

IV. Ergebnisse

4.1 Kultivierung muriner Knochenmarkstromazellen

Knochenmarkstromazellen (KMSZ) wurden durch ihre selektive Anheftung an die Plastikoberfläche von Zellkulturgefäßen aus Oberschenkelknochen 6-8 Wochen alter CD-1 Mäuse gewonnen.

Nach dem Entfernen nicht adhärenter Zellen, bei denen es sich vor allem um hämatopoetische Zellen handelt, war die Population zunächst morphologisch heterogen. Zwischen kleineren, spindelförmigen Zellen befanden sich größere, flache, kontrastarme Fibroblasten-ähnliche Zellen in der Kultur (Abb. 4.1b). Letztere wiesen morphologisch große Ähnlichkeit mit bereits beschriebenen humanen und Ratten-KMSZ auf (Azizi et al., 1998). Während die spindelförmigen Zellen gleichmäßig verteilt waren, wuchsen die größeren, flachen Zellen kolonieartig (Abb. 4.1a). Weiterhin befanden sich Zellen mit runder Morphologie in der Kultur, meist angeheftet auf einem der anderen Zelltypen (Abb. 4.1b). Bei diesen könnte es sich prinzipiell um hämatopoetische Zellen gehandelt haben, die durch ihre feste Verbindung zum Beispiel zu den Stromazellen nicht durch das Spülen mit PBS und den Mediumwechsel entfernt wurden. Andererseits wurden ähnliche Zellen als schnell replizierende Stammzellen beschrieben, die eventuell ein frühes Entwicklungsstadium von KMSZ darstellen (RC1/RC2, recycling/rapidly self-renewing stem cells, Colter et al. 2000, 2001).

Während der ersten Passagen blieb die Kultur zunächst heterogen (Abb. 4.1c), der Anteil der spindelförmigen und runden Zellen nahm jedoch ab. Im weiteren Verlauf der *in vitro* Kultivierung, ab Passage vier bis fünf, wurde die Kultur morphologisch sehr homogen (Abb. 4.1d). Nur die großen, flachen und kontrastarmen Zellen blieben bestehen.

Ein häufig beschriebenes Problem bei der Kultivierung insbesondere muriner KMSZ ist die Proliferationsrate. Nach anfänglich guter Proliferation sinkt die Teilungsrate der Zellen je nach verwendetem Mausstamm oder der Kulturflaschenbeschichtung nach einigen Passagen erheblich (Phinney et al., 1999).

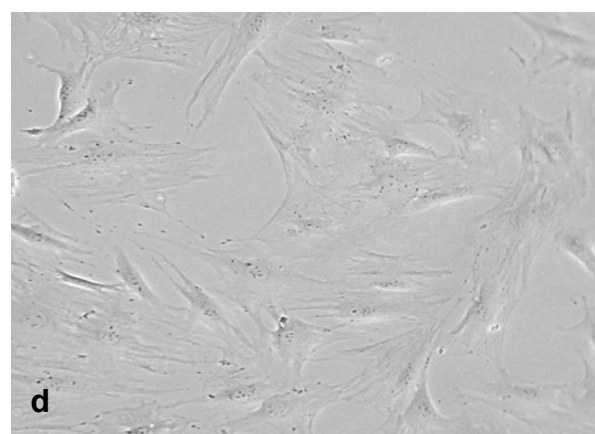
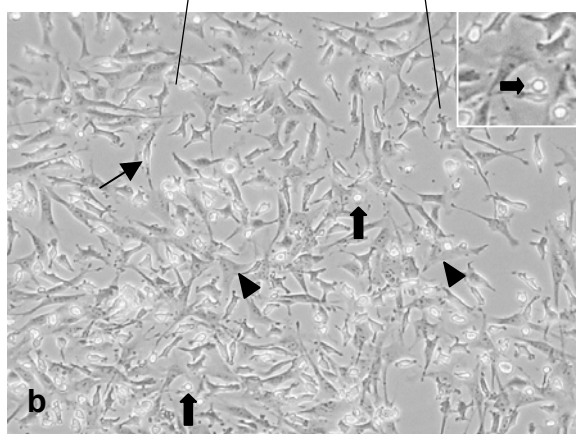
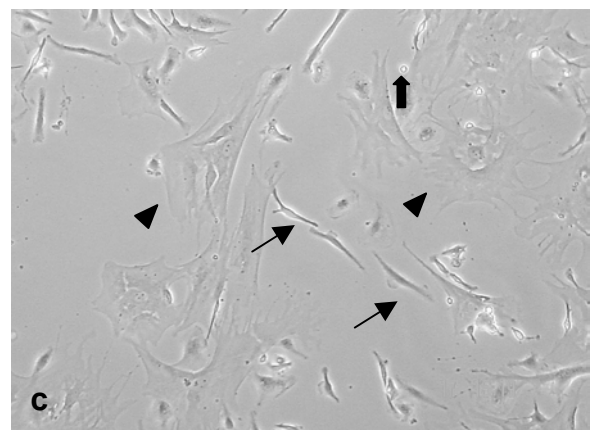
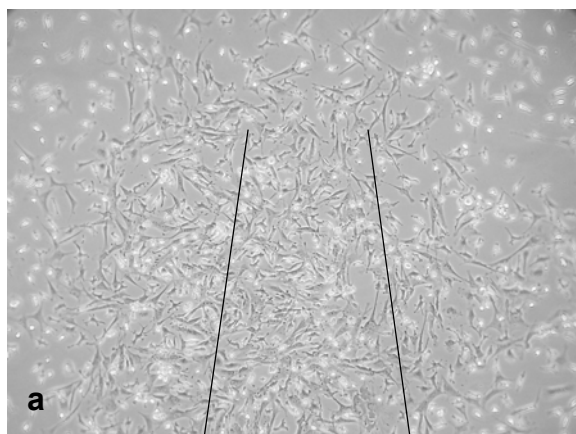
Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine sich ändernde Wachstumskinetik der murinen KMSZ beobachtet: Zu Beginn der Kultivierung wurden die zunächst kolonieförmig wachsenden, großen, flachen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, innerhalb von 10 bis 14 Tagen nahezu konfluent. Während der ersten zwei bis drei Passagen war die Proliferationsrate ebenfalls hoch, so daß die Kulturen nach drei bis vier Tagen bereits wieder Konfluenz erreichten. Dann folgte jedoch eine Phase verzögerter Proliferation (Passagendauer ca. 7-10

Tage), die nach Passage vier oder fünf überwunden war. Zu diesem Zeitpunkt waren keine der runden oder spindelförmigen Zellen mehr in der Kultur vorhanden. Die verbleibenden KMSZ hatten eine stabile Proliferationsrate mit einer Populationsverdopplung nach etwa zwei Tagen. Die Proliferationsrate nahm auch über einen längeren Zeitraum unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht ab (3-4 Monate, entsprechend 20-30 Passagen, entsprechend 60-90 Populationsverdopplungen).

Abbildung 4.1: Proliferation und Morphologie muriner Knochenmarkstromazellen

A, B: PASSAGE 0; C: PASSAGE 2; D: PASSAGE 15

IN FRÜHEN PASSAGEN SIND DREI UNTERSCHIEDLICHE ZELLTYPEN SICHTBAR:
GROÙE, FLACHE, KONTRASTARME ZELLEN (PFEILKÖPFE); KLEINERE, SPINDELFÖRMIGE ZELLEN (SCHMALE PFEILE); KLEINE, RUNDE ZELLEN (BREITE PFEILE)



4.2 FACS Analyse

Zur Bestimmung der Homogenität der KMSZ-Kultur anhand exprimierter Oberflächenproteine wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Antikörper gegen Oberflächenproteine verwendet, die bereits zur Charakterisierung von humanen und Ratten-KMSZ eingesetzt worden waren. Dazu gehören:

CD11b (auch Alpha-M-Integrin, ein Marker für Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen)

CD44 (auch H-CAM, u.a. involviert in Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen)

CD45 (auch LCA [engl. „leucocyte common antigen“], exprimiert von allen hämatopoetischen Zellen)

CD71 (Transferrin-Rezeptor, exprimiert in allen Zellen mit Eisenbedarf, zum Beispiel proliferierende Zellen, erythroide Vorläufer)

CD90 (Thy1, Funktion bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, aber auch im ZNS und Bindegewebe exprimiert)

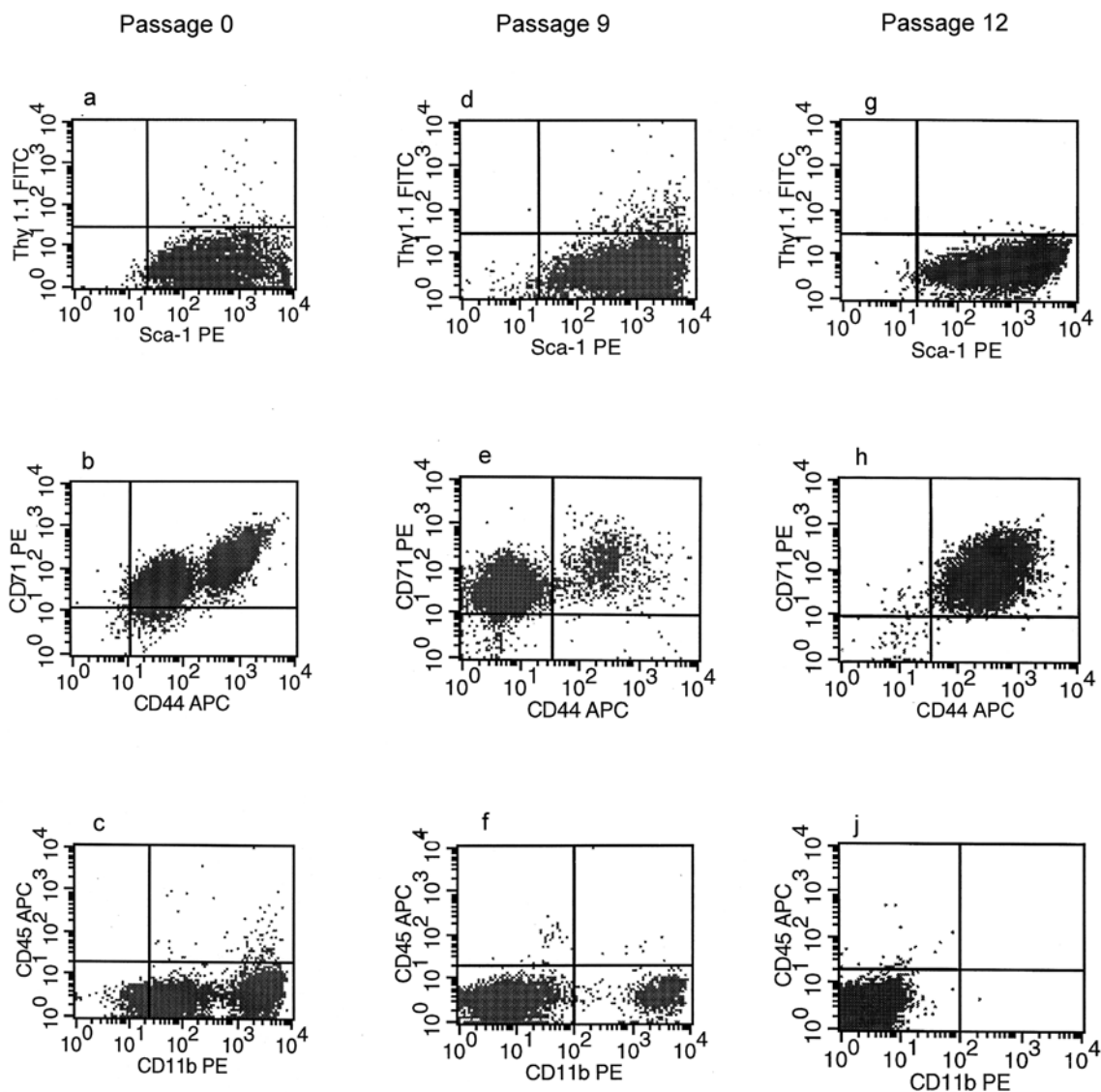
Sca-1 (auch Ly6A, exprimiert von verschiedenen Stammzelltypen)

Typisch für KMSZ ist, daß sie keine Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen exprimieren.

Die FACS-Analyse ergab, daß die Kulturen bei Passage 0 inhomogen waren und verschiedene Zellpopulationen enthielten: eine Population mit niedriger Expression von CD44 und CD71 (CD44/CD71^{low}) und eine andere, welche diese beiden Proteine stärker exprimiert (CD44/CD71^{high}); außerdem eine Population mit niedriger (CD11b^{low}), eine mit höherer Expression von CD11b (CD11b^{high}) (Abb. 4.2 a-c). Die Proteine CD90 und CD45 konnten nicht nachgewiesen werden. Alle Zellen exprimierten jedoch Sca-1.

Nach vier bis fünf Passagen waren die Zellkulturen morphologisch homogen, die FACS-Analyse zeigte jedoch eine noch bestehende Heterogenität hinsichtlich der getesteten Marker (Abb. 4.2 d-f). Dies spricht für die Anwesenheit einer hämatopoetischen Zellpopulation, sehr wahrscheinlich Makrophagen, welche CD11b stark exprimieren. Die CD11b-positive Zellpopulation wurde daher durch eine MACS-Sortierung (siehe Methoden) aus der Kultur entfernt. Danach konnten keine CD11b-positiven Zellen in der Kultur mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.2 j). Die Abbildungen 4.2 g-j zeigen, daß die CD11b-negativen Kulturen außerdem CD45- und CD90-negativ waren und deutlich CD44 (> 98%) und CD71 (>98%) exprimierten. Vorhergehende Analysen beschreiben ebenfalls die Expression von CD44 (Woodbury et al., 2000; Tremain et al., 2001; Colter et al., 2001) und CD71 (Woodbury et al., 2000) in Kulturen von humanen und Ratten-KMSZ.

Abbildung 4.2: FACS-Analyse verschiedener Kulturstadien muriner Knochenmarkstromazellen



Ebenso wurde die fehlende Expression von CD45 für Ratten- und humane KMSZ beschrieben (Woodbury et al., 2000; Colter et al., 2001).

Die Expression von CD90 war für KMSZ von Ratten und Menschen gezeigt worden, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit mit FACS-Analysen nicht nachgewiesen werden, obwohl Antikörper gegen zwei verschiedene Isoformen (CD90.1, CD90.2) getestet wurden. CD90-Transkripte konnten allerdings mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Als weiteres exprimiertes Oberflächenprotein wurde Sca-1 bestätigt. Sca-1 wird von verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert, so zum Beispiel hämatopoetischen Stammzellen, epithelialen und myo-endothelialen Vorläuferzellen (Tamaki et al., 2002; Welm et al., 2002; Satoh et al., 1997).

4.3 Expressionsprofil muriner Knochenmarkstromazellen

Die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils muriner KMSZ sollte über die Art der exprimierten Gene Aufschluss auf die Eigenschaften der Zellen geben. Mittels cDNS-Mikroarrays wurden drei verschiedene RNS-Proben von Zellen unterschiedlicher Passagen analysiert. RNS der einzelnen Proben wurde Cy-3 und Cy-5 markiert und auf cDNS-Mikroarrays kohybridisiert. Diese bestanden aus 13.603 verschiedenen cDNS-Sonden, die 8440 UniGene-Clustern (Genen) entsprechen.

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten (Abb. 4.3) ergab eine Anzahl von 6887 exprimierten Klonen, entsprechend 4860 UniGene-Clustern und 609 Klonen ohne Annotation in der Datenbank. Die Gesamtliste aller exprimierten Gene kann unter http://www.molgen.mpg.de/~dna_microarrays/gene_expr/publ/BMSC_profile eingesehen werden. Von den 6887 exprimierten Klonen wurden die Signalintensitäten von 1919 als hoch exprimiert gewertet. Diese entsprechen 1375 Genen mit UniGene Annotation, und 120 Klonen ohne UniGene Annotation (s. Abb. 4.3).

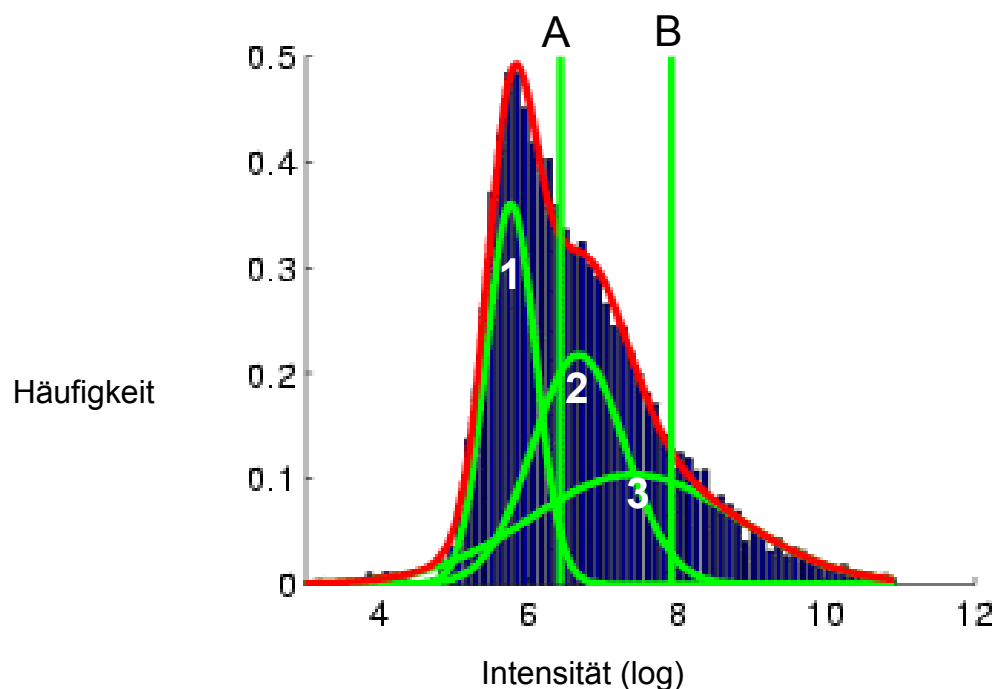
Abbildung 4.3: Histogramm der ermittelten Signalintensitäten (logarithmische Skala) und ihrer optimierten Darstellung durch drei verschiedene Normalverteilungen (Gaussian mixture mode)

ROTE LINIE: VERTEILUNG ALLER LOG-INTENSITÄTEN

GRÜNE KURVEN: 1: NICHT EXPRIMIERTE GENE; 2: EXPRIMIERTE GENE; 3: HOCH EXPRIMIERTE GENE

LINKE VERTIKALE LINIE (A): UNTERE INTENSITÄTS-GRENZE FÜR EXPRIMIERTE GENE (2 STANDARDABWEICHUNGEN ÜBER DEM INTENSITÄTS-MITTEL KURVE 1)

RECHTE VERTIKALE LINIE (B): UNTERE INTENSITÄTS-GRENZE FÜR EXPRIMIERTE GENE (2 STANDARDABWEICHUNGEN ÜBER DEM INTENSITÄTS-MITTEL KURVE 2)



Bisher wurden zwei Studien zur Genexpression humaner KMSZ publiziert. Tremain et al. (2001) benutzten hierzu die MicroSAGE Technik. Jia et al. (2002) sequenzierten ESTs (engl. „expressed sequence tags“), um ein Transkriptionsprofil humaner KMSZ zu erstellen. In der Studie von Tremain et al. werden die 50 am höchsten exprimierten Gene angegeben, in der Publikation von Jia et al. die 30 höchstexprimierten. Ein Vergleich zwischen diesen beiden Studien und den durch die Mikroarray-Analyse gefundenen Genen dieser Studie zeigt Tabelle 4.1. In dieser Tabelle wurden hochexprimierte ribosomale Gene nicht aufgelistet. 17 von 29 Genen (60%), welche durch die MicroSAGE-Analyse gefunden wurden, und 15 von 25 Genen (59%), welche durch EST-Sequenzierung als hoch exprimiert klassifiziert wurden, fanden sich auch unter den hochexprimierten Genen der Mikroarray-Analyse. Damit zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der verschiedenen Techniken.

Die Mikroarray-Analyse zeigte, daß KMSZ Gene exprimieren, welche für viele verschiedene Zellen und Gewebe typisch sind. So befanden sich unter den hochexprimierten Genen einige neurale Transkripte, z.B. N-Cam (engl. „neural cell adhesion molecule“), Synapsin, Nsg-1 (engl. „neuron-specific gene family member-1“) und Tubulin beta-4. Unter den exprimierten Genen waren außerdem das neuronale Intermediärfilament Alpha-Internexin, die Neuronenspezifische Enolase (Nse) und Neurogranin. Bemerkenswert ist auch die Expression von Reticulon-3, einem Gen, das hauptsächlich in neuroendokrinen Geweben exprimiert ist, und Gmfb (engl. „glia-maturation-factor beta“). Stark exprimiert war das für mesenchymale Zellen charakteristische Intermediärfilament Vimentin. Auch für hämatopoetische Zellen typische Gene wurden exprimiert, so das Oberflächenglykoprotein CD7, welches auf T-Zellen exprimiert ist, und die T-Zell-spezifische GTPase. Osteoblasten-Cadherin (OB-Cadherin), Comp (engl. „cartilage oligomeric matrix-protein“) und Osteocalcin sind in Knorpel- und Knochenzellen exprimiert und waren ebenfalls (hoch-) exprimiert in murinen KMSZ.

