaling." Free Radic Biol Med **45**(11): 1530-41.
- Arvidsson, A., T. Collin, et al. (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." Nat Med **8**(9): 963-70.
- Barnes, J. A. and I. W. Smoak (2000). "Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress." Anat Embryol (Berl) **202**(1): 67-74.
- Bellmann, K., M. Jaattela, et al. (1996). "Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide." FEBS Lett **391**(1-2): 185-8.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-32.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." Mol Cell Biol **25**(3): 1025-40.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2003). "Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine." Oncogene **22**(25): 3927-36.
- Burgers, H. F., D. W. Schelshorn, et al. (2008). "Acute anoxia stimulates proliferation in adult neural stem cells from the rat brain." Exp Brain Res **188**(1): 33-43.
- Caroni, P. (1997). "Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice." J Neurosci Methods **71**(1): 3-9.
- Cecconi, F. and B. Levine (2008). "The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death." Dev Cell **15**(3): 344-57.

Literaturverzeichnis

- Chen, G., Z. Fan, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons." J Neurosci Res **85**(8): 1674-84.
- Chen, J., A. Zacharek, et al. (2005). "Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice." J Neurosci **25**(9): 2366-75.
- Chong, K. Y., C. C. Lai, et al. (1998). "Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection." J Mol Cell Cardiol **30**(3): 599-608.
- Ciechanover, A. and P. Brundin (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." Neuron **40**(2): 427-46.
- Concannon, C. G., M. W. Ward, et al. (2008). "NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner." J Neurochem **105**(3): 891-903.
- Cummings, B. J., N. Uchida, et al. (2005). "Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14069-74.
- Curtis, M. A., P. S. Eriksson, et al. (2007). "Progenitor cells and adult neurogenesis in neurodegenerative diseases and injuries of the basal ganglia." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(5-6): 528-32.
- Czyz, J., C. Wiese, et al. (2003). "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." Biol Chem **384**(10-11): 1391-409.
- Daino, H., I. Matsumura, et al. (2000). "Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells." Blood **95**(8): 2577-85.
- Daugaard, M., M. Rohde, et al. (2007). "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions." FEBS Lett **581**(19): 3702-10.
- Davis, A. A. and S. Temple (1994). "A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex." Nature **372**(6503): 263-6.
- de Pril, R., D. F. Fischer, et al. (2006). "Conformational diseases: an umbrella for various neurological disorders with an impaired ubiquitin-proteasome system." Neurobiol Aging **27**(4): 515-23.
- Dickson, P. V., J. B. Hamner, et al. (2007). "Intravascular administration of tumor tropic neural progenitor cells permits targeted delivery of interferon-beta and restricts tumor growth in a murine model of disseminated neuroblastoma." J Pediatr Surg **42**(1): 48-53.

Literaturverzeichnis

- Ding, Q., E. Dimayuga, et al. (2006). "Proteasome inhibition induces reversible impairments in protein synthesis." FASEB J **20**(8): 1055-63.
- Endl, E. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function." Exp Cell Res **257**(2): 231-7.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Eskelinen, E. L. (2005). "Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells." Autophagy **1**(1): 1-10.
- Fenteany, G. and S. L. Schreiber (1998). "Lactacystin, proteasome function, and cell fate." J Biol Chem **273**(15): 8545-8.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, et al. (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447**(7148): 1121-5.
- Fischer, D. F., R. A. De Vos, et al. (2003). "Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain." FASEB J **17**(14): 2014-24.
- Fischer, D. F., R. van Dijk, et al. (2009). "Long-term proteasome dysfunction in the mouse brain by expression of aberrant ubiquitin." Neurobiol Aging **30**(6): 847-63.
- Flynn, G. C., J. Pohl, et al. (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP." Nature **353**(6346): 726-30.
- Fontanier-Razzaq, N. C., S. M. Hay, et al. (1999). "Upregulation of CHOP-10 (gadd153) expression in the mouse blastocyst as a response to stress." Mol Reprod Dev **54**(4): 326-32.
- Gabai, V. L. and M. Y. Sherman (2002). "Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock." J Appl Physiol **92**(4): 1743-8.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.
- Giasson, B. I. and V. M. Lee (2003). "Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease?" Cell **114**(1): 1-8.
- Glaser, T., A. Perez-Bouza, et al. (2005). "Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells." FASEB J **19**(1): 112-4.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Han, D., A. G. Lerner, et al. (2009). "IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates." Cell **138**(3): 562-75.

