

**Charakterisierung von Apoptoseprozessen
während der Differenzierung von
humanen neuronalen VM197-Progenitorzellen *in vitro***

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Alexandra Jaeger

aus Rostock

Rostock, April 2010

Gutachter:

Prof. Dieter G. Weiss, Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

Prof. Arndt Rolfs, Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration,
Universität Rostock

Prof. Jochen Prehn, Physiology & Medical Physics, Royal College of
Surgeons in Ireland, Dublin, Irland

Datum des Wissenschaftlichen Kolloquiums: 31.05.2010

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Neurogenese.....	1
1.1.1. Kanonischer Wnt-Signalweg – ein Steuerungsmechanismus neuraler Differenzierungsprozesse.....	3
1.2. Bedeutung der Apoptose für die neurale Differenzierung.....	4
1.2.1. Allgemeine Charakteristika des Apoptoseprozesses.....	6
1.2.1.1. Der extrinsische Apoptosesignalweg.....	7
1.2.1.2. Der intrinsische Apoptosesignalweg.....	7
1.2.2. Spezielle Relevanz von Apoptoseproteinen während der Neurogenese.....	8
1.3. VM197-Zellen als Modellsystem neuraler Differenzierung.....	8
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Zellkultur.....	11
2.1.1. Verwendete Zelllinie.....	11
2.1.2. Kultivierung von VM197-Zellen.....	11
2.1.3. Zellzahlbestimmung.....	12
2.1.4. Passagieren von VM197-Zellen.....	13
2.1.5. Zelldifferenzierung und Zeitreihenerstellung.....	14
2.1.6. Kryokonservierung von VM197-Zellen.....	14
2.1.7. Revitalisierung von VM197-Zellen.....	15
2.1.8. Zellfixierung.....	15
2.2. Herstellung von Positivkontrollen mittels Apoptoseinduktoren.....	16
2.2.1. Apoptoseinduktion durch Staurosporin.....	16
2.2.2. Apoptoseinduktion durch UV-B-Strahlung.....	16
2.3. Quantitative Apoptosenachweismethoden.....	17
2.3.1. Mikroskopische Quantifizierung von spätapoptotischen VM197-Zellen ("apoptotic bodies").....	17
2.3.2. Durchflusszytometrische Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer VM197-Zellen mittels Annexin V-FITC/PI Assay.....	17
2.3.3. Sub-G1-Peak-Messung.....	18
2.4. Proliferationsnachweismethoden.....	18
2.4.1. Mikroskopische Quantifizierung von mitotischen VM197-Zellen.....	18
2.4.2. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung.....	18
2.4.3. Metaphaseplatten.....	19
2.4.4. MTT-Assay.....	20
2.5. Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.5.1. Herstellung von Proteinvolllysaten.....	21
2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford bzw. BCA-Assay.....	22
2.5.3. SDS-Page und Westernblot.....	24
2.5.4. Immunoblot.....	27

2.5.5.	Semiquantitative Proteinbestimmung.....	30
2.6.	Genexpressionsanalysen.....	30
2.6.1.	Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Prüfung der Intaktheit von RNA.....	30
2.6.2.	DNA-Microarrays.....	32
2.6.3.	Real-Time reverse Transkriptase-PCR.....	35
2.7.	Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Nachweismethoden.....	37
2.7.1.	Lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie von VM197-Zellen.....	37
2.7.2.	Proteinlokalisierung mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie.....	37
2.7.3.	Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des Zytoskeletts von VM197-Zellen.....	38
2.8.	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Neuronenanzahl in VM197-Zellen.....	39
2.9.	Untersuchungen zum Einfluss des kanonischen Wnt-Signalweges auf das Expressionsmuster Apoptose-relevanter Proteine.....	40
2.9.1.	Inhibierung von GSK-3 β in VM197-Zellen mittels SB216763.....	40
2.9.2.	Inkubation der VM197-Zellen mit rekombinantem Wnt-3a.....	40
2.10.	Statistik.....	41
3.	Ergebnisse.....	42
3.1.	Charakterisierung von differenzierenden VM197-Zellen.....	42
3.1.1.	Morphologie von VM197-Zellen.....	42
3.1.1.1.	Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung von VM197-Zellen.....	42
3.1.1.2.	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Neuronen- anzahl in VM197-Zellkulturen.....	44
3.1.1.3.	Veränderungen des Zytoskeletts während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	46
3.1.2.	Physiologie von differenzierenden VM197-Zellen.....	48
3.1.2.1.	Bestimmung der Zellzyklusverteilung in differenzierenden VM197-Zellkulturen.....	48
3.1.2.2.	Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellkulturen.....	50
3.2.	Charakterisierung apoptotischer Vorgänge in VM197-Zellen.....	51
3.2.1.	Quantitative mikroskopische Bestimmung apoptotischer VM197-Zellen.....	51
3.2.2.	Durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer VM197-Zellen.....	52
3.2.2.1.	Annexin V-FITC/PI-Assay.....	52
3.2.2.1.1.	Vitale (Annexin V-/PI-) VM197-Zellen während der Differenzierung.....	55
3.2.2.1.2.	Frühapoptotische (Annexin V+/PI-) VM197-Zellen während der Differenzierung.....	55
3.2.2.1.3.	Spätapoptotische bzw. nekrotische (Annexin V+/PI+) VM197-Zellen während der Differenzierung.....	56
3.2.2.1.4.	Zellkernfragmente (Annexin V-/PI+) von VM197-Zellen während der Differenzierung.....	57
3.2.2.2.	Sub-G1-Peak-Analyse.....	58

3.3.	Biochemischer Nachweis Apoptose-relevanter Proteine.....	59
3.3.1.	Überblick des Proteinscreenings.....	59
3.3.2.	Expressionsstatus Apoptose-relevanter Proteine während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	60
3.3.2.1.	Pro-apoptotische Proteine.....	60
3.3.2.1.1.	Bax (Bcl-2-associated X protein).....	60
3.3.2.1.2.	AIF (apoptosis inducing factor).....	61
3.3.2.1.3.	CAS (cellular apoptosis susceptibility protein).....	62
3.3.2.1.4.	Caspase-2 (apoptosis-related cysteine peptidase 2; neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 2).....	63
3.3.2.1.5.	Caspase-3 (apoptosis-related cysteine peptidase 3).....	64
3.3.2.1.6.	Caspase-7 (apoptosis-related cysteine peptidase 7).....	64
3.3.2.1.7.	Caspase-8 (apoptosis-related cysteine peptidase 8).....	65
3.3.2.1.8.	PARP (poly (ADP-ribose) polymerase).....	66
3.3.2.1.9.	Nip-1 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 1).....	67
3.3.2.1.10.	Bid (BH3 interacting domain death agonist).....	67
3.3.2.1.11.	Cytochrom c.....	68
3.3.2.2.	Anti-apoptotische Proteine.....	69
3.3.2.2.1.	Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2).....	69
3.3.2.2.2.	XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein).....	70
3.3.2.2.3.	Survivin.....	71
3.4.	Expressionsanalysen Apoptose-relevanter Gene in VM197-Zellen.....	71
3.4.1.	Zeitlicher Verlauf der Genexpressionsprofile während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	72
3.4.2.	Genontologische Analyse der Differenzierungs-relevanten Expressionsprofile von VM197-Zellen.....	72
3.4.3.	Expressionsstatus Apoptose-relevanter Gene während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	73
3.4.3.1.	Pro-apoptotische Gene.....	73
3.4.3.1.1.	Bax-Genexpression.....	73
3.4.3.1.2.	AIF-Genexpression.....	74
3.4.3.1.3.	CAS-Genexpression.....	74
3.4.3.1.4.	Caspase-2-Genexpression.....	75
3.4.3.1.5.	Caspase-3-Genexpression.....	76
3.4.3.1.6.	Caspase-7-Genexpression.....	76
3.4.3.1.7.	Caspase-8-Genexpression.....	77
3.4.3.1.8.	PARP-Genexpression.....	77
3.4.3.1.9.	Nip-1-Genexpression.....	78
3.4.3.1.10.	Bid-Genexpression.....	78
3.4.3.1.11.	Cytochrom c-Genexpression.....	79
3.4.3.2.	Anti-apoptotische Gene.....	79
3.4.3.2.1.	Bcl-2-Genexpression.....	79
3.4.3.2.2.	XIAP-Genexpression.....	80
3.4.3.2.3.	Survivin-Genexpression.....	80
3.4.4.	Verifizierung ausgewählter Gene mittels RT-PCR.....	81
3.4.4.1.	<i>bax</i> -Expression in differenzierenden VM197-Zellen.....	81
3.4.4.2.	<i>bcl-2</i> -Expression in differenzierenden VM197-Zellen.....	82

3.5.	Wnt-assoziierte Proteine und ihre mögliche Beteiligung an apoptotischen Prozessen während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	82
3.5.1.	Apoptose-induziertes β -Catenin-Cleavage in VM197-Zellen.....	82
3.5.2.	Die Behandlung von differenzierenden VM197-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 bewirkte eine Reduktion der Apoptoserate.....	83
3.5.2.1.	Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung.....	84
3.5.2.2.	Mikroskopische Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung während der Differenzierung.....	84
3.5.2.3.	Expressionsstatus von GSK-3 β , phosphoryliertem GSK-3 β und Apoptose-relevanten Proteinen in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung.....	85
3.5.3.	Wnt-3a führte zu keiner signifikanten Verringerung der Apoptose in VM197-Zellen.....	91
3.5.3.1.	Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a.....	92
3.5.3.2.	Mikroskopische Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a während der Differenzierung.....	92
3.6.	Untersuchungen des intrinsischen Apoptosesignalweges in differenzierten VM197-Zellen.....	93
3.6.1.	Expressionsstatus von Proteinen des intrinsischen Apoptosesignalweges.....	94
3.6.2.	Mikroskopischer Nachweis von Apaf-1 in VM197-Zellen.....	95
3.7.	Untersuchungen der Apoptosesuszeptibilität in differenzierten VM197-Zellen.....	96
4.	Diskussion.....	98
4.1.	Morphologische und physiologische Veränderungen von VM197-Zellen während der Differenzierung.....	98
4.1.1.	Mikroskopisch sichtbare Veränderungen des Zellhabitus und der Zytoskelettstrukturen von VM197-Zellen während der Differenzierung.....	98
4.1.2.	Zunahme von neuronalen VM197-Zellen im Differenzierungsverlauf.....	99
4.1.3.	Veränderung der Zellzyklusverteilung von VM197-Zellen während der Differenzierung.....	100
4.1.4.	Abnahme der Mitoseaktivität von VM197-Zellen während der Differenzierung.....	101
4.2.	Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf zellulärer Ebene.....	102
4.2.1.	Zunahme spätapoptotischer VM197-Zellen im mikroskopischen Bild während der Differenzierung.....	102
4.2.2.	Erhöhte, durchflusszytometrisch bestimmte, Apoptoserate in VM197-Zellkulturen während der Differenzierung.....	103
4.2.2.1.	Annexin V-FITC/PI-Assay.....	103

4.2.2.2.	Sub-G1-Peak-Messung.....	104
4.3.	Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf Proteinexpressionsebene.....	104
4.3.1.	Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter pro-apoptotischer Proteine in VM197-Zellen während der Differenzierung.....	104
4.3.2.	Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter anti-apoptotischer Proteine in VM197-Zellen während der Differenzierung.....	106
4.3.3.	Verringerte Apoptosesuszeptibilität von differenzierten gegenüber proliferierenden VM197-Zellen bezüglich der Apoptoseinduktion durch Staurosporin.....	106
4.4.	Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf Genexpressionsebene.....	107
4.4.1.	Zunahme von Expressionsänderungen Apoptose-relevanter Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung.....	107
4.4.2.	Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter pro-apoptotischer Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung.....	108
4.4.3.	Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter anti-apoptotischer Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung.....	108
4.5.	Beteiligung Wnt-assoziiierter Proteine an apoptotischen Prozessen während der Differenzierung von VM197-Zellen.....	109
4.5.1.	Apoptose-induziertes Cleavage von β -Catenin in VM197-Zellen.....	109
4.5.2.	Korrelation von GSK-3 β -Phosphorylierungsgrad und Apoptosestatus in differenzierenden VM197-Zellen.....	111
4.5.3.	Wnt-3a führte zu keiner signifikanten Verringerung der Apoptoserate in VM197-Zellen.....	114
5.	Zusammenfassung.....	116
6.	Literaturverzeichnis.....	118
	Danksagung.....	128
	Lebenslauf.....	129
	Selbständigkeitserklärung.....	132

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
3T3-Li	Adipozyten
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen
AG	Arbeitsgemeinschaft
AIF	apoptosis inducing factor
Akt	Serin/Threonin-Proteinkinase
Apaf-1	apoptotic peptidase activating factor 1
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	bicinchonine acid
BCBL-1	humane, primäre Effusionslymphomzellen
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-x	Bcl-2-like 1 protein
Bcl-xL	Bcl-2-like 1-extra large
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BMP4	bone morphogenic protein 4
bp	Basenpaar
BRUCE	baculoviral IAP repeat-containing 6
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAS	cellular apoptosis susceptibility protein
Cat.	Catalog
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
c-Myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	cAMP responsive element binding protein
cRNA	complementary ribonucleic acid
CTP	Cytidintriphosphat
Cy3	cyanine 3
d	Tag
d. h.	das heisst
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes doppelt destilliertes Wasser
DFF45	DNA fragmentation factor, 45 kDa

DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DG	Deckgläser
DISC	death inducing signaling complex
DMEM/F12	Dulbecco`s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dsh	dishevelled
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELAV	embryonic lethal abnormal visual family
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	mitogen-activated protein kinase 1
et al.	und andere
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Fas/CD 95/APO-1	Fas receptor (TNF receptor superfamily, member 6)
FasL/CD95L	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s ²); Gramm; Guanin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β
h	Stunde
H184A1	humane Brustepithelzelllinie
HA 14-1	ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate
HaCa4	murine Hautkarzinomzellen
HBS	Hepes Buffered Saline
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HIV	human immunodeficiency virus
hILP/XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
HuC/D	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3/4
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
IGF I/II	insulin-like growth factor I/II
Inc.	Incorporated
J	Joule
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
M	Molar
mA	Milliampere
MCA3D	epidermale Mauszellen
MCF-10A	humane, epitheliale, Estrogen- und Progesteronrezeptor negative Brustzellen
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells
Meckl.	Mecklenburg
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
Na ₃ O ₄ V	Sodiumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Nip-1	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 1
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
O4	immunoglobulin kappa variable 1D-37 (non-functional)
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	tumor protein p53
Paju	humane Tumorzelllinie
PARP	poly-(ADP-ribose)-polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Personalcomputer
PC12	Phäochromozytom-Zellen der Ratte
PCP	planar cell polarity
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
pmol	Pikomolar
PMT	Photomultiplier
PUMA	Bcl-2 binding component 3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RCSI	Royal College of Surgeons of Ireland
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. runs per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB216763	3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler

Smac/Diablo	second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI
STS	Staurosporin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
tBid	truncated BH3 interacting domain death agonist
TBS	Tris Buffered Saline
TCF	T-cell factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-Ethyldiamintetraacetat-Puffer
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TRADD	TNF-receptor type 1-associated via death domain
Trit/Benz	Trituration/Benzonase-Lösung
Tryp/Benz	Trypsin/Benzonase-Lösung
TTBS	Tris Buffered Saline plus Tween
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV-B	Ultraviolett-B
UV-C	Ultraviolett-C
V	Volt
VM197	human neural progenitor cells from ventral mesencephalon
v-myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
vs	versus
w/v	weight per volume
WISP-1	Wnt1 inducible signaling pathway protein 1
Wnt	<i>Wg - Wingless, Int-1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1. Neurogenese

Das Säugergehirn ist in seiner morphologischen und physiologischen Komplexität das komplizierteste Organ im Tierreich. Eine überschaubare Anzahl unterschiedlicher neuraler Zelltypen bildet dessen strukturelle Einheiten, die sich wiederum, beruhend auf spezifischen Verschaltungsmustern, zu einem neuronalen Netzwerk formieren. Ausgehend von einem ursprünglichen Pool neuraler, undifferenzierter Stamm- bzw. Progenitorzellen, führen funktionsspezifizierende Prozesse während der Neurogenese zur Ausbildung des reifen Gehirns und zur Erlangung kognitiver Fähigkeiten und ermöglichen somit derartige Leistungen wie Wahrnehmung, Lernen, Erinnern und Denken.

