

## **V. Diskussion**

### **5.1 Kultivierung muriner Knochenmarkstromazellen**

Voraussetzung für die Durchführung der vorliegenden Arbeit über Genexpressionsanalysen muriner Knochenmarkstromazellen (KMSZ) war die Etablierung einer homogenen Kultur dieser Zellen. KMSZ wurden durch selektive Adhäsion an unbeschichtete Kunststoff-Zellkulturflaschen gewonnen. Im Gegensatz zu humanen KMSZ wurden Kulturen von KMSZ der Maus als inhomogen und schwierig zu proliferieren beschrieben (Prockop, 1997; Phinney et al., 1999). Diese enthielten Zellen mit verschiedener Morphologie: Fibroblasten-ähnliche, runde und sternförmige Zellen. Da die Mehrzahl der runden und sternförmigen Zellen CD11b und CD45 exprimierten, wurden sie als hämatopoetische Zellen angesehen (Phinney et al., 1999). In Übereinstimmung mit Publikationen zu humanen Zellen wurden in der hier durchgeführten Studie drei verschiedene Zelltypen beobachtet, die zum Teil als Subtypen von KMSZ angesehen werden: große, flache, Fibroblasten-ähnliche Zellen, schmale, spindelförmige Zellen und kleine runde Zellen (Mets und Verdonk, 1981; Colter et al., 2000, 2001). Im Laufe der Kultivierung wurde eine steigende morphologische Homogenität der Kultur muriner KMSZ beobachtet. Diese Beobachtung wurde auch bei humanen KMSZ gemacht (Mets und Verdonck, 1981; Kuznetsov et al., 1997; Bruder et al., 1997; DiGirolamo et al., 1999). Die Wachstumskinetik der KMSZ änderte sich ebenfalls im Laufe der Kultivierung. Eventuell hat die Zusammensetzung der Zellpopulation aus verschiedenen Zelltypen Einfluß auf die Wachstumskinetik insbesondere der großen, flachen Stromazellen. Ein bestimmter Zelltyp könnte zum Beispiel einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der anderen haben. Interessanterweise wurde ein nicht näher charakterisierter Faktor beschrieben, der von Zellen mit einem endothelialen Phänotyp in Kulturen adhärenter Knochenmarkzellen sezerniert wird und eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Fibroblasten-ähnlichen Zellen hat (Wolf 1999).

Trotz morphologischer Homogenität zeigte eine FACS-Analyse jedoch eine Heterogenität der Kulturen bezüglich bestimmter Oberflächenmarker. In frühen Passagen der etablierten Kulturen muriner KMSZ befanden sich kaum CD45-positive Zellen, jedoch eine kleine Population von CD11b-positiven Zellen (ca. 5-9% aller Zellen), vermutlich Makrophagen. Die CD11b-positiven Zellen wurden durch MACS-Sortierung aus der Kultur entfernt. Anschließende FACS-Analysen zeigten, daß keine CD11b-positiven Zellen mehr in den Kulturen vorhanden waren. Auch nach einer Vielzahl weiterer Passagen (8-10) konnten keine

CD11b-positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht dafür, daß diese Zellen tatsächlich eine eigenständige Population darstellen und nicht durch Differenzierung der KMSZ entstanden sind.

Eine homogene Kultur, und damit ein einheitliches Expressionsmuster, ist entscheidende Voraussetzung sowohl für die folgenden Expressionsanalysen der KMSZ in undifferenziertem Zustand, als auch ihrer Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp.

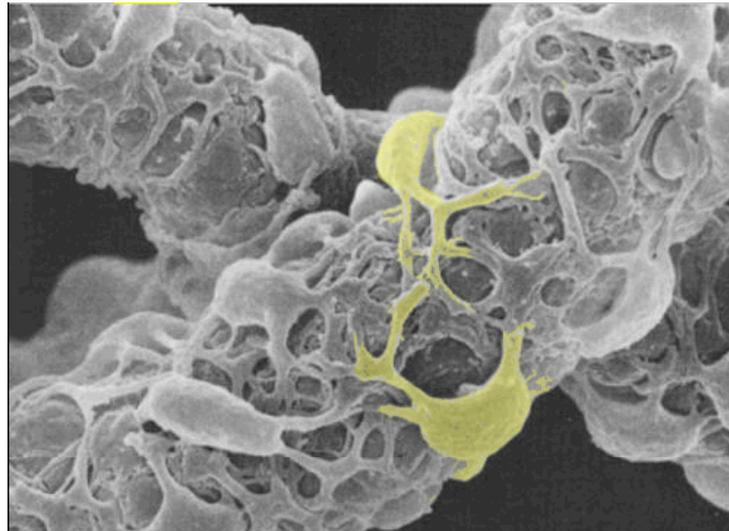
## **5.2 Expressionsprofil muriner Knochenmarkstromazellen**

Knochenmarkstromazellen werden seit etwa 30 Jahren durch ihre selektive Anheftung an die Plastikoberfläche von Zellkulturgefäßen gewonnen und sind in vielfältigen Studien untersucht worden. Ihr tatsächlicher *in vivo* Phänotyp ist jedoch nicht bekannt. Die Erstellung eines Genexpressionsprofils muriner Knochenmarkstromazellen erfolgte mit dem Ziel, über ihre molekularen Charakteristika Hinweise auf den *in vivo* Phänotyp der Knochenmarkstromazellen zu erhalten. Zwar wird die Genexpression *in vivo* maßgeblich von der Umgebung der Zelle beeinflusst, und das Genexpressionsprofil wurde von *in vitro* kultivierten Zellen erstellt. Dennoch sollte es erlauben, über die *in vitro* exprimierten Gene Rückschlüsse auf den Kontext und die Biologie der Knochenmarkstromazellen *in vivo* zu ziehen.

In Übereinstimmung mit einer Studie zur Genexpression humaner KMSZ von Tremain et al. (2001) exprimieren auch murine KMSZ Gene, die für viele verschiedene Zelltypen charakteristisch sind. Eventuell spiegelt dies den hohen Grad an Plastizität wider, den KMSZ zeigen. Das heißt, die Vielfalt an Zelltyp-spezifischen Genen weist auf eine Art Zwischenzustand der Zellen hin, der ihr breites Differenzierungspotential erklären könnte.

Die Literatur-Analyse der exprimierten Gene, welche für Proteine der extrazellulären Matrix sowie Proteine mit einer Funktion in der Zelladhäsion, dem Zytoskelett oder der Signalübertragung kodieren, ergab ein Expressionsmuster, das eine enge Verwandtschaft zwischen Knochenmarkstromazellen und vaskulären Zellen nahelegt. Im Folgenden soll gezeigt werden, daß ein Teil der exprimierten Gene sowie morphologische Übereinstimmungen dafür sprechen, daß KMSZ *in vivo* einen Perizyten-Phänotyp haben. „Perizyt“ ist ein Sammelbegriff für Zellen zum Teil unterschiedlicher ontologischer Herkunft, welche in oder auf der Basalmembran des Endothels kleiner Gefäße wie Arteriolen, Venolen und Kapillaren liegen (Abb. 5.1). Sie beeinflussen maßgeblich die Angiogenese und üben vielfältige regulative Funktionen aus (Shepro und Morel, 1993; Gerhardt und Betsholtz, 2003).

Unter den in KMSZ exprimierten Genen fanden sich Sdf-1 („stromal cell-derived factor 1“) und der Pdgf-Rezeptor beta (Pdgf- „platelet derived growth factor“). Beide Proteine werden auch in Perizyten synthetisiert (Pablos et al., 1999 Hellstrom et al., 1999). SDF-1 ist ein wichtiges Zytokin für verschiedene hämatopoetische Zellen (Whetton und Graham, 1999), spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems (Lazarini et al., 2003).