Literaturverzeichnis

Hansel, D. E., B. A. Eipper, et al. (2001). "Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor." Nature **410**(6831): 940-4.

Hara, T., K. Nakamura, et al. (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." Nature **441**(7095): 885-9.

Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-4.

Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-33.

Harper, J. M., C. Krishnan, et al. (2004). "Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 7123-8.

Hayashi, J., Y. Takagi, et al. (2006). "Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain." J Cereb Blood Flow Metab **26**(7): 906-14.

Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**(11): 3787-99.

Hideshima, T., P. Richardson, et al. (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." Cancer Res **61**(7): 3071-6.

Horie, N., K. So, et al. (2008). "Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro." Cell Mol Neurobiol **28**(6): 833-45.

Huang, Y. S., S. N. Cheng, et al. (2009). "Effects of interleukin-15 on neuronal differentiation of neural stem cells." Brain Res **1304**: 38-48.

Ikeda, R., M. S. Kurokawa, et al. (2005). "Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury." Neurobiol Dis **20**(1): 38-48.

Janosy, J., P. Ubezio, et al. (2004). "Calpain as a multi-site regulator of cell cycle." Biochem Pharmacol **67**(8): 1513-21.

Jian, R., X. Cheng, et al. (2007). "A cDNA-based random RNA interference library for functional genetic screens in embryonic stem cells." Stem Cells **25**(8): 1904-12.

Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 411-21.

Literaturverzeichnis

- Kawaguchi, A., T. Miyata, et al. (2001). "Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells." Mol Cell Neurosci **17**(2): 259-73.
- Kelly, S., T. M. Bliss, et al. (2004). "Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11839-44.
- Kerr, D. A., J. Llado, et al. (2003). "Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury." J Neurosci **23**(12): 5131-40.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2009). "Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review." J Neurosci Res **87**(10): 2183-200.
- Kim, S. U., I. H. Park, et al. (2006). "Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease." Neuropathology **26**(2): 129-40.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-75.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.
- Knapp, P. E., R. P. Skoff, et al. (1988). "Differential expression of galactocerebroside, myelin basic protein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase during development of oligodendrocytes in vitro." J Neurosci Res **21**(2-4): 249-59.
- Komatsu, M., E. Kominami, et al. (2006). "Autophagy and neurodegeneration." Autophagy **2**(4): 315-7.
- Koo, B. K., H. S. Lim, et al. (2005). "Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch." Development **132**(15): 3459-70.
- Koolman, J., K.-H. Röhm, et al. (2003). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, Thieme.
- Kurozumi, K., K. Nakamura, et al. (2004). "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model." Mol Ther **9**(2): 189-97.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lai, E. C. (2002). "Protein degradation: four E3s for the notch pathway." Curr Biol **12**(2): R74-8.
- Lamkanfi, M., N. Festjens, et al. (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." Cell Death Differ **14**(1): 44-55.

Literaturverzeichnis

- Lee, D. H. and A. L. Goldberg (1998). "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists." Trends Cell Biol **8**(10): 397-403.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." Dev Cell **6**(4): 463-77.
- Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 605-31.
- Liao, H., W. Huang, et al. (2008). "Beta 1 integrin-mediated effects of tenascin-R domains EGFL and FN6-8 on neural stem/progenitor cell proliferation and differentiation in vitro." J Biol Chem **283**(41): 27927-36.
- Lindvall, O., P. Brundin, et al. (1990). "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease." Science **247**(4942): 574-7.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders." Nature **441**(7097): 1094-6.
- Lindvall, O., Z. Kokaia, et al. (2004). "Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work." Nat Med **10** Suppl: S42-50.
- Löffler, G. and P. E. Petrides (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Springer.
- Ludwig, H., D. Khayat, et al. (2005). "Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies." Cancer **104**(9): 1794-807.
- Luo, S., C. Mao, et al. (2006). "GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development." Mol Cell Biol **26**(15): 5688-97.
- Luskin, M. B. (1993). "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone." Neuron **11**(1): 173-89.
- Ma, Y., J. W. Brewer, et al. (2002). "Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response." J Mol Biol **318**(5): 1351-65.
- Maccioni, R. B., J. P. Munoz, et al. (2001). "The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." Arch Med Res **32**(5): 367-81.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-52.
- Mao, C., W. C. Tai, et al. (2006). "In vivo regulation of Grp78/BiP transcription in the embryonic heart: role of the endoplasmic reticulum stress response element and GATA-4." J Biol Chem **281**(13): 8877-87.