Die Neurogenese des menschlichen Organismus umfasst die Prozesse der zellulären Proliferation, Migration und Differenzierung (Rado, 2006) (Abb. 1.1.). Die Generierung ausgereifter, funktionsfähiger neuraler Zelltypen wie Neurone und Gliazellen aus undifferenzierten Zellstadien stellt dabei nicht nur ein Charakteristikum pränatalen, sondern ebenso postnatalen und adulten Lebens dar (Eriksson et al., 1998; Kempermann et al., 1997).

Während der Embryonalentwicklung bildet sich aus dem äußeren Keimblatt des Embryos, dem Ektoderm, zunächst die Neuralplatte, die sich während der weiteren Entwicklung zum Neuralrohr faltet. Die stark ausgeprägte Teilungsaktivität von Zellen im vorderen Neuralrohrbereich führt zur Bildung des primitiven Vorder- und Mittelhirns, währenddessen sich Zellen des hinteren Neuralrohrabschnittes zum Hinterhirn und Rückenmark formieren. Die Differenzierung neuraler Vorläuferzellen ektodermalen Neuralplattenursprungs zu unreifen Neuronen oder Gliazellen wird hierbei durch die Transduktion mesodermaler Signale initiiert (Kandel et al., 2000). Proteinen mit neural-induzierender Aktivität, wie beispielsweise Noggin, Chordin und Follistatin werden dabei regulatorische Funktionen zugeschrieben (Smith & Harland, 1992; Sasai et al., 1994; Hemmati-Brivanlou et al., 1994).

Nachfolgend wandern unreife Neurone aus der Keimzone zu ihren Bestimmungsorten im Gehirn und bilden axonale Ausläufer. Im jeweiligen Zielgebiet kommt es daraufhin zur Verzweigung der Axonenden und zur Knüpfung initialer synaptischer Kontakte mit ausgewählten Zielzellen. Diese vorläufigen Verbindungen manifestieren sich infolge aktivitätsabhängiger Modifikationen zu reifen neuronalen Verschaltungsmustern bzw. die jeweilige Zielzelle unterliegt aufgrund einer fehlenden Innervierung dem Zelltod (Kandel et al., 2000).

Neben der zuvor beschriebenen Fähigkeit multipotenter neuraler Stammzellen, zu verschiedenen distinkten neuralen Zelltypen zu differenzieren, stellt zudem deren Potenzial zur Selbstregeneration einen wichtigen neurophysiologischen Aspekt dar. Während die Regenerationskompetenz neuraler Stammzellen im Embryonalstadium in der Regel ubiquitär im Gehirn gegeben ist, beschränkt sich dieser Vorgang im adulten humanen Organismus nach derzeitigem Kenntnisstand auf sogenannte neurogene Regionen. Zu diesen Gehirnarealen wird zum einen die Subventrikularzone der lateralen Ventrikel gezählt, deren Zellen zum Bulbus olfactorius wandern und dort ihre Funktionalität erlangen. Zum anderen ist die Subgranularzone des, im Hippocampus gelegenen, Gyrus dentatus für die Ausbildung von Zellen zuständig, die in das lokale neuronale Netzwerk integriert werden (Kukekov et al., 1999; Kempermann 2002).

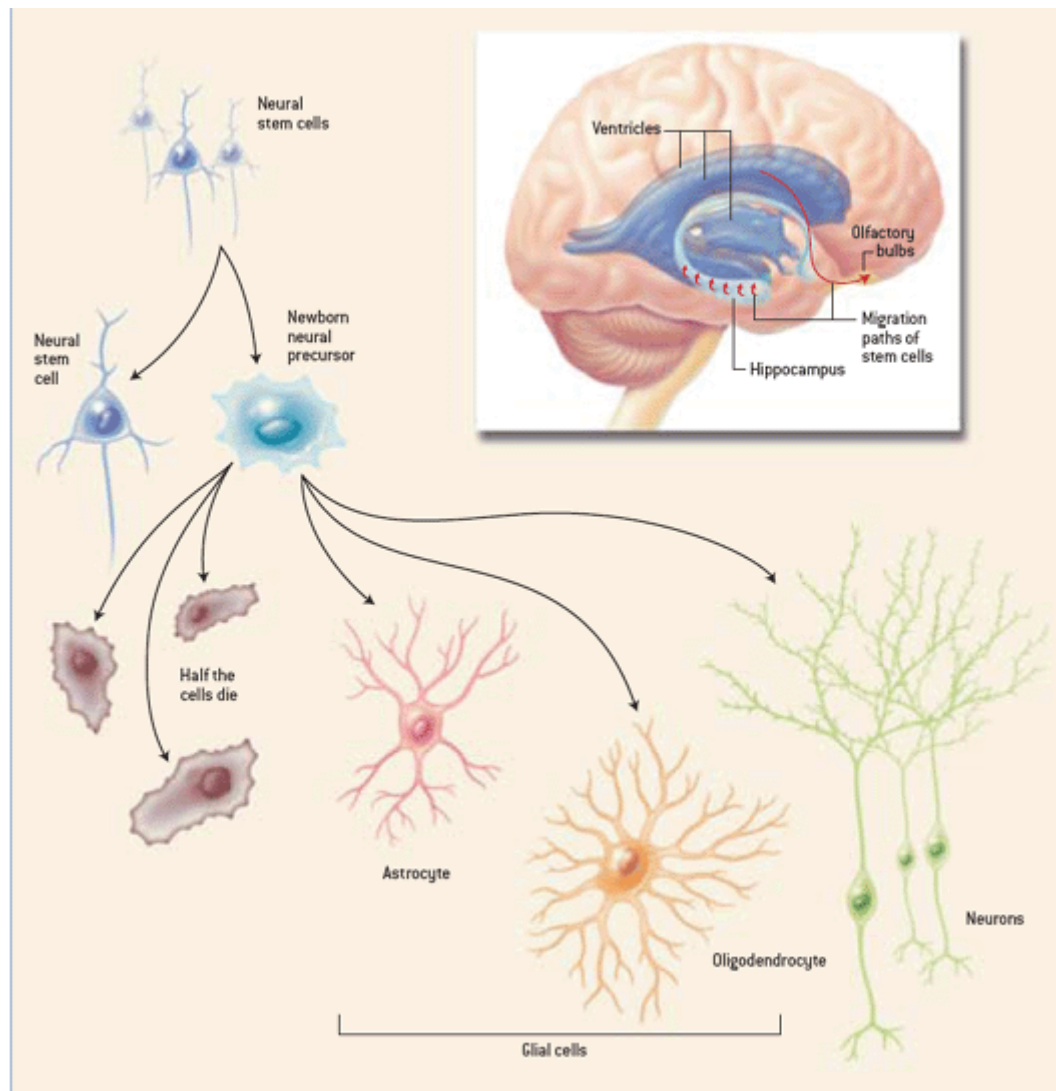


Abb. 1.1.: Neurogenese. Neuronale Stammzellen besitzen die Fähigkeit der Proliferation, der Selbstregeneration, der Migration und der Differenzierung. Sowohl im prä-, als auch im postnatalen Entwicklungsstadium reifen und undifferenzierte Stammzellen aus den Lateralventrikeln und dem Hippocampus des Gehirns zu verschiedenen neuronalen Zelltypen wie Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten aus und übernehmen spezifische Funktionen an ihren Bestimmungsorten. Während des Differenzierungsprozesses neuronaler Progenitorzellen unterliegt dahingegen etwa die Hälfte der ursprünglichen Zellpopulation der Eliminierung durch programmierten Zelltod. (www.rienstraclinic.com, 2007)

Das Wissen um die prinzipielle Existenz der Regenerationskapazität neuronaler Stamm- bzw. Progenitorzellen befeuert das wissenschaftliche Bestreben nach dem grundlegenden Verständnis der vielschichtigen Regulations- und Regenerationsmechanismen des humanen Nervensystems und damit nicht zuletzt auch die Hoffnung auf Heilung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, die in einer immer älter werdenden Gesellschaft zunehmend an Bedeutung gewinnen. Neue Erkenntnisse hinsichtlich entwicklungsregulatorischer Signalwege und die Erweiterung klinischer Methodenspektren könnten zukünftig gezielte Manipulationen in Richtung Wiederherstellung bzw. Stabilisierung neurozellulärer Integrität und Funktionalität erlauben und legitimieren.

1.1.1. Kanonischer Wnt-Signalweg – ein Steuerungsmechanismus neuraler Differenzierungsprozesse

Bisherige wissenschaftliche Studien belegen, dass der kanonische Wnt-Signalweg (Abb. 1.2.) einen essentiellen Regulationsmechanismus während der neuralen Differenzierung darstellt. Wnt-Gene kodieren für evolutionär hoch konservierte, sekretierte Proteine, die in der frühen Embryonalphase hauptsächlich für die Proliferation neuraler Stammzellen fungieren und in späteren Entwicklungsstadien die Spezialisierung neuraler Zelltypen und die Regeneration adulter Gewebsstrukturen gewährleisten (Logan & Nusse, 2004; Clevers, 2006; Castelo-Branco et al., 2003; Castelo-Branco et al., 2004).

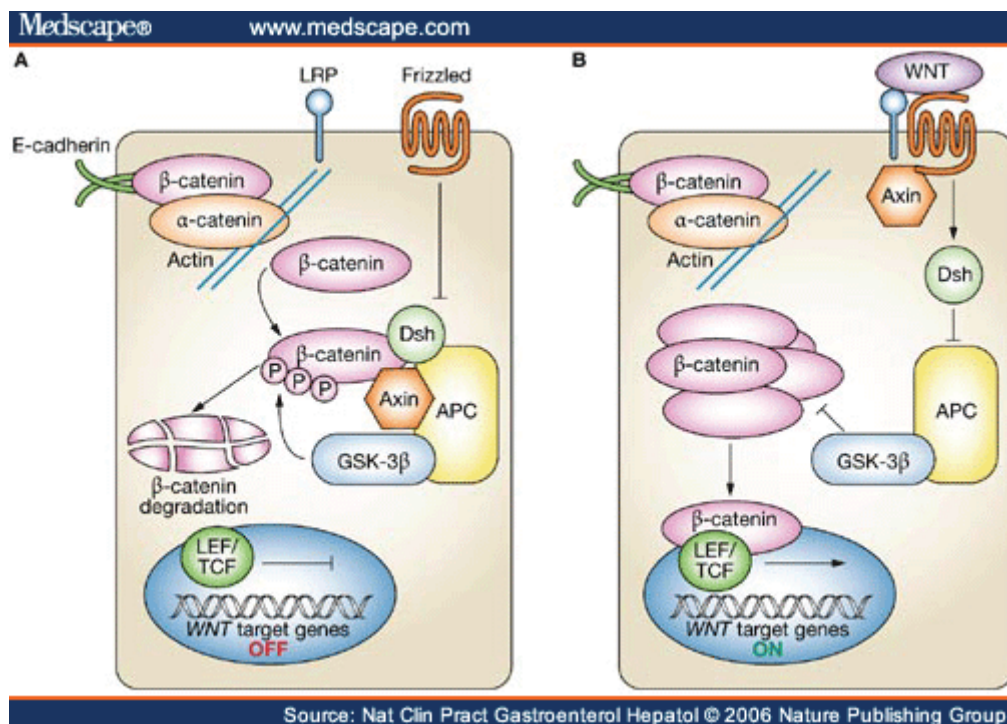


Abb. 1.2.: Kanonischer Wnt-Signalweg. Die Hauptkomponente des kanonischen Wnt-Signalweges stellt das Protein β -Catenin dar, das an intra- und interzellulären Signaltransduktionen sowie an der Stabilisierung des Zytoskeletts funktionell beteiligt ist. (A) In Abwesenheit von Wnt-Proteinen bleibt Dsh (dishevelled) im inaktiven Zustand und β -Catenin unterliegt dem Abbau durch den Degradationskomplex, bestehend aus APC (adenomatous polyposis coli), Axin und GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β). (B) Bindet Wnt an die Rezeptoren Frizzled und LRP (LDL-receptor-related protein), wird Dsh aktiviert und initiiert die Auflösung des Degradationskomplexes. Demzufolge akkumuliert β -Catenin im Zytosol der Zelle, wird in den Zellkern transportiert und beeinflusst dort über die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren LEF (lymphoid enhancer-binding factor) und TCF (T-cell factor) die Transkription bestimmter Zielgene, die unter anderem innerhalb der Signalwege der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose höherer Organismen von essentieller Bedeutung sind. (www.medscape.com, 2006)

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges erfolgt durch die Bindung von Wnt-Proteinen an Zelloberflächenrezeptoren der Frizzled- und LRP-Familien (LDL-receptor-related protein). Nachfolgend bewirkt die Interaktion verschiedener Zytosolproteine die Stabilisierung von β -Catenin, welches die Hauptkomponente des kanonischen Wnt-Signalweges darstellt. Der

Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma folgt dessen Translokation in den Zellkern, wo es die Transkription von bestimmten Zielgenen wie z. B. *cyclin D1*, *c-myc*, *E-Cadherin*, *BMP4*, *Naked*, *WISP-1* beeinflusst, die wiederum in die Regulation des Zellzyklus, der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung eingebunden sind (Nusse, 1999).

Zudem ist bekannt, dass einige Mitglieder der Wnt-Familie wichtige Funktionen hinsichtlich der Apoptoseregulation aufweisen (Ille & Sommer, 2005). Die Wnt-Signalweg-induzierte Hochregulation der Expression von IGF I/II (insulin-like growth factor) induziert anti-apoptotische Effekte in der Präadipozytenzelllinie 3T3-Li (Longo et al., 2002). Speziell der kanonische Wnt-Signalweg unterdrückt vermutlich Apoptoseprozesse durch die Inhibierung der c-Myc-induzierten Freisetzung von Cytochrom c und durch Caspaseinaktivierung (reviewed in Ille & Sommer, 2005). Andererseits wird dem kanonischen Wnt-Signalweg zudem eine pro-apoptotische Wirkung bei distinkten Entwicklungsstufen der Neuralrohrformierung zugesprochen. Hasegawa et al. (2002) beschrieben eine massive Induktion der Apoptose von Zellen der Neuralleiste im Mausmodell durch eine konditionelle Abnahme von APC (adenomatous poliposis coli) nach Stabilisierung von β -Catenin. Die Unterdrückung von β -Catenin im dorsalen Rückenmark soll ebenfalls apoptotische Prozesse forcieren (reviewed in Ille & Sommer, 2005). Beurel & Jope (2006) postulierten, dass GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) paradoxerweise einerseits den intrinsischen Apoptosesignalweg forcieren kann, aber andererseits den extrinsischen Apoptosesignalweg inhibiert.

Ein detailliertes Verständnis der Interkonnektivität zwischen Wnt-Signalweg-gesteuerter neuraler Differenzierung und Apoptose fehlt jedoch noch weitgehend. Dieser Punkt wurde als eine Fragestellung in der vorliegenden Arbeit formuliert und bearbeitet.

1.2. Bedeutung der Apoptose für die neurale Differenzierung

Die Entwicklung neuraler Stammzellen zu funktional spezialisierten, neuronalen Zelltypen, stellt, wie zuvor beschrieben, einen Balanceakt zwischen Proliferation, Selbstregeneration, Differenzierung und Zelltod dar.

Der Übergang vom Proliferations- zum Differenzierungsstadium neuraler Stammzellen geht mit einer erhöhten Apoptoserate einher, die sich nicht nur auf die frühe Entwicklungsphase des Nervengewebes beschränkt, sondern auch den späten "neurotrophen Zelltod" in differenzierten Neuronen einschließt, der durch einen Mangel an Neurotrophen (nerve growth factor, NGF; Neurokine; brain-derived neurotrophic factor, BDNF) initiiert wird (Yeo & Gautier, 2004).