<http://www.med.uiuc.edu/histo/small/atlas/slidesf.htm>

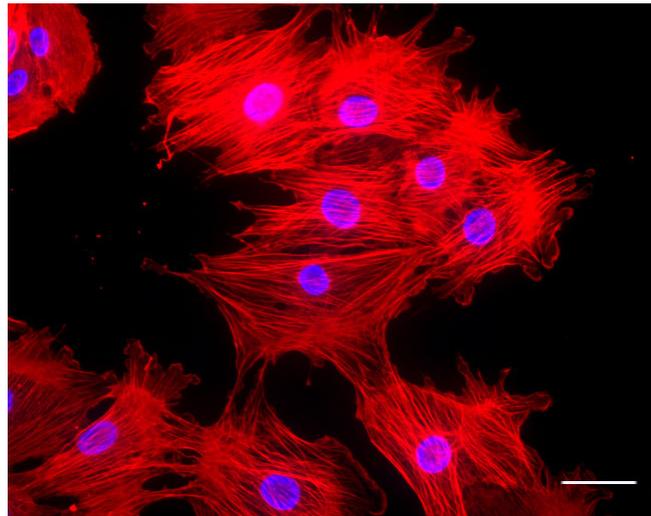
**Abb. 5.1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Perizyten auf einer Venole  
( ZWEI PERIZYTEN GELB HERVORGEHOBEN )

Die identifizierten Zelladhäsionsmoleküle weisen auf mögliche *in vivo* Interaktionen von KMSZ hin: Zell-Matrix Verbindungen, aber auch homo- und heterotypische Zell-Zell-Verbindungen, einschließlich Verbindungen mit endothelialen Zellen. So exprimieren KMSZ z.B. E-Selectin, ein endotheliales Oberflächenprotein, welches die Bindung von Leukozyten an Gefäßoberflächen ermöglicht (DeLisser et al., 1999). Die Expression verschiedener Cadherine (E-Cadherin/ -1, N-Cadherin/ -2, OB-Cadherin/ -11, H-Cadherin/ -13) sowie der Gene für die Plaque-Proteine  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin legen nahe, daß KMSZ Zell-Zell-Verbindungen vom Adhärenz-Typ bilden. Interessant ist die Expression von Cadherin-13, welches an inter-endothelialen Verbindungen nachgewiesen wurde, und von N-Cadherin, das Interaktionen zwischen Perizyten und Endothelzellen während der Gehirnentwicklung vermittelt (Haselton und Heimark, 1997; Gerhardt et al., 2000). Mit Peta-3 („platelet endothelial tetraspan antigen 3“, CD151) ist das Gen eines weiteren Proteins exprimiert, welches auf Endothelzellen, aber auch auf glatten Muskelzellen von Arteriolen, Sinusioden

der Leber und an der basolateralen Membran polarisierter Epithelien lokalisiert wurde (Sincock et al., 1997; 1999). Integrin beta-1, ebenfalls hoch exprimiert, kann Verbindungen mit Peta-3 eingehen und vermittelt Zell-Matrix-Interaktionen über Fibronectin. Integrin alpha-E, ebenfalls in KMSZ exprimiert, bindet an E-Cadherin epithelialer Zellen (Taraszka et al., 2000). Neuropilin-1, in KMSZ hoch exprimiert, dient in endothelialen Zellen als VEGF-Rezeptor. Eine Interaktion von Neuropilin mit Plexin A2, ebenfalls hoch exprimiert, unter Bildung eines Semaphorin-bindenden Komplexes im Nervensystem wurde ebenfalls beschrieben (Soker, 2001; Rohm et al., 2000).

Die Mikroarray-Analysen ergaben weiterhin, daß KMSZ viele Gene für Proteine der extrazellulären Matrix exprimieren: verschiedene Kollagene, Laminine und Perlecan, ein Heparansulfat-Proteoglykan. Diese Proteine sind typische Komponenten von Basalmembranen. Basalmembranen sind spezialisierte Formationen der extrazellulären Matrix zwischen Epithelzellen und Bindegewebe sowie um Muskelzellen, Nerven des peripheren Nervensystems (PNS) und Zellen des Fettgewebes (Erickson und Couchman, 2000). Im Knochenmark finden sich Basalmembranen um kleine Gefäße wie Kapillaren und Sinusoide. Komponenten von Basalmembranen werden sowohl von Endothelzellen, als auch von Perizyten produziert. Die Mikroarray-Analyse von *in vitro* kultivierten KMSZ zeigte die Expression verschiedener Gene, die für Proteine glatter Muskelzellen kodieren (Glattmuskelspezifisches Myosin und Actin gamma-2). Eine Ähnlichkeit von KMSZ und glatten Gefäßmuskeln wurde bereits gezeigt (Galmiche et al., 1993; Li et al., 1995). VEGF („vascular endothelial growth factor“) und PEDF („pigment epithelium derived factor“) werden ebenfalls von KMSZ exprimiert. Beide Faktoren beeinflussen die Angiogenese. Es liegt demnach nahe, dass KMSZ *in vivo* Gefäß-assoziierte Zellen sind. Die Expression von Actin der glatten Muskulatur und anderen Elementen des kontraktilen Zytoskeletts sowie die erwähnten Faktoren werden auch in Perizyten gefunden. Diese haben kontraktile Eigenschaften und exprimieren ebenfalls Actin der glatten Muskulatur, Myosin-Isoformen und Tropomyosin (Diaz-Flores, 1991). Immunfärbungen mit alpha-Actin der glatten Muskulatur zeigen die Expression dieses auch Perizyten-typischen Proteins in KMSZ (Abb. 5.2).

**Abb. 5.2:** Murine KMSZ exprimieren den Perizyten-Marker  $\alpha$ -SMA („alpha-smooth muscle actin“)  
BALKEN - 20 $\mu$ M



Bei der Literaturanalyse fiel bei vielen der in KMSZ exprimierten Gene auf, daß sie in einem Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit stehen. So exprimieren KMSZ verschiedene Gene, deren Produkte in den extrazellulären Plaques der Alzheimer Krankheit gefunden werden, zum Beispiel AbPP („Amyloid beta Precursor Protein“), das Herparansulfat-Proteoglykan Perlecan, Apolipoprotein E und verschiedene Syndecane (2, 3 und 4). Interessanterweise ist gezeigt worden, daß Perizyten Amyloid und einige der genannten Proteine synthetisieren (Wegiel und Wisniewski 1992; Wisniewski et al., 1992; Verbeek et al., 1999).

Abgesehen von den Übereinstimmungen in der Genexpression haben Perizyten und KMSZ auch eine ähnliche Morphologie und ähnliche Eigenschaften in Zellkultur: sie erscheinen als große, flache Zellen und differenzieren in verschiedene andere Zelltypen (Balabanov und Dore-Duffy, 1998; Alliot et al., 1999; Allt und Lawrenson, 2001). Wie für KMSZ wurde für Perizyten eine Differenzierung in Osteoblasten (Diaz-Flores et al., 1992), Adipozyten (Richardson et al., 1982) und Mikroglia beschrieben (Hirschi und Amore 1996; Thomas, 1999).

Zwar wurde ein Perizyten-Phänotyp für KMSZ *in vivo* bereits vorgeschlagen, aber eine wirkliche Übereinstimmung dieser beiden Zelltypen wurde bislang nicht gezeigt (Bianco et al., 2001). Es existiert kein eindeutiger Marker für Perizyten aller Spezies, so daß diese bis heute nur anhand ihrer histologischen Position definiert werden (Nehls und Drenckhahn 1991; Ehler et al, 1995). Ihre Verwandtschaft mit Perizyten-ähnlichen perivaskulären Zellen, die nicht in der Basalmembran liegen, sondern auf deren Oberfläche, ist nicht eindeutig geklärt (Thomas, 1999).

Das in dieser Arbeit erstellte Expressionsprofil muriner KMSZ weist somit auf eine deutliche Ähnlichkeit zwischen KMSZ und Perizyten hin und ist ein wichtiger Beitrag zu ihrer genauen Charakterisierung. Weiterhin stellt es eine Kombination molekularer Marker dar und erlaubt damit auf der Basis ihres Transkriptionsstatus die Auswahl spezifischer Proteine zur Lokalisierung der KMSZ im Knochenmark.

### **5.3 Lokalisierung von Knochenmarkstromazellen im Knochenmark adulter Mäuse**

Für die *in vivo*-Lokalisierung muriner KMSZ wurden auf Basis des erstellten Genexpressionsprofils verschiedene molekulare Marker ausgewählt. Gewebeschnitte vom Knochenmark adulter Mäuse (~ 3 Monate alt) wurden mittels Immunfärbungen auf vorhandene Proteine verschiedener in KMSZ exprimierter Gene untersucht.

Cadherin 13, Vimentin und Desmin zeigen zum einen die netzförmige Struktur des Knochenmarks, insbesondere aber runde Strukturen, die Gefäßen ähneln. Hier wird auch der Transkriptionsfaktor Slug deutlich exprimiert. Antikörper gegen den Gefäß-Marker VE-Cadherin (VE-Cadherin) färben gleiche Strukturen an und zeigen damit, daß es sich bei den angefärbten Strukturen tatsächlich um Gefäße handelt. Eine Kollokalisierung der Proteine Pleiotrophin, welches ebenfalls in KMSZ exprimiert wird, und VE-Cadherin zeigte, daß tatsächlich dieselben Zellen beide Proteine synthetisieren und nicht etwa verschiedene Zellen gleicher Strukturen.

Das heißt, die Produkte von KMSZ *in vitro* exprimierten Genen färben im adulten Knochenmark gefäßassoziierte Zellen an. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den gewonnenen Genexpressionsdaten und sprechen dafür, daß KMSZ *in vivo* gefäßassoziierte Zellen, wahrscheinlich Perizyten, sind.