Literaturverzeichnis

- Marcuccilli, C. J., S. K. Mathur, et al. (1996). "Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glial cells after heat shock." J Neurosci **16**(2): 478-85.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.
- Matta, H. and P. M. Chaudhary (2005). "The proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) inhibits growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma cells." Cancer Biol Ther **4**(1): 77-82.
- McDonald, J. W., X. Z. Liu, et al. (1999). "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord." Nat Med **5**(12): 1410-2.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.
- Meng, L., R. Mohan, et al. (1999). "Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10403-8.
- Mestril, R., S. H. Chi, et al. (1994). "Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury." J Clin Invest **93**(2): 759-67.
- Middeldorp, J., W. Kamphuis, et al. (2009). "Intermediate filament transcription in astrocytes is repressed by proteasome inhibition." FASEB J.
- Miller, M. W. and R. S. Nowakowski (1988). "Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system." Brain Res **457**(1): 44-52.
- Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-75.
- Mizushima, N. and T. Yoshimori (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." Autophagy **3**(6): 542-5.
- Molina-Hernandez, A. and I. Velasco (2008). "Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors." J Neurochem **106**(2): 706-17.
- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**(37): 34287-94.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Literaturverzeichnis

- Mosser, D. D., A. W. Caron, et al. (2000). "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **20**(19): 7146-59.
- Muchowski, P. J. and J. L. Wacker (2005). "Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones." Nat Rev Neurosci **6**(1): 11-22.
- Myung, J., K. B. Kim, et al. (2001). "The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors." Med Res Rev **21**(4): 245-73.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**(6765): 98-103.
- Naujokat, C. and T. Saric (2007). "Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells." Stem Cells **25**(10): 2408-18.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, et al. (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." Nat Neurosci **7**(2): 136-44.
- Okano, H., M. Sakaguchi, et al. (2007). "Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms." J Neurochem **102**(5): 1459-65.
- Ostrowska, H., C. Wojcik, et al. (1997). "Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme." Biochem Biophys Res Commun **234**(3): 729-32.
- Oza, J., J. Yang, et al. (2008). "Changes in the regulation of heat shock gene expression in neuronal cell differentiation." Cell Stress Chaperones **13**(1): 73-84.
- Papp, S., X. Zhang, et al. (2008). "Expression of endoplasmic reticulum chaperones in cardiac development." Open Cardiovasc Med J **2**: 31-5.
- Pluchino, S., L. Zanotti, et al. (2005). "Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism." Nature **436**(7048): 266-71.
- Poeck, K. and W. Hacke (2006). Neurologie. Heidelberg, Springer.
- Ramser, B., A. Kokot, et al. (2009). "Hydroxychloroquine modulates metabolic activity and proliferation and induces autophagic cell death of human dermal fibroblasts." J Invest Dermatol **129**(10): 2419-26.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-74.
- Reeves, S. A., L. J. Helman, et al. (1989). "Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5178-82.

Literaturverzeichnis

- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, et al. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-74.
- Rietze, R. L. and B. A. Reynolds (2006). "Neural stem cell isolation and characterization." Methods Enzymol **419**: 3-23.
- Roberts, T. J., J. Price, et al. (2006). "Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease." Neuroscience **139**(4): 1187-99.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-29.
- Rubinsztein, D. C. (2006). "The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration." Nature **443**(7113): 780-6.
- Ryu, J. K., J. Kim, et al. (2004). "Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease." Neurobiol Dis **16**(1): 68-77.
- Sadler, T. W. and J. Langman (2003). Medizinische Embryologie : die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart, Thieme.
- Scadden, D. T. (2006). "The stem-cell niche as an entity of action." Nature **441**(7097): 1075-9.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-89.
- Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff (2003). "Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation." Biochem Pharmacol **66**(8): 1453-8.
- Scott, A. M. and M. Saleh (2007). "The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis." Cell Death Differ **14**(1): 23-31.
- Sherman, M. Y. and A. L. Goldberg (2001). "Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases." Neuron **29**(1): 15-32.
- Singh, R., Y. Xiang, et al. (2009). "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice." J Clin Invest **119**(11): 3329-39.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, et al. (1997). "Structure and physiological function of calpains." Biochem J **328** (Pt 3): 721-32.
- Suzuki, K., S. Hata, et al. (2004). "Structure, activation, and biology of calpain." Diabetes **53** Suppl 1: S12-8.