Die Regulation des kontrollierten, apoptotischen Zellverlustes im Nervensystem ist hinsichtlich der Aufrechterhaltung der normalen Homöostase und der Modellierung von Hirnstrukturen während der Embryonal- und Fetalentwicklung von großer Bedeutung (Mazarakis et al., 1997). In nahezu allen Regionen des zentralen und des peripheren Nervensystems folgt auf die Überproduktion von Nervenzellen eine drastische Reduktion der Zellanzahl um etwa die Hälfte (Oppenheim, 1991; Biebl et al., 2000; Winner et al., 2002). Als Ursachen für den apoptotischen, neuronalen Zellverlust werden die Neuorganisation des neuronalen Netzwerkes, Korrekturen falscher Verknüpfungen und transiente Funktionen eliminiertes Zellen benannt (Burek & Oppenheim, 1999; Pettmann & Henderson, 1998). Im Überschuss gebildete Neurone stehen in Konkurrenz mit ihren Nachbarzellen hinsichtlich neurotropher Faktoren (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951/1953; Hamburger & Levi-Montalcini, 1949; Cohen & Levi-Montalcini, 1956). Neurone, die keine synaptische Verbindung zu einer Zielzelle etabliert haben und nicht innerviert wurden, unterliegen somit dem Eliminierungsprozess durch Apoptose (Raff, 1992; Raff et al., 1993;

Arenas & Persson, 1994; Snider, 1994). Zudem nimmt die Apoptose eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen und neurodegenerativen Erkrankungen ein (Nijhawan et al., 2000). Das in Abbildung 1.3. dargestellte Modell neuronaler Apoptoseregulationswege verdeutlicht die Komplexität der beteiligten Regulationsmechanismen.

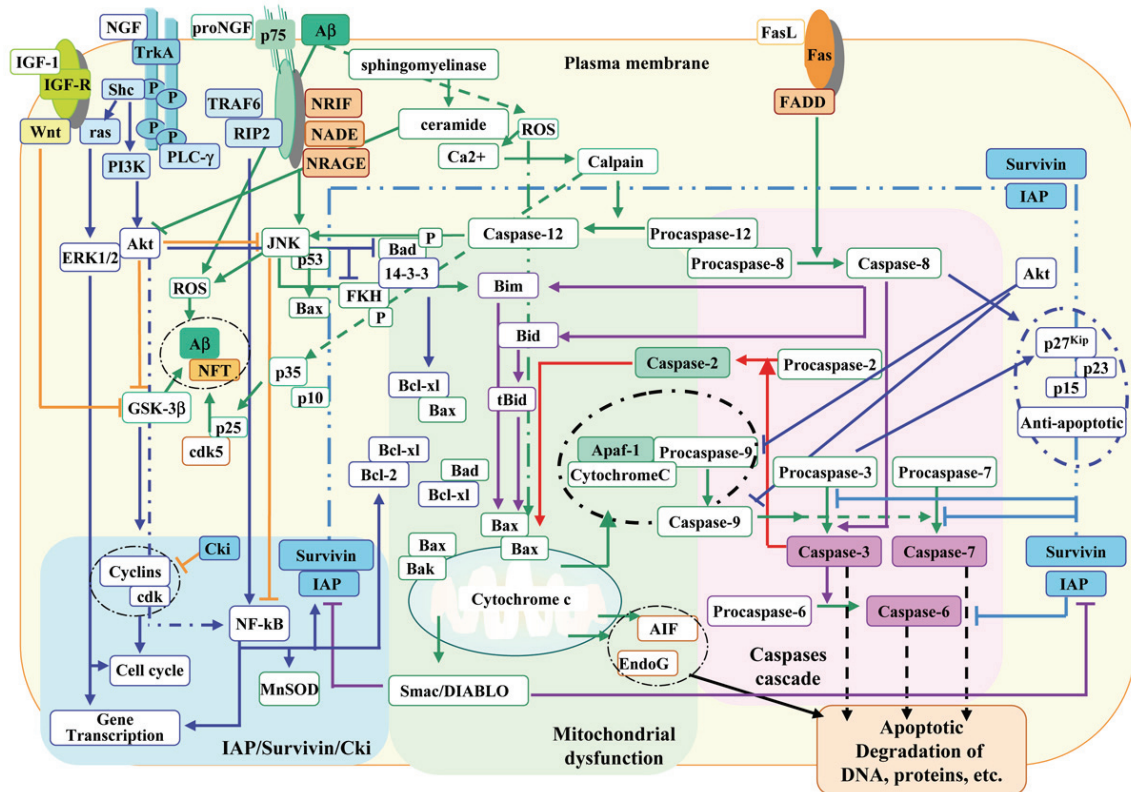


Abb. 1.3.: Modell neuronaler Apoptoseregulationswege. Die dargestellte Übersicht molekularer Ereignisse in neuronalen Zellen beruht auf dem derzeitigen Wissensstand über die, von Apoptose beeinflussten, Regulationsmechanismen während der Ausprägung neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer. Die Interkonnektivität von Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung und Transformation in neuronalen Zellen stellt die Basis für ein derartig komplexes Informationssystem dar. In diesem Kontext repräsentieren die Mitochondrien (grünes Feld) die zentralen Elemente der Apoptose-Maschinerie, die für eine Signalverstärkung apoptotischer Prozesse, für eine Herabregulation der Wachstumsfaktorsignalwirkung, den mitochondrialen Influx freigesetzter Kalzium-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum und die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als zelluläre Antwort auf Gehirnschäden verantwortlich sind. Den Mitochondrien kommt in diesem Modell somit die Funktion des Hauptsensors für neuronale Stressantworten (gelbes Feld) zu und eine Signalfreisetzung resultiert nachfolgend in spezifischen zellulären Effekten. Die dunkelblauen und –grünen Pfeile zeigen Überlebens- und Apoptose-Signalwege an. Orange Pfeile symbolisieren inhibierende Signale. Rote Pfeile stehen für positiven Feedback, während lilafarbene und hellblaue Pfeile den Cross-talk zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptosesignalweg bzw. die Überlebenskontrolle durch IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) darstellen. (Alberghina & Colangelo, 2006)

Eine gezielte Beeinflussung neuraler Differenzierungsprozesse zugunsten anti-apoptotischer Vorgänge könnte das Regenerationspotenzial neuraler Stamm- bzw. Progenitorzellen steigern und demnach eine spezifische funktionale Regeneration von neuronalen Strukturen begünstigen.

Regulatorischen Komponenten der Apoptose-Signalkaskade, wie beispielsweise Mitgliedern der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis protein), der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma 2 family) und den Caspasen gilt ein Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit. Insbesondere soll deren Apoptose-limitierende Funktion und die damit einhergehende verringerte Apoptosesuszeptibilität ausdifferenzierter neuraler Zellen (Wright et al., 2004) untersucht werden.

1.2.1. Allgemeine Charakteristika des Apoptoseprozesses

Die Apoptose (griech.: von *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“, wie das Fallen der Blätter im Herbst) ist eine Form des programmierten Zelltods, die genetisch determiniert ist, als physiologisch sinnvoll gilt und nach einem vorgeschriebenen Programm abläuft (Kerr et al., 1972). Durch einen extra- bzw. intrazellulären Apoptosestimulus aktivierte Zellen unterliegen dem streng kontrollierten Eliminierungsprozess, der evolutionär hochkonserviert ist und demnach einen essentiellen Bestandteil der Entwicklungsbiologie und der Überlebensstrategie komplexer, mehrzelliger Organismen darstellt.

Der Apoptosemechanismus verhindert effektiv die unkontrollierte Zellvermehrung und führt, im Fall gestörter Reparaturmechanismen oder der drohenden Manifestierung von DNA-Schäden, zum regulierten Zellabsterben (Mazarakis et al., 1997). Der energieverbrauchende Apoptoseprozess besitzt eine kardinale Funktion während der Embryogenese, der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase von Vertebraten sowie der Immunantwort (Arends & Wyllie, 1991; Ellis et al., 1991; Cohen et al., 1992), wobei eine Balance zwischen Proliferation von Zellen und der Apoptose von entscheidender Bedeutung ist. Dysfunktionen zu Gunsten verstärkter Apoptose treten unter anderem bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson bzw. bei HIV-Erkrankungen (human immunodeficiency virus) in Erscheinung (Engidawork et al., 2001; Gougeon, 1997). Eine verringerte Apoptosesuszeptibilität ist dahingegen während der Pathogenese und Biologie maligner Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Virusinfektionen zu beobachten (Ashwell et al., 1994; Bargou et al., 1996).

Zahlreiche pro- als auch anti-apoptotische Proteine sind sowohl in der extrinsischen, als auch in der intrinsischen Apoptosesignaltransduktion involviert, wobei Einzelkomponenten der beiden Signalkaskaden miteinander interagieren können (Li et al., 2006; Hengartner, 2000).

Zellen, die dem Apoptoseprozess unterliegen, sind durch bestimmte Veränderungen ihrer Morphologie und ihrer Biochemie charakterisiert. Obwohl die Membranintegrität einer Zelle während der Apoptose erhalten bleibt, tritt ein Verlust der Zelladhäsion auf, was zu einem Herauslösen der betroffenen Zelle aus dem Zellverband führt und mit einer Abkuglung und Schrumpfung der Zelle (cell shrinkage) verbunden ist. Zudem zieht die Externalisierung des Phospholipides Phosphatidylserin von der Membraninnen- auf die Membranaußenseite („eat-me-signaling“) die Ausstülpung der Plasmamembran (membrane blebbing) nach sich (Fadok et al., 1992). In späteren Apoptosestadien wird die Kondensierung des Chromatins, der Abbau genomischer DNA und die Fragmentierung des Endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns sowie des Golgi-Apparates erkennbar. Die Aktivierung distinkter Proteasen (Caspasen) zieht die proteolytische Spaltung intrazellulärer Substrate nach sich, wobei die Zelle in membranumschlossene Vesikel (apoptotic bodies) zerfällt, die von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert und abgebaut werden (Wyllie & Duvall, 1992).

1.2.1.1. Der extrinsische Apoptosesignalweg

Die extrinsische Apoptosesignaltransduktion wird durch Rezeptoren der TNF-Familie (Tumornekrosefaktor-Familie; z. B. Fas-Rezeptor/CD95) vermittelt. Die Bindung des dazugehörigen Liganden (FasL/CD95L) resultiert in die Bildung eines Apoptose-induzierenden Signalkomplexes (death inducing signaling complex, DISC). Dabei zieht die Trimerisierung des Rezeptors die Formierung einer spezifischen Struktur seiner intrazellulären Todesdomänen nach sich, woraufhin die Adaptermoleküle TRADD (TNF-receptor type 1-associated death domain protein) und FADD (Fas-associated death domain) binden und nachfolgend Caspasen aktivieren können (Krammer, 2000). Im weiteren Verlauf des Apoptoseprozesses rekrutiert FADD Pro-Caspase-8, die sich infolge lokaler Aufkonzentrierung autokatalytisch aktivieren kann. Aktive Caspase-8 aktiviert nachfolgend die Effektorcaspasen-3 und -7, die letztendlich eine Degradierung der betroffenen Zelle initiieren (Akhtar & Roth, 2006).

In einigen Zellen vermittelt aktive Caspase-8 die Spaltung von Bid (BH3 interacting domain death agonist) zu tBid (truncated Bid), welches nachfolgend eine Bax (Bcl-2-associated X protein)-vermittelte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken kann und somit eine Konnektivität zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptosesignalweg darstellt (Luo et al., 1998). Ein Beispiel für diese Art der Apoptoseinitiierung könnte die Aktivierung von Pro-Caspase-8 durch die autokatalytisch aktivierte Caspase-2 darstellen, wobei Letztgenannte vor allem in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Bonzon et al., 2006).

1.2.1.2. Der intrinsische Apoptosesignalweg

Die intrinsische Apoptosesignaltransduktion kann entweder durch den extrinsischen Apoptoseweg oder durch intrazellulären Stress, wie DNA-Schäden oder Wachstumsfaktorentzug, aktiviert werden (Parone et al., 2003; Maurer et al., 2007). Infolge dieser Stimuli werden pro-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie wie Bid oder Bax im Zytoplasma der betroffenen Zelle aktiviert, binden an die äußere Mitochondrienmembran und interagieren dort mit anti-apoptischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) (Akhtar & Roth, 2006). Entsteht durch diese Wechselwirkung ein Ungleichgewicht zugunsten der pro-apoptischen Signalkomponenten, resultiert aufgrund einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) eine Dysfunktion der Mitochondrien und die Ausschüttung von Cytochrom c (Liu et al., 1996) und Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) (Du et al., 2000) in das Zytoplasma.

Die Freisetzung von Smac/Diablo führt zur Inhibierung von Proteinen der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis protein) (Verhagen et al., 2000). Das zytoplasmatische Cytochrom c bindet zusammen mit dATP an Apaf-1, das nachfolgend eine Konformationsänderung erfährt und daraufhin Pro-Caspase-9 binden kann. Pro-Caspase-9 wird innerhalb dieses oligomeren Apoptosomkomplexes gespalten und aktiviert (Zou et al., 1997). Aktive Caspase-9 mobilisiert nachfolgend die Effektorcaspasen-3 und -7 (Acehan et al., 2002), die den programmierten Tod der betroffenen Zelle forcieren.

Neben der Freisetzung von Cytochrom c kann die Externalisierung von AIF (apoptosis inducing factor) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma einen weiteren Apoptosestimulus darstellen. Hierbei kann es, unabhängig von der Aktivierung von Effektorcaspasen, zur Initiierung des Apoptoseprozesses kommen (Cheung et al., 2005).

1.2.2. Spezielle Relevanz von Apoptoseproteinen während der Neurogenese

Die wenigen bisherigen wissenschaftlichen Studien belegen, dass sowohl pro-, als auch anti-apoptotischen Proteinen regulatorische Funktionen während der Neurogenese zugeschrieben werden können. Lindsten et al. (2003) postulierten, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak (Bcl-2-antagonist/killer) für die Limitierung der Anzahl neuraler Progenitorzellen im adulten Gehirn der Maus von Bedeutung sind, auf die Differenzierung dieser Zellen allerdings keinen Einfluss haben. Zudem wiesen Vekrellis et al. (1997) eine geringere Apoptosesuszeptibilität in PC12-Zellkulturen nach Herunterregulation der Bax-Expression nach. Den gleichen Effekt zeigten Wright et al. (2004) bzw. Lindholm & Arumae (2004) in PC12-Zellen, der in dieser Studie hingegen auf eine differenzierungsbedingte Proteinexpressionsabnahme von Apaf-1 und den gleichzeitigen Anstieg an IAPs zurückgeführt wurde. Die Arbeit von Biebl et al. (2000) führt den Beweis, dass neurogen-aktive Gehirnareale adulter Ratten eine 20-800-fach höhere Dichte an apoptotischen Zellen aufweisen, deren Entstehung mit der Aktivierung von Caspase-2, -3 und -9 begründet wurde. Die Arbeitsgruppe von Jiang et al. (2005) zeigte die anti-apoptotische Funktion von Survivin in neuralen Vorläuferzellen der Maus, wobei Caspase-3, -7 und -9 deaktiviert wurden. Dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 wird eine regulatorische Funktion hinsichtlich der Ausprägung von neuronalen Differenzierungsmerkmalen der humanen Zelllinie Paju zugeschrieben (Zhang et al., 1996).

Aufgrund der gut überschaubaren Literatur wurden alle benannten Proteine unter anderem im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Funktionalität während der Differenzierung der humanen neuralen Progenitorzelllinie VM197 analysiert.