Zur besseren Übersicht wurden die exprimierten und hochexprimierten Gene in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt. Tabelle 4.2 zeigt eine Auswahl der in Maus-KMSZ (hoch-) exprimierten Gene. Eine Anzahl von Klonen, insbesondere solche, die nur einmal auf dem Mikroarray vorhanden waren, wurden durch Sequenzierung verifiziert. 25 hochexprimierte Gene wurden durch RT-PCR getestet. Die Expression aller dieser Gene konnte bestätigt werden. Außerdem wurde die Expression von CD90, welche in der FACS-Analyse nicht gezeigt werden konnte, durch RT-PCR nachgewiesen (Abb. 4.2, 4.4).

Anschließend wurde versucht, aus dem Expressionsprofil über Vergleiche mit der vorhandenen Literatur Ähnlichkeiten mit bekannten (Stamm-)Zelltypen zu finden

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) und damit Aufschluß über die genauere Identität dieser Zellen zu erlangen. Diese Recherchen ergaben eine deutliche molekulare, aber auch morphologische Ähnlichkeit mit Perizyten (s. Diskussion Abschnitt 5.2).

Tabelle 4.1: Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis der Expression von Genen in Knochenmarkstromazellen:

NAMEN IN KLAMMERN VERWEISEN AUF ÄHNLICHE, ABER NICHT GLEICHE GENE. VERSCHIEDENE RIBOSOMALE GENE SIND NICHT AUFGELISTET

* UNIGENE-CLUSTER EXISTIERT NICHT MEHR

NAME DES UNIGENE-CLUSTERS HAT SICH GEÄNDERT

Microsage (Tremain et al. 2001)	Est- Sequenzierung (Jia et al., 2002) UniGene	Mikroarray-Analyse	Klon-Nr. (GenBank)
Fibronectin 1	Hs.118162	Fibronectin 1	-
Collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	Collagen, type I, alpha 2	BF121342
Collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	Collagen, type I, alpha 1	AI844874
-	Hs.111779	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	AW107915
Eef1a1	Hs.181165	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	AA682067
Actin, gamma	Hs.215747	Actin, gamma 1	AA638471
-	Hs.180952	Actin, beta	AI315953
-	Hs.75777	Transgelin	-
Ferritin, heavy polypeptide	Hs.62954	Ferritin, heavy polypeptide 1	AI194804
-	Hs.217493	Annexin II	AI840663
-	Hs.75511	Connective tissue growth factor	-
-	Hs.118787	Transforming growth factor beta-induced	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
-	Hs.195188	Human normal keratinocyte subtraction library mRNA, clone h22a, complete sequence	NM_009366
Vimentin	Hs.2064	Vimentin	BE553646
-	Hs.169476	Tubulin, alpha, ubiquitous	BE952337
-	Hs.195851	Human aortic-type smooth muscle a-actin (sm-a-a) gene, exon 9	AA692661
Insulin-like growth factor binding protein 3	Hs.1516	Insulin-like growth factor-binding protein 4	AI196480
-	Hs.82085	Plasminogen activator inhibitor, type I	-
-	Hs.76152	Decorin	AA986882
-	Hs.207396*	H. sapiens opa-interacting protein oip3 mRNA, partial cds	-
Collagen, type III, alpha 1	Hs.119571	Collagen, type III, alpha 1	AA142790
-	Hs.7753	Calumenin	AI119625
-	Hs.179661	H. sapiens clone 24703 b-tubulin mRNA,	Tubulin beta 2
-	Hs.5831	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	(<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>)
-	Hs.87409	Thrombospondin 1	-
Ferritin, light polypeptide	Hs.111334	Ferritin, light polypeptide	(<i>Ferritin heavy polypeptide</i>)
-	Hs.82985	Collagen, type V, alpha 2	(<i>Different collagens, no type V</i>)
23 kd highly basic protein	Hs.119122#	H. sapiens mRNA for 23 kd highly basic protein	-
-	Hs.74487	Human beta-1d integrin mRNA, cytoplasmic domain	Integrin beta 1, fibronectin receptor
Osteoblast specific factor 2	-	-	-
Collagen, type III, alpha 1	-	-	Procollagen, type III, alpha 1
Eef2	-	-	Eukaryotic translation elongation factor 2
Collagen, type I, alpha 1	-	-	Procollagen, type I, alpha 1
Cathepsin b	-	-	Cathepsin b
Thymosin, beta-4 Chr X	-	-	Prothymosin, beta 4
Matrix metalloproteinase 2	-	-	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Beta-2-microglobulin	-	-	Beta-2 microglobulin
Tpt1	-	-	Translationally controlled tumor protein
Glutamate receptor, nmda2c	-	-	-
Collagen, type VI, alpha 3	-	-	Procollagen, type VI, alpha 3
Keratin 8	-	-	(<i>Mouse type I epidermal keratin mRNA clone pksc-50 3 end</i>)
Glia-derived nexin 1, alpha	-	-	-
Heart mRNA for hsp90	-	-	-

Tabelle 4.2: Ausgewählte Gene, die in murinen Knochenmarkstromazellen exprimiert sind:

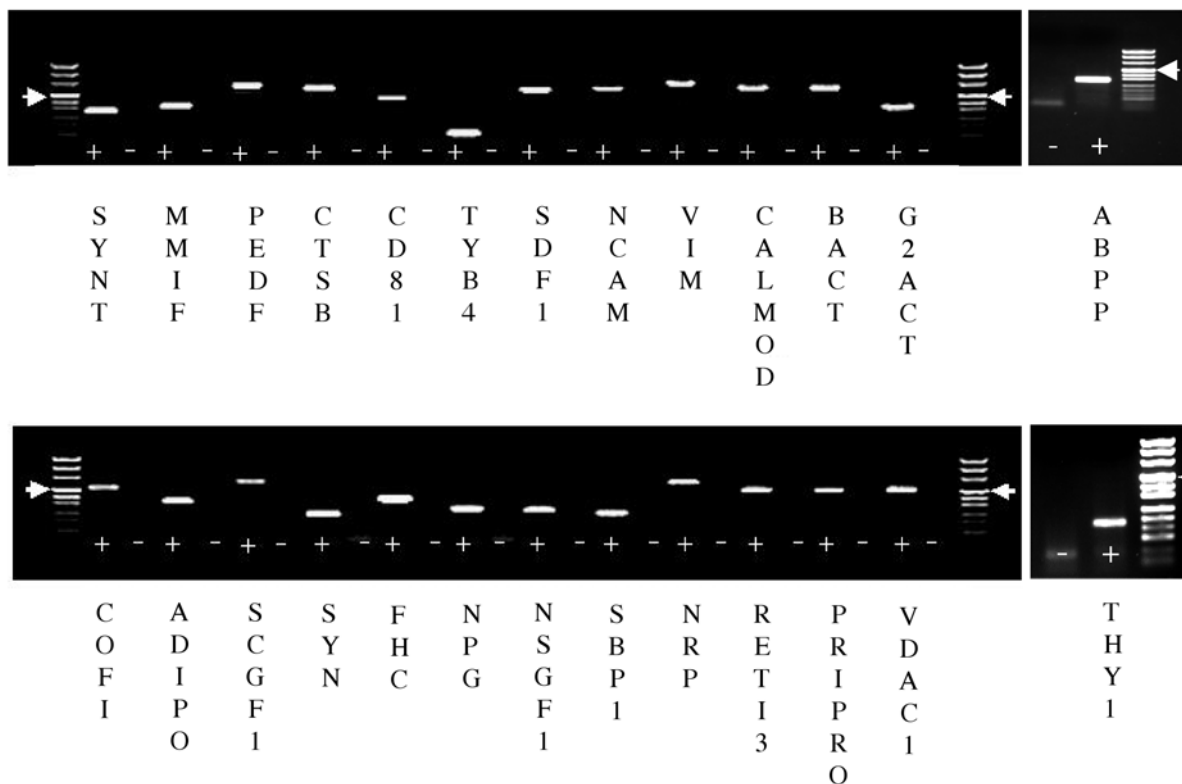
EINE ANZAHL DER GENE WURDE DURCH SEQUENZIERUNG DER MIKROARRAY-SONDEN (2) ODER RT-PCR (1) BESTÄTIGT, EINSCHLIEßLICH ALLER GENE, DIE NUR DURCH EINEN KLON AUF DEM MIKROARRAY VERTRETEN WAREN.

Datenbanknummer	UniGene Cluster	Genname (engl.)	Expressionsniveau	bestätigt durch RT-PCR (1), Sequenzierung (2)
Zytoskelett				
BE310891	Mm.16562	Actin, gamma 2, smooth muscle enteric	Hoch exprimiert	1
W20720	Mm.214950	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Hoch exprimiert	2
AW489211	Mm.2496	Alpha internexin neuronal intermediate filament protein	Exprimiert	2
W48198	Mm.1000	Myosin light chain alkali fast skeletal muscle	Exprimiert	2
BG087200	Mm.3328	Myosin light chain alkali nonmuscle	Hoch exprimiert	
AI324491	Mm.43	Myosin light chain, alkali, cardiac atria	Hoch exprimiert	
AI325140	Mm.17306	Tropomyosin 3, gamma	Hoch exprimiert	2
AA168151	Mm.7420	Tubulin beta-4	Hoch exprimiert	
M26251	Mm.7	Vimentin	Hoch exprimiert	1
Extrazelluläre Matrix				
NM_007541	Mm.87858	Bone gamma carboxyglutamate protein 1 (osteocalcin)	Exprimiert	2
NM_016685	Mm.45071	Cartilage oligomeric matrix protein	Exprimiert	2
AA048745	Mm.7524	Dystroglycan 1	Hoch exprimiert	
AA476153	Mm.2399	Laminin, alpha 4	Exprimiert	2
BE199074	Mm.1249	Laminin, gamma 1	Exprimiert	2
AA270034	Mm.7257	Perlecan heparan sulfate proteoglycan 2	Hoch exprimiert	
AW550457	Mm.22621	Procollagen, type I, alpha 1	Hoch exprimiert	2
BE553664	Mm.4482	Procollagen, type I, alpha 2	Hoch exprimiert	
BE200226	Mm.738	Procollagen, type IV, alpha 1	Hoch exprimiert	
BE951889	Mm.35439	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (osteonectin)	Hoch exprimiert	2
NM_008304	Mm.29350	Syndecan 2	Hoch exprimiert	
AI425881	Mm.206536	Syndecan 3	Hoch exprimiert	
AI528251	Mm.3815	Syndecan 4	Hoch exprimiert	2
Zelladhäsion				
AI156554	Mm.35605	Cadherin 1/E-cadherin	Exprimiert	2
NM_009866	Mm.1571	Cadherin 11/Osteoblast cadherin	Hoch exprimiert	2
NM_019707	Mm.24700	Cadherin 13	Exprimiert	2
AI385536	Mm.14897	Cadherin 2/N-cadherin	Exprimiert	2
AI463876	Mm.3476	Catenin beta	Hoch exprimiert	2
AW554919	Mm.806	CD81	Hoch exprimiert	1
AW554580	Mm.30246	CD151/PETA-3	Hoch exprimiert	2
AI852832	Mm.4100	CD7 antigen/T-cell antigen	Hoch exprimiert	
NM_009149	Mm.488	E-selectin endothelial cell ligand	Hoch exprimiert	2
AA521693	-	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Hoch exprimiert	
BF101201	Mm.4712	Integrin beta 1 fibronectin receptor	Hoch exprimiert	2
BE531600	Mm.21990	Junction plakoglobin	Exprimiert	
AI784966	Mm.4974	NCAM1	Hoch exprimiert	1
AW493460	Mm.2251	Plexin A2	Hoch exprimiert	2
Zytokine/-Rezeptoren				
AI225644	Mm.1341	Epidermal growth factor	Exprimiert	2
AI425567	Mm.7996	Fgf12 Fibroblast growth factor 12	Hoch exprimiert	
AI326934	Mm.3157	Fibroblast growth factor receptor 1	Hoch exprimiert	
AA172503	Mm.3986	Growth hormone receptor	Hoch exprimiert	
AA919985	Mm.1141	Hepatoma-derived growth factor	Hoch exprimiert	2
AI481195	Mm.1009	Interleukin 4 receptor alpha	Hoch exprimiert	2
AA245731	Mm.2326	Macrophage migration inhibitory factor	Hoch exprimiert	1
AI848244	Mm.90787	Nerve growth factor receptor associated protein 1	Hoch exprimiert	
AI323974	Mm.27448	Neuropilin-1 (VEGF165R)	Hoch exprimiert	1
NM_011340	Mm.2044	Pigment epithelium derived factor	Hoch exprimiert	1, 2
AA815901	Mm.2675	Platelet derived growth factor alpha	Exprimiert	2
NM_008809	Mm.4146	Platelet derived growth factor receptor beta polypeptide	Hoch exprimiert	2
W90911	Mm.465	Stromal cell derived factor 1	Hoch exprimiert	1
AI266799	Mm.30149	Stromal cell derived factor 4	Hoch exprimiert	
AA517257	Mm.15125	Stromal cell derived factor receptor 1	Hoch exprimiert	
AA793036	Mm.31540	Vascular endothelial growth factor alpha	Exprimiert	2

Abbildung 4.4: Nachweis der Expression verschiedener Gene in murinen Knochenmarkstromazellen durch RT-PCR:

(+) REVERSE TRANSKRIPTASE WURDE ZUGEgeben; (-) NEGATIVKONTROLLE OHNE REVERSE TRANSKRIPTASE. DIE PFEILE ZEIGEN EIN 500 BASENPAARE LANGES FRAGMENT DES DNA-MARKERS AN.

SYNT - SYNTENIN, **MMIF** - MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR, **PEDF** - PIGMENT EPITHELIUM DERIVED FACTOR, **CTSB** - CATHEPSIN B, **CD81** - CD81 ANTIGEN, **TYB4** - THYMOSIN BETA 4, **SDF-1** - STROMAL CELL DERIVED FACTOR 1, **NCAM** - NEURAL CELL ADHESION MOLECULE, **VIM** - VIMENTIN, **CALMOD** - CALMODULIN, **BACT** - ACTIN BETA CYTOPLASMIC, **G2ACT** - ACTIN GAMMA 2, **COF1** - COFILIN, **ADIPO** - ADIPOCYTE PROTEIN P4, **SCGF1** - STEM CELL GROWTH FACTOR 1, **SYN** - SYNAPSIN, **FHC** - FERRITIN HEAVY CHAIN, **NPG4** - NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 4 (NEDD4), **NSGF1** - NEURON SPECIFIC GENE FAMILY MEMBER 1, **SBP1** - SYNTAXIN BINDING PROTEIN1, **NRP** - NEUROFILAMEN 1, **RET13** - RETICULON3, **PRIPRO** - PRION PROTEIN, **VDAC1** - VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 1. **ABPP** - AMYLOID BETA PRECURSOR PROTEIN. **THY1** - T-CELL ANTIGEN (CD90).



4.4 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen

4.4.1 Etablierung eines geeigneten Differenzierungsprotokolls

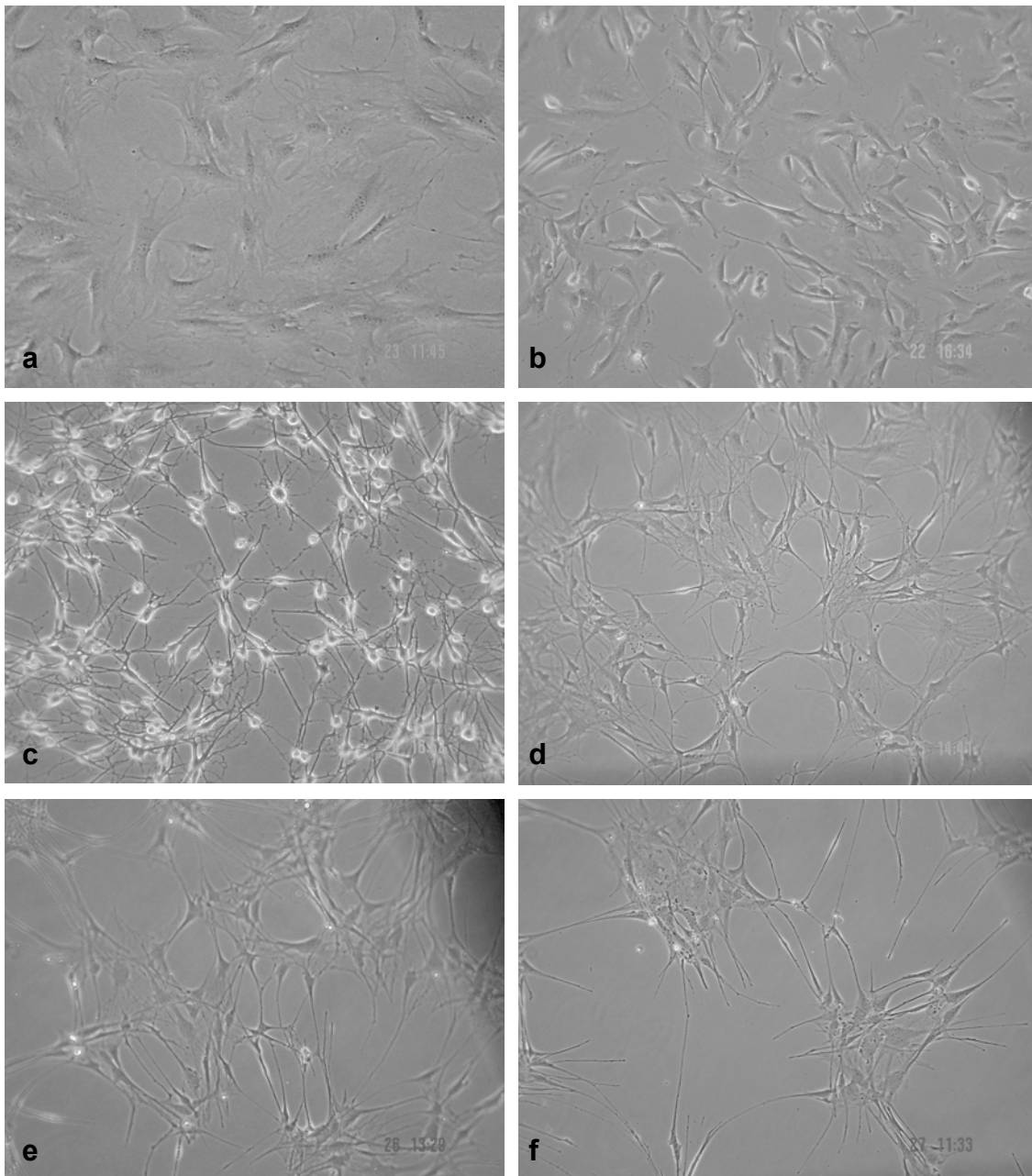
Um murine Knochenmarkstromazellen in Zellen mit neuronalen Charakteristika zu differenzieren, wurden zunächst Kulturbedingungen nach Woodbury et al. (2000) getestet. Die Autoren beschreiben eine *in vitro* Differenzierung von humanen und Ratten-KMSZ in Zellen, die durch Zugabe von Antioxidantien (β -Mercaptoethanol oder butyliertes Hydroxyanisol) neuronale Marker exprimieren. Beachtlich ist hier nicht nur die Schnelligkeit, mit der die Zellen auf die veränderten Kulturbedingungen reagierten, sondern auch der hohe Prozentsatz (~80%) an Zellen, die nachweislich neuronale Proteine wie Neurofilament-M (NF-M), die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) oder das Mikrotubuli-assoziierte Tau-Protein exprimierten.

Für die neuronale Differenzierung muriner KMSZ in der vorliegenden Arbeit wurden diese zunächst bei 50-60% Konfluenz für 24 Stunden in einem Medium aus DMEM, 15% fötalem Kälberserum und 10ng/ml bFGF inkubiert. Nach 24 Stunden nahmen die im Normalzustand großen, flachen, Fibroblasten-ähnlichen (Abb. 4.5 a) Zellen eine spindelförmige Morphologie an (Abb. 4.5 b). Die Medienbedingungen, die von Woodbury et al. zur neuronalen Differenzierung humaner und Ratten-KMSZ verwendet wurden, mußten für Mauszellen jedoch optimiert werden, da nach kurzer Zeit ein Zelltod der meisten Zellen beobachtet wurde. Daher wurden verschiedene Medien und zugesetzte Faktoren in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen getestet, um die Differenzierung und die Überlebensrate muriner KMSZ zu optimieren.