#### **5.4 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen**

Das Potential adulter KMSZ, in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren, ist schon bald nach ihrer Entdeckung als CFU-Fs festgestellt worden. Besondere Aufmerksamkeit erweckten verschiedene Studien, in denen eine Differenzierung von KMSZ in neuronale und andere nicht-mesenchymale Zelltypen gezeigt wurde (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001). Andere Studien beschrieben die *in vivo* Differenzierung von nicht näher definierten Knochenmarkzellen in Gliazellen und Neurone des Gehirns (Eglitis und Mezey, 1997; Priller et al., 2001). Neuere Erkenntnisse zur Fusion von Knochenmarkzellen mit gewebespezifischen Zellen lassen jedoch vermuten, daß diese Resultate zum Teil auf Zellfusionen beruhen (Alvarez-Dolado et al., 2003; siehe auch Einleitung 1.6).

Woodbury et al. (2000) beschrieben, daß bestimmte Antioxidantien bei kultivierten humanen und Ratten-KMSZ die Differenzierung der Zellen in einen neuronalen Phänotyp bewirken. Ein hoher Prozentsatz (~78%) der so behandelten Zellen exprimierte neuronale Proteine wie NF-M oder NSE, was bei anderen Studien (Sanchez-Ramos et al., 2000; Deng et al., 2001) nicht der Fall war. Für eine Analyse der Genexpressionsänderungen während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ ist ein hoher Prozentsatz differenzierender Zellen in der Kultur wichtig, um möglichst exakt die zugrundeliegenden Genexpressionsänderungen feststellen zu können. Daher wurden die von Woodbury et al. verwendeten Differenzierungsprotokolle für humane und Ratten-KMSZ als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführte neuronale Differenzierung muriner KMSZ herangezogen.

Bei Verwendung des Original-Protokolls kam es jedoch zu einem Absterben einer großen Zahl der kultivierten Zellen. Dieses Problem konnte durch die Entwicklung eines modifizierten Protokolls gelöst werden. Unter diesen Bedingungen kam es bei den meisten Zellen zur neuronalen Differenzierung (ca. 85% NF-M positive Zellen) und zu keinem Absterben von Zellen. Eine vollständige Differenzierung aller kultivierten Zellen ist insofern unwahrscheinlich, als die Kulturen nicht synchronisiert waren. Damit befindet sich ein Teil der Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem für eine Differenzierung ungünstigen Zellzyklus-Stadium.

Die erfolgreiche neuronale Differenzierung der murinen KMSZ wurde zunächst mit Hilfe von Antikörper-Fluoreszenzfärbungen verfolgt. Sowohl bei neuronalen als bei embryonalen Stammzellen ergibt eine neuronale Differenzierung *in vitro* eine gemischte Population aus neuronalen Zellen, das heißt Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten (Baizabal et al., 2003;

Czyz und Wobus, 2001). Die Immunfärbungen von neuronal *in vitro* differenzierten KMSZ mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine der drei neuronalen Subtypen in der vorliegenden Arbeit zeigten für alle differenzierenden Zellen eine gleichgerichtete Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp. Die Zellen sind negativ für den Astrozyten-Marker GFAP, sowie für die Oligodendrozytenmarker O4 und GalC. Der Ausschluß einer GFAP-Expression erfolgte mittels RT-PCR, da zunächst eine positive Färbung durch den polyklonalen Antikörper sc-6170 (Santa Cruz Biotechnology) erfolgte. Ein monoklonaler Antikörper gegen GFAP ergab dann allerdings ebenfalls ein negatives Signal.

Neben der Expression von neuronalen Markern wie NF-M und NSE ist die Expression von Proteinen wie Nestin, dem RC2-Antigen und HuC/HuD besonders interessant, da sie in frühen neuronalen Vorläufern während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert werden. Nestin wird von neuroepithelialen Vorläuferzellen synthetisiert, allerdings ist es im Laufe der Entwicklung auch im embryonalen Herzen und den sich entwickelnden Zähnen, Testes und Myoblasten exprimiert (Lendahl et al., 1990; Herrmann und Aebi, 2000). Bei der Zellreifung wird Nestin durch andere Intermediärfilamente ersetzt, im ZNS zum Beispiel durch Neurofilamente (Dahlstrand et al., 1992). In Knochenmarkstromazellen wurde die Expression von Nestin außer während ihrer neuronalen Differenzierung (Woodbury et al., 2000) auch bei Serum-Deprivation berichtet (Wislet-Gendebien et al., 2003). Die in dieser Arbeit festgestellte transiente Expression von Nestin während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ könnte Anzeichen für eine vorübergehende Änderung hin zu einem niedrigeren Entwicklungsstatus (Dedifferenzierung, s. Einleitung) der Zellen sein.

Das RC2-Antigen und Huc/HuD sind in undifferenzierten KMSZ nicht vorhanden, lassen sich jedoch bereits nach der Präinduktion der Zellen durch bFGF nachweisen. RC2 ist ein Antikörper, der im Nervensystem spezifisch ein Antigen radialer Gliazellen anfärbt (Misson et al., 1988). Radiale Gliazellen sind Vorläuferzellen für die meisten Neurone des Gehirns (Anthony et al., 2004) und bilden außerdem in der Entwicklung Führungsstränge für die gerichtete Wanderung der Neurone im ZNS (Hartfuss et al., 2001). Mit dem RC2 Antigen ist ein weiterer Marker eines niedrigeren Differenzierungsstatus exprimiert. Hu Proteine sind RNS-bindende Proteine. HuC und HuD gelten als frühe neuronale Marker (Wakamatsu und Weston, 1997; Perrone-Bizzozero und Bolognani 2002). Die Immunfärbungen von Vimentin zeigen, daß Vimentin in undifferenzierten KMSZ vorhanden ist und auch noch drei Tage nach Induktion ihrer neuronalen Differenzierung (Abb. 4.7). Vimentin wird zwar vor allem als

Marker mesenchymaler Zellen angesehen, jedoch wird es von neuronalen Vorläufern exprimiert und ist, zumindest *in vitro*, essentiell für die Ausbildung von Neuriten (Yabe et al., 2003). Weiterhin baut die Zelle Vimentin nur langsam ab (Halbwertszeit liegt bei 36h, Coleman und Lazarides, 1992).

Somit zeigen die Immunfärbungen, daß KMSZ während der Differenzierung einen - eventuell noch unreifen, wie die Expression von Nestin, RC2 und HuC/HuD nahelegt - neuronalen Phänotyp ausbilden.

### **5.5 Neuronal differenzierte Knochenmarkstromazellen zeigen keine Aktivität von Spannungs- oder Ligandenabhängigen Ionenkanälen**

Elektrophysiologische Ableitungen an differenzierten KMSZ sprachen gegen das Vorhandensein von funktionierenden Spannungs- oder ligandenabhängigen Ionenkanälen. Weder konnte durch elektrische Stimulation ein Aktionspotential hervorgerufen werden, noch gab die Zugabe der Neurotransmitter Glutamat und GABA einen Hinweis auf entsprechende Rezeptoren. Dies zeigt, daß KMSZ am zweiten Tag ihrer Differenzierung noch keinen vollständig reifen neuronalen Phänotyp aufweisen. Hierfür spricht unter anderem auch die oben erwähnte Expression verschiedener Marker-Proteine früher Neurone und neuronaler Vorläuferzellen wie Nestin, HuC/D und RC2.

Frühere Patch-Clamp-Ableitungen an mit beta-Mercaptoethanol neuronal differenzierten KMSZ (nach 48h) zeigten ebenfalls das Fehlen von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Hofstetter et al., 2002). Studien mit neuronal differenzierten embryonalen Stammzellen zeigen zwar deren volle Erregbarkeit, allerdings erst 13 Tage nach Induktion ihrer neuronalen Differenzierung (Lee et al., 2000). Die fehlende Reaktion muriner KMSZ kann somit auf eine zu frühe Messung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften zurückzuführen sein. Außerdem könnten sowohl der Transport der Zellen, als auch die Änderung des äußeren Milieus in der Meßkammer einen negativen Einfluß auf die Zellen gehabt haben.

## **5.6 Expressionsanalysen der neuronalen Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen**

Verschiedene Publikationen zeigen die Differenzierung von KMSZ in gliale und neuronale Phänotypen *in vivo* und *in vitro* (Eglitis und Mezey, 1997; Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2001; Deng et al., 2001). Die dabei stattfindenden Genexpressionsänderungen und damit mögliche Hinweise auf zugrundeliegende molekulare Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Differenzierung muriner KMSZ und die anschließende Analyse der Genexpressionsänderungen mit cDNS-Mikroarrays sollten die molekularen Grundlagen dieses Prozesses genauer untersucht werden.