1.3. VM197-Zellen als Modellsystem neuraler Differenzierung

Angesichts der, in den letzten Jahren in unserer alternden Gesellschaft zu beobachtenden, Zunahme neurodegenerativer Erkrankungen, rückt die Erforschung neuraler Stammzelltherapien verstärkt in den Fokus der Wissenschaft. Bisher etablierte experimentelle Arbeiten beruhen meist auf der Anwendung adulter, fetaler und embryonaler Nagerstammzellkulturen. Versuche mit äquivalenten humanen Stammzellen lieferten in dieser Hinsicht nur bedingt plausible Forschungsergebnisse, da sich diese Zellen über einen längeren Kultivierungszeitraum meist instabil hinsichtlich ihres Phänotyps verhalten (Donato et al., 2007).

Im Vergleich dazu stellt die Entwicklung immortalisierter, humaner, neuraler Stammzelllinien einen wesentlichen Fortschritt in der neuromedizinischen Forschung dar.

Die hierzu zählende und in der vorliegenden Arbeit verwendete, humane, neurale Progenitorzelllinie "ReNcell VM197" zeigt nach retroviraler Transduktion mit dem *v-myc* Onkogen eine unbegrenzte Regenerationskapazität und einen, über mehrere Passagen hinweg, stabilen Phäno- und Genotyp (Donato et al, 2007). Die ursprünglich aus dem ventralen Mesencephalon stammenden, multipotenten VM197-Zellen können nach einem standardisierten Protokoll problemlos in serumfreiem Medium als Monolayerkultur über längere Zeit kultiviert und passagiert werden. Ein Entzug der Mitogene bFGF (basic fibroblast growth factor) und EGF (epidermal growth factor) induziert auf simple Weise die Differenzierung, der zuvor undifferenzierten, Nestin-positiven VM197-Zellen, in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Diese verschiedenen neuralen Zelltypen weisen differenzierungsspezifische, phänotypische Veränderungen auf, wodurch das Stadium der Zelldifferenzierung eindeutig vom Proliferationsstadium der

VM197-Zellen abgrenzbar ist und eine funktionelle Vergleichsanalyse beider Entwicklungszeitpunkte gewährleistet wird.

Unter Verwendung eines Präaggregationsprotokolles wachsen VM197-Zellen zunächst in Form von Neurosphären und differenzieren nachfolgend auf zuvor beschriebene Weise, wodurch die Bildung elektrophysiologisch aktiver Neurone begünstigt und der Anteil dopaminerger Neurone erhöht wird.

Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die humane, neurale VM197-Progenitorzelllinie ein attraktives *In-vitro*-Modell für die Analyse regenerativer Systeme im Allgemeinen und für die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson im Speziellen dar, da bei diesen Organpathologien ventrale Mittelhirnareale betroffen sind, die zu einem Großteil aus dopaminergen Neuronen bestehen, deren Vorläuferzellen zu einem gewissen Prozentsatz auch im adulten Organismus regenerieren können.

Einen konkreten Ansatzpunkt bezüglich der Funktionalität und der Interkonnektivität von neuraler Differenzierung und Apoptose liefert die Arbeit von Hoffrogge et al. (2006), die belegt, dass das Protein Ubiquilin-1, welches vor neuronaler Apoptose schützt, in VM197-Zellen während der Differenzierung herunterreguliert ist.

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Daten hinsichtlich der Proliferation, der Differenzierung und des programmierten Zelltodes von VM197-Zellen liefern wichtige Erkenntnisse bezüglich grundlegender Forschungsaspekte neuraler Progenitorzellen und stellen somit greifbare Fakten dar, die zum Verständnis der hochkomplexen intrazellulären Signalkaskaden während der Neurogenese beitragen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, am Beispiel der humanen, neuralen Progenitorzelllinie VM197, das Auftreten apoptotischer Prozesse während ihrer Differenzierung nach Wachstumsfaktorentzug zu charakterisieren.

Im Einzelnen soll:

- unter Anwendung mikroskopischer und durchflusszytometrischer Methoden, die Zeitspanne der neuralen Differenzierung von VM197-Zellen erfasst werden, in der signifikante Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie, der Proliferationsaktivität, der Zellzyklusverteilung und des apoptotischen Zellverlustes im Vergleich zum Proliferationsstadium der VM197-Zellen zu verzeichnen sind.
- die Quantifizierung apoptotischer Vorgänge anhand zellbiologischer und proteinbiochemischer Parameter erfolgen, wobei bei Letzterem, neben der immunfluoreszenztechnischen Lokalisierung, vor allem der Proteinexpressionstatus pro- und anti-apoptotischer Proteine in gewonnenen Zelllysaten mittels spezifischer Antikörper beschrieben wird, um Aufschluss über die Funktionalität und den Aktivierungsstatus des intrinsischen bzw. des extrinsischen Apoptosesignalweges während der Differenzierung von VM197-Zellen zu geben.
- der Erkenntnisgewinn, der aus diesen Versuchen resultiert, durch Expressionsanalysen Apoptose-relevanter Gene mittels DNA-Microarrayversuchen und quantitativer Real Time-PCR verifiziert werden.

- die Exposition von proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung durchgeführt werden, um Aussagen über die generelle Apoptosesuszeptibilität der VM197-Zellkulturen treffen zu können.
- im Anschluss an die Beweisführung, dass der Differenzierungsprozess der VM197-Zellen einerseits mit einem apoptotischen Zellverlust und/oder auch mit einem anti-apoptotischen Zellschutzprogramm einhergeht, weiterführend gezeigt werden, dass Differenzierungsprozesse und Apoptose miteinander interagieren. Hierzu sollen Hauptkomponenten des kanonischen Wnt-Signalweges, der eine entscheidende regulatorische Funktion hinsichtlich der neuralen Zelldifferenzierung einnimmt (Ille & Sommer, 2005), experimentell manipuliert und die hieraus resultierenden Apoptose-relevanten Effekte mittels Mikroskopie und auf proteinbiochemischer Ebene beschrieben und analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Verwendete Zelllinie

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit der humanen neuronalen Progenitorzelllinie ReNcell™ VM197 (ReNeuron Group PLC, Guildford, UK) durchgeführt, die ursprünglich aus dem ventralen Mesencephalonbereich eines zehn Wochen alten Fötus gewonnen und mittels einer retroviralen Transduktion mit dem *v-myc* Onkogen immortalisiert wurde (Donato et al., 2007).

Die VM197-Zelllinie zeichnet sich durch ein schnelles Monolayerwachstum mit einer Verdopplungszeit von 20 bis 30 Stunden aus, wobei durch den Entzug von Wachstumsfaktoren eine rasche Zelldifferenzierung zu dopaminergen Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten induziert werden kann. Die äußerst stabilen geno- und phänotypischen Merkmale der VM197-Zellen und die Ausbildung spontan elektrophysiologisch aktiver Neurone zeichnet diese Zelllinie als ein geeignetes Forschungsmodell für pharmakologische Studien hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, als auch für Studien bezüglich Neurotoxizität und Neurogenese aus (siehe Produktbeschreibung www.millipore.com; Cat. SCC008).

2.1.2. Kultivierung von VM197-Zellen

- Begasungsbrutschränke (BB 6220 bzw. BB 16; Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany; Cat. 51011605 bzw. 51008331)
- Pipetten (Eppendorf Research; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Laminin (Cultrex® Mouse Laminin I; Trevigen, Gaithersburg, Maryland/USA; Cat. # 3400-010-01)
- Deckgläschen (ø 13 mm; Kindler GmbH & Co, Freiburg im Breisgau, Germany; Cat. # O2R131-D)
- Sterilbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Germany bzw. Antair BSK Sicherheitswerkbank; Anthos, Siegburg, Germany)
- 24-Lochplatten (TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. # 92424)
- Zellkulturflaschen – 25 cm² und 75 cm² (TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. # 9026 und Cat. # 90076)
- 6-well plates TPP # 92406
- Poly-D-Lysin (PDL, Endkonzentration 25 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. P-7280)
- Proliferationsmedium
 - 498,5 ml Differenzierungsmedium
 - 0,5 ml basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/ml; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. # 13256-029)
 - 1 ml epidermal growth factor (EGF, 20 ng/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # E-9644)
- Differenzierungsmedium
 - 485 ml Dulbecco`s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. # D-5796)

- 10 ml B27 (50x; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. # 17504-044)
 - 5 ml Glutamin (200 mM; Gibco/Invitrogen; Carlsbad, USA; Cat. # 25030-024)
 - 1 ml Heparin (5000 U/ μ l; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # H-3149)
 - 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. # 15750-037)
- Sterilfiltration:
- BD Plastikpak Einwegspritze 50 ml; Becton Dickinson Medical Systems, Drogheda, Ireland; Cat. 300865
 - Spritzenfilter 0,22 μ m (TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. 99722)

Die Kultivierung der VM197-Zellen erfolgte für etwa drei Tage in Proliferationsmedium in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchte.

Vor Aussaat der Zellen in entsprechende Zellkulturgefäße wurden diese mit Laminin beschichtet, um eine bessere Anhaftung der Zellen an die Plastikoberfläche zu gewährleisten. Dafür wurde eine bestimmte Menge an kaltem DMEM/F12 mit Laminin im Verhältnis 1:100 vermischt, in die Gefäße pipettiert und dort für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lamininlösung entfernt, das Gefäß einmal mit warmem DMEM/F12 gespült und die Zellen in Proliferationsmedium ausgesät.

Deckgläschen hingegen wurden vor der Laminierung auf Alufolie befindlich mit einem Bunsenbrenner in einer Sterilbank abgeflammt, in 24-Lochplatten gelegt, mit je 80 μ l Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das PDL wurde danach entfernt, die Deckgläschen einmal mit Aqua dest. gespült, anschließend 20 min unter UV-C-Strahlung in der Sterilbank getrocknet und dann, im Vorfeld der Versuchsansätze, laminiert oder einige Tage bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Nach Aussaat der Zellen in die Kulturgefäße erfolgte eine meist dreitägige Kultivierung bei 37 °C im Brutschrank. Bei einer Zelldichte von maximal 60 % bis 80 % wurden die Zellen gesplittet oder auf Differenzierungsmedium umgestellt und in einigen Versuchen zusätzlich mit einem Stressor (Staurosporin; UV-B-Strahlung) behandelt.

2.1.3. Zellzahlbestimmung

- Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer 0,1 mm; Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Germany)
- Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T-8154)
- Eppendorfgefäß (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)
- Durchlichtmikroskop (Nikon TMS-F Inverted Microscope, Japan; Objektiv E.10, 0.25, 160/-, Ph1 DL; Okular CFWE 10 x A/18)

Um die Aussaat einer jeweils definierten VM197-Zellzahl in entsprechend verwendete Zellkulturgefäße zu gewährleisten, erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mittels eines Hämocytometers. Dafür wurde die VM197-Zellsuspension jeweils mit Trypanblaulösung in einem Eppendorfgefäß im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 vermischt, ein Tropfen davon in die Zählkammer überführt und die Zellzahl mittels eines inversen Durchlichtmikroskops bei 100-facher Vergrößerung

ermittelt. Die Trypanblaufärbung ermöglichte in dem Zusammenhang die Diskriminierung vitaler Zellen von toten Zellen und Zelldebris.

2.1.4. Passagieren von VM197-Zellen

- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. 14170)
- 15 ml Falcon (TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. # 91015)
- Labofuge 400 R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)
- Trypsin/Benzonase-Lösung (Sterilfiltration)
 - 100 ml Trypsin/EDTA in 1x HBSS (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. 25300)
 - 10 µl Benzonase[®]-Endonuklease (250 U/µl; Merck KG aA, Darmstadt, Germany; Cat. # 1.01654.0001)
- Trituration/Benzonase-Lösung (Sterilfiltration)
 - 172,7 ml DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. # D-5796)
 - 9,09 ml Human Serum Albumin Grifols[®] (HAS, 20 %; Instituto Grifols, S.A., Barcelona, Spain; Cat. # 720604)
 - 100 mg Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # T-6522)
 - 18,2 µl Benzonase[®] (250 U/µl; Merck KG aA, Darmstadt, Germany; Cat. # 1.01654.0001)

Tab. 2.1.: Aussaatdichten der VM197-Zellen in entsprechende Kulturgefäße

96 Lochplatte	24 Lochplatte	6 Lochplatte	25 cm ² Flasche	75 cm ² Flasche
0,2 x 10 ⁴ Zellen	0,6 x 10 ⁴ Zellen	0,2 x 10 ⁵ Zellen	0,1 x 10 ⁶ Zellen	0,3 x 10 ⁶ Zellen
200 µl Medium	1 ml Medium	3 ml Medium	5 ml Medium	15 ml Medium

Die VM197-Zellen wurden bei Erreichen eines, zu 60 % bis 80 % konfluenten, Zellmonolayers gesplittet und in neue Zellkulturgefäße passagiert. Dabei wurde zunächst das Proliferationsmedium aus dem Zellkulturgefäß entfernt und die adhärenen Zellen einmal mit warmem HBSS gewaschen, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen. Je nach Größe des Zellkulturgefäßes (siehe Tab. 2.1.) wurden die Zellen anschließend mit 1 bis 2 ml Trypsin/Benzonase-Lösung überschichtet und für mindestens 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Gefäßuntergrund erfolgte die Zugabe von 2 bis 4 ml Trituration/Benzonase-Lösung, die die proteolytische Wirkung des Trypsins neutralisiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon pipettiert und für 5 min bei RT und 126 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in entsprechender Zelldichte in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

2.1.5. Zelldifferenzierung und Zeitreihenerstellung

- Phosphate Buffered Saline (PBS; selbst angesetzt)
 - 0,2 g/l Kaliumchlorid (KCl; Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Germany; Cat. # 6781.1)
 - 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. # A 3620)
 - 8 g/l Natriumchlorid (NaCl; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. # A 3597)
 - 1,15 g/l *di*-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 ; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. # A 3567)
- Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline-Gebrauchslösung (PBS; Autoklavieren)
 - 50 ml 10x PBS (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria; Cat. H15-011)
 - 450 ml Aqua dest.

Die Einleitung der Differenzierung der VM197-Zellen erfolgte nach dreitägiger Proliferation mittels einer einmaligen Waschung der Zellen mit warmem PBS und anschließender Zugabe von warmem Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und zu bestimmten Differenzierungszeitpunkten im Zeitreihenprinzip (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h) beprobt. Eine Zellprobe des Proliferationszeitpunktes (0 h) wurde jeweils als Kontrollbezugspunkt mitgeführt.

2.1.6. Kryokonservierung von VM197-Zellen

- Labofuge 400 R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)
- Einfriermedium
 - Differenzierungsmedium
 - 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # 4540)
- Kryoröhrchen (2 ml; TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. 89020)

Mittels Kryokonservierung wurde ein gewisser Vorrat an VM197-Zellbeständen, bevorzugt niedrigerer Passagen, angelegt.

Die Zellen wurden dafür zunächst aus dem Zellkulturgefäß abtrypsiniert, in Triturationslösung resuspendiert und in einem 15 ml Falcon für 5 min bei 126 x g zentrifugiert. Die Zellzahlbestimmung (siehe 2.1.3.) erfolgte vor dem Zentrifugationsschritt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt (circa 2-3 x 10⁶ Zellen/ml). Die so aliquotierten Zellen wurden schrittweise für 2 h bei -20 °C und anschließend für mehrere Tage bei -80 °C kryokonserviert, bevor sie für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff bei -196 °C eingebracht wurden.

2.1.7. Revitalisierung von VM197-Zellen

- Labofuge 400 R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)

Bei Bedarf wurden eingefrorene VM197-Zellen eines Kryoröhrchens zügig in einem 15 ml Falcon, in dem bereits 10 ml vorgewärmtes Proliferationsmedium vorgelegt wurden, aufgenommen und bei 126 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und verworfen, wohingegen das Zellpellet in 15 ml Proliferationsmedium resuspendiert und die Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät wurden. Nach zwei- bis dreitägiger Kultivierung wurden die Zellen gesplittet und entsprechend des Versuchsaufbaus weiter passagiert.