Literaturverzeichnis

Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-5.

Takagi, Y., J. Takahashi, et al. (2005). "Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model." J Clin Invest **115**(1): 102-9.

Tan, Z., X. Sun, et al. (2007). "Mutant ubiquitin found in Alzheimer's disease causes neuritic beading of mitochondria in association with neuronal degeneration." Cell Death Differ **14**(10): 1721-32.

Tank, E. M. and H. L. True (2009). "Disease-associated mutant ubiquitin causes proteasomal impairment and enhances the toxicity of protein aggregates." PLoS Genet **5**(2): e1000382.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.

Thored, P., A. Arvidsson, et al. (2006). "Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke." Stem Cells **24**(3): 739-47.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2005). "Another way to die: autophagic programmed cell death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1528-34.

Tuszynski, M. H., L. Thal, et al. (2005). "A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease." Nat Med **11**(5): 551-5.

van der Kooy, D. and S. Weiss (2000). "Why stem cells?" Science **287**(5457): 1439-41.

van Praag, H., A. F. Schinder, et al. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." Nature **415**(6875): 1030-4.

Vembar, S. S. and J. L. Brodsky (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 944-57.

Wang, B., Y. Gao, et al. (2009). "Erk1/2 promotes proliferation and inhibits neuronal differentiation of neural stem cells." Neurosci Lett **461**(3): 252-7.

Wegele, H., L. Muller, et al. (2004). "Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding." Rev Physiol Biochem Pharmacol **151**: 1-44.

Windrem, M. S., M. C. Nunes, et al. (2004). "Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain." Nat Med **10**(1): 93-7.

Literaturverzeichnis

- Wu, J. and R. J. Kaufman (2006). "From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response." Cell Death Differ **13**(3): 374-84.
- Xu, H. M., B. Liao, et al. (2004). "Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination." J Biol Chem **279**(22): 23495-503.
- Yang, J., J. Oza, et al. (2008). "Neural differentiation and the attenuated heat shock response." Brain Res **1203**: 39-50.
- Yoon Mi Cho, Y.-S. J., et al. (2009). "Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells." Experimental and Molecular Medicine **41**: 440-452.
- Yoon Mi Cho, Y. S. J., et al. (2007). "Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress Response in the Neuronal Differentiation." Korean J Physiol Pharmacol **11**: 239 - 246.
- Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky (2005). "Autophagy: molecular machinery for self-eating." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1542-52.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-91.
- Yoshida, H., T. Okada, et al. (2001). "Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response." Mol Cell Biol **21**(4): 1239-48.
- Young, J. E., R. A. Martinez, et al. (2009). "Nutrient deprivation induces neuronal autophagy and implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation." J Biol Chem **284**(4): 2363-73.
- Zavrski, I., C. Naujokat, et al. (2003). "Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion." J Cancer Res Clin Oncol **129**(7): 383-91.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2006). "The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease." Neurology **66**(2 Suppl 1): S102-9.
- Zhang, X., E. Szabo, et al. (2007). "Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse." Int J Dev Neurosci **25**(7): 455-63.
- Zhang, X. M., G. W. Huang, et al. (2009). "Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro." J Clin Biochem Nutr **45**(1): 14-9.
- Zhao, Y., Q. Huang, et al. (2009). "Autophagy impairment inhibits differentiation of glioma stem/progenitor cells." Brain Res.

Literaturverzeichnis

Zhong, W. and W. Chia (2008). "Neurogenesis and asymmetric cell division." *Curr Opin Neurobiol* 18(1): 4-11.