Insgesamt wurden zwei Differenzierungsreihen, das heißt zwei biologische Replikate, durchgeführt, wobei jeweils vier verschiedene Zeitpunkte der Differenzierung untersucht wurden. Eine Clusteranalyse ermöglichte die Gruppierung von Genen, welche im Verlauf der Differenzierung ähnliche Expressionsänderungen zeigten. Ein Vergleich der fünf verschiedenen Cluster je Differenzierungsreihe zeigte zum Teil hohe, zum Teil nur geringe Übereinstimmungen (siehe Tab. 4.3). Zwei der fünf Cluster der Differenzierungsreihen (Nr. 1 und 2) enthielten kontinuierlich hoch- oder herunterregulierte Gene. Diese Cluster zeigten auch die höchste Übereinstimmung, das heißt den größten Anteil an gleichen Genen (ca. 50%). Eine hundertprozentige Übereinstimmung ist aufgrund biologischer Schwankungen zwischen den beiden unabhängigen Differenzierungsansätzen nicht zu erwarten. Außerdem wurden für die Clusteranalyse nur Gene herangezogen, die mindestens eine zweifache Expressionsänderung an mindestens einem der untersuchten Zeitpunkte aufwiesen. Damit fallen Gene, die nur knapp darunter liegen, aus der Clusteranalyse heraus. Für die weitere Analyse der Daten wurden nur Gene herangezogen, die in beiden Differenzierungsansätzen konsistent differentiell exprimiert waren. Diese wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt und hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung für die Differenzierung muriner KMSZ in einen neuronalen Phänotypen anhand der vorhandenen Literatur analysiert.

Die Expression einiger Gene wurden zur Kontrolle mittels semiquantitativer RT-PCR (sqRT-PCR) über den Verlauf der Differenzierung untersucht. Für alle Gene konnten die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen bestätigt werden. Ausnahme war Reticulon 4 (Nogo). Die sqRT-PCR zeigte keine differentielle Expression dieses Gens, die Mikroarray-Analyse ergab eine sinkende Expression. Eine BLAST Analyse des verwendeten cDNS-Klons zeigte jedoch, daß

dieser außer einer Nogo-spezifischen Sequenz auch eine Sequenz spezifisch für Herzmuskel-spezifisches alpha-Actin enthielt. Somit läßt sich dieses Ergebnis durch eine Kreuzhybridisierung mit Actin-Sequenzen erklären, die generell ein deutlich sinkendes Expressionniveau zeigen.

Die Genexpressionsänderungen der verschiedenen funktionellen Gruppen (zum Beispiel Zellzyklus, Zytoskelett, extrazelluläre Matrix, Transkriptionsfaktoren, s. Abschnitt 4.6.3) wurden im Ergebnisteil besprochen. Daher sollen hier nur Resultate der festgestellten Expressionsmuster, welche in Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung stehen, dargelegt werden.

### Zytoskelett

Die Differenzierung von KMSZ in Zellen mit einem neuronalen Phänotyp ist begleitet von dramatischen Änderungen der Zellmorphologie und somit des Zytoskeletts. Neben den durch Immunfluoreszenz gezeigten Änderungen der Zytoskelettzusammensetzung konnten durch die DNS-Mikroarray-Analyse vielfältige Genexpressionsveränderungen von Zytoskelett-Proteinen, die in der Ausbildung eines neuronalen Phänotyps involviert sind, identifiziert werden.

Die Ausbildung von Zellfortsätzen, einschließlich der Neuriten von Neuronen, erfordert unter anderem eine koordinierte Polymerisation von Actin. Diese führt an der Zellmembran zur Bildung von längeren, schmalen Fortsätzen, sogenannten Filopodien, und breiten Fortsätzen, sog. Lamellipodien. Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) sind neben anderen Proteinen an der Kontrolle der Bildung von Zellfortsätzen, insbesondere von Axonen und Dendriten, beteiligt (Luo, 2000; Alberts et al., 2002; Meyer und Feldmann, 2002). Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven (GTP-gebundenen) und inaktiven (GDP-gebundenen) Status wechseln. Ihre Aktivierung wird von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), ihre Inaktivierung von GTPase-aktivierenden-Proteinen (GAPs) katalysiert. Die Bindung an Guanin-Nukleotid-Dissoziierungs-Inhibitoren (GDIs) führt ebenfalls zu einer Inaktivierung von Rho-GTPasen.

Während Rho entscheidend für die Bildung von Stressfasern ist, sind Rac und Cdc42 für die Bildung von Lamellipodien bzw. Filopodien verantwortlich (Nobes und Hall, 1995). Außerdem wurde gezeigt, daß Rho die Bildung neuraler Fortsätze hemmt, während cdc42 und Rac diese unterstützen (Jalink et al., 1994; Luo et al., 1994). Die sinkende Genexpression von Rac-GAP, Cdc42 -inhibierendes Protein und Rho-GEF sprechen, wenn auch jeweils indirekt,

für eine positive Regulation der neuriten-bildenden Proteine Cdc42 und Rac, bzw. eine negative von Rho, welches eine Retraktion der Neuriten induziert (Luo et al., 1996).

Knock-Out Studien an LIM-Kinase<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten die Bedeutung der LIM-Kinase, deren Expression während der neuronalen Differenzierung der KMSZ steigt, bei der Ausbildung von Synapsen sowie dem räumlichen Lernen (Meng et al., 2002). Deletionen des LIM-Kinase Gens sind möglicherweise eine Ursache des Williams-Syndroms (Hoogenraad et al., 2004).

Interessant ist auch das steigende Expressionsniveau von Agrin. Das Agrin-Gen kodiert für ein Heparansulfat-Proteoglykan, das entscheidend ist für die neuromuskuläre Synapsenbildung, hier die koordinierte Sammlung der Acetylcholinrezeptoren, aber auch für synaptische Strukturen in Immun- und Nervenzellen. Agrin kann den MuSK Signaltransduktionsweg aktivieren, welcher neben der Rezeptor-Tyrosinkinase MuSK c-Abl und letztlich GEFs und Rho GTPasen beinhaltet (Bezakova und Ruegg, 2003; Finn et al., 2003).

Im adulten Gehirn wurde Ezrin (auch Villin 2), dessen Expression deutlich steigt, insbesondere in Fortsätzen von Astrozyten gefunden, nicht jedoch in Neuronen (Derouiche und Frotscher, 2001). Die Lokalisierung in Filopodien neuronaler Wachstumskegel und Perikarien *in vitro* (Goslin et al., 1989; Birgbauer et al., 1991; Paglini et al., 1998) sowie eine neuronale Expression im Hühnerembryo (Everett et al., 1990; Takahashi et al., 1999) legen jedoch eine Funktion auch in der neuronalen Entwicklung nahe.

Bei Actin-Genen sinkt das Expressionsniveau insbesondere von Gewebe-spezifischen Formen wie alpha-1-Actin des Skelettmuskels oder gamma-2-Actin der glatten Muskulatur. Ebenfalls herunterreguliert wurde die Genexpression vieler Tubuline; nur das Expressionsniveau von Tubulin-beta-4, das im Gehirn exprimiert wird (Lewis and Cowan, 1990), stieg.

Die Mikroarray-Analysen offenbaren damit, daß die Regulation vieler weitere Gene während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ sich mit bisherigen Kenntnissen zum Auf- und Umbau eines neuronalen Zytoskeletts deckt.

### Extrazelluläre Matrix

Typisch für Zellen des Bindegewebes ist die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), aber auch von Proteasen, welche Komponenten dieser Matrix spalten. Das Expressionsprofil der undifferenzierten KMSZ zeigte eine breite Expression von Genen der EZM (siehe Abschnitt 5.2).

Die durch Mikroarrays festgestellten Expressionsänderungen von Genen für EZM-Proteine, Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren sprechen für einen Bindegewebszelltyp undifferenzierter KMSZ und einen Verlust dieser Charakteristika während der Zelldifferenzierung. Die Gene für EZM-Proteine werden während der Differenzierung generell herunterreguliert. Matrix-Metallo-Proteinasen, die der Degradation der EZM z.B. bei invasivem Verhalten von Zellen dienen, werden ebenfalls schwächer exprimiert, die Genexpression ihrer Inhibitoren (TIMPs, „tissue inhibitor of metalloproteinase“) steigt hingegen. Dies weist auf Änderungen des invasiven Verhaltens der Zellen hin, wie es zum Beispiel bei epithelial-mesenchymalen-Transitionen (EMT, s.u.) vorkommt (Duong und Erickson, 2004).