Eine Kombination zweier Medien zeigte letztlich den besten Effekt. Nach etwa vier Stunden im ersten Medium zeigten die Zellen deutliche morphologische Veränderungen: das Zellsoma zog sich um den Zellkern zusammen und rundete sich ab. Es bildeten sich verzweigte und lange Fortsätze, womit die Zellen Nervenzellen sehr ähnelten (Abb. 4.5 c). Da sich einige Zellen bei längerer Inkubation in diesem Medium ablösten, wurde es nach 4 Stunden gegen ein zweites („Reifungs“-) Medium ausgetauscht, in welchem die Zellen verblieben. Nach einem bzw. zwei Tagen in diesem Medium lag das Zellsoma weniger eng um den Zellkern, die Fortsätze blieben jedoch bestehen (Abb. 4.5 d,e). Am dritten Tag wurde eine Aggregation der Zellkörper beobachtet und noch längere Fortsätze wurden sichtbar (Abb. 4.5 f).

Abbildung 4.5: Morphologische Änderungen während der Differenzierung von Maus-Knochenmarkstromazellen in Zellen mit neuronalem Phänotyp:

- a) UNDIFFERENZIERTE MAUS-KNOCHENMARKSTROMAZELLEN
 - b) NACH 24H INKUBATION IN DMEM/15%FBS/10NG/ML BFGF
 - c) NACH 4H IN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 1
 - d) NACH EINEM TAG IN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 2
 - e) NACH ZWEI TAGEN IN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 2
 - f) NACH DREI TAGEN IN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 2
- SCHATTEN OBEN RECHTS D-F: FILZSTIFTMARKIERUNG AUF DER KULTURFLASCHE, UM DENSELBBN BILDAUSSCHNITT ZU ZEIGEN



4.4.2 Immunzytochemische Untersuchung der Expression neuronaler Markerproteine

Entscheidend für die Feststellung einer erfolgreichen neuronalen Differenzierung der Knochenmarkstromazellen ist der Nachweis der Expression neuronaler Marker oder Neuronen-typischer Proteine. Hierzu wurden verschiedene neuronale und gliale Markerproteine durch Immunfluoreszenz getestet. Bei diesen Experimenten wurden die gleichen Zeitpunkte gewählt wie auch für die späteren Mikroarray-Analysen: undifferenzierte Knochenmarkstromazellen (Zeitpunkt 1), Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit bFGF (2), ein Tag nach Induktion der neuronalen Differenzierung (3), zwei Tage (4) und drei Tage (5) danach.

Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Neurofilament-M (NF-M, 145kD), Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Nestin, Vimentin, GFAP (ein monoklonaler, ein polyklonaler Antikörper), TrkA, HuC/HuD, L1-CAM, RC2, Ki67 und die Oligodendrozytenmarker O4 und GalC markiert. Undifferenzierte Maus-KMSZ synthetisierten kein NF-M. Bereits nach der Präinkubation mit bFGF ist NF-M in einigen Zellen nachweisbar, am ersten Tag nach der neuronalen Differenzierung sind bereits viele Zellen NF-M positiv. Nach zwei Tagen im Differenzierungsmedium synthetisieren 81,6% bis 86,9% der Zellen NF-M. Hierbei geben die Prozentzahlen jeweils den Durchschnitt an NF-M-positiven von 16 zufällig ausgewählten Sichtfeldern im Fluoreszenzmikroskop zweier verschiedener Differenzierungsansätze an (s. Abb. 4.6). Die Expression der Neuronen-spezifischen Enolase nimmt im Verlauf der Differenzierung stark zu, kann aber bereits in undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden (in Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil der undifferenzierten Zellen und auch bereits veröffentlichter Daten (Deng et al., 2001)). Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1, der NGF-Rezeptor TrkA und HuC/HuD werden im Verlauf der Differenzierung ebenfalls deutlich höher exprimiert. Von besonderem Interesse ist die Expression von Nestin während des Differenzierungsvorganges. In undifferenzierten Zellen ist dieses Protein nicht vorhanden. Die Expression nimmt jedoch schon während der Präinkubation zu und erreicht ihren Höhepunkt am Tag eins und zwei der Differenzierung. Am dritten Tag ist die Expression wieder schwächer. Nestin ist ein Marker neuroepithelialer Vorläuferzellen (Lendahl et al., 1990) und wird nach der Differenzierung der Vorläuferzellen nicht mehr exprimiert. Insofern stimmen die Daten hier mit Erkenntnissen zu Differenzierungsprozessen neuroepithelialer Vorläuferzellen überein.

Abbildung 4.6: Immunfärbung von neuronal differenzierenden Knochenmarkstromazellen der Maus 1:

- (1) UNDIFFERENZIERTE KNOCHENMARKSTROMAZELLEN
- (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10NG/ML BFGF
- (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG

NF-M NEUROFILAMENT-M (145 KD), **NSE** – NEURONEN SPEZIFISCHE ENOLASE, **TRK-A** – NFG-REZEPTOR, **L1-CAM** – NEURONALES ZELL-ADHÄSIONSMOLEKÜL L1 JEWEILS ROT; DAPI (DNS DES ZELLKERNS) BLAU
10x/20x: VERGÖSSERUNG DES MIKROSKOPOBJEKTIVS

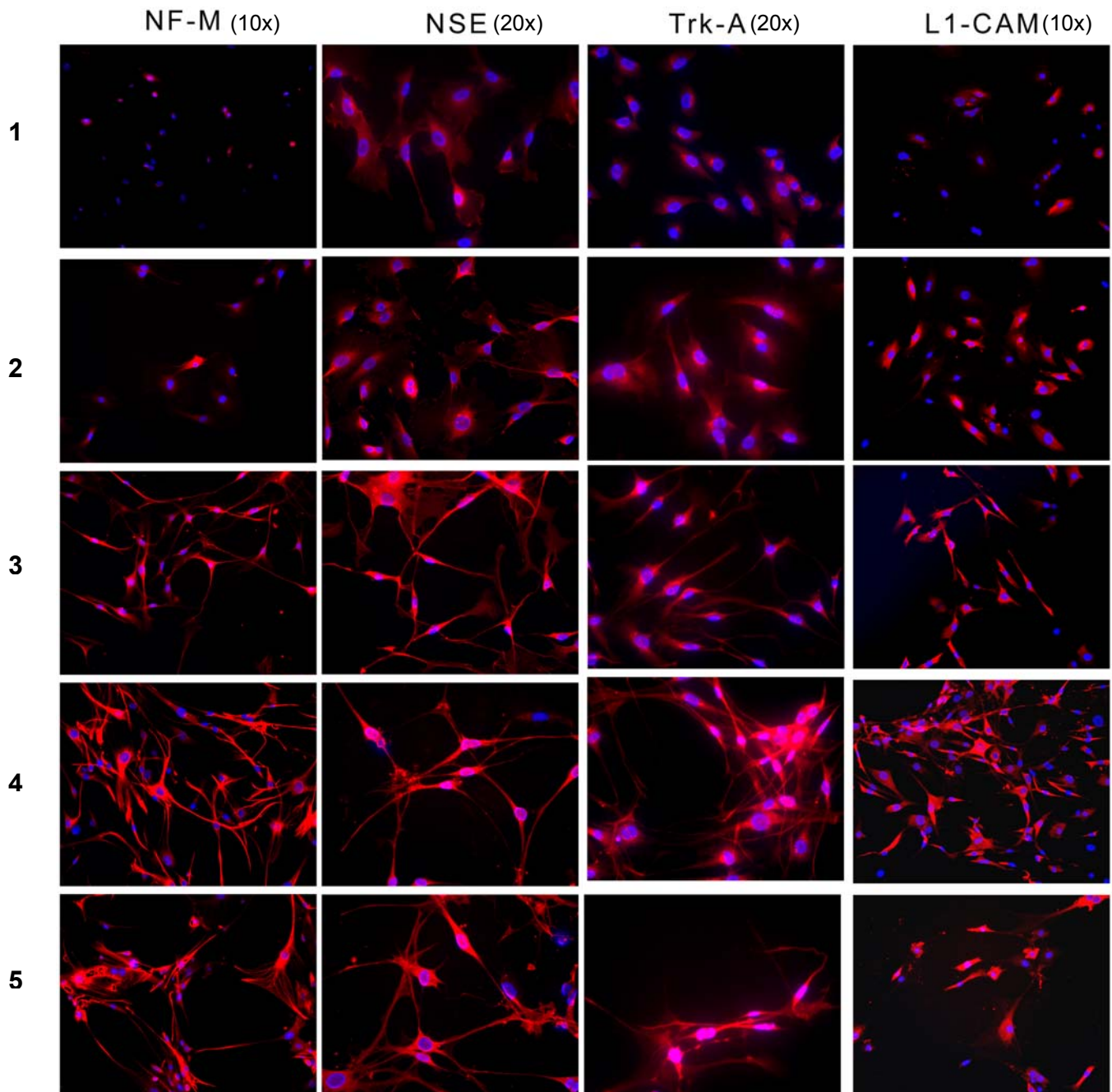
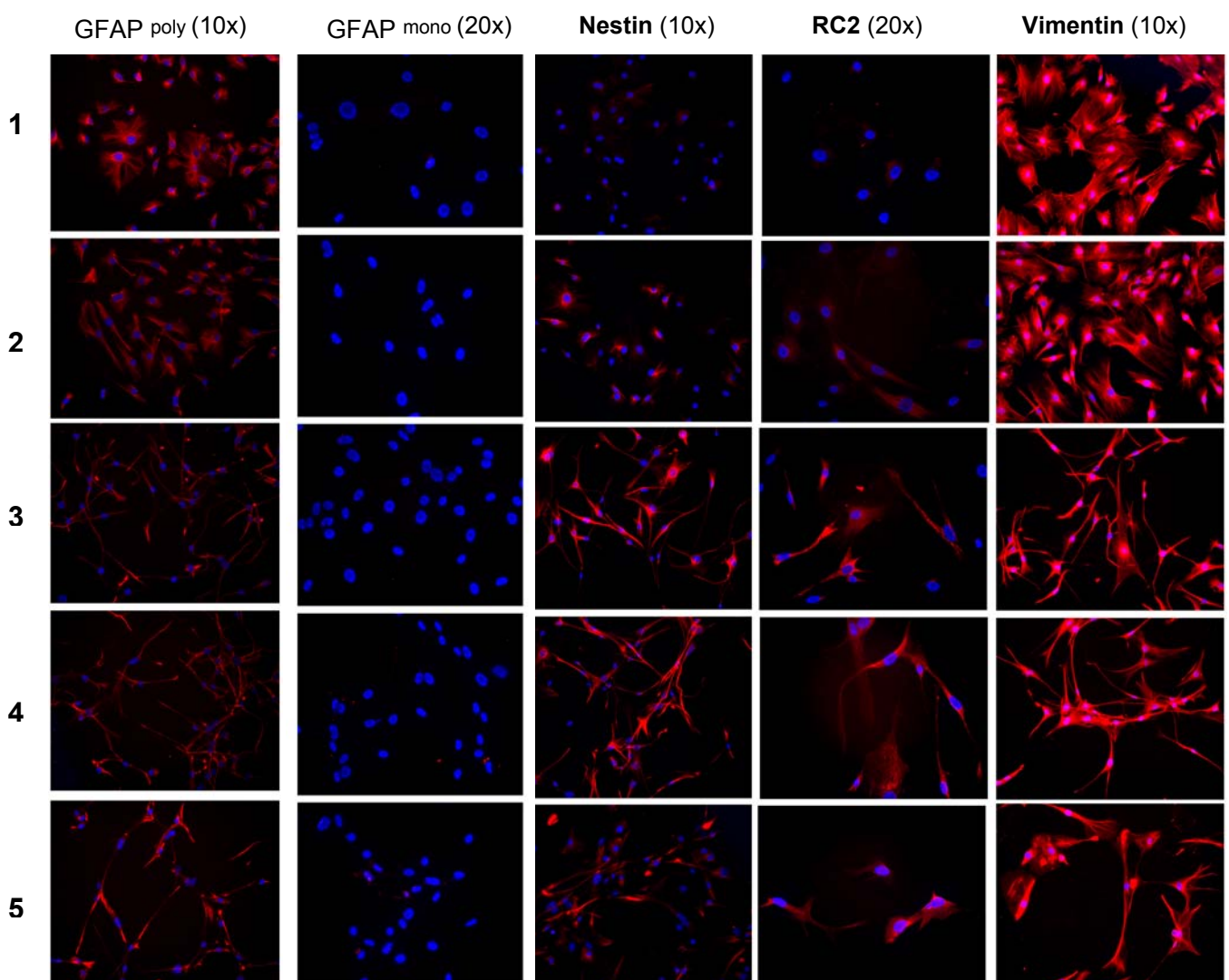


Abbildung 4.7: Immunfärbung von neuronal differenzierenden Knochenmarkstromazellen der Maus 2:

- (1) UNDIFFERENZIERTE KNOCHENMARKSTROMAZELLEN
- (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10NG/ML BFGF
- (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG

GFAP POLY- POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN DEN ASTROZYTENMARKER GLIAL ACIDIC FIBRILLARY PROTEIN; **GFAP-MONO** MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN GFAP; **NESTIN** MARKIERT NEURONALE VORLÄUFERZELLEN; **RC2** IST EIN IN RADIALEN GLIAZELLEN EXPRIMIERTES ANTIGEN; **VIMENTIN** WIRD U.A. IN MESENCHYMALEN ZELLEN EXPRIMIERT
10x/20x: VERGÖSSERUNG DES MIKROSKOPOBJEKTIVS

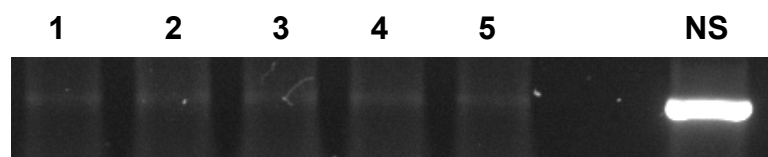


Immunfärbungen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen GFAP („glial fibrillary acidic protein“) erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. GFAP ist ein Intermediärfilament, das typischerweise von reifen Astrozyten exprimiert wird. Bei Verwendung eines polyklonalen Antikörpers (sc-6170, C-19, Santa Cruz Biotechnology) waren bereits die undifferenzierten

Zellen leicht positiv (Abb. 4.7). Während der Differenzierung wurde die Markierung schwächer, konzentrierte sich aber besonders auf die Enden der von den Zellen gebildeten Fortsätze. Bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen GFAP waren die Zellen negativ. Kontrollfärbungen auf Gehirnschnitten ergaben jedoch eine Kolo-kalisation beider Antigene. Vermutlich ist die GFAP-Färbung der KMSZ aufgrund einer Kreuzreaktion mit einem anderen Protein zu erklären, da durch eine RT-PCR keine GFAP-Transkripte nachgewiesen werden konnten; eine Kontrollreaktion mit cDNS neuronaler Stammzellen war hingegen positiv (Abb. 4.8).

Abb. 4.8: RT-PCR des Astrozyten-spezifischen Markers GFAP mit cDNS verschiedener Stadien von KMSZ und mit cDNS neuronaler Stammzellen (jeweils 32 Zyklen)

- (1) UNDIFFERENZIERT KNOCHENMARKSTROMAZELLEN
- (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10NG/ML BFGF
- (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- NS- POSITIV-KONTROLLE MIT CDNS NEURONALER STAMMZELLEN



Die Oligodendrozytenproteine O4 und GalC (Abb. 4.10) konnten weder in undifferenzierten noch in differenzierten KMSZ nachgewiesen werden.

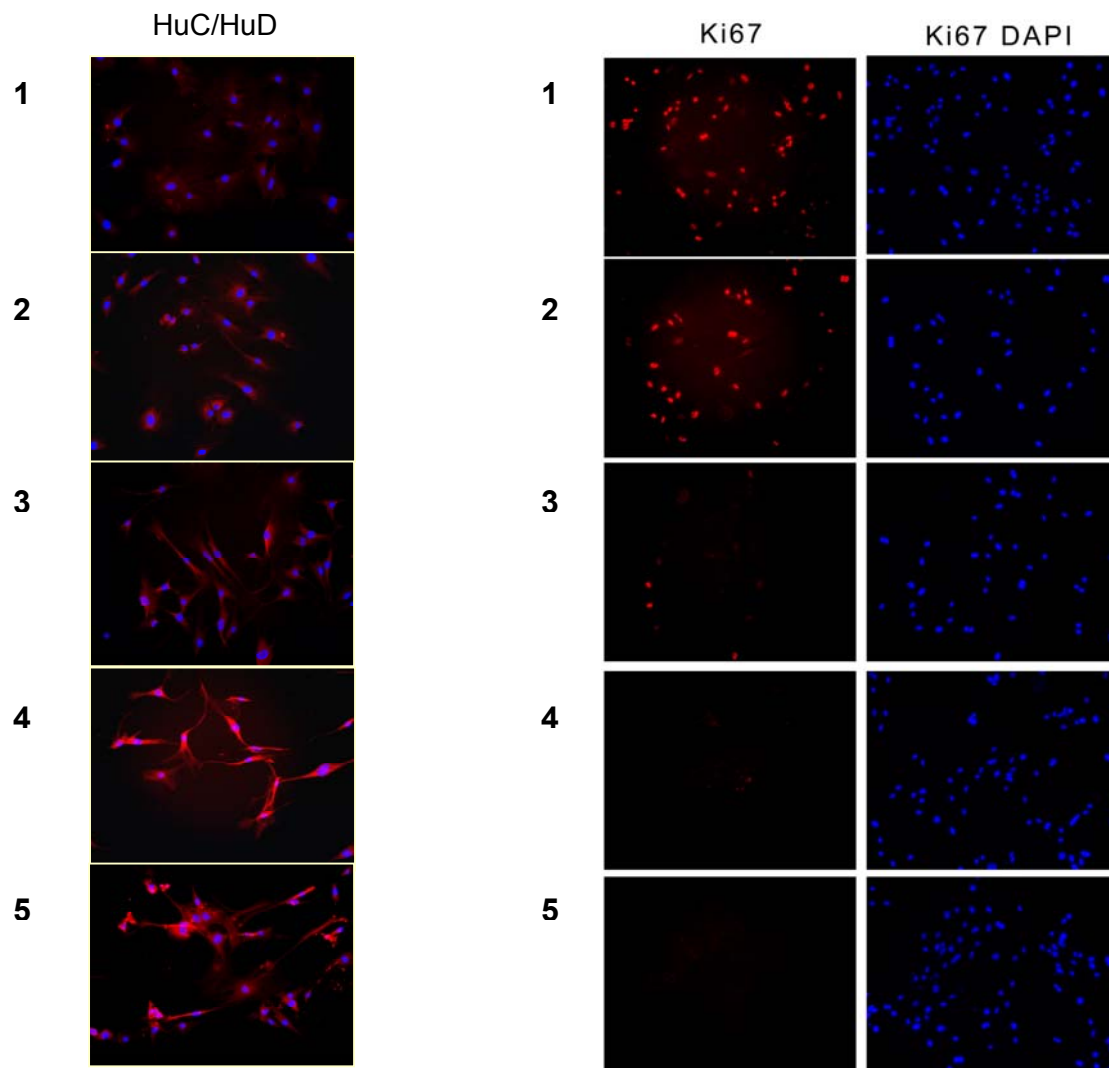
Interessant ist der Nachweis des RC2-Antigens während der Differenzierung (Abb. 4.7). RC2 ist ein Antigen, welches typischerweise in radialen Gliazellen, die neuronale Vorläuferzellen darstellen, aber auch in sich entwickelnden Muskelzellen (Chanas-Sacré et al., 2000) und einigen anderen ZNS-Vorläuferzellen wie zum Beispiel Oligodendrozytenvorläufern (Hartfuss et al., 2001; Götz et al., 2002) gefunden wird. Das RC2-Antigen stellt vermutlich eine Modifikation von Nestin dar (Chanas-Sacré et al., 2000).

Die Färbung mit dem Antikörper Ki67 ermöglicht eine Aussage über den Proliferationsstatus der Zellen (Brown und Gatter, 2002). Während undifferenzierte Zellen und auch Zellen nach der Präinkubation mit bFGF noch positiv sind, nimmt die Zahl der positiven Zellen mit Einsetzen der Differenzierung bereits sehr stark ab. Ab dem zweiten Tag im Differenzierungsmedium lassen sich keine Ki67-positiven Zellen mehr nachweisen. Dieses Ergebnis zeigt in Übereinstimmung mit den Mikroarray-Daten (siehe Abschnitt 4.6) den Proliferationsstopp der Zellen (Abb. 4.9).