2.1.8. Zellfixierung

- Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA-Lösung)
 - 80 ml Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - 4 g Paraformaldehyd (PFA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # P-6148); pH 7,3 einstellen
 - 4 g Sucrose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # S-0389)
 - Aqua dest. ad 100 ml
- Stopp-Lösung (50 mmol Ammoniumchlorid, NH₄Cl)
 - 0,268 g Ammoniumchlorid (Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Germany; Cat. # K298.1)
 - PBS ad 100 ml
- Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A0688)
- Labofuge 400R (Rotor 8179; Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany)

Im Vorfeld zu indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden VM197-Zellen auf Deckgläschen mittels Paraformaldehyd fixiert. Dafür wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit warmem PBS gespült, die DG in eine neue 24-Lochplatte überführt, mit jeweils 0,5 ml PFA-Lösung überschichtet und für 20 min bei RT fixiert. Die Zellfixierung wurde nachfolgend für 10 min durch Zugabe von je 0,5 ml NH₄Cl-Lösung bei RT gestoppt. Die DG wurden danach zweimal für 5 min in kaltem PBS gespült und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

VM197-Zellpräparate, die für DNA-Färbungen vorgesehen waren, wurden zuvor mit Methanol fixiert. Zunächst wurde dafür das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen, die DG in eine neue 24-Lochplatte überführt und mit jeweils 0,5 ml Methanol bei -20 °C für 20 min fixiert. Das Methanol wurde anschließend entfernt, die DG luftgetrocknet und bis zur Färbung dunkel und kühl (4 °C) gelagert.

Die Methanol/Eisessig-Fixierung der VM197-Zellen, die für die Metaphaseplatten-Versuche verwendet wurden, ist unter Punkt 2.4.3. beschrieben.

Die, für die durchflusszytometrische Neuronenquantifizierung vorgesehenen, VM197-Zellen wurden analog dem Passagieren der Zellen (siehe 2.1.4.) mit HBSS gewaschen und abtrypsinisiert. Die Zellsuspension wurde nachfolgend für 10 min bei 126 x g und 4 °C

zentrifugiert und das Pellet in 200 µl PBS (RT) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen mit -20 °C kaltem Methanol gefüllten 15 ml Falcon gegeben und im Gefrierschrank für 20 min bei -20 °C fixiert.

2.2. Herstellung von Positivkontrollen mittels Apoptoseinduktoren

Unter Verwendung der Apoptoseinduktoren Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung wurden Apoptosesignalkaskaden auf unterschiedliche Art und Weise in VM197-Zellen unter Differenzierungsbedingungen eingeleitet (Klum, 2008).

2.2.1. Apoptoseinduktion durch Staurosporin

- Staurosporin (STS; 1 mM/ml Stammlösung in DMSO; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. S4400)

Der Proteinkinaseinhibitor und Apoptoseinduktor Staurosporin wurde bis zu einer Endkonzentration von 1-2 µM in Differenzierungsmedium verdünnt, auf die VM197-Zellen gegeben und für drei Stunden bei 37 °C im Begasungsbrutschrank bis zur anschließenden Probennahme auf ihnen belassen.

2.2.2. Apoptoseinduktion durch UV-B-Strahlung

- UV-181 Bestrahlungsgerät (Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Germany)
- UV-B Kompaktstrahler (UV 6, Breitband, 36 W; Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Germany)
- Petrischalen (60x15 mm bzw. 100x20 mm; TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. 9360 bzw. 93100)

Die Bestrahlung der Zellen mit UV-B ($\lambda = 315 \text{ nm} - 280 \text{ nm}$) wurde mit einem Waldmann UV-181 Bestrahlungsgerät unter einer Sterilbox durchgeführt. Das Gerät wurde mit fünf Kompaktstrahlern für UV-B ausgestattet. Vor der jeweiligen UV-B-Behandlung wurde das Proliferationsmedium aus den Zellkulturgefäßen entnommen und die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen. Für die anschließende Strahlenexposition wurden die Zellkulturgefäße invers auf die Glasoberfläche des Bestrahlungsgerätes UV 181 positioniert und mit einer UV-B-Dosis von 0,45 J/cm² bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen im Differenzierungsmedium für vier Stunden bis zur Zellernte bei 37 °C im Begasungsbrutschrank weiterkultiviert.

2.3. Quantitative Apoptosenachweismethoden

Um quantitative Aussagen hinsichtlich des Apoptoseverhaltens proliferierender und differenzierender VM197-Zellen treffen zu können, wurde die Apoptoserate in diesen Zellen vor und nach Wachstumsfaktorentzug unter Anwendung nachfolgend beschriebener Methoden erfasst.

2.3.1. Mikroskopische Quantifizierung von spätapoptotischen VM197-Zellen ("apoptotic bodies")

- Bisbenzimidlösung (Hoechst Nr. 33258; Endkonz. 1 µg/ml in Aqua dest.; 1 mg/ml Stammlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. B1155)
- Mowiol-Eindeckmedium (Calbiochem/Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Germany)
- Mounting-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. M1289)
- Objektträger (Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Germany)
- Leica DMRB fluorescence microscope (Leica Camera AG, Solms, Germany; Leica Okular L PLAN 10x/25; Objektiv PL APO 63x/1.32-0.6 OIL)

Um Aussagen über die Anzahl apoptotischer VM197-Zellen in proliferierenden, differenzierenden und mit Staurosporin-behandelten bzw. UV-B-bestrahlten Kulturen treffen zu können, wurden die, auf DG befindlichen und mittels Methanol fixierten, VM197-Zellen in einer 24-Lochplatte mit je 0,5 ml Bisbenzimidlösung überschichtet und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Präparate einmal mit PBS bei RT gespült, luftgetrocknet und in Mowiol bzw. Mounting-Medium auf Objektträgern eingedeckt. Die Präparate wurden lichtgeschützt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Beurteilung der DG-Präparate hinsichtlich des Auftretens apoptotischer VM197-Zellen erfolgte unter UV-Lichtanregung (Anregungs-λ 350 nm; Emissions- λ 460 nm) des DNA-Farbstoffes an einem Fluoreszenzmikroskop bei 630-facher Vergrößerung. Pro Analysezeitpunkt wurden drei DG mit jeweils 6 x 500 Zellen bezüglich des Auftretens von "apoptotic bodies" ausgewertet.

2.3.2. Durchflusszytometrische Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer VM197-Zellen mittels Annexin V-FITC/PI Assay

- Annexin V-FITC/PI-Assay (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, San Diego, USA; Cat. 556547 bzw. Annexin V Alexa Fluor 488 Conjugate, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. A13201 und PI, 1 mg/ml Stammlösung in Aqua dest., AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A2261)
- Durchflusszytometer (EPICS ALTRA und ALTRA HyPerSort, Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- Beckman Coulter EXPOTM32 MultiCOMP Software (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

- EXPO32 v 1.2 Analysis Programm (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

Die VM197-Zellen wurden für die Apoptoseanalyse mittels Annexin V-FITC/PI-Assay in 24-Lochplatten ausgesät. Zu entsprechenden Kultivierungszeitpunkten wurde der jeweilige Mediumüberstand in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, die Zellen einmal mit warmem PBS gespült, für 2 min mit jeweils 200 µl Tryp/Benz abgelöst und mit je 400 µl Trit/Benz vermischt. Die Zellsuspension wurde zum Überstandsvolumen dazupipettiert und alles zusammen für 5 min bei 126 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und maximal $0,1 \times 10^6$ Zellen mit 100 µl 1x Bindepuffer vermischt. Danach erfolgte die Zugabe von je 5 µl Annexin V-FITC und PI. Die Zellsuspension wurde kurz gevortext, für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert, nochmals mit 400 µl 1x Bindepuffer verdünnt und innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer analysiert. Je Probe wurden 5000 bis 10000 Events gemessen (PMT2, 900 nm, Annexin V-FITC; PMT4, 528 nm, PI) und anschließend mit Hilfe der Beckman Coulter EXPOTM32 MultiCOMP Software und dem EXPO32 v 1.2 Analysis Programm ausgewertet. Ungefärbte und jeweils mit Annexin V-FITC bzw. PI einfach gefärbte VM197-Zellen wurden als Eigenfluoreszenzkontrolle und für die Fluoreszenz-kompensation mitgeführt.

2.3.3. Sub-G1-Peak-Messung

Zusammen mit der, unter Punkt 2.4.2. beschriebenen, Zellzyklusanalyse der VM197-Zellen wurde der Anteil an apoptotischen Zellen anhand des Sub-G1-Peaks bestimmt, da apoptotische Zellen hingegen den Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen und dementsprechend eine geringere Fluoreszenz zeigen.

2.4. Proliferationsnachweismethoden

Mit Hilfe verschiedener Proliferationsassays wurden Ergebnisse hinsichtlich der Mitoseaktivität und des Zellzyklusverlaufs proliferierender und differenzierender VM197-Zellen gewonnen.

2.4.1. Mikroskopische Quantifizierung von mitotischen VM197-Zellen

Die Anzahl mitotisch aktiver VM197-Zellen wurde wie unter Punkt 2.3.1. beschrieben in Hoechst-gefärbten Zellpräparaten während der Proliferation, während der Differenzierungszeitreihe und nach Behandlung mit Staurosporin (siehe 2.2.1.) bzw. UV-B-Strahlung (siehe 2.2.2.) quantifiziert.

2.4.2. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung

- Hepes Buffered Saline (HBS, sterilfiltriert)
 - 9 g/l Natriumchlorid (NaCl, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A3597)

- 3,33 g/l Hepes (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany; Cat. # 25245); pH 7,5 einstellen
- ad Aqua dest. 1 l
- Labofuge 400 R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)
- 70 % Ethanol (Ethanol absolut in Aqua dest.; AppliChem, Darmstadt, Germany; Cat. A1613)
- RNase-Lösung (Ribonuclease I, E. coli 10 u/μl, Fermentas GmbH, Baden-Württemberg, Germany; Cat. EN0601)
- Wasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany)
- MultiCycle-Software (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA)

Unter Anwendung der Propidiumiodidfärbung (siehe 2.3.2.) wurden der DNA-Gehalt und damit die Zellzyklusverteilung proliferierender, als auch differenzierender VM197-Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt.

Dafür wurde das Medium von, sich in 24-Lochplatten befindlichen, Zellen abgenommen und verworfen und die Zellen einmal mit warmem PBS gespült. Danach erfolgte die Zugabe von je 200 μl Tryp/Benz, welches 2 min bei 37 °C auf den Zellen belassen wurde. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt, mit je 400 μl Trit/Benz vermischt und 5 min bei 126 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min bei 126 x g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 μl PBS aufgenommen und die Zellsuspension tropfenweise in einen 15 ml Falcon pipettiert, in den zuvor 10 ml -20 °C kaltes 70 %iges Ethanol vorgelegt wurde. Die Zellfixierung erfolgte bei -20 °C für mindestens 1 h bzw. die Zellen wurden auf diese Weise bis zur weiteren Verwendung gelagert (siehe 2.1.8.).

Für die DNA-Färbung wurde ein Zellsuspensionsvolumen, das maximal 1×10^6 Zellen enthielt, abgenommen und bei 11 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1,5 ml RNase-Lösung resuspendiert, die zuvor für 30 min bei 37 °C im Wasserbad aktiviert wurde. Zu der jeweiligen Zellsuspension wurden 150 μl PI-Lösung pipettiert, woran sich eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad im Dunkeln anschloss. Nach einer Mindestlagerung der Proben für 5 min bei 4 °C erfolgte die Analyse von 5000 Events pro Probe am Durchflusszytometer. Bei zu hoher Zellkonzentration wurde die Probe mit HBS verdünnt. Die Anregung des PI erfolgte im Wellenlängenbereich von 488 nm, wonach eine Emissionswellenlänge im Bereich von 575-620 nm (PMT4) detektiert wurde. Als Kontrolle für die Bestimmung einer möglichen Eigenfluoreszenz der Zellbestandteile, wurde eine ungefärbte Probe mitgeführt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte abschließend mit Hilfe der MultiCycle-Software.

2.4.3. Metaphaseplatten

- Colcemidlösung (Colcemid KaryoMax 0,6 μg/ml Endkonz., 10 μg/ml Stammlösung in PBS; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. 15210-057)
- Nikon TMS-F Inverted Microscope (Nikon Corporation, Kawasaki, Japan; Objektiv E.10, 0.25, 160/-, Ph1 DL; Okular CFWE 10 x A/18)

- Kaliumchloridlösung (0,075 % KCl in Aqua dest.; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; Cat. P-5405)
- Methanol/Eisessig (Verhältnis 3:1, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A0688 bzw. Roth GmbH, Karlsruhe, Germany; Cat. 3738.1)
- Giemsalösung (50 % Giemsalösung in Aqua dest.; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. GS500)

Für die Herstellung von Metaphaseplattenpräparaten wurden VM197-Zellen in 25 cm² Flaschen für 3 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,6 µg/ml Colcemidlösung für 24 h bzw. 48 h. Die Arretierung der VM197-Zellen im Metaphasestadium wurde mittels Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung kontrolliert. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit warmem PBS gespült und mit 1 ml Tryp/Benz für 2 min bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 2 ml Trit/Benz vermischt, in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei 126 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 1 ml 0,075 %iger KCl-Lösung resuspendiert und bei RT für 15 min inkubiert. Nach dieser induzierten Aufquellung der Zellen erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 126 x g und RT. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml -20 °C kaltem Methanol/Eisessig resuspendiert, in dem die Zellen für 30 min fixiert wurden. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei zwischendurch jeweils ein Zentrifugationsschritt für 7 min bei 181 x g und RT erfolgte. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml Methanol/Eisessig resuspendiert. Anschließend wurden mehrere Tropfen der Zellsuspension aus 10 bis 60 cm Höhe auf Objektträger getropft, sodass ein Großteil der Zellen aufplatzte. Nach Lufttrocknung der Präparate erfolgte eine 30-minütige Färbung in 50 % Giemsalösung bzw. eine einminütige Färbung in Bisbenzimidlösung. Daran schloss sich jeweils eine Waschung mit Aqua dest. und eine erneute Lufttrocknung an. Die mit Giemsalösung gefärbten Präparate wurden mittels Lichtmikroskopie und die mittels Bisbenzimidlösung gefärbten Präparate mittels Fluoreszenzmikroskopie unter UV-Anregung beurteilt.

2.4.4. MTT-Assay

- MTT-Lösung (5 mg/ml; sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert)
 - 100 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # M-5655)
 - 20 ml Aqua dest.
- Lysislösung
 - 19,88 ml Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # D-4540)
 - 0,12 ml Essigsäure, 100 % (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany; Cat. # 3738.1)
 - 2 g Sodiumdodecylsulfat (SDS; Fluka Chemika AG/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 71730)
- 96 Lochplatten (TPP AG, Trasadingen, Switzerland)
- Taumelschüttler (Polymax 1040; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany)

- ELISA-Reader (Biochrom Anthos 2010 Microplate Reader, Cambridge, UK)

Um zytotoxische Effekte applizierter Substanzkonzentrationen auszuschließen bzw. die Proliferationsaktivität der VM197-Zellen nachfolgend zu überprüfen, wurde das MTT-Assay angewendet.

Die VM197-Zellen wurden hierfür in 96-Lochplatten ausgesät und unter Proliferationsbedingungen bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von je 200 µl frischem Proliferationsmedium, welches die zu testende Substanz in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Zugabe von jeweils 20 µl steriler MTT-Lösung, welche für 2 h bei 37 °C im Brutschrank auf den Zellen belassen wurde. Das Medium wurde anschließend mittels einer Multikanalpipette von den Zellen abgenommen und durch je 200 µl Lysis-Lösung ersetzt. Nach dem Durchmischen erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT auf einem Taumelschüttler. Vitale Zellen sollten das gelbe Tetrazoliumsalz MTT aufgenommen und es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem intensiv blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt haben. Mittels Zelllyse wurde der Farbstoff freigesetzt und dessen Konzentration photometrisch mittels ELISA-Reader im Wellenlängenbereich von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen, wobei die Intensität der Blaufärbung mit der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert. Als Negativkontrolle wurden einige Vertiefungen der 96-Lochplatte nur mit Lysislösung befüllt und gemessen, um eine Eigenabsorption dieser Lösung auszuschließen oder gegebenenfalls von den ermittelten Probenwerten abzuziehen.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

Um Aussagen über den Expressionsstatus verschiedener Apoptose-relevanter und Wnt-Signalingweg-regulierender Proteine treffen zu können, wurden Western/Immunoblots durchgeführt.