Abkürzungsverzeichnis

VIII. Abkürzungsverzeichnis

ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
BCA	Bicinchoninic acid, Chinarindensäure
BiP	Immunoglobulin heavy chain binding protein
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CHOP	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), Transkriptionsfaktor
CNPase	zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase)
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal Growth Factor (<i>Epidermaler Wachstumsfaktor</i>)
eIF2 α	Eukaryotic initiation factors
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated degradation
ES	Embryonale Stammzellen
FGF	Fibroblast Growth Factor (<i>Fibroblasten Wachstumsfaktor</i>)
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IRE1	Inositol-verbrauchendes(requiring) Enzym 1
kDa	Kilodalton
LC 3	Leichtkette 3 (Markerprotein für Autophagie)
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NSC	Neurale Stammzellen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline,
PERK	Pankreatische ER-Kinase
Phos eIF2 α	Phosphorylierte, d.h. aktivierte Form von eIF2 α

Abkürzungsverzeichnis

	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SVZ	Subventrikuläre Zone
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBB	Ubiquitin
UBB+1	pathologische Variante des Ubiquitins
UPR	Unfolded Protein Response, zelluläre Stressantwort durch fehlgefaltete Proteine
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
Verd.	Verdünnung
Vol.	Volumen

Abbildungsverzeichnis

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1: Differenzierungsschema neuronaler und glialer Zellen.	2
Abbildung I-2: Unfolded Protein Response	10
Abbildung I-3: Durch ER-Stress induzierte Apoptose.	12
Abbildung IV-1: Neurosphären in lichtmikroskopischer Darstellung	33
Abbildung IV-2: Immunzytochemische Untersuchung der Markerexpression der differenzierenden neuronalen Stammzellen	34
Abbildung IV-3: Immunzytochemische Darstellung der Markerproteine in undifferenzierten neuronalen Stammzellen zum Nachweis ihrer Lokalisation in der Zelle.	39
Abbildung IV-4: Western Blot Analyse von eIF2 α und seiner aktivierten phospho- rylierten Form Phospho eIF2 α und ihre graphische Darstellung.....	40
Abbildung IV-5: Western Blot Analyse der beiden Hitzeschockproteine HSP 70 und HSP 90 und graphische Darstellung.	41
Abbildung IV-6: Western Blot Analyse von BiP und graphische Darstellung	41
Abbildung IV-7: Western Blot Analyse des Apoptose-Markerproteins ProCaspase12 . im Vergleich zur aktivierten Form und graphische Darstellung.....	42
Abbildung IV-8: Western Blot Analyse des Autophagie-Markerproteins LC3 und graphische Darstellung	43
Abbildung IV-9: Immunzytologische Darstellung der neuronalen Differenzierung von 7 Tage differenzierten Zellen unter Hemmung des Proteasoms mittels UBB+1-Gen..	45
Abbildung IV-10: Immunzytologische Darstellung des Proliferationsverhaltens unter Hemmung des Proteasoms mittels UBB+1-Gen.....	45
Abbildung IV-11: Vergleich der neuronalen Differenzierungsrate und der Proliferationsrate zwischen neuronalen Stammzellen des Wildtyps und der UBB+1-Mutante.	46
Abbildung IV-12: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des ER-Stress Induktors Tunicamycin	49
Abbildung IV-13: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Autophagiehemmstoffes Chloroquin	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung IV-14: Diagramme zur Darstellung der Zellviabilität unter Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteasomhemmstoffes MG132.	51
Abbildung IV-15: Immunzytochemische Darstellung von neuronalen Zellen nach Behandlung Tunicamycin, Chloroquin und MG132 und 7 tägiger Differenzierung.....	52
Abbildung IV-16: Graphischer Vergleich der Neuronenanteile nach 7 tägiger Differenzierung und Behandlung mit Tunicamycin, Chloroquin und MG132	53

Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Glatzel dafür, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Christian Bernreuther für sein Engagement zum Gelingen der Arbeit, für seine Anregungen, Impulse und Erklärungen, sowie vor allem auch für seine Geduld.

Mein Dank gilt auch dem Graduiertenkolleg GRK 1459 für die fachliche und finanzielle Unterstützung.

Mein großer Dank gilt den Mitarbeitern und Doktoranden des Labors der Neuropathologie des Universitätsklinikums Eppendorf für die fruchtbare und freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Sina Rosenkranz für die Einführung in die Zellkulturarbeiten, Angelika Schipanski für die Unterstützung bei der Arbeit in der Proteinanalytik und Dr. Diego Sepulveda-Falla bei der Unterstützung und Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Vor allem möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in dieser Zeit durch Höhen und Tiefen begleitet haben und dabei stets ein offenes Ohr und guten Rat bereit hielten. Sie haben mich stets ermuntert und neu motiviert.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 05.06.2011

Jana Vogel