Abbildung 4.9: Immunfärbung von neuronal differenzierenden Knochenmarkstromazellen der Maus 3:

- (1) UNDIFFERENZIERTE KNOCHENMARKSTROMAZELLEN
- (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10 NG/ML BFGF
- (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG

HUC/HuD IST EIN MARKER FÜR EMBRYONALE NEURONEN
Ki67 MARKIERT EIN ZELLYKLUS-ABHÄNGIGES PROTEIN
(JEWEILS 10X-OBJEKTIV)



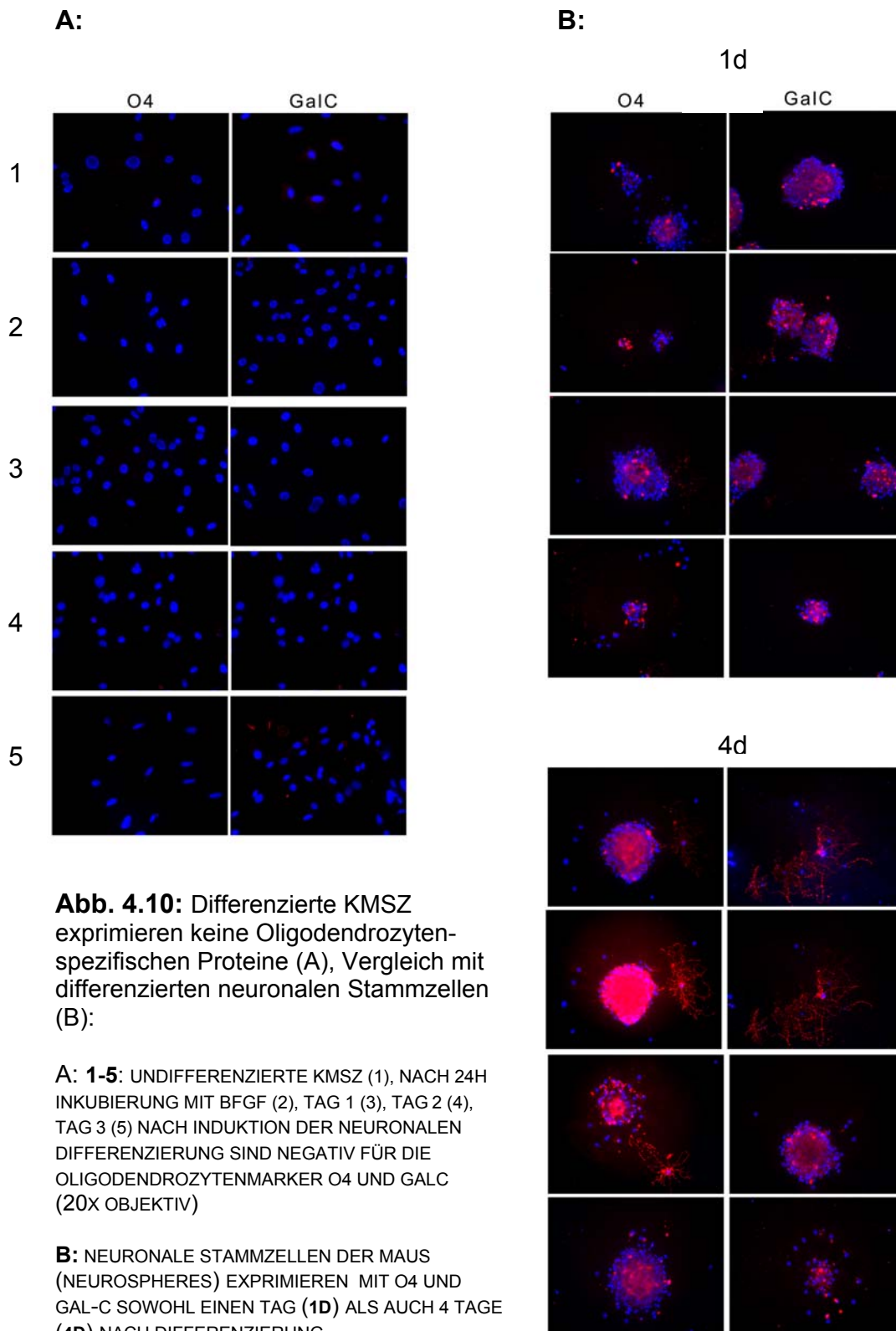


Abb. 4.10: Differenzierte KMSZ exprimieren keine Oligodendrozyten-spezifischen Proteine (A), Vergleich mit differenzierten neuronalen Stammzellen (B):

A: 1-5: UNDIFFERENZIERT KMSZ (1), NACH 24H INKUBIERUNG MIT BFGF (2), TAG 1 (3), TAG 2 (4), TAG 3 (5) NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG SIND NEGATIV FÜR DIE OLIGODENDROZYTENMARKER O4 UND GALC (20X OBJEKTIV)

B: NEURONALE STAMMZELLEN DER MAUS (NEUROSPHERES) EXPRIEMIEREN MIT O4 UND GAL-C SOWOHL EINEN TAG (1D) ALS AUCH 4 TAGE (4D) NACH DIFFERENZIERUNG OLIGODENDROZYTEN-SPEZIFISCHE PROTEINE (10X-OBJEKTIV)

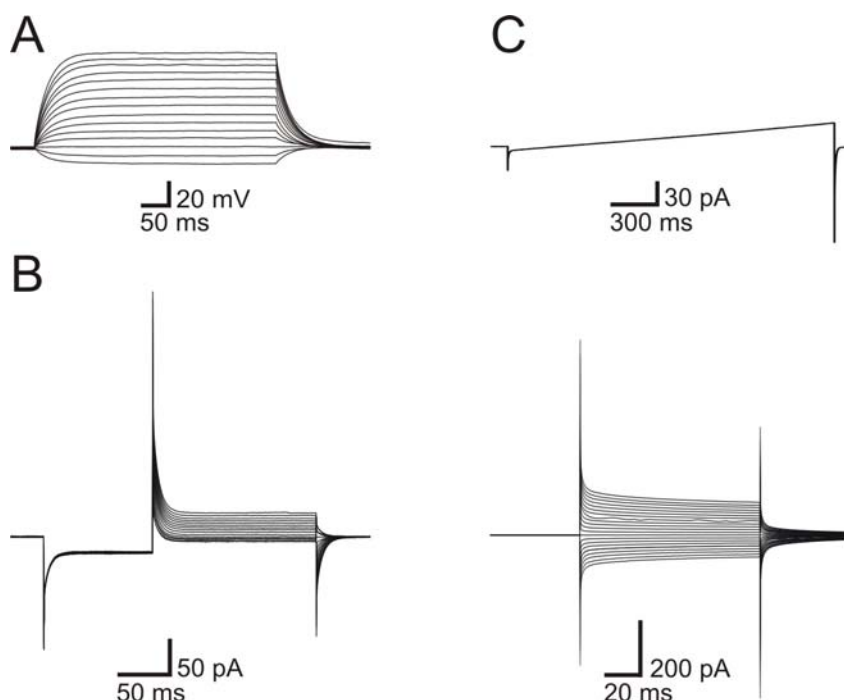
4.5 Elektrophysiologische Ableitungen an neuronal differenzierten Knochenmarkstromazellen

Um die elektrische Erregbarkeit der differenzierten KMSZ zu untersuchen, wurden Patch-clamp-Ableitungen am Tag 2 der neuronalen Differenzierung durchgeführt (Kristin Hartmann, Charité, Berlin). Die Zellen wurden bei einem Membranpotential von ca. -60mV stabilisiert und Strompulse von -40pA bis 240pA induziert (Steigerungsraten je 20pA ; Dauer 400ms ; Abb. 4.11A). Keine der untersuchten Zellen ($n=6$) zeigte eine Reaktion in Form eines Aktionspotentials oder andere Hinweise auf eine spannungsabhängige Änderung ihrer Leitfähigkeit. Zur weiteren Untersuchung spannungsabhängiger Ionenkanäle wurden Pulse verschiedener Potentialstärke mit ($n=3$) oder ohne prä-Hyperpolarisierung ($n=4$) gegeben (Abb. 4.11B). Außerdem wurden ein sich langsam steigerndes (rampenförmiges) Potential induziert (von -80mV bis 40mV), um nicht-lineare Reaktionen der Zellen festzustellen ($n=2$; Abb. 4.11C). Keine dieser Methoden führte zu detektierbaren spannungsabhängigen Ionenkanälen.

Durch Zugabe von GABA und Glutamat (jeweils $100\mu\text{M}$) in die Messkammer wurden die Zellen auf das Vorhandensein von funktionierenden Rezeptoren dieser Transmitter hin untersucht. Weder GABA ($n=3$), noch Glutamat ($n=2$) führten zu detektierbaren Strömen. Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß KMSZ nach zwei Tagen ihrer neuronalen Differenzierung keine funktionierenden spannungs- oder ligandenabhängige Ionenkanäle haben.

Abb. 4.11: Die Induktion verschiedener Spannungen in neuronal differenzierten KMSZ (an Tag 2 der neuronalen Differenzierung) ergibt keine Hinweise auf das Vorhandensein spannungsabhängiger Ionenkanäle

- A:** BEI EINEM MEMBRANPOTENTIAL DER KMSZ VON -60mV WERDEN STROMPULSE VON -40 BIS 240pA INDUZIERT – ES ZEIGT SICH KEINE REAKTION DER ZELLEN IN FORM VON AKTIONSPOTENTIALEN (AP)
- B:** UNTERSUCHUNG SPANNUNGSABHÄNGIGER IONENKANÄLE DURCH PULSE VERSCHIEDENER POTENTIALSTÄRKE MIT (LINKS, $n=3$) ODER OHNE PRÄ-HYPERPOLARISIERUNG (RECHTS, $n=4$) ZEIGT EBENFALLS KEINE AP
- C:** RAMPENFÖRMIGES POTENTIAL (VON -80mV BIS 40mV), UM NICHT-LINEARE REAKTIONEN DER ZELLEN FESTZUSTELLEN (KEINE REAKTION)

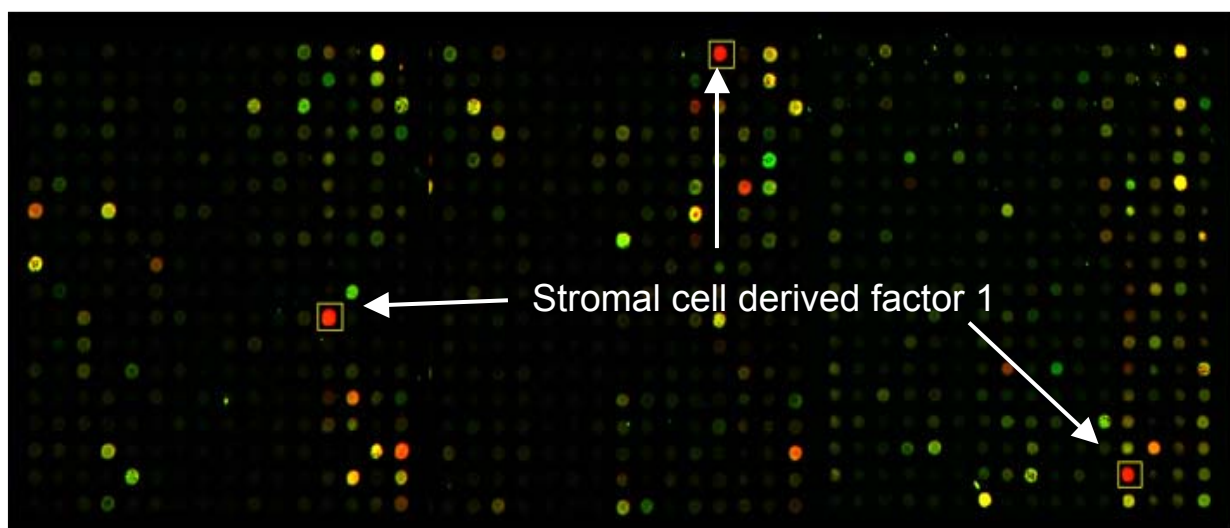


4.6 Genexpressionsanalysen zur neuronalen Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen mit cDNS-Mikroarrays

4.6.1 Mikroarray-Hybridisierungen

Für die Identifizierung von Genexpressionsänderungen während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ wurden cDNS-Proben von vier verschiedenen Differenzierungsstadien (24h nach Präinkubation mit 10ng/ml bFGF, einen Tag, zwei Tage und drei Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung) jeweils mit cDNS undifferenzierter Zellen verglichen. Die cDNS-Proben der einzelnen Differenzierungsstadien und der undifferenzierten Zellen wurden mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert (Cy3 oder Cy5) und auf Mikroarrays kohybridisiert (siehe Methoden 3.4.2). Insgesamt wurden zwei unabhängige Differenzierungsreihen untersucht. Die Experimente wurden anschließend mit einem Farbstofftausch, bei dem vorher Cy3 markierte Proben Cy5 markiert wurden und umgekehrt, wiederholt. Hierdurch können eventuelle farbstoffspezifische Intensitätsunterschiede festgestellt und normalisiert werden. Desweiteren erhöhen technische Replikate die Aussagekraft der Analyse. Die festgestellten Expressionsunterschiede der einzelnen Farbstoffe lassen sich optisch durch folgenden Farbcode bei den übereinandergelegten Bildern beider Farbstoffe einer Kohybridisierung darstellen: gelb = etwa gleich starke Expression (Intensität) beider Proben; rot = stärkere Expression in Probe A; grün = stärkere Expression in Probe B (als Beispiel siehe Abb. 4.12).

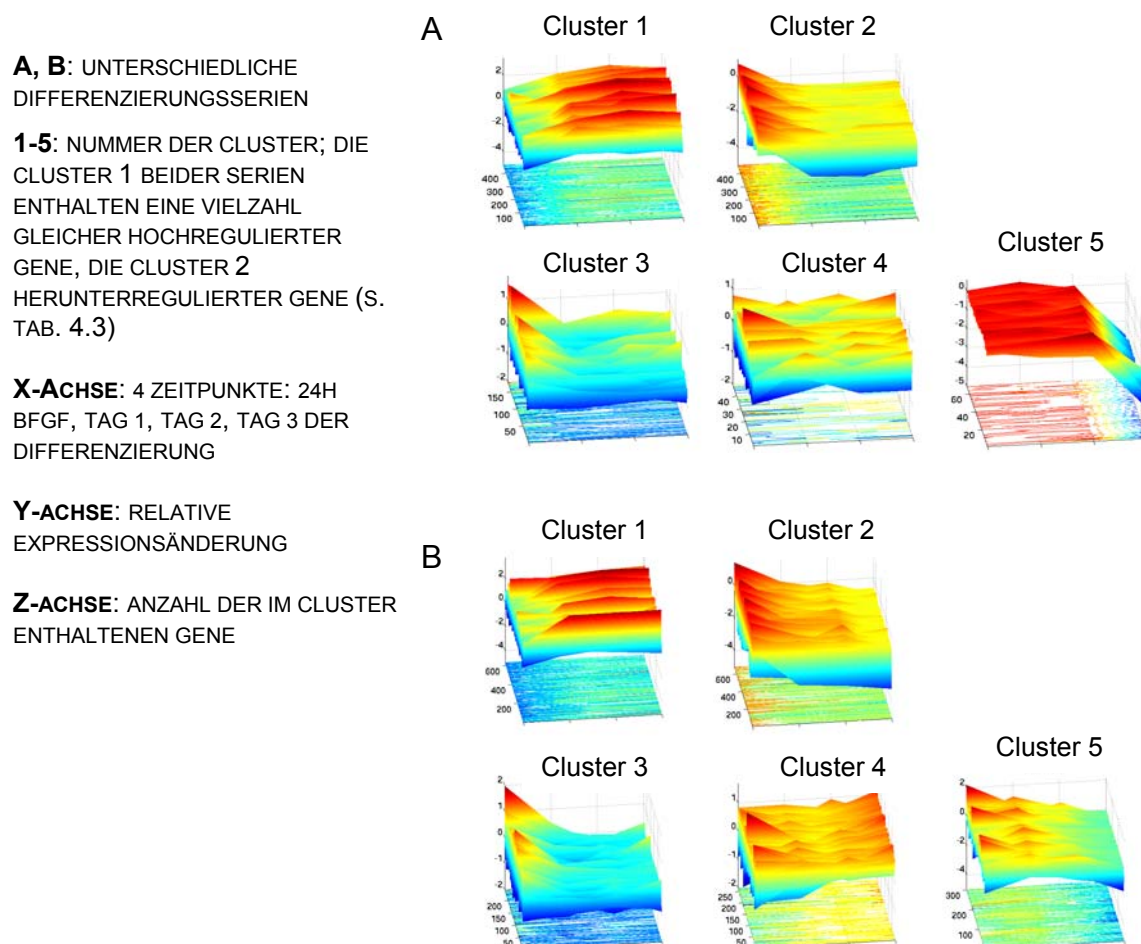
Abb. 4.12: Beispielbild einer Mikroarray-Kohybridisierung:
 STROMAL CELL DERIVED FACTOR 1, TYPISCH FÜR KMSZ, WIRD WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG DEUTLICH HERUNTERREGULIERT.
ROT MARKIERT: UNDIFFERENZIERTE KMSZ,
GRÜN MARKIERT: KMSZ 24H NACH INDUKTION MIT BFGF; AUSSCHNITT AUS DEM GESAMTBILD (DREI SDF1- KLONE SIND AUF DEM MIKROARRAY VERTRETEN); GELBE „SPOTS“ ZEIGEN GLEICHES EXPRESSIONSNIVEAU BEIDER PROBEN



4.6.2 Cluster-Analyse

Um die nach den Mikroarray-Analysen erhaltenen Daten der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ zu strukturieren, wurde zunächst eine Cluster-Analyse durchgeführt (Dr. Christine Steinhoff). Ziel war es, Gene mit ähnlichen Expressionsmustern über die vier Zeitpunkte (nach 24-stündiger Präinkubation mit bFGF, Tag 1, 2 und 3 nach Induktion der neuronalen Differenzierung) in Gruppen, sogenannten Clustern, zusammenzufassen. Es wurde eine Anzahl von fünf Clustern für jede der beiden Differenzierungsreihen festgelegt (graphische Darstellung Abb. 4.13). Mehrere Cluster jeder Serie enthielten Gene, die klar hoch- oder hinunterreguliert waren. Diese wurden wiederum zusammengefasst, um eine Schnittmenge von Genen festzustellen, die in beiden Serien - und damit 4 unabhängigen Hybridisierungsexperimenten - konstante Expressionsänderungen zeigen (siehe Tab 4.3). Diese Vorgehensweise ist relativ konservativ, reduziert jedoch die Zahl falsch positiver Ergebnisse und erhöht somit maßgeblich die Verlässlichkeit der weiter betrachteten Expressionsänderungen. Dies haben alle Kontrollen zum Beispiel mit einer semiquantitativen RT-PCR, siehe Abb. 4.15, bestätigt.

Abb. 4.13: Graphische Darstellung des Ergebnisses der Clusteranalyse



Es zeigte sich, daß insbesondere die Cluster 1 und 2 beider Serien eine Vielzahl gleicher Klone enthielten (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Schnittmengen gleicher Klone in den verschiedenen Clustern

		Serie 1				
		1	2	3	4	5
Serie 2	Cluster#	1	2	3	4	5
	1	298	2	3	4	33
	2	2	270	15	18	4
	3	2	0	0	2	1
	4	48	6	6	9	10
5	3	4	10	4	2	

4.6.3 Funktionelle Kategorien der differentiell exprimierten Gene

In einer zweiten Stufe der Datenanalyse wurden die Gene der Cluster 1 und 2 beider Serien hinsichtlich ihrer biologischen Funktion gruppiert. Gene, die während der Differenzierung hochreguliert wurden, sind von Interesse, da sie möglicherweise für Faktoren codieren, welche die Differenzierung steuern. Auch können ihre Produkte Hinweise auf zelluläre Prozesse geben, welche mit einer Differenzierung einhergehen, wie zum Beispiel Änderungen des Zytoskeletts. Herunterregulierte Gene hingegen können charakteristisch für den undifferenzierten und proliferativen Status der Zellen sein und spielen möglicherweise bei der Erhaltung dieses Zustandes eine Rolle. Einen Teil der Ergebnisse gibt Tabelle 4.4 wider. Im Folgenden sollen jeweils einige Gene der verschiedenen Kategorien genauer besprochen werden:

Expressionsänderungen von Genen für Zytoskelettproteine

Die Form einer eukaryotischen Zelle wird von Zytoskelettelementen bestimmt, das heißt von Intermediärfilamenten, Actinfilamenten und Mikrotubuli, die zum großen Teil typisch für einen bestimmten Zelltyp sind. Während ihrer Differenzierung ändert sich die Morphologie der KMSZ von großen, flachen Zellen ohne Fortsätze in Zellen mit stark verkleinertem, rundem Zellkörper und langen, teilweise verzweigten Fortsätzen (Abb. 4.5). Diesen starken Veränderungen müssen deutliche Änderungen in der Genexpression der beteiligten Zytoskelett-Proteine vorausgehen.