2.5.1. Herstellung von Proteinvolllysaten

- 50 ml Falcon (TPP AG, Trasadingen, Switzerland)
- Zellschaber (24 cm, TPP AG, Trasadingen, Switzerland; Cat. 99002)
- Labofuge 400R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)
- Ultraschallsonotrode (Sonopuls HD 2070 und UW 2070; Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany)
- Zentrifuge 5417R (Rotor # F45-30-11; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Lyophylle (Vakuumpumpe Univac D4, Kühlfälle Unicryo MC 2L -60°C und Zentrifuge Univapo 100H; UniEquip Laborgerätebau & Vertriebs GmbH, Martinsried, Germany)
- Vortexer (Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Bohemia, USA)
- Lysispuffer
 - 1 ml Tris-HCl, pH 7,5 einstellen
 - 150 mM Natriumchlorid (NaCl; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. # A 3597)

- 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # E-6635)
- 1 mM Ethylenglykoltetraacetat (EGTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, # E-4378]
- 1 mM Natriumorthovanadat ($\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$; ACROS, New Jersey, USA; Cat. # 20533)
- 1 mM Natriumfluorid (NaF; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # S-7920)
- 1 % Alkylphenylpolyaethylenglykol (Triton[®] X-100; Ferak, Berlin, Germany; Cat. # 501104)
- 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # P-7626)
- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # P-4265)
- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # A-1153)
- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # L-2884)

Die Extraktion von Proteinen erfolgte aus proliferierenden, differenzierenden, Staurosporin-behandelten und UV-B-bestrahlten VM197-Zellen auf Eis. Dabei wurde der Überstand in ein 50 ml Falcon dekantiert und die adhären Zellen nach Zugabe von 5 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche abgelöst. Die Zellsuspension wurde zu der Überstandssuspension pipettiert. Nachdem das Zellkulturgefäß noch zweimal mit kaltem PBS nachgespült und die Lösungen jeweils in das Falcon pipettiert wurden, erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei $126 \times g$ und 4°C . Das Zellpellet wurde anschließend je nach Zellmasse in 200-250 μl Lysispuffer resuspendiert und 3 min mit einer Ultraschallsonotrode bei 70 % Power und $2 \times 10\%$ Intervalleinstellung lysiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 10 min bei 1°C und $20800 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Einengung bzw. Aufkonzentrierung der Volllysate wurde mittels Lyophilie erreicht. Das entstandene Lyophilisat wurde in 100 μl Aqua dest. resuspendiert, intensiv gevortext, erneut 1 min mit der Ultraschallsonotrode behandelt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford bzw. BCA-Assay

- Bradford-Reagenz
 - 0,01 % (100 mg) Coomassie Brilliant Blue G (Acros, New Jersey, USA; Cat. 19148)
 - 1,6 M (100 ml) ortho-Phosphorsäure (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany; Cat. 6366.1)
 - 0,8 M (47 ml) absolut Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A1613)[Coomassie Brilliant Blue in Ethanol und ortho-Phosphorsäure unter Rühren lösen, 3-4 h oder über Nacht bei 4°C ; ad Aqua dest. 1 l und mittels Whatman Nr.1 Filter filtrieren]
- Heizblock (Thermomixer Comfort; Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Bovine Serum Albumin (BSA-Standard, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 - 1 ml BSA (2 mg/ml; Pierce Biotechnology/Thermo Scientific, Rockford, USA, Cat. # 23209)

- 19 ml Aqua dest.
- Probenpuffer (4-fach)
 - 10 g Sodiumdodecylsulfat (Fluka Chemika AG/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # 71725)
 - 3,03 g Trizma[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # T-1503)
 - 40 ml Glycerin (Acros, New Jersey, USA; Cat. # 27736-0010)
 - 20 ml 2- Mercaptoethanol (Acros, New Jersey, USA; Cat. 12547); pH 6,8 einstellen
 - Aqua dest. Ad 100 ml
 - Bromphenolblau (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Cat. # 108122)
- MicroBC-Assay Protein quantification kit (Uptima, Montlucon, France)

Tab. 2.2.: Pipettierschema der BSA-Eichkurve

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	BSA-Standard (100 $\mu\text{g/ml}$)	Aqua dest. (μl)
2,5	5	195
5	10	190
10	20	180
20	40	160
30	45	105
40	80	120
50	60	60
60	120	80
80	160	40
100	200	-

Die Proteinkonzentrationen der Volllysate wurden photometrisch nach der Bradford-Methode quantifiziert, welche auf der Protein-bindenden Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau basiert.

Dafür wurden je 10 μl des Lysats mit Aqua dest. im Verhältnis 1:100 in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß verdünnt und daraus wiederum eine 1:2 Verdünnung in Aqua dest. hergestellt, sodass die Endverdünnung der Proteinlösung 1:200 betrug. Mittels einer Transferpipette wurden je 200 μl Bradford-Reagenz in einer 96-Lochplatte vorgelegt, zu denen dann jeweils 50 μl des 1:200 verdünnten Proteinlysats dazupipettiert wurden. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgte die Absorptionsmessung mittels ELISA-Messgerät im Wellenlängenbereich von 620 nm.

Parallel wurden die Referenzabsorptionen einer Verdünnungsreihe, die Bovines Serum Albumin in bekannten Konzentrationen enthielt, mitbestimmt (Tab. 2.2.). Aus der Gegenüberstellung der ermittelten Extinktionen (Ordinaten-Werte) und der bekannten BSA-Standardkonzentrationen (Abzissen-Werte) wurde mittels Excel eine Eichkurve erstellt, auf deren Grundlage eine Regressionsgerade mit zugehöriger Gleichung berechnet wurde. Aufgrund der linearen Abhängigkeit, der hierbei berücksichtigten Parameter, konnte durch Auftragen der Lysatextinktionen deren Proteingehalt pro Volumen abgelesen werden.

Danach wurde das Lysat mit 30 μl vierfachem Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 98 °C in einem Heizblock inkubiert. Nach diesem Proteindenaturierungsverfahren wurden die Lysate für anschließende Western/Immunoblot-Untersuchungen verwendet bzw. bei -20 °C verwahrt.

Am RCSI (Dublin/Irland) wurde die Proteinkonzentration von VM197-Zellysaten mittels BCA-Assay nach Herstellerprotokoll bestimmt. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen, die mit der zugegebenen Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff ergeben, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen wurde.

2.5.3. SDS-Page und Westernblot

- Gelgießkammer (Hoefer[®] Mighty Small, dual gel caster, Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria)
- Rectangular Glass Plates (10 x 8 cm; GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, USA; Cat. 80-6136-81)
- Alumina Plates (10 x 8 cm; Amersham Biosciences Corp., Piscataway, USA; Cat. 80-6136-43)
- T Spacers (8 cm x 75 mm; Amersham Bioscience Piscataway, USA; Cat. # 80-6137-95)
- 66 % Butanol (1-Butanol 99 % in Aqua dest.; Acros Organics, New Jersey, USA; Cat. 107690010)
- Käbme (Comb spineless 15 well 75 mm; Amersham Bioscience Piscataway, USA; # 80-6138-71)
- Elektrophoresekammer (Hoefer[®] Mighty Small II; Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria)
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany; Cat. SM1841)
- 50 ml und 15 ml Falcon (TPP AG, Trasadingen, Switzerland)
- Vortex-Genie 2 (Model: G-560E; Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA)
- Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech Wien, Austria; 20 mA pro Gel bzw. Standard Power Pack P25, Biometra)
- Immuno-Blot[™] PVDF Membran 0,2 µm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; Cat. 162-0177)
- Schleicher & Schuell Gel Blotting Papiere (Dassel, Germany; Cat. GB003)
- Semi-Dry-Blotgerätes (Fastblot B33; Whatman Biometra, Göttingen, Germany; Cat. 014-100)
- Ponceau S-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. P-7170)
- Trenngelpuffer
 - 22,5 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # T1503)
 - 0,5 g Sodiumdodecylsulfat (SDS; Fluka Chemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 71725); pH 8,8 einstellen
 - Aqua dest. ad 250 ml
- Sammelgelpuffer
 - 7,7 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 0,5 g Sodiumdodecylsulfat (SDS; Fluka Chemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 71725); pH 6,8 einstellen
 - Aqua dest. ad 250 ml

- Acrylamid-Lösung (30 %)
 - 29,2 g Acrylamid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A 3626)
 - 0,8 g N,N' Methylene-bisacrylamid (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; Cat. 161-0201)
 - Aqua dest. ad 100 ml
- Ammoniumperoxodisulfat 12,5 % (APS, 98 % in Aqua dest.; Acros Organics, New Jersey, USA; Cat. 20153-0010)
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin 99 % (TEMED; Fluka Chemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 87689)
- Elektrophoresepuffer (10x; für Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen)
 - 30 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 10 g Sodiumdodecylsulfat (SDS; Fluka Chemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 71725)
 - 144 g Glycin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; Cat. 161-0724); pH 8,5 einstellen
 - Aqua dest. ad 1000 ml

Tab. 2.3.: Pipettierschema für Acrylamidgele

Chemikalien	Trenngel (für 4 Gele)				Sammelgel 5 % (für 2 Gele)
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	
Acrylamid 30 % & Bisacrylamid	3,75 ml	5 ml	7 ml	7,5 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer/ Sammelgelpuffer	7,5 ml -	7,5 ml -	8,4 ml -	7,5 ml	- 1,5 ml
Aqua dest.	3,75 ml	2,5 ml	1,4 ml	-	1,0 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 12,5 %	71,5 µl	71,5 µl	80 µl	50 µl	8,5 µl
N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	3,5 µl	3,5 µl	4 µl	12,5 µl	17,0 µl

- Anodenpuffer I
 - 18,15 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 100 ml Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A 0645); pH 10,4 einstellen
 - Aqua dest. ad 500 ml
- Anodenpuffer II
 - 1,5 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 100 ml Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A 0645); pH 10,4 einstellen

- Aqua dest. ad 500 ml
- Kathodenpuffer
 - 1,65 g Aminocapronsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. A-7824)
 - 1,50 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 100 ml Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A 0645); Cat: A 0645); pH 9,4 einstellen
 - Aqua dest. Ad 500 ml
- Probenpuffer
 - 0,76 % Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 2 % Sodiumdodecylsulfat (SDS; Fluka Chemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 71725)
 - 10 % Glycerin (Acros Organics, New Jersey, USA; Cat. 27736-0010)
 - 0,005 % Bromphenolblau (Spatelspitze; Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Cat. 108122)
- Geräte und Reagenzien, die am RCSI (Dublin/Irland) verwendet wurden:
 - Protran BA83 Nitrocellulose Whatman[®], 0,2 µm (Whatman GmbH, Dassel, Germany)
 - Trans-Blot-SD Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
 - Gelgießstand (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
 - Power Pack HC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
 - Page Ruler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, Baden-Württemberg, Germany; Cat. SM1811)
 - Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) (New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA)

Unter Verwendung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurden die einzelnen Proteine des Lysatgemisches der Größe nach aufgetrennt (Laemmli 1976).

Dafür wurden zuerst die Komponenten für ein Trenngel in einem 50 ml Falcon zusammenpipettiert (Tab. 2.3.), gevortext und in die Gelgießkammern gegossen, die in einer Gelgießvorrichtung eingespannt waren, welche sich aus jeweils einer Glasplatte und einer durch Spacer separierten Tonerdeplatte zusammensetzte. Während der circa einstündigen Gelaushärtung wurde das Austrocknen desselbigen durch Überschichtung mit 66 %igem Butanol verhindert, wobei gleichzeitig die Geloberfläche geglättet wurde.

Nach Einsetzen eines Kammes zwischen beide Platten wurde ein etwa 1,5 cm hohes Sammelgel, welches zuvor in einem 15 ml Falcon angesetzt wurde, über das Trenngel gegossen und für etwa 20 min aushärten gelassen.

Die Gelkonstruktion wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt, die mit dem Elektrophoresepuffer befüllt wurde. Anschließend wurde der Kamm gezogen und die einzelnen Lysate einer gleich gewählten Proteinkonzentration mit entsprechend dazugehörigen Voluminas in die Geltaschen in randomisierter Reihenfolge appliziert. Um eine Größenzuordnung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu gewährleisten, wurden 11 µl eines Größenstandards mitgeführt. Leere Taschen wurden mit einem entsprechenden Volumen an Probenpuffer gefüllt.

Die Auftrennung der Proteine im Lysat erfolgte nach Anlegen einer Spannung, wobei die negativen Oberflächenladungen der Proteine und deren unterschiedliche Molekulargewichtsgrößen verschieden lange Laufwege im Gel in Richtung Anode bewirkten.

Nachdem die Lauffront, die durch eine Bromphenolblaubande ersichtlich war, das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Anschließend erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran mittels Westernblot-Verfahren unter Anlegen einer Spannung. Auf die Anodenseite des Semi-Dry-Blotgerätes wurde ein Stapel aus, in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkten, Blotpapieren, PVDF-Membran und SDS-Gel formiert. Die PVDF-Membran musste zuvor zudem 5 min in Methanol getränkt werden, damit sie den Anodenpuffer II adsorbierte. Luftblasen zwischen den einzelnen Stapelschichten wurden durch mehrmalige Rollbewegung eines Glasstabes über den Stapel entfernt, der Deckel der Blotapparatur aufgesetzt und ein einstündiger Blotvorgang mit einer Spannung von 50 mA pro Gel gestartet.

Die Bloteffizienz wurde mit Hilfe der Ponceau S-Färbung überprüft. Dafür wurde die PVDF-Membran aus dem Blotgerät entnommen, für 5 min in Ponceau S-Lösung gefärbt und mit Aqua dest. gespült. Im Fall eines rot gefärbten und regelmäßigen Proteinbandenmusters auf der PVDF-Membran schloss sich der Immunoblot an.

Am RCSI in Dublin erfolgte die SDS-Page auf ähnliche Weise (5 min 120 V; 1 h 80 V) und der Westernblot unter Verwendung einer Nitrocellulosemembran und eines einzigen Blotpuffers (1 h 80 V).