### Zellzyklus und Chromatin

Eine Differenzierung in Neurone geht mit einem Zellzyklusaustritt und einem Übergang in die G<sub>0</sub>-Phase einher. Die G<sub>0</sub>-Phase in Neuronen ist charakterisiert durch eine permanente Stilllegung der Expression mehrerer Cyclin-abhängiger Kinasen und Cycline (Ohnuma und Harris, 2003). Die durch Immunfärbungen nachgewiesene vollständige Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 weist bereits auf einen Stillstand der Zellproliferation hin. Ki67 ist ein Zellzyklus-assoziiertes Protein und hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Ribosomen-Produktion im Nucleolus (Brown und Gatter, 2002). In der Mikroarray-Analyse wurden außerdem Expressionsänderungen vieler Gene festgestellt, die für Zellzyklusproteine kodieren. Das Expressionsniveau der meisten dieser Gene sank. Diese Veränderungen korrelieren damit sehr gut mit einem Austritt aus dem Zellzyklus. Hervorzuheben ist die Regulation der Zellzyklus-assoziierten Retinoblastom-ähnlichen Proteine p107 und p130. Die Genexpression von p107 sinkt, die von p130 steigt. Exakt dieses Verhalten wurde bei der neuronalen Differenzierung einer Neuroblastom-Zelllinie beschrieben (Kobayashi et al., 2002). Außerdem wurde eine Funktion von p130 bei der Spezifizierung und Entwicklung eines reifen neuronalen Phänotyps festgestellt (Jori et al., 2001). Auch die negative Regulation von Cyclin F, welches im G<sub>2</sub>-M Übergang degradiert wird und die NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen hemmt, kann mit der neuronalen Differenzierung der KMSZ korreliert werden (Movsesyan, 1996). Eine neuroprotektive Eigenschaft von MDM2, welches hochreguliert wird, wurde berichtet (Trinh et al., 2001).

Verschiedene Gene für Proteine der High-mobility-group (HMG-) Proteine werden im Laufe der neuronalen Differenzierung differentiell reguliert, zum Beispiel sank die Expression von Hmbg1 (auch Amphoterin). Abgesehen von seiner Funktion der DNS-Bindung kommt Hmbg1 auch im Zytoplasma vor und wirkt extrazellulär als Zytokin (Andersson und Tracey,

2003; Degryse und de Virgilio, 2003; Muller et al., 2004). Eine wichtige Funktion in der Ausbildung von Neuriten und der neuronalen Migration wurde ebenfalls berichtet (Fages et al., 2000; Hori et al., 1995). Während der Differenzierung von P19 Neuroblastomzellen *in vitro* ist Hmgb1 im Nukleus der undifferenzierten Zellen bzw. den Fortsätzen der differenzierten Zellen zu finden (Guazzi et al., 2003).

Auch Genexpressionsänderungen von Zellzyklus- und Chromatin-assoziierten Genen lassen sich demnach sehr gut mit bereits untersuchten Vorgängen während neuronaler Differenzierungen korrelieren.

### Redox-Status

Eine weitere Auffälligkeit während der neuronalen Differenzierung der KMSZ war die differentielle Expression verschiedener Gene, die für Proteine codieren, welche in die Regulierung des Redox-Status involviert sind. Das mag auf den ersten Blick widersprüchlich sein, da Antioxidantien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder BHA (butyliertes Hydroxyanisol) im Differenzierungsmedium oxidativen Stress durch Neutralisierung von Radikalen eher reduzieren sollten. Es ist jedoch bekannt, daß zum Beispiel BHA eine stärkere Expression von Glutathion-S-Transferasen (GSTs) bewirkt, die eine wichtige Rolle im Metabolismus verschiedener Fremdstoffe und Karzinogene spielen (Kong et al., 2001). Auch wurde ein direkter Einfluß von Antioxidantien auf die Signaltransduktion durch die Änderung des zellulären Redox-Status gezeigt (Filomeni, 2002; Allen und Tresini, 2000). Reduzierende Substanzen erhöhen zum Beispiel die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, während die von NF-kB oder p53 reduziert wird (Sun und Oberley, 1996).

Dem Effekt von oxidierenden Substanzen, wie zum Beispiel Sauerstoffradikalen, kann die Zelle durch verschiedene antioxidative Mechanismen entgegenwirken. Diese beruhen im Wesentlichen auf der Oxidation von Glutathion oder Thioredoxin und verhindern dadurch die Oxidation zellulärer Proteine. Glutathion ist jedoch der wichtigste Redox-Puffer der Säugetierzelle (Filomeni, 2002). So stieg die Expression verschiedener Glutathion-S-Transferasen und der Glutathion-Synthase. Die Bedeutung des Redox-Status als Modulator zwischen Proliferation und Differenzierung wurde kürzlich für gliale Vorläuferzellen des ZNS gezeigt (Noble et al., 2003).

### Signaltransduktion

Die Medien zur neuronalen Differenzierung der murinen KMSZ enthielten unter anderem Substanzen wie Forskolin oder Valproinsäure. Von diesen ist bekannt, daß sie über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus und/oder Aktivierung von

Signaltransduktionswegen wie dem MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg z.B. die Ausbildung von Neuriten fördern (Hansen et al., 2003; Yuan et al., 2001). Außerdem kamen Wachstumsfaktoren wie bFGF und NGF zum Einsatz, die unter anderem neuroprotektive Eigenschaften besitzen und die neuronale Differenzierung fördern (Bonthius et al., 2003).

Neben Genen für Komponenten des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges sprechen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für die Aktivität anderer Signaltransduktionswege wie TGF- $\beta$ , G-Protein gekoppelte Signaltransduktion und den Delta-Notch Signalweg.

Auch die differentielle Expression einzelner anderer Gene ist hinsichtlich neuronaler Differenzierung interessant. So steigt die Expression des RTK-Liganden VEGF-A („vascular endothelial growth factor alpha“). VEGF-A ist zwar insbesondere in Perizyten und Zellen der glatten Muskulatur exprimiert (Witmer et al., 2003). Neben diesen Funktionen wurde jedoch gezeigt, daß VEGF Neuronen vor oxidativem Stress und daraus resultierendem Zelltod schützt (Li et al., 2003); außerdem fördert VEGF die Proliferation von Vorläufern kortikaler Neurone (Zhu et al., 2003). Ein weiterer RTK-Ligand, Ephrin B1, sinkt in seiner Expression, was im Zusammenhang mit der neuronalen Differenzierung der KMSZ interessant ist. Wie Elowe (2001) zeigte, führt die Ephrin B1-induzierte Aktivierung des Ephrin B2-Rezeptors in neuronalen Zellen zu einem Kollaps des Wachstumskegels und der Rückbildung von Neuriten. Eine konstitutive Expression von Ephrin B1 ist somit für die Ausbildung von Zellfortsätzen hinderlich.

### Transkriptionsfaktoren

Die Effektoren der Signaltransduktion sind die Transkriptionsfaktoren (TF). Sie binden an spezifische DNS-Sequenzen im Genom und inhibieren oder aktivieren spezifische Gene. Viele TF sind allerdings sehr niedrig exprimiert, und die Sensitivität von DNS-Mikroarrays reicht oft nicht aus, um diese niedrigen Transkriptlevel zu messen.

Die sinkende Expression der Helix-Loop-Helix-TF Id3 und Id4 (Id = „inhibitor of DNA-binding“) im Verlauf der neuronalen Differenzierung von KMSZ ist besonders interessant. Generell fördert eine konstitutive Expression von Id-Proteinen die Zellproliferation und blockiert ihre Differenzierung (Lasorella et al., 2001). In neuronalen Vorläufern verhindern Id-Proteine durch Dimer-Bildung mit bHLH-TF wie zum Beispiel Neurogenin die Differenzierung in Neurone oder Oligodendrozyten. Ihre Funktion in der neuronalen Differenzierung ist vielfach beschrieben (Tzeng, 2003; Jögi et al., 2002), z.B. die Herunterregulierung von Id3 im Zuge der NGF-induzierten neuronalen Differenzierung von

PC12 Zellen (Persengiev und Kilpatrick 1997). In *Xenopus* zeigt Id4 ein besonders breites Inhibierungspotential von bHLH-TF wie Neurogenin, NeuroD und MyoD (Liu und Harland, 2003).

Die Expression der Gene FoxD1 und FoxM1 sinkt ebenfalls während der neuronalen Differenzierung der KMSZ. FoxD1 ist im ZNS, in Niere und Testes exprimiert (Ernstsson et al., 1996; Cederberg et al., 1999) und aktiviert die Expression der RI $\alpha$ -Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase PKA (Dahle et al., 2002). FoxD1 wird in kranialen Zellen der Neuralleiste (s. Abschnitt 5.7) exprimiert, und durch „sonic hedgehog“ (shh) reguliert (Jeong et al., 2004). FoxM1 wird über shh und Gli1 aktiviert (Teh et al., 2002). Indirekt könnte dieses Ergebnis für ein aktives shh-Signal in den undifferenzierten Zellen sprechen, welches im Zuge der Differenzierung wegfällt, wodurch auch die Expression seiner nachgeordneten Signalfaktoren wie FoxD1 und FoxM1 sinkt.