Transkripte der Intermediärfilamente Neurofilament-M, welches von Neuronen exprimiert wird, und Nestin, typisch für neuroepitheliale Vorläuferzellen, werden zum Beispiel auch nach den Mikroarray-Daten deutlich hochreguliert, wie bereits die Immunfluoreszenzmarkierungen zeigten (Lendahl et al., 1990 ; Benson et al., 1996). Der Transkriptlevel von Vimentin, welches typischerweise in mesenchymalen Zellen exprimiert ist (Paulin, 1981), sinkt. Zwar zeigen die Immunfärbungen, daß Vimentin auch nach drei Tagen noch in den Zellen vorhanden ist (Abb. 4.7), allerdings ist eine Quantifizierung hier schwer möglich.

Die Mikroarray-Analysen zeigten eine während der Differenzierung sinkende Genexpression von Faktoren, welche Rho GTPasen regulieren: Rac-GAP, Rho-GEF und Cdc42-Inhibierendes Protein. Mit der LIM-Kinase (engl. „LIM-domain containing protein kinase-1“) wird das Gen eines weiteren Faktors hochreguliert, der, abhängig von Rac und Rho, durch Phosphorylierung des Actin-destabilisierenden Faktors Cofilin zur Stabilisierung von Actinfilamenten führt. Faktoren, die den Rho GTPasen übergeordnet den Umbau des Actin-Zytoskeletts modulieren, sind Substrate der c-Abl Tyrosinkinase, sogenannte Abl-interagierende Proteine (engl. „abl-interacting protein“, Stradal et al., 2001). Das Gen für das Abl-Interagierende Protein-1 zeigt eine zunächst leicht reduzierte, dann jedoch steigende Expression während der Differenzierung. Mit Neurotactin wird ein weiteres Gen hochreguliert, das mit c-Abl interagiert und für welches eine Funktion in der Ausbildung von Axonen bei *Drosophila* beschrieben wurde (Fremion et al., 2000; Liebl et al., 2003).

Das Agrin-Gen, dessen Expression steigt, kodiert für ein Heparansulfat-Proteoglykan, welches unter anderem entscheidend ist für die neuromuskuläre Synapsenbildung.

Das Protein Ezrin, dessen Genexpression ebenfalls steigt, bindet das Zytoskelett an die Zellmembran. Ezrin gehört zur Familie der ERM-Proteine (Bretscher et al., 2002). ERM Proteine verbinden Actinfilamente in Filopodien und Microvilli an Membranproteine. Sie sind nicht nur in die Ausbildung der Zellmorphologie, sondern auch in die spezifische Lokalisierung von Membran-Proteinen, in den Membran-Transport und die Signaltransduktion involviert.

Weiterhin sinkt die Expression verschiedener Actin-Formen wie beta-Actin, γ -2-Actin der glatten Muskulatur („smooth muscle“) und α -1-Actin des Skelettmuskels. Die Expression eines weiteren alpha-Actins (Herzmuskel-Isoform) sinkt ebenfalls, allerdings fand es sich im Cluster aller herunterregulierten Gene nur bei einer der verglichenen experimentellen Serien.

Der Transkriptlevel des Actin-bindenden Proteins „capping protein actin filament gelsolin-like“ steigt während der Differenzierung, der eines anderen, Filamin, sinkt.

Auch viele Gene der Tubulin-Familie zeigen im Verlauf der Differenzierung Änderungen ihres Expressionsniveaus. Während viele Tubulin-Gene schwächer exprimiert wurden (Tubulin alpha-6/-3/-7, beta-2/-5 und gamma-2 der glatten Muskulatur) wurde mit Tubulin beta-4 ein gehirnspezifisches Tubulin hochreguliert (Lewis und Cowan 1990).

Extrazelluläre Matrix und Zell-Matrix Interaktionen

Bereits die feste Haftung der KMSZ an die Oberfläche der Zellkulturflaschen und ihre flache Morphologie *in vitro* lassen eine bevorzugte Interaktion mit extrazellulären Faktoren vermuten. Zell-Matrix-Interaktionen können von definierten Strukturen wie fokalen Zelladhäsionen oder Hemidesmosomen oder aber von Einzelmolekülen vermittelt werden (Petit und Thiery, 2000; Nievers et al., 1999). Fokale Adhäsionen werden von Transmembranproteinen wie Integrinen und intrazellulären Proteinen, welche das Zytoskelett an die Zellmembran binden, gebildet (Critchley, 2000). Von diesen werden Gene wie Filamin alpha, Talin 2, Vinculin, Parvin alpha sowie Integrin beta-3 negativ reguliert, während die Genexpression der Integrine alpha-6 und beta-2 steigt.

Die Genexpressionsanalysen der undifferenzierten KMSZ (s. 4.3) haben gezeigt, daß diese eine Vielzahl von Komponenten der extrazellulären Matrix exprimieren, insbesondere solche der Basalmembran. Während der Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp werden viele Gene dieser Komponenten herunterreguliert, so z.B. viele Prokollagen-Typen, Proteoglykane wie Fibroglycan, Perlecan, Syndecan 2 und 3, aber auch das auf neuronalen Vorläuferzellen exprimierte Protein Tenascin C oder der sezernierte Faktor Sparc (engl. „secreted acidic cysteine rich glycoprotein“) (Tab. 4.4).

Auch Gene für Komponenten der Degradation der extrazellulären Matrix werden differentiell exprimiert: einige Matrix-Metalloproteinasen (MMP) werden schwächer exprimiert (MMP2, MMP14), während andere (MMP13) sowie MMP-Inhibitoren (Timp2, Timp3) stärker exprimiert werden. Als eine der wenigen Matrix-Komponenten der Kollagen-Familie wird Prokollagen XVIII alpha1, dessen Spaltprodukt Endostatin antiangiogene Wirkung hat (Benezra und Rafii, 2004), während der Differenzierung hochreguliert.

Zellzyklus

Die Immunfärbungen mit dem Zellzyklus-Marker Ki67 zeigten bereits, daß die KMSZ während ihrer neuronalen Differenzierung aufhören zu proliferieren. Der der Proliferation zugrundeliegende Zyklus von Zellwachstum, Verdopplung der DNS und Zellteilung verlangt eine koordinierte Aktivität eines komplexen Netzwerkes verschiedener Proteine. Im Kern sorgt hierfür eine zyklische Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen („cyclin-dependent kinases“, Cdk's). Die Cycline werden in jedem Zellteilungszyklus neu synthetisiert, binden an ihre Cdk und bilden damit einen für die verschiedenen Zellzyklusphasen spezifischen Cyclin-Cdk-Komplex, welcher wiederum die Aktivität anderer Proteine reguliert. Es gibt vier Klassen von Cyclinen: G1-Cycline (Cyclin D) steuern den Start- bzw. Restriktionspunkt des Zellzyklus, G1/S-Cycline (Cyclin E) die Determinierung des Übergangs in die (DNS-) Synthese-Phase, die dann von den S-Cyclinen (Cyclin A) gesteuert wird, gefolgt von der Mitose, die von den M-Cyclinen (Cyclin B) kontrolliert wird (Alberts et al., 2002).

Eine Vielzahl Zellzyklus-spezifischer Gene wird im Zuge der neuronalen Differenzierung der KMSZ herunterreguliert. Hierzu gehören verschiedene Cycline (A2, B1, C, D1/2, E, F), die während der einzelnen Zellzyklus-Phasen exprimiert werden. Weiterhin werden Transkripte von Proteinen zur Kontrolle der M-Phase abgebaut, zum Beispiel Cdc20, ein Protein, das an den „Anaphase-promoting-complex“ bindet (APC, verantwortlich für die Ubiquitinierung und Proteolyse der M-Cycline), Cdc28 (CKS1, Aktivator von Cdc20) und „gene rich cluster C8“, welches wahrscheinlich das Ortholog des humanen Tome1 und verantwortlich für die Initiierung und Beendigung der Mitose ist (Ayad, 2003). Das Expressionsniveau des „pituitary tumor transforming gene“ (PTTG) sinkt ebenfalls. PTTG ist ein Substrat des APC, welches zu Beginn der S-Phase akkumuliert und in der G2-M-Phase parallel zu Cyclin B1 am höchsten konzentriert ist (Zou et al., 1999). Ishikawa et al. (2001) berichteten von einer angiogenen Funktion von PTTG.

Das Cdc42-GTPase-inhibierende Protein wird herunterreguliert. Neben seiner oben beschriebenen Funktion bei der Ausbildung von Zellprozessen (Erickson und Ceroine 2001) fördert es die Progression der G1-Phase durch selektive Induktion von Cyclin E (Chou et al. 2003). Die beiden Retinoblastom-ähnlichen Gene p107 und p130, unter anderem involviert in die Transition von G1- zur S-Phase (Lipinski und Jacks, 1999), werden herunter- bzw. heraufreguliert.

MDM2 (mouse double minute 2) wird ebenfalls hochreguliert. MDM2 ist einer der Hauptregulatoren des Tumorsuppressors p53, welcher verantwortlich für den DNS-Schaden-Kontrollpunkt der G2-Phase ist.

Auch verantwortliche Faktoren für die DNS-Synthese werden herunterreguliert: eine Untereinheit der DNS-Primase (p49), die DNS-Polymerase epsilon und der Kofaktor der DNS-Polymerase delta, PCNA („proliferating cell nuclear antigen“); außerdem Rpa1 („replication protein A1“), welches vielfältige Rollen bei der DNS-Replikation, -Reparatur und -Rekombination hat (Umezumi et al., 1998), und CAF1 („chromatin assembly factor 1“, baut Histon-Oktamere in gerade replizierte DNS ein; Kamakaka et al., 1996).

Als letzte Zellzyklus-assoziierte Proteine, die im Laufe der Differenzierung differentiell exprimiert sind, seien Replikations-Lizensierungsfaktoren genannt, wie zum Beispiel die Homologe von *S.cerevisiae* „minichromosome maintenance deficient“ -3/-6/-7 und die Serin/Threonin Kinasen 6 und 12 (auch „Aurora/ipl1-like kinases“, AIK 1 und 2). AIK1 und -2 sind in die Anordnung der Chromosomen während der Mitose involviert (Kimura et al. 1997, Shindo et al., 1998).

Expressionsänderungen von Chromatin-Komponenten

Während ihrer Differenzierung erwirbt eine Zelle einen neuen Phänotyp, um spezifische Funktionen auszuführen. Dies geht mit Änderungen der Transkription vieler Gene einher, welche von Änderungen des Chromatin-Zustandes begleitet wird. Regionen mit inaktiver Transkription werden zum Beispiel in Heterochromatin umgewandelt (Francastel et al., 2000; Feuerbach et al., 2002).

Im Verlauf der Differenzierung der KMSZ ändert sich die Expression verschiedener Chromatin-Komponenten wie Histone, Histon-modifizierende Faktoren oder Proteine der HMG-Familie (HMG- „high mobility group“). Das Transkriptionsniveau der Histonvarianten 2AZ und 2AX sinkt. Für Histon 2AZ wurde gezeigt, daß dieses Protein früh in der Embryonalentwicklung der Maus aktiviert wird, während der Differenzierung der inneren Zellmasse in extraembryonales Endoderm (Rangasamy et al., 2003). Ferner wurde gezeigt, daß die Hefe-Variante (Htz1) in euchromatischen Regionen angereichert ist und die Ausbreitung des Heterochromatins verhindert (Meneghini et al., 2003). Die Funktion von Histon 2AX (H2AX) steht in Zusammenhang mit DNS-Doppelstrangbrüchen (Redon et al., 2002). Die differentielle Expression von H2AX kann allerdings nicht als sicher angenommen

werden, da die Möglichkeit einer Kreuzreaktion zwischen den sehr ähnlichen Sequenzen der zehn Histon 2A1- bzw. der Histon 2A2-Varianten bei der Mikroarray-Hybridisierung besteht. Die Zugänglichkeit der DNS für Transkriptionsfaktoren wird wesentlich durch Modifikationen der Histone durch zum Beispiel Methylierung (Stabilisierung der Chromatinstruktur), Acetylierung (Destabilisierung der Chromatinstruktur), Phosphorylierung (Mitose/Meiose) oder Ubiquitinierung (Signal für Methylierung) reguliert (Alberts et al., 2002; Osley 2004). So war zum Beispiel Ube2b („Ubiquitin-conjugating enzyme E2B“, auch RAD6B) im Verlauf der Differenzierung stärker exprimiert. Ube2b ist ein Ubiquitin-konjugierendes Protein, welches in der postreplikativen DNS-Reparatur benötigt wird. Diese beeinflusst u.a. die Monoubiquitinierung von Histonen, welche wiederum das Signal für eine Methylierung durch COMPASS und Dot1p darstellt (Koken et al., 1996; Lyakhovich und Shekhar, 2004).

Proteine der HMG-Familie ändern die lokale Konformation der DNS bzw. der Nukleosomen und tragen zur Bildung von Enhanceosomen bei (Bustin, 1999; Bianchi und Beltrame, 2000). Hier waren Hmgb1 und Hmgb2 herunterreguliert, während die Expression von Hmga1, welches die Bildung von Protein-DNS Transkriptionskomplexen fördert, stieg (Wood et al., 2000). Hmgb2 wird vor allem während der Embryogenese, im adulten Organismus nur in einigen wenigen Geweben exprimiert, zum Beispiel in Thymus und Testes (Ronfani et al., 2001). Eine Inhibierung von Hmgb2 mit Antisense-Oligonukleotiden verhindert die Zellteilung (Yamazaki et al., 1995). Hmgb2 Knockout-Mäuse weisen auf eine Funktion von Hmgb2 insbesondere in der Spermatogenese hin (Ronfani et al., 2001). Hmga ist in terminal differenzierten Zellen nur gering exprimiert, hohe Konzentrationen werden in schnell wachsenden oder malignen Zellen gefunden (Goodwin et al., 1985; Giacotti et al., 1987).

Abgesehen von der lokalen Chromatin-Architektur werden die Chromosomen im Zellkern auch auf höherer Ebene organisiert. Sie sind nicht zufällig verteilt, sondern besetzen auch in anderen Phasen als der Mitose bestimmte Kernterritorien (Parada und Misteli, 2002). Bei der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) liegen Bereiche aktiver Genexpression eher zentral im Kern, während inaktive Bereiche, also das Heterochromatin, eher komprimiert am Rand des Kerns lokalisiert sind (Feuerbach et al., 2002). Dies wird durch Verknüpfung der inaktiven Regionen mit der Kernmembran erreicht. Als Adaptoren dienen hier Strukturproteine der inneren Kernmembran, zu denen Lamin-Filamente und verschiedene Lamin-assoziierte Proteine (LAPs) gehören (Holmer und Worman, 2001). Diesen kommt eine entscheidende Bedeutung bei Auflöschung („disassembly“) und Wiederherstellung („reassembly“) des Zellkerns während der Mitose zu (Vlcek et al., 2001; Dechat et al., 2000). Von diesen wurden

einige, wie Lamin A, Lamin B1 und Thymopoietin (LAP2), während der Differenzierung herunterreguliert.

Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind die Hauptregulatoren der Genexpression und dienen der Verarbeitung intra- und extrazellulärer Signale. Die Regulierung von Differenzierungsvorgängen erfordert die spezifische Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. Die Genexpressionsanalysen der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ deckte Expressionsänderungen verschiedener Transkriptionsfaktoren auf. Von besonderem Interesse sind in Zusammenhang mit dieser Studie Faktoren der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH-) Familie, da diese maßgeblich an der Determinierung der Zellen des sich entwickelnden Nervensystems beteiligt sind (Guillemot, 1999).

Zum Beispiel steigt im Verlauf der Differenzierung der KMSZ die Expression des Gens für das Max-interagierende-Protein (Mxi). Mxi agiert als transkriptioneller Repressor in Korepressor-Komplexen und spielt eine wichtige Rolle bei der Transition zwischen Proliferierung und Differenzierung. Sin3b, ebenfalls herunterreguliert, ist eine weitere Komponente dieser Korepressor-Komplexe (Spronk et al., 2000).

Die Expression von negativen Regulatoren der bHLH-Faktoren, den Id-Proteinen (Inhibitor of DNA-binding) 3 und 4, sinkt. Id-Proteine sind auch HLH-Proteine, ihnen fehlt jedoch die basische Proteindomäne. Sie bilden Dimere mit verschiedenen bHLH-Faktoren und verhindern deren DNS-Bindung (Lasorella et al., 2001).

Auch Gene für Faktoren der Forkhead-Familie sind im Verlauf der Differenzierung differentiell exprimiert: die Expression von FoxD1 (auch FREAC4/FKHL8) und FoxM1 sinkt verglichen zu den undifferenzierten Zellen.

Das Gen für C/EBP δ („CCAAT enhancer binding protein δ “) wird hochreguliert. C/EBP δ ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei der terminalen Differenzierung vieler Zellen eine Rolle spielt, aber zum Beispiel auch bei der pro-inflammatorischen Antwort reaktiver Astrozyten (Cardinaux et al., 2000). OASIS („old astrocytes specifically induced substance“) gehört zur Familie der CREB/ATF-Transkriptionsfaktoren und wurde ursprünglich ebenfalls in reaktiven Astrozyten gefunden (Honma et al., 1999), aber auch im sich entwickelnden Knochen (Nikaido et al., 2001). Das Expressionsniveau der OASIS mRNA sinkt während der Differenzierung der KMSZ.

Mit KLF2 (auch engl. „lung kruppel-like factor“) wird ein Zink-Finger Transkriptionsfaktor in undifferenzierten KMSZ exprimiert, im Zuge der Differenzierung jedoch herunterreguliert.

KLF2 wurde als Transkript beschrieben, das typisch für embryonale Stammzellen ist (Anisimov et al., 2002). Andererseits induziert KLF2 einen Ruhezustand in Jurkat T-Zellen mit reduzierter Proliferation, Zellgröße und Proteinsynthese (Buckley et al., 2001). Mit PHD-type zinc finger protein 2 (Phf2) und SLUG werden zwei weitere Zink-Finger Proteine differentiell reguliert.

Die Expression von Phf2 steigt. *In situ* Hybridisierungen haben eine ubiquitäre schwache Expression von Phf2 gezeigt, höhere Expression jedoch im Neuralrohr und dem sich entwickelnden Ganglion spinale (Hasenpusch-Theil et al., 1999).

SLUG vermittelt die epithelial-mesenchymale Transition unter anderem im Neuralrohr und wird als früher Marker für Zellen der Neuralleiste angesehen (Aybar et al., 2003; Del Barrio und Nieto, 2002; Savagner 2001). Das Slug-Gen ist in undifferenzierten KMSZ exprimiert und wird im Laufe der Differenzierung herunterreguliert. Das ist nicht nur interessant hinsichtlich einer möglichen Umkehrung des mesenchymalen Phänotyps der Zellen (d.h. eine mesenchymal-epitheliale Transition der Zellen), sondern führte auch zu der Idee, weitere Neuralleistengene im Zuge der Differenzierung zu testen (siehe Abschnitt sqRT-PCR, 4.6.4).

Jun-B, ein Leucin-Zipper Protein und Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors, reguliert die Zellproliferation negativ. Die Mikroarray-Analyse ergab eine Aktivierung des Jun-B-Gens.

Dp1, ein Dimerisierungspartner des E2F Transkriptionsfaktors und vornehmlich in die Regulierung Zellzyklus-spezifischer Gene involviert (Müller und Helin, 2000), wird im Zuge der Differenzierung schwächer exprimiert.

Zuletzt sei CREM (cAMP responsive element modulator) genannt, dessen Genexpression steigt. CREM ist ein Faktor, der infolge einer cAMP-abhängigen Signaltransduktion aktiviert wird. Ihm wird insbesondere eine Funktion in der Spermatogenese zugeschrieben (Don und Stelzer, 2002).

Signaltransduktion

Die Differenzierung der KMSZ wurde durch schrittweise Exposition verschiedener Mediumkomponenten und Medienwechsel induziert. Um etwas über die Effekte auf die Differenzierung der KMSZ zu erfahren, ist die Betrachtung der Expressionsänderungen von Genen verschiedener Signaltransduktionswege von besonderem Interesse.

So erhöht sich zum Beispiel die Expression von VEGF-A („vascular endothelial growth factor A“), einem Ligand von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). Die Expression von Ephrin B1, einem anderen RTK-Liganden, sinkt hingegen. VEGFs spielen eine Rolle bei der Kontrolle

der Angiogenese und vaskulären Permeabilität. Ephrin B1 ist ein Transmembran-Protein, welches über Ephrin-Rezeptoren Angiogenese sowie Zell- und Axonmigration reguliert (Palmer et al., 2002; Davy et al., 2004).