2.5.4. Immunoblot

- Schüttler Typ 3015 (GFL, Hannover-Vinnhorst, Germany)
- Taumelschüttler (Polymax 1040; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany; Cat. 543.42210.000)
- Vortex-Genie 2 (Model: G-560E; Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA)
- Folienschweißgerät (Typ FS 400 A vacuplus; Petra electric GmbH, Burgau, Germany)
- Einschweißfolie-Folienhalbschlauch (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany; Cat. 0278.1)
- Einschweißfolie-Frischhaltefolie (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany; Cat. 9106450)
- Immun-StarTM AP Substrate Pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; Cat. 170-5012)
- Scanner (Fluor-STM MultiImager, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Tris Buffered Saline (TBS, 10x; für gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt)
 - 24,22 g Trizma[®] base, minimum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. T1503)
 - 292,20 g Natriumchlorid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. A 3597); pH 7,5 einstellen
 - Aqua dest. ad 1000 ml
- 0,1 % Tris Buffered Saline plus Tween (TTBS)
 - 500 ml TBS (1x)
 - 500 µl Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. P-2287)

- Blockpuffer
 - 3 % Skim Milk Powder in TBS (Fluka Analytical/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 70166); kurz aufkochen
- Antikörperpuffer
 - 1 % (w/v) Instant Nonfat Dry Milk (Stop & Shop, USA; Cat. 21120-00056) in TTBS; kurz erhitzen

Tab. 2.4.: Verwendete Antikörper für die Proteinexpressionsanalysen

Primärantikörper	Firma	Bestellnummer	MW [kDa]	Wirt/Verdünnung
AIF (H-300)	Santa Cruz	sc-5586	57	rabbit 1:200
Apaf-1 (NT) (Dublin)	Chemicon	AB16941	130	rabbit 1:1000
Bad	BD	# 610391	23	mouse 1:500
Bak	BD	556382	24	mouse 1:500
Bax	BD	# 610982	21/18	mouse 1:250
Bcl-2	BD	# 610538	26	mouse 1:500
Bcl-x	BD	# 610746	26	mouse 1:250
Bid (C-20)	Santa Cruz	sc-6538	23/15	goat 1:100
BRUCE	BD	# 611192	528	mouse 1:250
CAS	BD	# 610482	100	mouse 1:1000
Caspase-2/ICH-1L	BD	# I75620	48/33/32	mouse 1:500
Caspase-3 (H-277)	Santa Cruz	sc-7148	32/30/17/ 11	rabbit 1:200
Caspase-3 (Dublin)	Cell Signaling	#9662	35/17	rabbit 1:1000
Caspase-7/MCH-3	Santa Cruz	# M64620	35	mouse 1:500
Caspase-7 (Dublin)	Cell Signaling	# 9492	35/20	rabbit 1:1000
Caspase-8 (H-134)	Santa Cruz	sc-7890	55	rabbit 1:200
Caspase-9 p10 (C-17)	Santa Cruz	sc-8297	85	goat 1:100
Caspase-9 (Dublin)	Cell Signaling	# 9502	47/37/35	rabbit 1:1000
β-Catenin (E-5)	Santa Cruz	sc-7963	92	mouse 1:200
Cytochrom c (H-104)	Santa Cruz	sc-7159	22/11	rabbit 1:200
DFF 45	BD	# D76320	45	mouse 1:500
FADD	BD	# F36620	24	mouse 1:250
Fas/CD 95/APO-1	BD	# F22120	45	mouse 1:2500
Fas Ligand/CD 95L	BD	# F37720	37	mouse 1:1000
GSK-3β	BD	# 610201	46	mouse 1:2500
hILP/XIAP	BD	# 610716	57	mouse 1:200
hILP/XIAP (Dublin)	BD	# 610762	57	mouse 1:1000
Nip-1	BD	# 611096	26	mouse 1:250
p53	BD	# 610183	53	mouse 1:500
PARP Clone 42	BD	# 611038	113/24	mouse 1:500

PARP (46D11)	Cell Signaling	# 9532	116/89	rabbit 1:1000
Phospho-GSK-3 β (Ser9) (5B3)	Cell Signaling	# 9323	46	rabbit 1:1000
PUMA	Cell Signaling	# 4976	23/18	rabbit 1:1000
Survivin (71G4B7E)	Cell Signaling	# 2808	16	rabbit 1:1000
Smac/Diablo (Dublin)	R&D Systems		22	rabbit 1:2000
TRADD (H-278)	BD	# T50320	34	rabbit 1:200
β -Actin Clone AC-15	Sigma	A 5441	42	mouse 1:4000
GAPDH (FL-335)	Santa Cruz	sc-25778	37	rabbit 1:500
Sekundärantikörper	Firma	Bestellnummer	MW [kDa]	Wirt/Verdünnung
goat anti-mouse	Santa Cruz	sc-2047		
goat anti-rabbit	Santa Cruz	sc-2007		
donkey anti-goat	Santa Cruz	sc-2022		

- Geräte und Reagenzien, die am RCSI (Dublin/Irland) verwendet wurden:
 - Immobilon Western Chemiluminescence HRP Substrate (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany)
 - Image Reader LAS-4000, CCD Camera (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Germany)
 - Image J Software

Der Nachweis der, mittels Gelelektrophorese aufgetrennten, Proteine des Zelllysats erfolgte mit Hilfe spezifischer Primär- und Sekundärantikörper (Tab. 2.4.).

Die PVDF-Membran bzw. Nitrozellulosemembran wurde zunächst dreimal für je 5 min mit TBS gewaschen, dann 1 h in warmem Blockpuffer inkubiert und danach dreimal für je 15 min mit TTBS gewaschen, wobei alle Schritte in Glasfärbekästen auf einem Schüttler erfolgten. Nachfolgend wurde der erste Primärantikörper, der entsprechend der Vorgaben in 2 ml Antikörper-Puffer in einem 2 ml Eppendorfgefäß verdünnt und gevortext wurde, auf die Membran gegeben. Für diesen Schritt wurde die Membran zuvor mit Hilfe eines Einschweißgerätes in Haushaltsfolie von drei Seiten her eingeschweißt, dann die Antikörper-Lösung dazupipettiert und nach Entfernung der Luftblasen an der noch offenen Seite komplett verschweißt. Nach Ablauf der einstündigen Inkubation bei RT auf einem Schwenktisch wurde die Membran dreimal für je 15 min in TTBS auf dem Schüttler gewaschen. Nachfolgende Inkubationen mit weiteren Primär- bzw. Sekundärantikörpern schlossen sich auf die zuvor beschriebene Weise an. Als Haushaltsproteine wurden β -Actin und GAPDH definiert, da beide Proteine keine signifikanten Änderungen in ihren Expressionsprofilen in VM197-Zellen zeigen. Das jeweilige Haushaltsprotein wurde bei jedem Proteinnachweis mitdetektiert und für die spätere Proteinnormierung genutzt.

Abschließend wurde die Membran für 5 min mit einem Gemisch aus 1 ml Substratlösung und 50 µl Enhancer-Lösung bei RT inkubiert, kurz abtropfen gelassen, danach möglichst faltenfrei in Haushaltsfolie eingeschweißt und für die Detektion der Proteinbanden mittels Chemilumineszenzmethode im Dunkelraum unter den Scanner gelegt. Mittels dieser Technik wurden zunächst für 90 min ein Dunkelbild erzeugt und dann für weitere 90 min die Photonen detektiert, die durch die Substrat-Enzym-Reaktion auf der Membran entstanden. Die Auswertung des spezifischen Bandenmusters erfolgte unter Anwendung der Quantity One Software 4.3.1.

Am RCSI in Dublin erfolgte die Quantifizierung der Proteinexpressionen mittels Image J-Software.

2.5.5. Semiquantitative Proteinbestimmung

Die Intensität der jeweils nachgewiesenen Proteinbande wurde auf ein gleichzeitig mitbestimmtes Haushaltsprotein normiert, indem der Quotient aus beiden Pixelintensitäten gebildet wurde. Innerhalb einer Differenzierungszeitreihe erfolgte eine Reskalierung der Einzelwerte, indem der Mittelwert aus den Einzelquotienten jedes Zeitpunktes, inklusive des Quotienten des Proliferationszeitpunktes (0 h), gebildet wurde. Dieser Mittelwert wurde dann mit jedem Einzelquotienten der unterschiedlichen Lysatnahmezeitpunkte multipliziert. Diese Reskalierung der Ausgangswerte begünstigt eine Vergleichbarkeit verschiedener Blotergebnisse untereinander und ermöglicht eine optimierte statistische Auswertung und demzufolge eine höhere Plausibilität der generierten Daten. Durch die Normierung der semiquantitativen Proteindaten der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte auf den Proliferationsausgangswert (0 h) konnten vergleichende semiquantitative Aussagen über den Expressionsstatus einzelner Proteine während der Proliferation und des frühen Differenzierungsverlaufs der VM197-Zellen getroffen werden.

2.6. Genexpressionsanalysen

Die im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Methoden wurden für die Charakterisierung der VM197-Zelllinie hinsichtlich des Expressionsmusters relevanter Apoptosegene und zudem für die Validierung der, unter gleicher Fragestellung erhobenen, Proteinexpressionsdaten durchgeführt.

2.6.1. Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Prüfung der Intaktheit von RNA

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany; Cat. No. 74106) bzw. High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; Cat. 11 828 665 001)
- Spritze (20 ml; Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) und Kanüle Microlance 2 (0,8 mm x 40 mm, 21G, Nr.2; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)
- 70 % Ethanol (Ethanol absolut in Aqua dest.; AppliChem, Darmstadt, Germany; Cat. A1613)
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

- DEPC-H₂O (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany; Cat. T143.1)
- Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator; Pharmacia Biotech, Wien, Austria; Cat. 80-2103-98 und Quarzglas Suprasil[®] Präzisionsküvette (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany; Cat. 105.202.008-QS)
- NanoDrop[®] ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany)
- SeaKem[®] LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany; Cat. 50004)
- Tris-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (10x TE-Puffer 1:10 in Aqua dest.)
 - 400 mM Trizma[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # T-1503)
 - 100 mM Ethylendiamintetraacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # E-6635)
 - pH 8,3 einstellen
- Gelgießvorrichtung (Subcell GT Widi, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Ladepuffer (10x Ladepuffer 1:10 in Aqua dest., peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) bzw. 2x Loading Dye (Fermentas GmbH, Baden-Württemberg, Germany; Cat. # R0641)
- Marker: RNA Ladder High Range, 1:1 in 2x Ladepuffer bzw. DNA Gene Ruler 1kb (beide Fermentas GmbH, Baden-Württemberg, Germany; Cat. # SM1821 bzw. # SM0314)
- Power Pack 300 (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Ethidiumbromidbad (1 Tropfen Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml auf 1 l Aqua dest., Endkonzentration 5 µg/ml; Bio-Rad, Hercules, USA; Cat.)
- Schwenktisch GFL 3013 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany)
- TFX-40 M Transilluminator (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany)
- Canon-Kamera, Germany
- 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. G2938A) und 2100 Expert Software
- RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5067-1511)

In Vorbereitung auf die RNA-Isolierung wurden VM197-Zellen in 25 cm² ZK-Flaschen bzw. 24-Lochplatten ausgesät, zu bestimmten Zeitpunkten abtrypsiniert und maximal 1x10⁶ Zellen weiterverwendet.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits wie nachfolgend beschrieben bzw. in ähnlicher Weise mittels High Pure RNA Isolation Kit.

Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und unter Verwendung einer Spritze und einer Nadel homogenisiert. Dann erfolgte die Zugabe von einem Volumen (350 µl) 70 %igen Ethanols, wonach dieses Gemisch in ein RNeasy Zentrifugationssäule gegeben und 15 sec bei 11160 x g zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, die dann 15 sec bei 9300 x g zentrifugiert wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer mit anschließend 15-sekündiger Zentrifugation bei 9300 x g, der eine RPE-Pufferzugabe von 500 µl und ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 9300 x g folgte. Die Zentrifugationssäule wurde

abschließend auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, mit 40-80 µl DEPC-H₂O bzw. Elutionspuffer überschichtet und 1 min bei 9300 x g zentrifugiert. Das entstandene RNA-Isolat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C verwahrt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte auf zweierlei Weise.

In Anwendung der Photometermessmethode wurden 10 µl RNA-Lösung mit 90 µl DEPC-H₂O (1:10) verdünnt, in eine Quarzküvette pipettiert und gegen einen Blindwert bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Gesamtmenge an RNA ergab sich aus der Produktbildung des Extinktionswertes (A_{260}), des Verdünnungsfaktors, dem Probenvolumen und dem Faktor 40 µg/ml (OD = 1 bei 260 nm). Aussagen über die Reinheit der RNA konnten getroffen werden, indem eine vergleichende Extinktionsmessung bei 260 nm (DNA) und bei 280 nm (Proteine) durchgeführt wurde, wobei der Koeffizient zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte.

Im Rahmen der Durchführung der DNA-Microarrayversuche bot sich die RNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer als Alternative an, wobei ein RNA-Volumen von 1,2 µl für die Extinktionsmessung bei 260/280 nm ausreichte.

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurde die Intaktheit der isolierten RNA überprüft. Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1x TE-Puffer unter Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in eine Gelgießvorrichtung, in der zuvor ein Kamm eingesetzt wurde, gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses mit 1x TE-Puffer überschichtet und der Kamm gezogen. Vom jeweiligen RNA-Isolat wurden jeweils 5 µl mit 5 µl 1x Ladepuffer vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard wurden 4 µl eines RNA-Markers bzw. ein 1 kb DNA-Marker in gleicher Konzentration mitgeführt. Nach vollständiger Beladung des Gels wurde die Apparatur an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen und die Elektrophorese für 5 min bei 130 V und nachfolgend für 1 h bei 80 V laufen gelassen. Die Visualisierung der aufgetrennten RNA-Banden erfolgte mittels 30-minütiger Färbung des Agarosegels in einem Ethidiumbromidbad auf einem Schwenktisch, sowie mit Hilfe der Transillumination auf einem UV-Tisch, wobei das Gel fotografiert wurde.

Während der Durchführung der DNA-Microarrayversuche am Forschungszentrum Jülich bestand die Möglichkeit, die Intaktheit der RNA-Isolate mittels Agilent 2100 Bioanalyzer zu überprüfen. Hierbei handelt es sich um eine Mikrofluidik-Plattform, die basierend auf einer Lab-on-a-chip-Technologie eine schnellere Variante einer Gelelektrophorese darstellt, wobei die farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert wird. Die Durchführung erfolgte nach Protokollanleitung des Herstellers.

2.6.2. DNA-Microarrays

- DEPC-H₂O (Fermentas GmbH, Baden-Württemberg, Germany)
- One-Color RNA Spike-In Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5188-5282)
 - One-Color-Spike Mix (Stammlösung vortexen, 5 min bei 37 °C erwärmen, erneut vortexen und kurz anzentrifugieren; 1:20, 1:25 und 1:10 mit Verdünnungspuffer ansetzen)
 - cDNA Master Mix pro Ansatz:

5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl

10 mM dNTP Mix	1 µl
MMLV-RT	1 µl
RNaseOut	0,5 µl

(Endvolumen 8,5 µl)

- 50 % PEG solution (1 min bei 40 °C erwärmen, vortexen und kurz anzentrifugieren)

- Transcription Master Mix pro Ansatz:

Nuclease-free water	15,3 µl
4x Transcription Buffer	20 µl
0,1 M DTT	6 µl
NTP mix	8 µl
50 % PEG solution	6,4 µl
RNaseOut	0,5 µl
Inorganic pyrophosphatase	0,6 µl
T7 RNA Polymerase	0,8 µl
Cyanine 3-CTP	2,4 µl

(Endvolumen 60 µl)

- Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5184-3523)
 - T7 Promoter primer
- Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5188-5242)
 - 10x Blocking Agent (Lyophilisat in 500 µl Nuclease-freiem Wasser lösen, vortexen, 5 min bei 37 °C erwärmen und kurz anzentrifugieren)
 - Fragmentation Mix pro 4x44K Microarray:

Cyanine 3-labeled, linearly amplified cRNA	1,65 µg
10x Blocking Agent	11 µl
Nuclease-free water	ad 52,8 µl
25x Fragmentation Buffer	2,2 µl
 - (Endvolumen 55 µl)
 - 2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM pro 4x44K Microarray-Hybridisierung:

cRNA from Fragmentation Mix	55 µl
2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM	55 µl
 - (mit Pipette mischen, 1 min bei RT und 13000 rpm zentrifugieren und auf Array geben)
- PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, USA)
- Magnetrührer RCT basic IKAMAG[®] safety control (IKA[®]Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Zentrifuge 5417R (Rotor # F45-30-11; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany; Cat. No. 74106) bzw. High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; Cat. 11 828 665 001)
- NanoDrop[®] ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer und Software ND-1000V3 3.3 (peq-lab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany)
- Whole Human Genome Microarray Kit, 4 x 44K (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. G4112F)

- 012391 Whole Human Genome Oligo Microarrays (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. G4112A)
- Microarray Hybridization Chamber Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. G2534A)
- Shel Lab Hybridisierungsofen (Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, USA; Cat. G2545)
- Feature Extraction 9.5.1 Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany)
- Agilent Technologies Microarray Scanner und Agilent's Scan Control Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany)
- GeneSpring GX 7.3.1 Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany)
- RNase Zap (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA; Cat. AM9780)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 271004)
- Gene Expression Wash Buffer 1 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5188-5325)
- Gene Expression Wash Buffer 2 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; Cat. 5188-5326)

Die Genexpressionsanalyse der VM197-Zellen wurde nach dem „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis“ Protokoll (Agilent Technologies) mit zwei verschiedenen biologischen Replikatreihen (1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn), wobei die Kontrollen (0 h, proliferierend) jeweils zudem als zwei technische Replikate vorlagen, durchgeführt.