Schlingensiepen (1993) zeigte, daß eine Jun-B-Inhibierung die NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen verhindert. Jun-B wird im Laufe der Differenzierung negativ reguliert, womit eine Funktion von Jun-B bei der neuronalen Differenzierung der KMSZ nahe liegt. KLF2 („lung kruppel-like factor“) wird in embryonalen Stammzellen exprimiert (Anisimov et al., 2002). Die sinkende Expression von KLF2 während der neuronalen Differenzierung der KMSZ könnte für eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der Zellen sprechen.

Für eine mögliche Erklärung der Fähigkeit von KMSZ, in einen neuronalen Phänotyp zu differenzieren, war jedoch die differentielle Expression des Transkriptionsfaktors Slug entscheidend.

Der Transkriptionsfaktor Slug ist in murinen KMSZ exprimiert, und seine Expression sinkt während ihrer Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp. Slug ist ein Zinkfinger-Protein der Snail-Protein-Familie. Das *Drosophila*-Protein Snail ist in den Prozess der Mesoderm-Entwicklung involviert und reprimiert die Expression von neuroepithelialen Genen während der Gastrulation (Alberga et al., 1991; Leptin et al., 1991). Das Slug-Protein ist entscheidend für epithelial-mesenchymale Transitionen (EMTs) in der Entwicklung verantwortlich. Als EMT bezeichnet man den Übergang von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp. Dieser geht mit einer Änderung der Mobilität der einzelnen Zellen einher und erfordert erhebliche Änderungen des Zytoskeletts. EMTs kommen in der Entwicklung bei der Bildung des Mesoderms durch Einwanderung von Zellen des Primitivstreifens in das Innere des Embryos, später bei der Auswanderung der Neuralleistenzellen aus dem sich schließenden Neuralrohr vor (siehe Abschnitt 5.7; Nieto et al., 1994; für Übersichtsartikel zu Slug, EMT

siehe Savagner, 2001; Shook und Keller, 2003). Die Expression von Slug wurde neben ihrer Bedeutung für die Initiierung von EMTs auch mit der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten mesenchymalen Zellstatus korreliert. Sie wird vor allem aber als einer der frühesten Marker für Zellen der Neuralleiste angesehen und bleibt in migratorischen Zellen der Neuralleiste bestehen. (Ros et al., 1997; Savagner, 2001 ; Knecht und Bronner-Fraser, 2002).

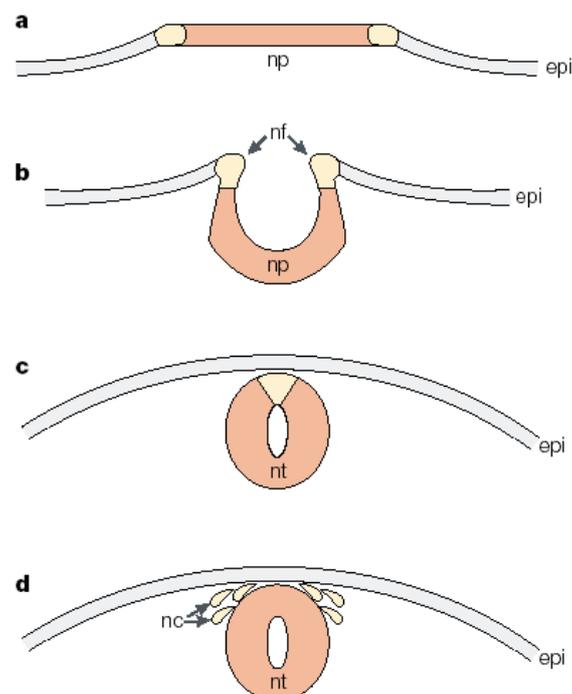
Daher wurde die Expression verschiedener anderer Neuralleisten-spezifischer Gene - alle nicht als Sonde auf dem verwendeten cDNS-Mikroarray vorhanden - im Verlauf der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ mittels sqRT-PCR getestet.

### **5.7 Knochenmarkstromazellen exprimieren Neuralleisten-spezifische Gene**

Neuralleistenzellen sind eine hoch migratorische embryonale Zellpopulation, welche sich während der Neurulation, d.h. der Bildung des Neuralrohres aus der Neuralplatte, zwischen dorsalem Neuralrohr und nicht-neuronalem Ektoderm bildet (s. Abb. 5.3). Die Existenz der Neuralleiste ist spezifisch für Vertebraten (genauer: Craniaten).

**Abb. 5.3:** Entwicklung der Neuralleiste (nc) in Embryonalentwicklung:

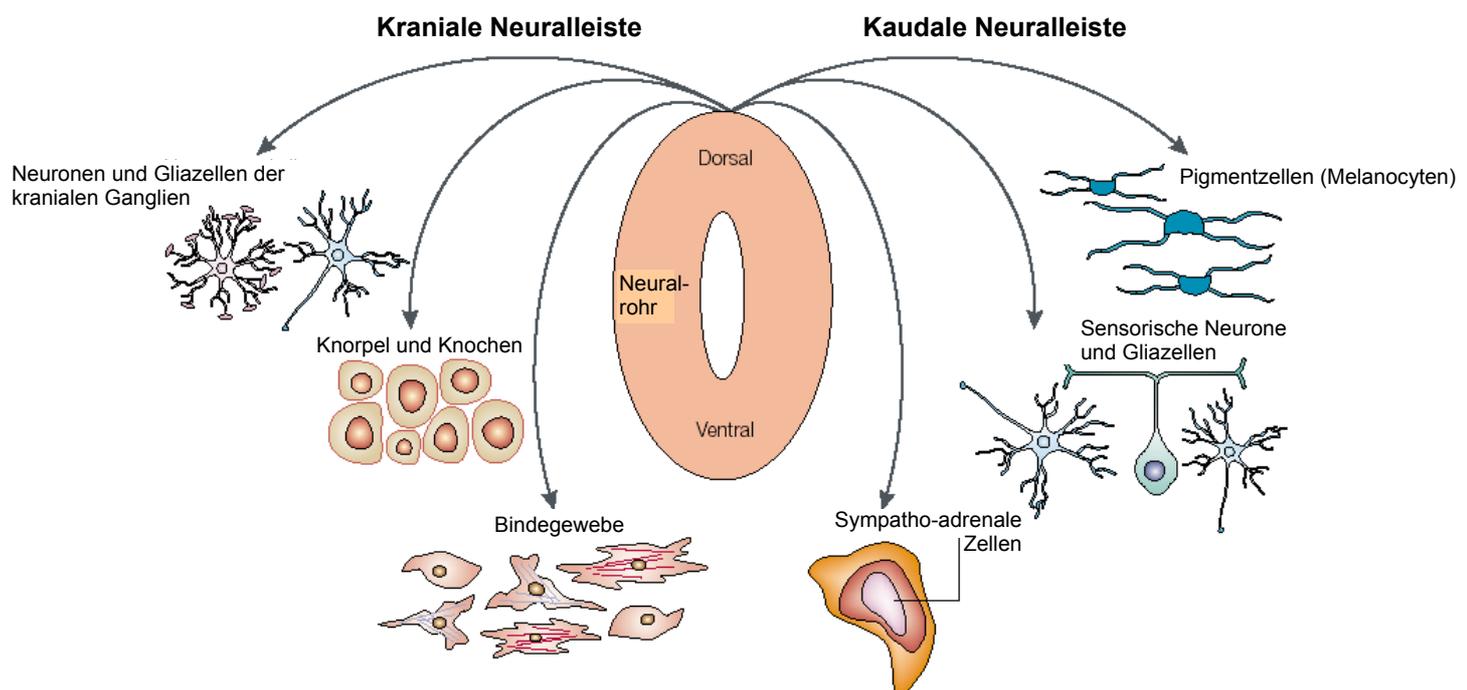
DIE NEURALPLATTE (NP) BILDET DURCH INVAGINATION DAS NEURALROHR (NT, A-C). DIE ZELLEN DER NEURALLEISTE WERDEN SCHON VOR IHRER EMIGRATION AUS DEM DORSALEN NEURALROHR, AM ÜBERGANG ZWISCHEN NEURALPLATTE UND NICHT-NEURALEM EKTODERM (EPI), SPÄTER DEN NEURALFALTEN (NF) SPEZIFIZIERT (HELLES ORANGE, A-C). SIE WANDERN ANSCHLIEßEND DORSAL ZWISCHEN NEURALROHR UND NICHT NEURONALEM EKTODERM AUS (D). (KNECHT UND BRONNER-FRASER, 2002)



Zellen der Neuralleiste tragen zur Bildung äußerst unterschiedlicher Gewebe bei. Sie wird deshalb auch als „viertes Keimblatt“ bezeichnet (Bronner-Fraser, 1993; Hall, 1999, 2000):

So entstehen aus der Neuralleiste Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystem (PNS), Melanozyten, glatte Muskelzellen, kraniofaciales Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe (Abb. 5.4). Interessanterweise weisen nicht nur die ursprünglichsten Stammzellen der Neuralleiste ein enormes Entwicklungspotential auf, sondern auch Neuralleisten-Derivate späterer Entwicklungsstadien. So wurde gezeigt, daß Schwann-Zellen *in vitro* durch Endothelin-3 in bipotente (Glia-Melanozyten) Stammzellen umgewandelt werden (Dupin et al., 2003). Dies führt u.a. zu der Einschätzung, daß Neuralleisten-Derivate auch im adulten Organismus zum Teil instabil determiniert sind (Le Douarin und Dupin, 2003).