Zwei IGF-bindende Proteine, Igfbp4 und Igfbp7 („insulin-like growth factor binding protein“), werden im Verlauf der Differenzierung stärker exprimiert. Igfbp4 wirkt als IGF-1 Inhibitor in Osteoblasten, für Igfbp7 wird eine wachstumshemmende Funktion vermutet (Zazzi et al., 1998; Oh et al., 1996).

Mit Fgfr2 („fibroblast growth factor receptor 2“) und Pdgfr beta („platelet derived growth factor receptor“) sinkt die Expression zweier RTKs. Weiterhin zeigt sich eine differentielle Expression verschiedener Komponenten des **MAP-Kinase Signaltransduktionsweges** (MAP-Kinase: „mitogen activated protein-kinase“): die Expression der Gene für MAP-KKKK 4 und der MAP-Kinase 8 interagierenden Proteins 3 (JIP3/JSAP1) steigt, die des MAP-Kinase Stress-aktivierten Proteins sinkt. JIP3 ist ein im Gehirn exprimierter Faktor, der mit Raf-1, MEK1 (ERK), JNKs, SEK1, MEKK1 und anderen Signalvermittlern interagiert (Ito et al., 1999; Kelkar et al., 2003; Kuboki et al., 2000). JIP 3 ist ein Adapter-Protein für JNK-vermittelte Signaltransduktion und vermittelt u.a. den Kinesin-abhängigen Transport in Neuronen (Kelkar et al., 2003). Es formt aber auch einen Signal-Komplex bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress (Matsuura et al., 2002). Komponenten am Ende der MAPK-Kaskade wie Jun-B oder NDR2 („N-Myc-downstream regulated 2“) werden im Verlauf der Differenzierung hochreguliert.

Ein anderer wesentlicher Signaltransduktionsweg wird von Faktoren der **TGF- β -Familie** aktiviert, zu der TGF- β selbst, Activine und BMPs („bone morphogenic proteins“) gehören. Diese binden an Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen, welche wiederum über verschiedene SMAD-Proteine spezifische Gene im Zellkern aktivieren (Alberts et al., 2002). Differentiell regulierte Gene sind hier zum Beispiel TGF- β 3, BMP4, TGF- β bindendes Protein 2, deren Expressionsniveau sinkt. Hingegen steigt die Expression des TGF- β bindenden Proteins 4.

Einige Komponenten der **G-Protein gekoppelten Signaltransduktion** fanden sich ebenfalls unter den herunterregulierten Genen: „G-protein-pathway suppressor 1“ (Gps1), „regulator of G-protein signaling 16“ (Rgs 16) und „regulator of G-protein signaling 4“ (Rgs4). Alle drei Proteine haben einen negativen Einfluß auf G-Protein-gekoppelte Signalwege. Die Herunterregulierung spricht damit für eine Aktivierung der G-Protein gekoppelten Signalverarbeitung. G-Proteine wirken über verschiedene Mechanismen, zum Beispiel der Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration, der Aktivierung des Inositol-Phospholipid-Signaltransduktionsweges oder über direkte Beeinflussung von Ionenkanälen.

cAMP wirkt unter anderem über die Protein-Kinase A (PKA), die viele verschiedene Zielproteine phosphoryliert, wie zum Beispiel CREB (cAMP responsive element binding protein). CREB kann jedoch auch über Phosphorylierung durch p90Rsk im ERK- oder p38 MAPK-Signalweg aktiviert werden. CREB stimuliert die Transkription spezifischer Gene, unter anderem auch seinen Negativ-Regulator CREM (cAMP responsive element modulator), dessen Expressionsniveau steigt. Auch die Expression der Phosphatidylinositol 4-Kinase Typ 2 beta steigt, die im Inositol-Phospholipid-Signalweg aktiv ist und eine neuroprotektive Funktion hat (Furuta et al., 2003).

Zuletzt seien Gene des **Delta-Notch-Signalweges** genannt: CBF1 (RBPJk), CBF1 interacting corepressor (CIR) und deltex homolog 1 steigen in ihrer Expression. In Abwesenheit von Notch-Signalen verhindert CBF1 die Expression von Zielgenen. CIR ist hier Korepressor und rekrutiert einen Histondeacetylasekomplex (Hsieh et al., 1999).

Expressionsänderungen von Genen für Proteine des Metabolismus und der Redox-Regulation der Zelle

Die Mikroarray-Analyse zeigt Expressionsänderungen einer Vielzahl von Genen, deren Produkte eine Funktion im Metabolismus der Zelle haben. Mehrheitlich findet sich eine sinkende Expression dieser Gene. Dies ist insofern logisch, als die Zelle beim Übergang von einem proliferativen in einen differenzierten und damit weitgehend ruhenden Status den Metabolismus zum Beispiel für Lipide der Zellmembran oder zur Herstellung von Nukleotiden, die bei der DNS-Replikation benötigt werden, reduzieren kann.

Verschiedene Gene, deren Produkte im Fettsäuremetabolismus involviert sind, werden herunterreguliert, zum Beispiel „fatty acid synthase“, „fatty acid desaturase 3“ und „fatty acid coenzyme A ligase long chain 5“ (Wakil, 1989; Marquardt et al., 2000; Oikawa et al., 1998). Gene für Enzyme der Purin- und Pyrimidin-Synthese, deren Expressionsniveau sinkt, sind zum Beispiel die Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (auch Thymidin-Kinase) und CTP-Synthase (Al-Madhoun et al., 2004; Yamauchi et al., 1990). Auch Gene des Aminosäure-Metabolismus werden herunterreguliert, z.B. die Propionyl-Koenzym A Carboxylase, die den ersten Schritt im Katabolismus von Propionyl-Koenzym A, einem wichtigen Zwischenprodukt im Metabolismus verschiedener Aminosäuren, katalysiert (Kalousek et al., 1980).

Die Expression der mitochondrialen Serin-Hydroxymethyltransferase 2 sinkt ebenfalls. Dieses Enzym ist maßgeblich am Folat-Metabolismus und der Biosynthese von Nukleotiden und Aminosäuren beteiligt (Skibola et al., 2002).

Besonders auffällig ist eine deutlich stärkere Expression von Genen, die für Enzyme der Regulation von oxidativem Stress und des Redox-Status der Zelle codieren. Der Redox-Status einer Zelle beschreibt das Verhältnis von ineinander umwandelbaren oxidierten und reduzierten Formen eines spezifischen Redox-Paares, zum Beispiel NAD^+/NADH , $\text{GSSG}/2\text{GSH}$ (GSH = Glutathion) (Schafer und Buettner, 2001). Die Mikroarray-Analyse ergab eine stärkere Expression von verschiedenen Glutathion-S-Transferasen (alpha 3, alpha 4, mu 1), außerdem der Glutamat-Cystein-Ligase und der Glutathion-Synthase, Schlüsselenzymen in der Synthese von Glutathion, dem wichtigsten Redox-Puffer in Säugerzellen (Filomeni, 2002). Eine wachsende Zahl von Studien beschreibt den Einfluß der Redox-Regulation der Zelle auf Proliferation, Signalverarbeitung, Differenzierung und Zelltod (als Übersichtsartikel s. Allen und Tresini, 2000).

Eine stärkere Expression von Selenoprotein P wurde ebenfalls festgestellt. Selenoprotein P ist in der Abwehr von Oxidantien im extrazellulären Raum involviert. Eine neuroprotektive Funktion wurde ebenfalls beschrieben (Chen und Berry, 2003). Verschiedene Metallothioneine (1, 2 und 3) werden im Zuge der KMSZ-Differenzierung hochreguliert. Alle haben eine Funktion in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress. Sie werden auch im ZNS exprimiert, wo neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen wurden (Sogawa et al., 2001; Penkowa und Hidalgo, 2003; Sharma und Ebadi, 2003; You et al., 2002).

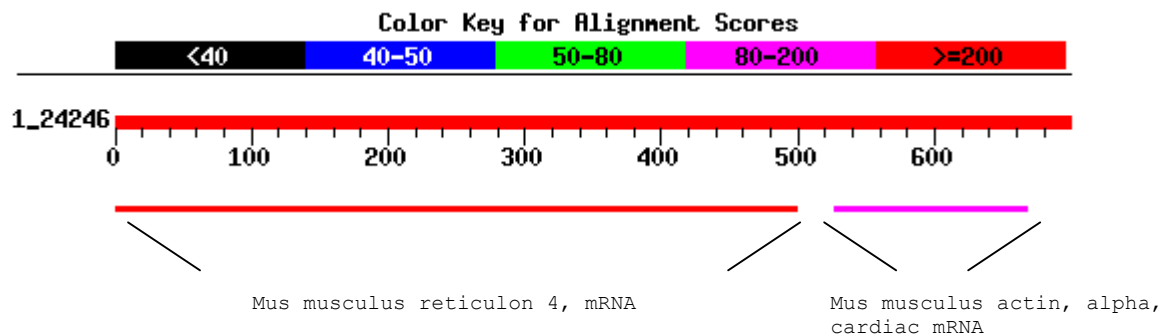
Genexpressionsänderungen im Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung

Von besonderem Interesse sind im Rahmen dieser Studie Expressionsänderungen von Genen, die eine Rolle in der neuronalen Entwicklung oder Differenzierung spielen.

Reticulon 4 (Nogo, „neurite outgrowth inhibitor“) ist ein mit dem endoplasmatischen Reticulum assoziiertes Protein, das in drei Isoformen vorkommt (A,B,C). Nogo-A wird hauptsächlich von Oligodendrozyten exprimiert und ist wesentlich für mangelnde Axon-Regeneration in ZNS verantwortlich. Nogo-B wird weitverbreitet exprimiert, Nogo-C besonders im Skelettmuskel (Oertle et al., 2003; Oertle und Schwab, 2003; Schwab, 2004). Die exakte Funktion aller drei Isoformen ist noch nicht geklärt. Laut Mikroarray-Analyse wird Reticulon 4 im Laufe der Differenzierung herunterreguliert. Die sqRT-PCR zeigt allerdings keine wesentliche Änderung des Expressionsniveaus (Abb 4.15). Eine BLAST-

Analyse der Sequenz des auf dem Mikroarray verwendeten IMAGE-Klones (AA145354) ergab jedoch neben einer etwa 500bp langen Reticulon 4-homologen Sequenz eine kurze (ca. 120bp) Sequenz für „M.musculus actin, alpha, cardiac“ (Abb. 4.14). Somit könnte eine Kreuzhybridisierung dieser Actin-Form, die nach Hybridisierungssignalen auf anderen Sonden herunterreguliert wird (Klon AA646402), dieses Ergebnis erklären.

Abb. 4 14: BLAST-Analyse der Sequenz des IMAGE-Klones „AA145354“



Enc-1 („ectodermal-neural cortex 1“) ist ebenfalls herunterreguliert. Enc-1 ist ein Actin-bindendes Protein, das vor allem sowohl im fötalen wie auch im adulten Gehirn vorkommt (Kim et al., 1998). Es findet sich in der nukleären Matrix von Hippocampus-Neuronen der Ratte, nicht jedoch in Astrozyten. Die Expression in Enc-1 führt zur Bildung von Zellfortsätzen bei Neuronen und steigert die Retinsäure-induzierte neuronale Differenzierung einer Neuroblastom-Zelllinie (Kim et al., 1998; Hernandez et al., 1998). Außerdem wurde Enc-1-Expression in der stroma-vaskulären Fraktion von Fettgewebe gefunden (Zhao et al., 2000).

Stathmin (Op18) zeigte eine sinkende Genexpression im Zuge der Differenzierung der KMSZ. Stathmin ist ein zytoplasmatisches, Mikrotubuli-destabilisierendes Protein, das in proliferierenden Zellen und Neuronen exprimiert ist und in terminal differenzierten Zellen herunterreguliert wird (Cassimeris, 2002; Brattsand et al., 1993; Rowlands et al., 1995). Die Expression von Ulip1 sinkt während der Differenzierung der murinen KMSZ ebenfalls. Ulip1 ist ein Homolog des *C.elegans* Gens *unc-33*, dessen Produkt die Ausbildung von Neuriten fördert. Es ist hauptsächlich in Neuronen, hier insbesondere in Wachstumskegeln exprimiert, aber auch in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen (Byk et al., 1998). Die Expression des Hippocalcin-ähnlichen Proteins 4 (auch „neural visinin-like protein 2“), das im Gehirn, aber auch in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes exprimiert ist (Kobayashi et al., 1998; Ohya und Horowitz, 2002), sinkt gleichermaßen.

Hingegen wurde eine steigende Expression verschiedener Gene festgestellt, die typisch für Zellen des Nervensystems sind: HuD, Uchl1 (Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase L1),

Nestin, Neurofilament-M, Latexin und Glykoprotein M6B. HuD ist ein Neuronenspezifisches RNS-bindendes Protein, dessen Expression mit frühen Phasen der neuronalen Differenzierung korreliert. Eine Überexprimierung in PC12 Zellen bewirkt deren Differenzierung *in vitro* (Perrone-Bizzozero und Bolognani, 2002). UCHL1 ist spezifisch in neuronalen Zellen und im Testis/Ovar exprimiert und stabilisiert Ubiquitin in Neuronen (Wilkinson et al., 1989,1992; Osaka et al., 2003). Das Intermediärfilament Nestin wird vor allem als Marker für unreife neuroepitheliale Vorläufer betrachtet (Lendahl et al., 1990). Neurofilamente sind typisch für Neuronen (Lee und Cleveland, 1996).

Latexin, ein Carboxypeptidase A Inhibitor, ist in verschiedenen Geweben exprimiert, aber auch ein Marker für glutamaterge Neuronen (Hatanaka et al., 1994; Liu et al., 2000; Takigushi-Hayashi, 2001). Außerdem wurde eine Hochregulierung während der BMP-2 induzierten Differenzierung von Osteoblasten gefunden (Balint et al., 2003). Das Proteolipid M6B gehört zur Familie der „Tetraspanine“, die eine vierfache Transmembrandomäne aufweisen, und ist in frühen Phasen der Embryonalentwicklung im Rückenmark exprimiert, später in Neuronen und Oligodendrozyten (Yan et al., 1996).

Tab. 4.4: Expressionsänderungen verschiedener während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ differentiell regulierter Gene, nach funktionalen Kategorien sortiert:**c#** : CLUSTERNUMMER LAUT CLUSTERANALYSE**1-4** : 4 UNTERSUCHTE ZEITPUNKTE: 24H BFGF, TAG 1, TAG 2, TAG 3 DER DIFFERENZIERUNG,
ZAHLEN GEBEN DIE RELATIVE EXPRESSIONSÄNDERUNG ZUM UNDIFFERENZIIERTEN ZUSTAND
WIDER**+/-** : IM ZUGE DER DIFFERENZIERUNG HERAUF/HERUNTERREGULIERT

GeneBank UniGene												
Nr.	Cluster	Genname (engl.)	Serie 1				Serie 2					
Metabolismus/Energie			C#	1	2	3	4	C#	1	2	3	4
AW413162	Mm.250332	Deoxythymidylate kinase	2	-1,43	-2,48	-2,10	-2,20	2	-1,08	-2,65	-3,39	-2,70
NM_010634	Mm.741	Fatty acid binding protein 5, epidermal	2	-1,42	-5,99	-6,11	-7,17	2	-1,69	-4,41	-3,17	-2,53
AA261572	Mm.30263	Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 5	2	+1,14	-2,80	-2,48	-3,49	2	-1,15	-2,61	-3,95	-3,53
NM_021890	Mm.34345	Fatty acid desaturase 3	2	-1,92	-4,62	-4,35	-4,39	2	-1,03	-2,84	-2,59	-2,11
X13135	Mm.268690	Fatty acid synthase	2	+1,39	-2,01	-3,25	-3,46	2	+1,11	-2,24	-2,22	-1,91
AI314687	Mm.21079	Pccb propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	2	-1,79	-3,03	-3,53	-3,29	2	-1,50	-2,05	-2,63	-2,33
AA047942	Mm.2661	Thymidine kinase 1	2	-1,68	-4,10	-3,63	-4,22	2	-1,15	-7,83	-9,86	-5,95
BE863716	Mm.5262	Choline kinase	1	+1,11	+2,10	+1,88	+2,20	1	+1,44	+1,88	+1,75	+2,12
NM_008062	Mm.27210	Glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	1	-1,27	+2,23	+2,16	+2,01	1	-1,17	+2,62	+2,86	+1,94
AI226822	Mm.4368	Glutamate cysteine ligase, catalytic	1	+1,22	+7,24	+9,21	+7,54	1	+1,17	+8,30	+8,96	+5,50
AI316219	Mm.7504	Glutathione synthetase	1	+1,65	+2,64	+2,25	+2,51	1	+1,53	+2,99	+2,23	+1,57
NM_008102	Mm.10651	GTP cyclohydrolase 1	1	+7,24	+10,80	+10,59	+6,62	1	-1,08	+4,94	+6,25	+3,55
AI785054	Mm.248746	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B	1	+1,05	+1,67	+2,25	+2,46	1	-1,05	+1,77	+2,16	+2,26
Extrazelluläre Matrix												
AA269757	Mm.7524	Dystroglycan 1	2	-1,05	-2,59	-2,64	-2,25	2	+1,26	-2,83	-2,42	-2,01
BE945812	Mm.87150	Integrin beta 3	2	-1,63	-1,72	-1,58	-2,34	2	+1,32	-2,00	-1,99	-1,39
NM_008610	Mm.29564	Matrix metalloproteinase 2	2	-1,84	-2,72	-2,32	-1,62	2	-1,61	-3,35	-4,15	-3,16
AA270034	Mm.7257	Perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	2	-1,08	-1,52	-2,89	-3,46	2	+1,16	-2,46	-2,73	-2,13
BE200226	Mm.738	Procollagen, type iv, alpha 1	2	-1,19	-2,69	-3,03	-2,12	2	-1,96	-3,05	-4,44	-3,50
AA589377	Mm.35439	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	2	-2,69	-4,31	-3,90	-4,39	2	-1,33	-3,14	-4,99	-5,03
NM_008304	Mm.29350	Syndecan 2	2	-2,25	-2,32	-2,80	-2,61	2	-1,02	-2,22	-3,56	-3,51
AI528729	Mm.980	Tenascin c	2	+4,06	-1,60	-5,70	-7,92	2	+2,70	-1,90	-2,13	-2,37
BE132989	Mm.206505	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	2	-1,68	-2,36	-3,90	-3,60	2	-1,23	-3,58	-3,18	-2,39
AL362855	Mm.12842	Vinculin	2	-1,46	-2,69	-2,41	-2,72	2	-1,57	-3,68	-2,85	-2,42
AA606435	Mm.22753	Cathepsin b	1	+1,49	+2,56	+2,72	+3,86	1	-1,04	+1,80	+2,41	+1,95
AA020035	Mm.231395	Cathepsin d	1	+1,16	+2,14	+2,72	+2,86	1	+1,06	+1,62	+1,88	+2,03
AA273590	Mm.51356	Chemokine (c-x3-c motif) ligand 1	1	+6,69	+5,99	+3,29	+3,00	1	+1,64	+2,38	+2,59	+2,15
AI528574	Mm.225096	Integrin alpha 6	1	+27,94	+24,53	+16,28	+11,82	1	+9,22	+2,59	+6,42	+4,77
AA086686	Mm.1137	Integrin beta 2	1	+1,02	+2,56	+2,32	+1,99	1	+1,04	+1,67	+3,16	+2,48
NM_00860746	Mm.5022	Matrix metalloproteinase 13	1	+3,56	+4,22	+3,53	+3,49	1	+1,27	+2,39	+2,99	+2,35
BG228742	Mm.41596	Procollagen (type III) N-endopeptidase	1	+1,08	+2,36	+2,69	+3,35	1	-1,06	+3,77	+4,87	+5,70
BG072504	Mm.4352	Procollagen type XVIII alpha 1	1	+2,14	+9,12	+11,02	+9,03	1	-1,48	+2,63	+3,41	+2,76
Zytoskelett/ Zytoskelett-Organisation												
W20720	Mm.214950	Actin, alpha 1, skeletal muscle	2	-1,35	-1,67	-1,92	-4,14	2	-1,24	-2,57	-2,20	-2,13
W35717	Mm.297	Actin, beta, cytoplasmic	2	-1,62	-2,29	-2,69	-6,05	2	+1,04	-3,64	-2,53	-2,55
BG094026	Mm.1147	Calmodulin 2	2	-1,54	-2,18	-2,29	-2,75	2	+1,19	-2,10	-2,20	-1,37
BE853341	Mm.25194	Myosin ic	2	-1,12	-2,14	-1,95	-2,12	2	+1,37	-3,35	-2,73	-2,41
AI325107	Mm.1000	Myosin, light polypeptide 1; atrial, embryonic	2	-1,30	-1,45	-1,95	-2,72	2	-1,34	-2,45	-2,35	-2,34
AI037024	Mm.143763	Parva parvin, alpha	2	-1,07	-2,20	-2,34	-2,94	2	-1,02	-1,91	-2,55	-3,08
AI037244	Mm.3063	Pleiotrophin	2	-2,44	-2,34	-3,32	-5,31	2	-1,46	-2,01	-3,16	-2,31
BF454923	Mm.1155	Tubulin alpha 4	2	-1,01	-2,53	-4,26	-4,81	2	-1,03	-3,94	-2,79	-2,76
AA059763	Mm.246377	Tubulin, beta 2	2	-1,48	-1,22	-4,18	-4,31	2	-1,03	-3,46	-3,61	-3,39
BE553646	Mm.7	Vimentin	2	-1,09	-1,75	-4,10	-2,48	2	-1,84	-2,93	-4,82	-4,31
AA186035	Mm.695	Abl-interactor 1	1	-1,08	+2,53	+1,84	+1,54	1	-1,11	+2,14	+3,25	+2,91
AW741564	Mm.269006	Agrin	1	+1,25	+2,18	+2,86	+3,49	1	-1,11	+1,68	+2,32	+1,68
BE456923	Mm.18626	Capping protein (actin filament), gelsolin-like	1	+3,10	+3,49	+2,83	+2,29	1	+1,55	+1,59	+2,13	+1,68
AA511887	Mm.4323	Microtubule-associated protein 1 b	1	+2,08	+1,93	+1,97	+1,93	1	+1,01	+2,29	+1,30	+1,49
AA986418	Mm.28357	Microtubule-associated protein 1 light chain 3	1	+1,06	+2,44	+2,05	+2,48	1	-1,38	+2,23	+2,14	+2,17
BE570531	Mm.23742	Nestin	1	+2,83	+6,05	+2,80	+2,10	1	+2,64	+3,30	+2,71	+2,14
BF466963	Mm.142140	Neurofilament medium polypeptide	1	+1,39	+3,60	+2,39	+2,10	1	+4,85	+6,30	+9,59	+3,52
AI317155	Mm.20399	Profilin 2	1	-1,07	+2,01	+2,03	+2,48	1	+1,03	+2,17	+1,53	+1,54
AI849897	Mm.7420	Tubulin, beta 4	1	+1,09	+2,72	+3,86	+4,39	1	+1,11	+2,14	+3,39	+2,75
AA139292	Mm.4551	Villin 2 (= Ezrin)	1	+1,48	+3,63	+2,41	+2,39	1	+1,48	+3,51	+5,08	+2,79

Zellzyklus		Serie 1				Serie 2						
		C#	1	2	3	4	C#	1	2	3	4	
AI036659	Mm.45312	Anaphase-promoting complex subunit 5	2	-1,07	-2,64	-2,23	-2,51	2	-1,15	-1,49	-2,36	-2,76
AA267949	Mm.244975	Breast cancer 1	2	+1,07	-1,82	-1,65	-2,10	2	-1,13	-2,75	-3,51	-2,86
AW552477	Mm.1483	Cdc42 gtpase-inhibiting protein	2	-1,42	-2,44	-1,90	-2,12	2	+1,34	-2,49	-2,60	-1,77
BG094131	Mm.4761	Cell cycle protein p34 (cdc2)	2	-1,16	-5,37	-6,42	-8,17	2	-1,01	-4,61	-7,44	-7,54
BF018699	Mm.29931	Cell division cycle 20 homolog (s. Cerevisiae)	2	-1,16	-14,30	-16,95	-24,05	2	-1,07	-10,44	-12,07	-6,11
NM_009862	Mm.1248	Cell division cycle 45 homolog (s. Cerevisiae)	2	-1,12	-3,00	-4,53	-8,08	2	+1,10	-3,99	-5,49	-3,14
AI482525	Mm.27609	Chromatin assembly factor 1 subunit a p150; ests	2	-1,06	-3,42	-2,72	-5,05	2	+1,11	-2,34	-3,18	-2,29
AI528796	Mm.4189	Cyclin a2	2	-1,48	-4,18	-4,81	-4,71	2	+1,04	-3,99	-5,24	-3,88
AW537757	Mm.286338	Cyclin b1	2	-1,08	-6,42	-8,08	-9,30	2	+1,10	-9,65	-12,99	-8,11
BE995549	Mm.22288	Cyclin d1	2	+3,86	-1,35	-1,95	-3,94	2	+1,25	-2,59	-2,68	-3,35
BG143824	Mm.4008	Cyclin f f-box only protein 1	2	-1,21	-4,35	-2,77	-4,48	2	-1,18	-1,87	-2,53	-2,00
AA218046	Mm.27224	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	2	-1,57	-2,03	-2,25	-1,75	2	-1,41	-2,25	-4,18	-3,09
NM_011132	Mm.35061	Dna polymerase epsilon	2	-1,20	-3,22	-4,06	-5,37	2	+1,10	-1,66	-2,20	-1,77
NM_008921	Mm.2903	Dna primase p49 subunit	2	-1,30	-2,77	-2,46	-2,16	2	+1,18	-2,48	-4,01	-2,77
AI386143	Mm.9653	Gadd45 gamma	2	-5,70	-6,17	-2,36	-3,74	2	-2,74	-8,71	-9,12	-9,01
AA014315	Mm.6856	Pituitary tumor-transforming 1	2	-1,45	-6,11	-9,03	-11,13	2	-1,31	-4,40	-12,06	-8,09
AI325179	Mm.7141	Proliferating cell nuclear antigen	2	-1,03	-4,71	-3,90	-2,64	2	+1,26	-1,54	-2,93	-2,45
AW557954	Mm.180734	Replication protein a1	2	+1,03	-2,89	-2,01	-1,73	2	+1,04	-2,28	-4,35	-3,89
AA199508	Mm.2994	Retinoblastoma-like 1 p107	2	-1,35	-2,41	-2,08	-1,86	2	+1,04	-2,70	-2,40	-2,09
AI265698	Mm.28027	Retinoblastoma-like 2 p130	1	-1,12	+1,99	+2,46	+2,59	1	-1,05	+1,61	+1,77	+2,02
Chromatin / Transkriptionsfaktoren												
AI324190	Mm.4639	C/ebp, delta	2	-2,19	+1,71	+1,95	+2,00	1	-2,18	+1,23	+1,44	+1,59
AI893923	Mm.27015	Forkhead box d1	2	-2,53	-7,17	-8,00	-8,58	2	-1,71	-4,19	-6,91	-5,30
AA498609	Mm.42148	Forkhead box m1	2	-1,06	-1,68	-1,68	-2,08	2	-1,05	-5,00	-4,78	-3,63
BE553691	Mm.22593	General transcription factor ii i	2	-1,11	-1,90	-1,97	-2,18	2	-1,11	-2,05	-2,64	-2,04
AA208980	Mm.245931	H2a histone family, member x	2	-1,55	-3,46	-5,21	-5,58	2	+1,45	-3,74	-4,57	-3,40
AI605727	Mm.916	H2a histone family, member z	2	-1,09	-2,69	-3,25	-2,86	2	+1,03	-2,13	-2,48	-2,03
AI325263	Mm.1693	High mobility group box 2	2	-2,08	-4,01	-2,94	-2,20	2	-1,27	-1,67	-1,96	-2,59
AI528621	Mm.16421	High mobility group protein 1	2	+1,17	-2,66	-2,44	-2,39	2	-1,16	-2,33	-2,62	-2,32
NM_008321	Mm.110	Inhibitor of dna binding 3	2	-3,63	-14,30	-17,29	-17,81	2	-1,92	-3,50	-5,02	-6,25
AI894046	Mm.28223	Inhibitor of dna binding 4	2	-1,70	-1,68	-2,29	-3,67	2	-3,53	-9,19	-7,64	-7,13
BF227818	Mm.3438	Lamin a	2	+1,93	-2,25	-3,06	-2,75	2	+1,30	-2,64	-2,98	-3,35
AA017786	Mm.4105	Lamin b1	2	-1,05	-1,43	-1,84	-2,27	1	-1,01	-1,82	-2,56	-2,61
AA472248	Mm.29187	Lim domain only 4	2	-1,26	-1,48	-2,44	-3,63	2	-1,00	-3,11	-2,32	-1,92
AI528802	Mm.9394	Nuclear factor i/x	2	-1,51	-3,00	-2,77	-2,64	2	-1,30	-2,92	-3,53	-3,08
AA839285	Mm.10353	Old astrocyte specifically induced substance	2	-3,74	-3,94	-2,56	-2,29	2	-2,63	-3,10	-3,58	-2,24
AI510087	Mm.202774	Rna binding motif protein 9	2	-1,40	-1,72	-2,39	-3,13	2	-1,06	-2,08	-2,14	-1,96
AA266624	Mm.124	Thymopoietin	2	-1,11	-3,06	-2,46	-1,79	2	+1,48	-2,95	-2,05	-1,79
AK019997	Mm.925	Transcription factor dp 1	2	+1,19	-3,22	-2,34	-1,90	2	+1,25	-2,20	-2,38	-1,82
AI326536	Mm.5244	Camp responsive element modulator	1	+1,93	+6,17	+4,95	+3,42	1	+1,12	+4,10	+3,66	+1,75
NM_025854	Mm.22919	Cbf1 interacting corepressor	1	-1,38	+1,73	+1,75	+2,51	1	-1,11	+2,06	+2,29	+1,55
BE953948	Mm.4438	High mobility group at-hook 1	1	+5,42	+5,00	+4,44	+2,12	1	+3,82	+6,24	+3,96	+3,95
BF681888	Mm.25613	Immediate early response 3	1	+1,72	+5,93	+3,10	+1,67	1	+2,23	+5,60	+5,74	+3,93
AI325047	Mm.1167	Jun-b oncogene	1	-1,51	+2,48	+1,03	+1,38	1	+1,02	+4,17	+2,93	+2,33
AI462042	Mm.25648	KappaB-ras1 protein	1	-1,12	+2,16	+2,32	+2,56	1	-1,10	+1,71	+2,18	+1,67
NM_010847	Mm.2154	Max interacting protein 1	1	+1,31	+2,66	+3,19	+2,61	1	-1,09	+1,49	+2,28	+1,83
AW489001	Mm.106185	Putative serine/threonine kinase	1	+1,75	+2,20	+1,62	+2,14	1	+1,44	+1,89	+2,53	+2,48
AA190082	Mm.234262	Rab20, member ras oncogene family	1	+1,22	+1,84	+1,90	+2,44	1	+1,12	+2,21	+2,39	+2,26
AI098267	Mm.4139	Rhotekin	1	+1,45	+2,29	+2,97	+2,44	1	-1,10	+2,68	+5,76	+5,19
AA051766	Mm.2137	Transcriptional regulator, sin3 yeast homolog b	1	+1,11	+2,01	+1,82	+1,63	1	+1,09	+2,11	+2,17	+1,57
Zellulärer Transport												
AA275110	Mm.9703	Atx1 (antioxidant protein 1) homolog 1	2	+1,02	+1,94	+2,25	+1,77	1	-1,08	+1,86	+2,35	+1,75
AA682081	Mm.12508	Karyopherin (importin) alpha 2	2	+1,11	-5,81	-5,93	-4,90	2	-1,14	-5,45	-6,50	-5,55
AA549497	Mm.25548	Karyopherin (importin) alpha 3	2	+1,02	-3,39	-3,06	-2,44	2	+1,09	-2,53	-3,88	-2,76
AA792884	Mm.259374	Kinesin family member 23	2	-1,08	-7,32	-13,20	-29,08	2	-1,07	-8,53	-11,72	-8,37
BG065940	Mm.27828	Kinesin family member 2c	2	+1,02	-5,70	-9,12	-8,33	2	+1,07	-2,19	-2,98	-2,05
BE954571	Mm.3130	Kinesin heavy chain member 4	2	-1,23	-3,03	-2,27	-2,66	2	-1,02	-3,56	-8,60	-3,59
AI450533	Mm.32321	Vesicle-associated membrane protein 1	2	-1,49	-3,86	-5,00	-6,75	2	-1,33	-2,47	-5,70	-5,19
AA592034	Mm.3110	Kinectin 1	1	+1,14	+1,32	+2,08	+2,44	1	+1,29	+1,50	+2,03	+1,85
BE994918	Mm.4762	Kinesin family member 1a	1	+1,11	+1,67	+2,18	+2,66	1	-1,13	+1,29	+2,10	+1,78
BE995759	Mm.41379	Kinesin family member 21a	1	+1,39	+2,27	+2,08	+2,39	1	-1,05	+2,91	+3,02	+2,58
BF608252	Mm.21002	Slc2a1 solute carrier family 2, member 1	1	+2,05	+2,94	+2,80	+2,53	1	-1,05	+2,02	+2,11	+2,76

			Serie 1				Serie 2					
Zell-Zellkommunikation/Signal-Transduktion			C#	1	2	3	4	C#	1	2	3	4
AA473799	Mm.6813	Bone morphogenetic protein 4	2	-10,28	-4,71	-5,64	-5,16					
AI550849	Mm.3374	Ephrin B1	2	-1,65	-2,61	-3,71	-3,74	2	-2,05	-3,19	-3,16	-3,32
BE199460	Mm.16340	Fibroblast growth factor receptor 2	2	-7,32	-4,81	-4,22	-4,44	2	-2,73	-3,62	-3,95	-3,17
AI132355	Mm.3126	Four and a half LIM domains 1 G1 to phase transition 2 = Guanine Nucleotide Regulatory	2	-4,66	-4,18	-2,48	-2,27	2	-1,36	-8,15	-12,41	-8,96
AI585682	Mm.20826	Protein, complete cds	2	-1,73	-2,51	-3,03	-2,39	2	-1,26	-1,57	-2,14	-2,54
W08013	Mm.22248	Insulin-like growth factor binding protein 4	2	-2,89	-2,94	-2,72	-2,08	2	-1,50	-3,27	-5,66	-7,37
W13450	Mm.233470	Insulin-like growth factor binding protein 7	2	-1,35	-1,80	-1,99	-2,41	2	-1,36	-1,75	-2,50	-2,41
AI606037	Mm.26938	Kruppel-like factor 2 (lung)	2	-1,23	-3,49	-6,89	-7,17	2	+1,13	-2,65	-2,09	-2,05
BE947702	Mm.3900	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	2	-1,70	-4,57	-5,05	-5,87	2	-1,09	-2,86	-7,03	-7,86
NM_008809	Mm.4146	Platelet derived growth factor receptor, beta	2	-3,03	-4,22	-4,44	-3,67	2	-1,65	-6,89	-6,23	-6,13
BE686016	Mm.3124	Protein kinase C delta-binding protein (SRBC)	2	-1,55	-2,64	-2,10	-1,92	2	-1,50	-3,47	-3,50	-3,62
AW553107	Mm.27141	Rac gtpase-activating protein 1	2	-1,42	-9,97	-13,74	-18,36	2	-1,03	-7,73	-13,84	-7,23
AI987912	Mm.3833	RAN gtpase activating protein 1	2	+1,22	-2,03	-1,88	-2,14	2	+1,22	-2,52	-2,47	-1,87
AI876531	Mm.181709	Rgs16 regulator of G-protein signaling 16	2	-4,35	-1,14	-1,55	-4,22	2	+2,36	-1,81	-1,82	-2,03
AI847765	Mm.41642	Rgs4 regulator of G-protein signaling 4	2	-8,17	-11,94	-8,50	-14,01	2	-10,03	-24,93	-21,79	-19,79
AA050055	Mm.11738	Serine threonine kinase 6	2	-1,06	-6,69	-7,54	-14,44	2	+1,11	-8,96	-11,06	-6,33
AI413876	Mm.3488	Serine/threonine kinase 2 = Stk12=Ark2	2	-1,20	-4,35	-3,86	-4,35	2	-1,02	-1,61	-2,71	-2,53
AI893985	Mm.4936	Stress-activated protein kinase JNK3	2	+1,05	-2,20	-1,70	-1,67	2	+1,33	-2,03	-2,30	-2,05
NM_009368	Mm.3992	Transforming growth factor beta 3	2	-4,57	-3,32	-3,90	-5,05	2	-3,14	-2,84	-4,50	-2,94
AA544610	Mm.2021	Cell adhesion kinase = DDR1	1	+1,05	+12,43	+11,70	+11,70	1	-2,92	+3,16	+5,48	+4,09
BC002130	Mm.142293	Dusp14 = MAP kinase phosphatase 6	1	+2,16	+3,94	+2,12	+1,63	1	+3,25	+2,98	+2,98	+2,21
BF227601	Mm.33484	Egln3 EGL nine homolog 3 (C. Elegans)	1	+1,60	+1,55	+1,93	+3,32	1	-1,20	+1,45	+2,02	+1,87
AI448992	Mm.100060	Ethanolamine kinase (EKI)	1	+1,67	+2,05	+1,86	+2,14	1	+1,26	+1,81	+1,67	+2,16
AK002347	Mm.41662	Lag protein	1	+1,39	+3,71	+4,18	+2,77	1	-1,02	+1,96	+2,90	+2,86
AI324059	Mm.12409	LIM-domain containing, protein kinase=Limk1	1	+1,60	+2,59	+2,16	+2,94	1	+1,18	+2,52	+2,61	+2,58
AA051293	Mm.260092	Latent transforming growth factor beta binding protein 4 Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 = JIP3	1	+1,55	+6,69	+7,46	+7,46	1	+1,07	+2,10	+2,86	+1,64
AA537307	Mm.43081		1	-1,02	+1,43	+2,01	+2,41	1	-1,26	+1,84	+2,43	+2,21
AI314094	Mm.26722	Ndr2 N-myc downstream regulated 2	1	+1,16	+1,49	+1,93	+2,44	1	-1,06	+1,80	+2,62	+2,01
AK017458	Mm.27143	Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	1	-1,14	+2,29	+2,08	+1,80	1	-1,12	+3,00	+3,39	+3,04
BG072571	Mm.117037	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	1	+1,31	+2,18	+1,79	+1,62	1	+1,13	+1,65	+2,06	+1,89
NM_025951	Mm.248647	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	1	+2,18	+3,63	+2,10	+1,75	1	+2,17	+3,48	+3,02	+2,49
NM_009046	Mm.1741	Transcription factor relb.	1	-1,17	+1,38	+2,32	+2,29	1	+1,02	+2,39	+2,69	+2,56
AA793036	Mm.276273	Vascular endothelial growth factor A	1	+1,14	+4,39	+2,59	+2,23	1	+1,03	+3,78	+3,23	+2,08
Neuronaler Zelltyp/ -e Differenzierung												
W18400	Mm.196484	Cysteine rich protein 1	2	-3,56	-4,62	-5,21	-6,96	2	-2,68	-4,20	-6,18	-4,63
AW490585	Mm.241073	Enc1 ectodermal-neural cortex 1	2	-1,15	-2,29	-1,88	-2,27	2	+1,79	-2,16	-1,62	-1,42
AA561753	Mm.1141	Hepatoma-derived growth factor	2	-1,16	-3,97	-2,75	-2,77	2	+1,11	-2,20	-2,48	-1,98
AA982527	Mm.229220	Hpcal4 hippocalcin-like 4	2	-2,18	-2,20	-3,94	-5,16	2	-1,43	-2,04	-2,34	-2,55
AI894047	Mm.3970	Hu-antigen d	2	+2,39	-1,60	-2,97	-3,03	2	+2,24	-1,66	-1,78	-1,78
W29423	Mm.1089	Mesoderm specific transcript	2	-9,21	-5,93	-7,54	-7,24					
AI132351	Mm.1089	Mesoderm specific transcript	2	-1,90	-1,75	-2,14	-2,83					
AA145354	Mm.220966	Reticulon 4 (=nogo)	2	-1,54	-2,53	-4,81	-7,17	2	+1,03	-2,28	-1,70	-1,81
AK014286	Mm.32439	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	2	-2,25	-4,31	-4,57	-5,21	2	-1,19	-2,21	-3,32	-3,12
AI131641	Mm.28479	Stathmin 1	2	-1,52	-6,36	-6,89	-9,87	2	-1,66	-5,01	-9,96	-9,20
AI528734	Mm.462	Stromal cell derived factor 1	2	-7,92	-33,45	-8,50	-4,31	2	-3,57	-11,93	-11,75	-5,39
AI173885	Mm.30017	Gaba(a) receptor-associated protein like 2	1	+1,05	+2,20	+1,99	+1,80	1	+1,26	+2,19	+1,89	+2,22
AI195714	Mm.14638	Gaba(a) receptor-associated protein-like 1	1	+1,01	+2,56	+3,29	+2,97	1	+1,07	+2,92	+2,42	+2,39
AA200258	Mm.41791	Glycoprotein m6b	1	-2,64	+3,16	+4,31	+3,97	1	-3,37	+1,14	+1,91	+1,17
BF020647	Mm.2632	Latexin	1	+1,02	+3,90	+4,22	+4,48	1	-2,15	+1,81	+3,03	+1,85
BE570531	Mm.23742	Nestin	1	+2,83	+6,05	+2,80	+2,10	1	+2,64	+3,30	+2,71	+2,14
Oxidative Regulation												
BE136042	Mm.14719	Glutathione S-transferase alpha 3	1	0 1,00	+4,10	+4,81	+15,03	1	+1,11	+15,21	+13,56	+4,55
AI043064	Mm.2662	Glutathione S-transferase alpha 4	1	-1,34	+19,49	+27,66	+19,30	1	+1,35	+14,74	+17,08	+14,30
AI132441	Mm.2011	Glutathione S-transferase mu 1	1	-1,88	+5,81	+6,62	+7,17	1	-2,07	+3,15	+4,15	+3,07
NM_010362	Mm.282	Glutathione S-transferase omega 1	1	-2,69	+3,60	+2,39	+1,30	1	+1,55	+1,61	+2,53	+1,64
NM_008180	Mm.7204	Glutathione synthetase	1	+1,79	+2,72	+3,32	+3,19	1	+1,60	+2,97	+2,42	+1,58
BG077818	Mm.192991	Metallothionein 1	1	+3,63	+14,73	+26,58	+25,03	1	-1,67	+5,51	+10,22	+8,26
NM_007453	Mm.6287	Peroxiredoxin 2	1	+1,80	+6,89	+6,96	+6,30	1	+1,14	+5,71	+9,13	+6,22

4.6.4 Semiquantitative RT-PCR

Da viele Gene durch mehrere Sonden auf dem verwendeten Mikroarray vertreten sind, besteht eine hinreichende Verlässlichkeit bezüglich der gemessenen Änderungen des Expressionsniveaus. Trotzdem wurde die Expression einiger Gene mit Hilfe einer anderen Methode bestätigt. Die semiquantitative (sq) RT-PCR erlaubt eine Aussage über das Expressionsverhalten eines Gens, ausgehend von gleichen Mengen an RNS zwischen verschiedenen Zellen oder Zellzuständen. Da die Amplifizierung für jedes Gen individuell etabliert wird, lässt sich keine - oder nur eine relativ grobe - Aussage über Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen getesteten Genen treffen.