Für das erstaunliche Differenzierungspotential adulter KMSZ findet sich bisher keine Erklärung. Ein reversibler mesenchymaler, ursprünglich jedoch neuroepithelialer Phänotyp, nämlich als Neuralleisten-Derivat, wäre eine Möglichkeit.



**Abb. 5.4:** Neuralleisten-Derivate:

ZELLEN DER NEURALLEISTE MIGRIEREN IN DEN GESAMTEN KÖRPER UND DIFFERENZIEREN IN VIELE VERSCHIEDENE ZELLTYPEN. ES BESTEHT EIN ANTEROPOSTERIORER GRADIENT HINSICHTLICH DER ZELLTYPEN, DIE VON DER NEURALLEISTE GEBILDET WERDEN: ZELLEN DER POSTERIOREN NEURALLEISTE BILDEN MELANOCYTEN, NEURONE UND GLIAZELLEN DES PNS, GLATTE MUSKELZELLEN; ZELLEN DER ANTERIOREN (KRANIALEN) NEURALLEISTE SIND AUßERDEM IN DER LAGE, MESENCHYMMALE GEWEBE WIE KNORPEL, KNOCHEN UND ANDERE BINDEGEWEBE ZU BILDEN. (KNECHT UND BRONNER-FRASER, 2002)

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren keine Anhaltspunkte dafür, daß Zellen der Neuralleiste ins Knochenmark wandern (Hall, 1999). Mit dem Transkriptionsfaktor Slug ist in KMSZ ein typisches Neuralleisten-Gen exprimiert. Die sqRT-PCR-Analysen weiterer Neuralleisten-spezifischer Gene ergaben, daß außer Slug noch drei andere wichtige Gene in undifferenzierten KMSZ exprimiert werden, die als früheste Marker spezifisch von Zellen der Neuralleiste exprimiert werden: Snail, Twist und Noelin-1.

Snail ist, wie auch Slug, bei Vertebraten maßgeblich an EMTs in der Entwicklung beteiligt und ebenfalls in prä-migratorischen Zellen der Neuralleiste exprimiert (Nieto, 2002). Während die Inhibierung von Slug im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und im Huhn (*Gallus gallus*) die Entstehung der migratorischen Zellen der Neuralleiste verhindert (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 2000), scheint in der Maus Snail der entscheidende Faktor für die EMT zu sein. So sterben Snail<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse früh in der embryonalen Entwicklung ab, während Slug<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse keine Entwicklungs-Defekte der Neuralleiste und ihrer Derivate zeigen (Carver et al., 2001; Jiang et al., 1998). Snail ist in der Lage, eine komplette EMT in epithelialen Zellen der Maus zu induzieren (Cano et al., 2000). Die sqRT-PCR-Ergebnisse zeigen zunächst eine Herunterregulierung der Snail Expression. Im Gegensatz zur Slug-Expression, die ab Induktion der neuronalen Differenzierung konstant niedrig bleibt, steigt die Expression von Snail wieder leicht an (siehe Abb. 4.15). Eventuell ist dies auf eine Funktion von Snail im Zellzyklus zurückzuführen. Vega et al. (2004) berichten, daß Snail den G1-S-Phase Übergang durch Repression der Cyclin D2-Expression blockiert. Sowohl die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen als auch Immunfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 (siehe Abb 4.9) zeigen den Proliferationsstopp der KMSZ nach Induktion der neuronalen Differenzierung.

Das Twist-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor der Helix-Loop-Helix-Familie. Twist Knockout-Mäuse zeigen eine Fehlfunktion beim Schließen des kranialen Neuralrohres sowie Fehlbildungen des kraniofazialen Mesenchyms, der Somiten sowie der Extremitätenanlagen (Chen und Behringer, 1995). Es ist in der kranialen Neuralleiste exprimiert und seine Funktion ist Voraussetzung für eine korrekte Differenzierung der kranialen Neuralleistenzellen (Gitelman, 1997; Soo et al., 2002).

Noelin („neuronal olfactomedin-related ER-localized protein“) ist ein sezerniertes Glykoprotein, welches in die Entstehung der Neuralleiste involviert ist. Seine Überexprimierung (in *G. gallus*) führt zu einer verstärkten und verlängerten Auswanderung der Neuralleistenzellen (Barembaum et al., 2000). Die Überexprimierung von Noelin in *Xenopus* führt zu einer verstärkten Neurogenese (Moreno und Bronner-Fraser, 2001). In der

Determinierung der Neuralleistenzellen im Neuralrohr spielt Noelin vermutlich eine entscheidende Rolle (Bronner-Fraser, 2002). Noelin ist in der Embryonalentwicklung der Maus in der Neuralplatte exprimiert, später im Gehirn und der kranialen Neuralleiste (Moreno und Bronner-Fraser, 2002).

Die Expression keines dieser Neuralleisten-spezifischen Gene wurde bisher im Knochenmark oder in Knochenmarkstromazellen gezeigt. Einzig für den Transkriptionsfaktor Slug wurde eine protektive Eigenschaft für hämatopoetische Zellen beschrieben (Perez-Losada et al., 2002).

Ein weiteres Gen, das unter anderem eine Funktion sowohl in der Induktion der Neuralplatte sowie der Entstehung der Neuralleiste hat, ist BMP4 („bone morphogenic protein 4“). BMPs gehören zur TGF-beta-Familie von Signalfaktoren („transforming growth factor beta“), welche vielfältige Funktionen in der Entwicklung u.a. bei der Induzierung des Mesoderms sowie bei der Ausbildung morphogenetischer Muster haben (Dale und Jones, 1999). BMP4 verhindert die Neuralisierung des embryonalen Ektoderms, die erst durch seine Inhibierung unter anderem durch Noggin ermöglicht wird, und bewirkt eine Dorsalisierung des Mesoderms (Zimmerman et al., 1996). BMP4 wird aber auch im dorsalen Neuralrohr exprimiert (*G. gallus*) und bewirkt sowohl die Determinierung der neuralen Stammzellen als Neuralleistenzellen sowie ihre Auswanderung (Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999). BMP4 hat also je nach Expressionszeitpunkt unterschiedliche Funktionen wie Inhibition der neuralen Entwicklung des embryonalen Ektoderms, Induktion der Neuralleistenzellen, sowie vielfältige Funktionen in der Ausbildung morphogenetischer Gradienten, die eine Interpretation der Herunterregulierung während der Differenzierung der KMSZ schwierig machen.

Alle bisher beschriebenen Gene (Slug, Snail, Twist, Noelin, BMP4) sind bereits in undifferenzierten KMSZ exprimiert und spielen eine Rolle bei der Neurulation, EMTs, der Mesoderm-Entwicklung, der Ausbildung von morphogenetischen Gradienten, vor allem aber bei der Induktion und frühen Spezifizierung der Neuralleiste. Daher wurde der Verlauf der Expression weiterer Gene, die in der Induktion und Differenzierung der Neuralleistenzellen eine Rolle spielen, in KMSZ und während ihrer neuronalen Differenzierung untersucht: Neurogenin, sowie Gene der Pax-, Wnt- und Sox-Familie.

Sox-Proteine („sry-related HMG-Box“) können anhand ihrer HMG-Domäne in zehn Untergruppen eingeteilt werden (Bowles et al., 2000). Sox-Proteine der Gruppe E (Sox-8, -9, -10) werden in verschiedenen Geweben exprimiert, vor allem aber auch in der Neuralleiste. Während Sox-8-Mutanten keinen schweren Phänotyp entwickeln (Sock et al., 2001), zeigen verschiedene Studien die Bedeutung von Sox-9- und Sox-10 für die korrekte Entwicklung der Neuralleiste (Spokony et al., 2002; Britsch et al. 2001; Dutton et al., 2001). Bei der Induktion der Neuralleiste im Neuralrohr sowie der Entwicklung der kranialen Neuralleiste spielt insbesondere Sox-9 eine entscheidende Rolle (Cheung und Briscoe, 2003; Spokony et al., 2002). Es wird unter anderem von Snail reguliert und induziert die Expression verschiedener Neuralleisten-spezifischer Gene wie Sox-10 und Wnt3a (Cheung et al., 2003). Diese Reihenfolge paßt zu den festgestellten Expressionsmustern während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ: Sox-9 wird deutlich bereits nach 24-stündiger Inkubation mit bFGF exprimiert, Sox-8 und -10 erst nach Induktion der neuronalen Differenzierung (siehe Abb. 4.16). Es ließe sich spekulieren, daß die Expression von Sox-9 die KMSZ für die Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp kompetent macht.

Mit Wnt-1 und Wnt-3a werden zwei weitere Gene exprimiert, deren Produkte zu einer Proteinfamilie wichtiger Signalfaktoren in der Entwicklung gehören (Cadigan und Nusse, 1997). Wnt-1 und Wnt-3a werden im dorsalen Neuralrohr exprimiert, zusammen mit BMP4, und spielen vermutlich nicht nur bei der Induktion, sondern vor allem auch bei der Aufrechterhaltung des Zellstatus und der Differenzierung der Neuralleistenzellen eine entscheidende Rolle (Saint-Jeannet et al., 1997; Yanfeng et al., 2003; Knecht und Bronner-Fraser, 2002; Dorsky et al., 2000). Beide werden im Laufe der Differenzierung heraufreguliert.

Transkriptionsfaktoren der Paired-Box-Familie (kurz Pax) sind ebenfalls in vielfältiger Weise in die Entwicklung von Vertebraten und Invertebraten involviert. Verschiedene Phänotypen konnten mit Mutationen in Pax-Genen assoziiert werden. So führt eine Deletion im Pax-3 in der Maus („splotch“-Mutante) zu Defekten in der Entwicklung des Neuralrohres und der Neuralleiste, beim Menschen zum Waardenburg-Syndrom (Wollnik et al., 2003). Mutationen im Pax-6 Gen führen zur „Small-eye“ Mutante, die Fehlbildungen der Augen, Nase und des ZNS zeigt (Callaerts et al., 1997), beim Menschen zur Aniridie (Fehlen der Iris, Hanson et al., 1993).

In der Neuralleiste ist Pax-3 zunächst in allen Zellen exprimiert, induziert aber insbesondere die Entwicklung von sensorischen Neuronen. So wurde gezeigt, daß Pax-3-Antisense-

Oligonukleotide die Entstehung von sensorischen Neuronen zu 80-90% inhibiert (Knecht und Bronner-Fraser, 2002; Koblar et al., 1999). Darüber hinaus induziert Pax-3 eine Epithelialisierung mesenchymaler Zellen, also eine MET (mesenchymal-epitheliale-Transition) und führt zu einer Zell-Aggregation, wenn es in mesenchymalen Zelllinien exprimiert wird (Wiggin et al., 2002). Pax-3 wird nach Induktion der neuronalen Differenzierung in KMSZ exprimiert. Dies ist in zweierlei Hinsicht interessant: Erstens wird mit Neurogenin ein zweites Gen aktiviert, welches die Entstehung sensorischer Neurone aus Zellen der Neuralleiste induziert (s.u.). Zweitens haben KMSZ ursprünglich einen mesenchymalen Phänotyp (=> MET), und es wurde eine Aggregation der Zellkörper während der Differenzierung beobachtet (s. Abb. 4.5 c-f).

Pax-6 ist während der Entwicklung bereits früh im Neuralrohr exprimiert, später in weiten Teilen des ZNS, und ist insbesondere involviert in die Entwicklung des Auges und des olfaktorischen Systems (Callaerts et al., 1997). Eine Mutation des Pax-6 Gens wurde mit einer fehlerhaften Migration von Neuralleistenzellen des anterioren Mittelhirns assoziiert (Matsuo et al., 1993). Im Neuralrohr ist Pax-6 eher ventral exprimiert. Seine Expression überlappt jedoch mit Pax-3, welches im dorsalen Neuralrohr exprimiert wird (Walther und Gruss, 1991). Kürzlich wurde gezeigt, daß das pro-neuronale Protein Neurogenin-2 direkt von Pax-6 reguliert wird (Scardigli et al., 2003).

Neurogenin-2 wird ebenfalls im Zuge der neuronalen Differenzierung der KMSZ exprimiert. Neurogenin-2 ist ein proneuraler Transkriptionsfaktor der Helix-Loop-Helix Familie, der die Expression neuronaler Gene fördert sowie die Expression glialer Gene unterdrückt (Morrison, 2001). Neurogenin-2 wurde mit der Entstehung von sensorischen Neuronen aus Neuralleistenzellen assoziiert (Zirlinger et al., 2002). Außerdem bewirkt Neurogenin-2 eine neuronale Differenzierung nicht-neuronaler Zellen der Retina (Yan et al., 2001).

Bereits undifferenzierte Knochenmarkstromazellen exprimieren also verschiedene Neuralleisten-spezifische Gene (Slug, Twist, Snail, Noelin). Während ihrer neuronalen Differenzierung aktivieren sie weitere Gene (Sox-, Pax-, Wnt-), die in dieser Kombination spezifisch im dorsalen Neuralrohr exprimiert werden, in welchem die Neuralleistenzellen entstehen.

Eine mögliche Erklärung für die Befunde dieser Arbeit wäre, daß KMSZ Neuralleistenzellen molekular ähneln und der neuronalen Differenzierung beider Zelltypen ähnliche genetische Programme zugrunde liegen.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß KMSZ neuroektodermaler Herkunft sind. Neuralleistenzellen weisen eine hohe Migrationsfähigkeit und ein breites Differenzierungsspektrum auf. Slug wird von undifferenzierten mesenchymal-neuroepithelialen Zellen exprimiert. Weiterhin wird vermutet, daß Neuralleisten-Derivate, wie auch KMSZ, adult nicht stabil determiniert sind (Le Douarin und Dupin, 2003).

Falls KMSZ von Neuralleistenzellen abstammen sollten – die Beweise müßten noch erbracht werden – , kann bei ihrer neuronalen Differenzierung weder von einer Transdifferenzierung noch von einem Sprung über Keimblattgrenzen hinweg (Mesoderm => Ektoderm) die Rede sein.

## **5.8 Ausblick**

Knochenmarkstromazellen stellen eine hochinteressante Zellpopulation dar: gewonnen durch die relativ undefinierte Selektion anhand ihrer adhäsiven Eigenschaften an Kunststoff-Zellkulturflaschen, zeigen sie *in vitro* und *in vivo* ein erstaunliches Entwicklungspotential. Bisher wurden sie nur mit Hilfe weniger Marker charakterisiert. Die Analyse der Genexpression muriner KMSZ erlaubt die Feststellung neuer Marker, die für eine genauere Charakterisierung und Isolierung verwendet werden können. Weiterhin wurde bislang davon ausgegangen, daß KMSZ mesodermaler Herkunft sind. Die Expression und Regulation des Transkriptionsfaktors Slug sowie anderer Neuralleisten-spezifischer Gene während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ führen zu der völlig neuen Frage, ob KMSZ von Neuralleistenzellen abstammen und damit neuroektodermaler Herkunft sind.

Bisher gibt es keine Hinweise auf eine Wanderung von Zellen der Neuralleiste ins Knochenmark. Allerdings wurde auch die Wanderung von Zellen der kranialen Neuralleiste und ihre Beteiligung bei der Entstehung des kraniofacialen Knochen-, Knorpel und Bindegewebes lange Zeit übersehen und zunächst angezweifelt (Hall, 1999).

Um die entwicklungsbiologische Herkunft von KMSZ untersuchen zu können, müßte die Wanderung von Neuralleistenzellen exakt verfolgt werden, z.B. durch „lineage tracing“. Hierbei würden Markerproteine wie GFP oder beta-Galaktosidase spezifisch von Zellen exprimiert, die in ihrer Entwicklung Neuralleisten-spezifische Gene wie Wnt-1 oder Slug exprimiert haben (Alvarez-Dolado et al., 2003; Brault, 2001; Lee et al., 2004). Anschließend könnte anhand der exprimierten Marker nachgewiesen werden, ob positive Zellen im Knochenmark vorhanden sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern somit grundlegend neue Ansatzpunkte für Untersuchungen zur Herkunft und Biologie von Knochenmarkstromazellen.