Als Kandidaten für die sqRT-PCR wurden Gene gewählt, die für die verschiedenen Kategorien typisch sind, aber auch von besonderem Interesse hinsichtlich des Prozesses der neuronalen Differenzierung. Hierzu gehörten verschiedene Transkriptionsfaktoren (Jun-B, CREM, CIR), Gene von Proteinen des Zytoskeletts und der Zelladhäsion (MAP1 A/B, Ezrin, Agrin), des Zellzyklus (p107, p130), Chromatins (H2A.Z, HMGB1) und auch Signalfaktoren wie BMP4 und SLUG (Abb. 4.15).

Sämtliche der zuvor mit der Mikroarray-Methode festgestellten Expressionänderungen konnten durch die sqRT-PCR bestätigt werden. Während die Cluster-Analyse der Mikroarray-Daten nur ein grobe Zusammenfassung des Trends der Genexpressionänderung für verschiedene Gengruppen erlaubte, ermöglicht die sqRT-PCR eine feinere Auflösung über den Zeitraum der Differenzierung. So werden manche Gene (zum Beispiel Jun-B) graduell hochreguliert, andere (LIM-K1) bereits nach der Präinkubation mit bFGF stark, dann schwächer oder transient (CREM). Bei den herunterregulierten Genen zeigt sich meistens ein sehr abruptes Absinken der Expression mit Einsetzen der neuronalen Differenzierung (zum Beispiel H2A.Z, KLF2, p107). Die Expression von Reticulon 4 geht gemäß des Ergebnisses der sqRT-PCR, im Gegensatz zu den Mikroarray-Daten, nur sehr schwach zurück (s. Tab 4. 4). Dies könnte jedoch, wie oben erwähnt, an einer Kreuzhybridisierung mit „actin, alpha, cardiac“ liegen.

EF-1 beta diente für alle Reaktionen als Kontrollgen, da es nach den Mikroarrayergebnissen keine differentielle Expression zeigte, was sich auch in der sq-RT-PCR bestätigte.

Abb. 4.15: Semiquantitative RT-PCR von ausgewählten während der Differenzierung muriner KMSZ differentiell regulierten Genen

(1) UNDIFFERENZIERTE KMSZ, (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10NG/ML BFGF, (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG, (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG, (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG

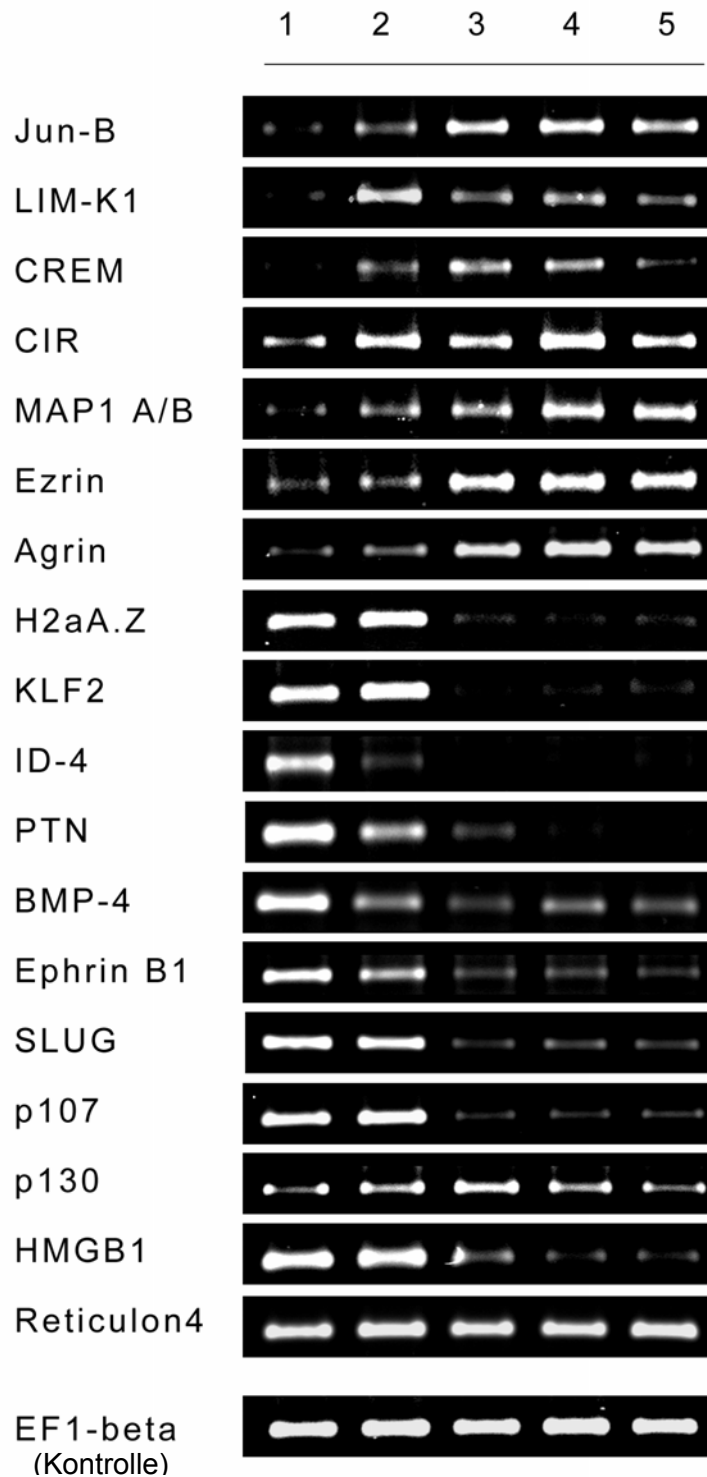
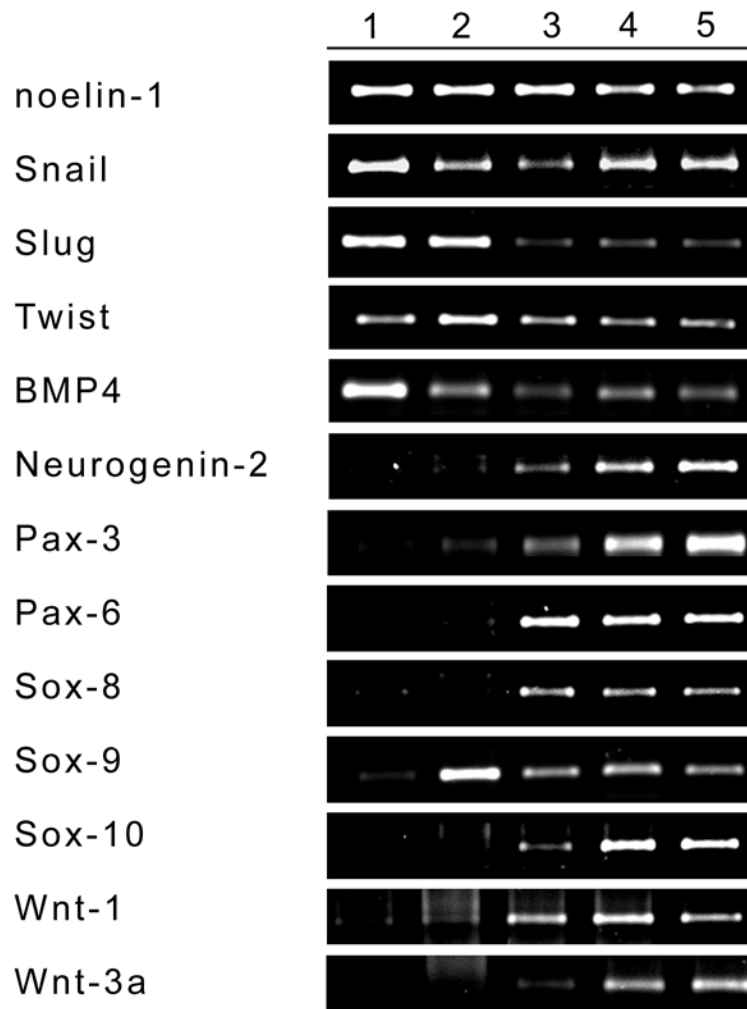


Abb. 4.16: Semiquantitative RT-PCR von Neuralleisten-spezifischen Genen in KMSZ und während ihrer neuronalen Differenzierung

(1) UNDIFFERENZIERTE KMSZ, (2) NACH 24H-INKUBATION MIT 10NG/ML BFGF, (3) TAG 1 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG, (4) TAG 2 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG, (5) TAG 3 NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG; SLUG/BMP4: GLEICHE SQ-RT-PCR-REAKTION WIE IN ABB. 4.15



Mit Slug wird ein Gen in den KMSZ exprimiert, welches einer der ersten Marker bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von frühen Zellen der Neuralleiste ist. Es wird vermutet, daß Slug auch eine inhibitorische Funktion bei der Entwicklung eines epithelialen Phänotyps in mesenchymalen Zellen hat (Savagner, 2001).

Neuralleistenzellen sind eine entwicklungsbiologisch äußerst interessante Zellpopulation mit enorm breitem Entwicklungspotential von neuronalen Zellen des Peripheren Nervensystems bis zu Bindegewebszellen, Knochen und Knorpel des Vertabratenschädels (siehe Diskussion Abschnitt 5.7). Neben Slug wurden weitere Neuralleisten-spezifische Gene auf ihre

Expression in KMSZ und während ihrer neuronalen Differenzierung untersucht (diese wurden also nicht im Rahmen der Mikroarray-Analyse gefunden).

Interessanterweise sind mit Twist, Snail und Noelin drei weitere der frühesten Neuralleistenmarker bereits in undifferenzierten KMSZ exprimiert. Während die Expression von SLUG sinkt, steigt die Expression von Twist zunächst leicht an, um wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückzufinden. Snail wird zunächst schwächer exprimiert und steigt bis Tag drei der neuronalen Differenzierung ebenfalls wieder auf das ursprüngliche Niveau. Die Expression von Noelin, dem vielleicht grundständigsten Neuralleistenmarker, bleibt zunächst konstant, um dann leicht abzufallen (Abb. 4.16).

Weitere Gene, die in prä-migratorischen Neuralleistenzellen exprimiert werden, sind die Sox-Gene der Gruppe E, Sox 8, Sox 9 und Sox 10 (sox – sry-box containing homeobox-gene) (Cheung und Briscoe, 2003). Alle drei sind nicht, bzw. im Falle Sox-9 nur sehr schwach in undifferenzierten KMSZ exprimiert. Mit der Präinkubation durch bFGF (Sox-9) bzw. nach Beginn der neuronalen Induktion (Sox-8, Sox-10) werden diese drei Sox-Gene jedoch deutlich heraufreguliert. Bemerkenswert ist die frühere Expression von Sox-9, was im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen der frühen Neuralentwicklung steht (Cheung und Briscoe, 2003). Mit Wnt-1 und Wnt-3a und Pax-3 und Pax-6 werden weitere Gene der frühen neuronalen Entwicklung nach neuronaler Induktion der Zellen exprimiert (Abb. 4.16). Wnt-1 und Wnt-3a werden im dorsalen Neuralrohr exprimiert und tragen vermutlich zu Bildung der Neuralleiste bei (Saint-Jeannet et al., 1997).

4.7 Immunhistochemische Untersuchung des Knochenmarks der adulten Maus

Obwohl bereits seit dreißig Jahren bekannt und intensiv erforscht (Friedenstein et al., 1970, 1976; Prockop 1997, 2003), ist der exakte *in vivo* Phänotyp von KMSZ nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Die Expressionsanalysen der undifferenzierten KMSZ legen einen Perizyten-ähnlichen Phänotyp als *in vivo* Phänotyp nahe, wie teilweise schon vorher vermutet wurde (Bianco et al., 2001). Perizyten sind Blutgefäß-assoziierte kontraktile Zellen, die eine Vielzahl von regulativen Funktionen der Gefäßentwicklung und -funktion haben (Hirschi und Amore, 1996, s. auch Diskussion). Der Transkriptionsfaktor Slug und weitere exprimierte Gene lassen sich als Marker nutzen, um eine *in vivo* Lokalisierung von KMSZ zu ermöglichen.

Ausgehend von *in vitro* in KMSZ-Kulturen exprimierten Genen wurde die Lokalisierung im nativen Knochenmark adulter Mäuse untersucht. Hierzu gehörten der Transkriptionsfaktor Slug, die Zytoskelettproteine Vimentin und Desmin sowie die Zelladhäsionsmoleküle Cadherin 13, VE-Cadherin (VE= vaskulär-endothelial) und Pleiotrophin. Vimentin, Desmin und Cadherin 13 verdeutlichen besonders die retikuläre Struktur des Knochenmarkstromas. Allerdings zeigen sich in allen Färbungen übereinstimmend Strukturen, die auf Blutgefäße oder Sinusoide hindeuten. Hier findet sich auch die deutlichste Färbung von VE-Cadherin und dem Transkriptionsfaktor Slug (s. Abb. 4.17).

Ko-Immunfärbungen von Pleiotrophin und VE-Cadherin zeigen, daß Zellen in der Position von Perizyten gleichzeitig diese beiden Proteine exprimieren (Abb.4.18).

Dieses Resultat lässt darauf schliessen, daß im adulten Knochenmark ein Perizyten-ähnlicher (aufgrund seiner blutgefäß-assoziierten Lage) undifferenzierter (aufgrund des Transkriptionsfaktors Slug) mesenchymaler Zell-Phänotyp existiert, der *in vitro* vermutlich als Knochenmarkstromazelle einen multipotenten Zelltyp darstellt.

Abb. 4.17: Immunfärbungen im nativen Knochenmark gegen verschiedene in KMSZ *in vitro* exprimierte Proteine markieren gefäßassoziierte Zellen:

ROT: MARKIERTES PROTEIN (CY3); BLAU: DNS-FÄRBUNG MIT DAPI
 + (A,C,E,G,J) : POSITIVE FÄRBUNG MIT ERST- UND ZWEITANTIKÖRPER
 (B,D,F,H,K): DAPI FÄRBUNG (A,C,E,G,J)
 - (A",C",E",G",J") : NEGATIV KONTROLLE NUR MIT ZWEITANTIKÖRPER
 (B",D",F",H",K") : DAPI FÄRBUNG (A",C",E",G",J")

Balken: 50µm

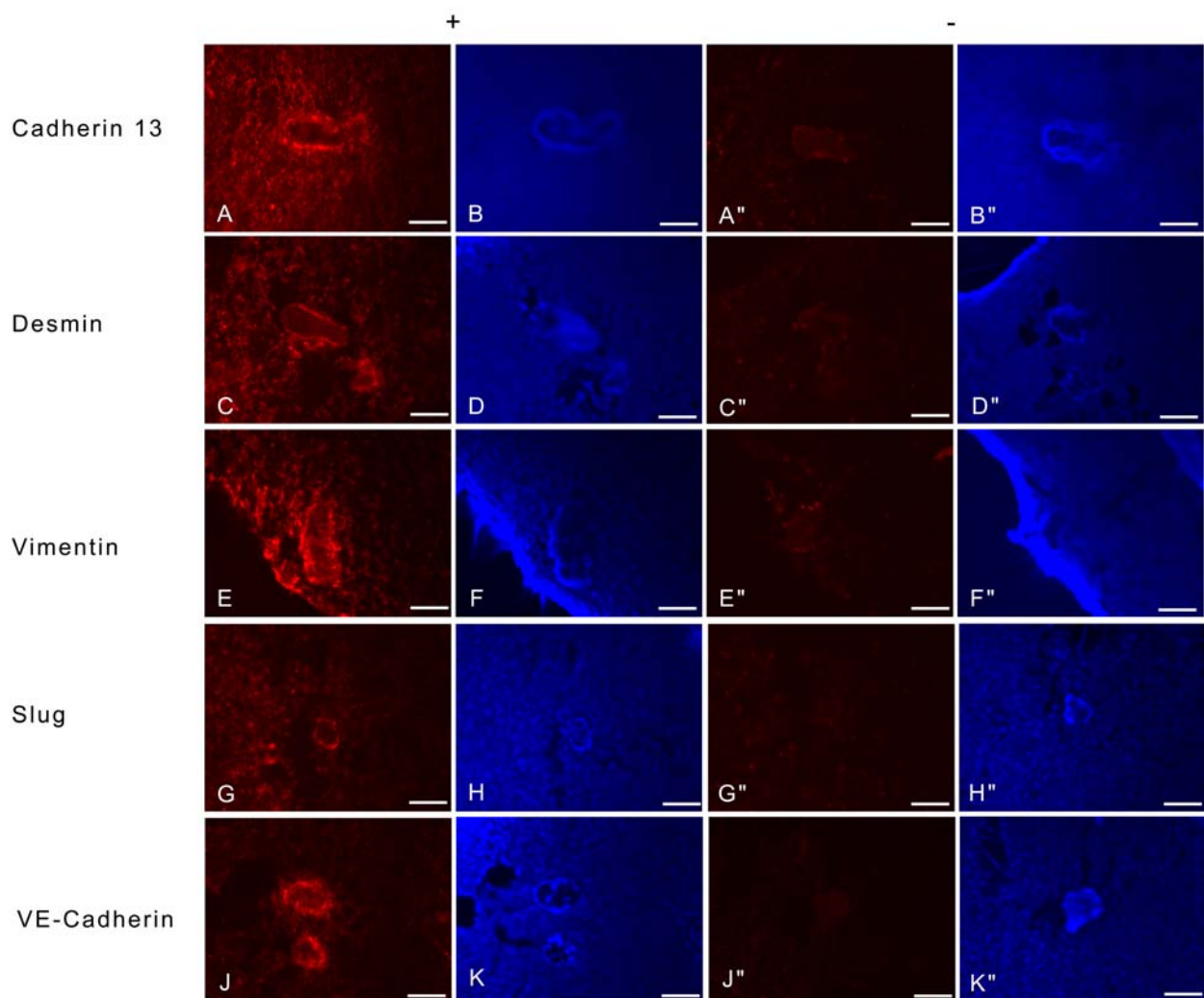


Abb. 4.18: Ko-Immunfärbungen gegen VE-Cadherin und Pleiotrophin, beide Gene *in vitro* in undifferenzierten KMSZ exprimiert, färben übereinstimmend gefäßassoziierte Zellen im adulten Knochenmark an:

A-D (+): **A:** VE CADHERIN CY3; **B:** PLEIOTROPHIN FITC; **C:** A UND B ÜBERLAPPEND; **D:** DAPI-FÄRBUNG.
 A"-D" (-): NEGATIV KONTROLLE NUR MIT ZWEITANTIKÖRPER: **A"** ANTI-KAN.-CY3; **B"** ANTI-ZIEGE-FITC; **C"** A" UND B" ÜBERLAPPEND; **D"** DAPI-FÄRBUNG
 Balken: 50µm (GILT FÜR ALLE BILDER)