Pro RNA-Probe wurden 200 µl DEPC-H₂O in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und eine RNA-Menge, die eine Konzentration von 300 ng total-RNA beinhaltet, dazupipettiert. Anschließend wurden 7,3 µl der RNA-Lösung mit 3 µl des One-Color-Spike Mixes (1:10 in Verdünnungspuffer) und 1,2 µl T7 Promoter Primer vermischt (Endvolumen 11,5 µl). Das RNA-Primer-Gemisch wurde im Thermocycler denaturiert (PCR-Programm 1: 65 °C 10 min, 4 °C 5 min), danach mit 8,5 µl cDNA Master Mix versetzt und der cDNA-Synthese (Thermocycler PCR-Programm 2: 40 °C 2 h, 65 °C 15 min, 4 °C 5 min) unterzogen. Nach kurzem Anzentrifugieren des Gemisches, wurden 60 µl Transcription Master Mix dazupipettiert. Im Thermocycler (PCR-Programm 3: 40 °C 2 h) erfolgte nachfolgend die cRNA-Synthese und Amplifikation der Cyanin 3-CTP-gekoppelten RNA, die danach über eine Säule aufgereinigt wurde. Die aufgereinigte Cy3-gelabelte cRNA wurde mittels Nanodrop-Gerät quantifiziert und auf ihre Reinheit hin analysiert. Die Proben, deren cRNA-Gehalt größer als 1,65 µg und deren Cy3-Aktivität größer als 7 pmol pro µg cRNA betrug, wurden für die anschließende Hybridisierung verwendet.

Ein Lösungsvolumen mit einem Gehalt an 1,65 µg cRNA wurde mit dem Fragmentation Mix für 4 x 44K Microarrays auf ein Volumen von 55 µl aufgefüllt und im Thermocycler (PCR-Programm 4: 60 °C 30 min) behandelt. Diese Menge an fragmentierter cRNA wurde dann mit 55 µl 2x GEx Hybridisierungspuffer HI-RPM luftblasenfrei gemischt, 1 min bei RT und 17900 x g zentrifugiert und bis zum Auftrag auf den Array auf Eis verwahrt.

In eine Hälfte der Array-Metallhalterung wurde ein Glasobjektträger (Agilent SureHyb chamber base) mit dem Label nach oben eingelegt und 100 µl der RNA-Probe auf eine markierte Rechteckfläche luftblasenfrei pipettiert, ohne die Glasoberfläche zu berühren. Darauf wurde ein Array

gelegt, sodass dessen Barcode nach unten zeigte. Das Sandwich wurde mit der anderen Hälfte der Array-Metallhalterung zusammengeschraubt und im Rotor (10 rpm) des Hybridisierungsofens fixiert und über Nacht für mindestens 17 h bei 65 °C inkubiert (siehe „Agilent Hybridization Chamber User Guide, Cat. G2534-90001).

Die Metallhalterung wurde aufgeschraubt und in einem Färbekasten, der mit Waschpuffer 1 gefüllt war, wurde der Array vom Objektträger getrennt und in eine Halterung überführt, in der er für 1 min in frischem Waschpuffer 1 auf einem Magnetrührer belassen wurde. Dann schloss sich ein einminütiger Waschschrift in Waschpuffer 2 bei 34 °C (Waschpuffer 2 über Nacht auf 37 °C erwärmen!) auf dem Magnetrührer an. Abschließend wurde der Array für 30 sec in Acetonitril auf dem Magnetrührer gewaschen und dann für weitere 30 sec in frischem Acetonitril ohne Rühren belassen. Die Halterung mit dem Array wurde vorsichtig aus dem letzten Färbekasten entnommen, auf ein Tuch gestellt und mit einem Deckel abgedeckt.

Alle Arrays wurden zusammen in die Halterungen des Scannerkarussells eingespannt, mittels Agilent Scan Control Software ausgelesen, die Daten mittels Feature Extraction 9.5.1 Software extrahiert und mit Hilfe der Agilent GeneSpring GX 7.3.1 Software ausgewertet.

Zuerst erfolgte eine Qualitätskontrolle der Arrays anhand der internen Kontrollen auf den Selbigen und eine Filterung der Hintergrundfluoreszenzen. Dann wurden alle Gene der vier Kontrollen (0 h, Proliferation), die eine geringere Fluoreszenzintensität als 50 Pixel pro Dot aufwiesen, aus der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen. Alle anderen Daten wurden als vertraulich gewertet. Darauf folgte die Normalisierung der Kontrollen, wobei Gene ausgesiektiert wurden, die sich in allen vier Kontrollen um eine mehr als zweifache Hoch- bzw. Herunterregulation ihrer Expression unterschieden. Gene, die in allen vier Kontrollen um 0,5-fach bis 2-fach hoch- bzw. herunterreguliert waren, wurden weiter analysiert. Aus den identischen technischen Replikaten wurden Gruppen gebildet, wobei nachfolgend ein Vergleich zwischen den Genen der Kontrollgruppe (0 h, Proliferation) und jedem einzelnen Differenzierungszeitpunkt (1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h) angestellt wurde. Gene, die sich als mehr als zweifach unterschiedlich zur Kontrollgruppe exprimiert herausstellten, wurden der Varianzanalyse (One-Way ANOVA) unterzogen, um signifikante Genexpressionsveränderungen erkennen zu können. Anschließend wurde der Post-hoc Test nach Tukey angewandt, wobei mehr als zweifach größere Mittelwertunterschiede von Genexpressionen zwischen Kontrollgruppe und Differenzierungszeitpunkten als eindeutig signifikant ($p < 0,05$) gewertet wurden. Gene, die in dieses Muster fielen, wurden mittels Volcano-Plot dargestellt und dabei als Gengruppen funktionell annotiert, das heißt, hinsichtlich ihrer biologischen und statistischen Signifikanz dargestellt (Gen Ontologie Annotation).

2.6.3. Real-Time reverse Transkriptase-PCR

- iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA; Cat. 170-8891)
- iCycler (Bio-Rad, Hercules, USA)
- iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA; Cat. 170-8880)
- iTaqTM DNA polymerase (Bio-Rad, Hercules, USA; Cat. 170-8870)
- Glucocorticoidrezeptor-Standard (FBN Dummerstorf, Germany)
- Primer
 - human RPS18 (ribosomales Protein); Produktgröße 244 bp:

- Vorwärtsprimer (24 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 972340)
 5'- CAT ATT TTg CgA gTA CTC AAC ACC -3'
- Rückwärtsprimer (24 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 972341)
 5'- CCT TTA CAT CCT TCT gTC TgT TCA -3'
- bovine β-Actin
 Vorwärtsprimer GE22 (20 mer, 25 pmol/μl; Sigma-ark GmbH, Darmstadt, Germany)
 5'- GCC AAG TCC AGA CGC AGG AT -3'
- Rückwärtsprimer GE 23 (23 mer, 25 pmol/μl; Sigma-ark GmbH, Darmstadt, Germany)
 5'- AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAG AT -3'
- human BAXa, Produktgröße 158 bp:
 Vorwärtsprimer (23 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 971017)
 5'- ACG AAC TGG ACA GTA ACA TGG AG -3'
- Rückwärtsprimer (24 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 971018)
 5'- CAG TTT GCT GGC AAA GTA GAA AAG -3'
- human BCL-2, Produktgröße 230 bp:
 Vorwärtsprimer (22 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 971019)
 5'- GAT TGT GGC CTT CTT TGA GTT C -3'
- Rückwärtsprimer (24 mer, 20 pmol/μl; TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany; Cat. 971020)
 5'- AAC TGA GCA GAG TCT TCA GAG ACA -3'

Für die Validierung der differentiellen Regulation ausgewählter Gene wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit der isolierten total RNA (siehe 2.6.1.) und spezifischen Primern durchgeführt.

Die reverse Transkription erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit unter Einsatz von 100 ng total RNA, 4 μl 5x iScript Reaction Mix, 1 μl iScript Reverse Transcriptase und dem entsprechenden Volumen an Nuclease-freiem Wasser (Endvolumen 20 μl). Die entstandene cDNA wurde anschließend mit Hilfe der Real-Time PCR im iCycler und unter Verwendung des iQ-SYBR Green Supermixes amplifiziert, wobei je 1 μl jeder RT-Reaktion (1/20 des Gesamtvolumens) mit 10 μl PCR-Mix, der die genspezifischen Oligonukleotide enthielt, vermischt wurde. Die PCR wurde durch einen Hot-Start initiiert (3 min, 94 °C; 30 sec, 60 °C; 45 sec; 70 °C), welchem 45 Zyklen (10 sec, 94 °C; 30 sec, 60 °C; 45 sec, 70 °C mit zusätzlich 5 sec für jeden weiteren Zyklus) folgten. Denaturierung, Annealing und Elongation liefen jeweils unter gleichen Bedingungen (10 sec, 94 °C; 30 sec, 60 °C; 7 min, 70 °C) ab. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass sie ein entsprechendes Intron umfassten und das Annealen zwischen 60 °C bis 70 °C ermöglichten. Als Kontrolle wurden die Haushaltsproteine S18 (ribosomales Protein) bzw. β-Actin mitamplifiziert.

Die Spezifität der entstandenen Produkte wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse (Start bei 60 °C; Temperaturerhöhung bis 90 °C – 1 °C pro 10 sec) bestimmt. Zudem erfolgte der Amplifikatnachweis mittels Agarosegelelektrophorese und die Oligonukleotidstruktur wurde zusätz-

lich durch Sequenzierung überprüft. Die Menge an mRNA wurde mittels bekannter Konzentration eines Standards (Glucocorticoidrezeptor-Gen) und der Amplifikationseffizienz, welche durch den iCycler angezeigt wurde, berechnet.

2.7. Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Nachweismethoden

Die VM197-Zellen wurden mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades und ausgewählter Proteinverteilungsmuster beurteilt.

2.7.1. Lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie von VM197-Zellen

- Olympus CK 40 Inverted Microscope (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany); Okular WHK 10x/20 L, Objektiv A10PL 0,25 160/0,17
- Camera AIPTEK 1,3 Mega (AIPTEK International GmbH, Willich, Germany)
- 2Mega Camera Manager Software
- am RCSI in Dublin:
 - Nikon Eclipse TE 2000-S; Objektiv Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45
 - Hamamatsu Digitalcamera C474295

Die Auswertung ungefärbter Lebendkulturen erfolgte in Zusammenhang mit der Bilderfassung mittels Kamera an einem inversen Lichtmikroskop unter Verwendung eines 10er Objektivs. Die Bildübertragung auf einen PC wurde durch eine 2Mega Camera Manager Software gewährleistet.

2.7.2. Proteinlokalisierung mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie

- MitoTracker (1 mM Stammlösung, 1:5000 im Medium verdünnen)
 - 50 µg MitoTracker[®] Green FM (Invitrogen Carlsbad, USA; Cat. 1391-3)
 - 74,42 µl Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. D-4540)
- 0,2 % TritonX-100 in Aqua dest. (Ferak Berlin GmbH, Berlin, Germany; Cat. 501104)
- Gelatine Gold (Fluka Chemika AG/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. 18808)
 - Blockierlösung/Antikörperlösung (1 % Gelatine Gold in PBS)
 - Waschlösung (0,2 % Gelatine Gold in PBS)
- Zentrifuge 5417R (Rotor # F45-30-11; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Parafilm (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)
- Bisbenzimidlösung (Hoechst Nr. 33258; Endkonz. 1 µg/ml in Aqua dest.; 1 mg/ml Stammlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. B1155)
- ProLong[®] Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA; Cat. P-36930)

Tab. 2.5.: Verwendete Antikörper für die Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Primärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
βIII-Tubulin-FITC-Conjugate	Abcam	Ab25770	mouse 1:70
GFAP Cy3- Conjugate	Sigma	C-9205	mouse 1:200
O4 (Clone 81)	Chemicon	MAB345	mouse 1:50
Sekundärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
mouse Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen	A-11029	goat 1:100
mouse Alexa Fluor [®] 594	Invitrogen	A11032	goat 1:300

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden VM197-Zellen auf DG kultiviert, mit PFA fixiert (siehe 2.1.8.) und hinsichtlich ihrer Morphologie und Proteinlokalisationsmustern beurteilt.

In Fällen, in denen Proteine in Mitochondrien nachgewiesen werden sollten, wurden diese vor der Fixierung für 45 min mit 200 nM MitoTracker gefärbt. Die PFA-fixierten Zellen wurden für 5 min mit 0,2 % TritonX-100 in PBS bei RT permeabilisiert und anschließend zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Diesem Schritt schloss sich ein einstündiger Blockvorgang mit einer 1 %igen Gelatine Gold-PBS-Lösung bei RT an. Alle nachfolgend verwendeten Antikörper (Tab. 2.5.) wurden in 1 %iger Gelatine Gold-PBS-Lösung auf Eis angesetzt und für 5 min bei 4 °C und 17900 x g zentrifugiert. Die anschließende Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer, wobei jeweils 15 µl Antikörperlösung auf einen Parafilm pipettiert wurden, worauf das DG mit der Zellseite gelegt und für eine entsprechende Zeit inkubiert wurde. Die Inkubation des ersten Primärantikörpers dauerte 60 min bei RT, wonach die DG zweimal für 5 min mit 0,2 % Gelatine Gold-PBS-Lösung gespült und nachfolgend für 30-45 min mit dem dazugehörigen Sekundärantikörper inkubiert wurden. Falls die Zellen mit weiteren Antikörpern inkubiert werden sollten, erfolgte die Prozedur auf gleiche Weise wie eben beschrieben mit den entsprechenden Waschschritten dazwischen. Abschließend wurden die DG für 5 min bei RT in einer Hoechst-Lösung gefärbt, dann zweimal 5 min mit 0,2 % Gelatine Gold-PBS-Lösung und zweimal 5 min in PBS gewaschen. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die DG auf Objektträgern mittels je 5 µl Prolong Antifade eingedeckt.

2.7.3. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des Zytoskeletts von VM197-Zellen

Tab. 2.6.: Verwendete Antikörper für Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts

Primärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
Phalloidin-FITC (200 µM)	Sigma	-	mouse 1:300
α-Tubulin	Sigma	-	mouse 1:2000
Sekundärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
mouse Alexa 594	Invitrogen	A11032	goat 1:100

Die VM197-Zellen, die für die mikroskopische Beurteilung ihrer Zytoskelettstruktur verwendet wurden, wurden nach Herstellungsprotokoll von Immunfluoreszenzpräparaten (siehe 2.7.2.; Tab. 2.6.) gefärbt.

2.8. Durchflusszytometrische Quantifizierung der Neuronenzahl in VM197-Zellen

- Labofuge 400 R (Rotor 8179; Heraeus, Instruments GmbH, Hanau, Germany)
- Zentrifuge 5417R (Rotor # F45-30-11; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Rotator (H. Sauer Laborbedarf, Reutigen, Germany)
- Hepes Buffered Saline (HBS; sterilfiltriert)
 - 9 g/l Natriumchlorid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; Cat. # A 3597)
 - 3,33 g/l Hepes (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany; Cat. # 25245)
 - pH 7,5 einstellen
 - ad Aqua dest. 1 l
- Arbeitspuffer
 - 0,1 % (w/v) Bovine Serum Albumine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # A-7906)
 - 0,3722 g/l Ethylendiamintetraacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. # E-6635)
 - pH 7,4 einstellen
 - Phosphate Buffered Saline ad 1 l (PBS; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria; Cat. H15-011)
 - pH 7,4 einstellen
- Coulter Epics XL/MCL, Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- EXPO32 v 1.2 Analysis Programm (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

Tab. 2.7.: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Neuronenquantifizierung

Primärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
human neural protein HuC/D	Invitrogen	# A-21271	mouse 1:1000
Sekundärantikörper	Firma	Bestellnummer	Wirt/Verdünnung
mouse Alexa Fluor® 488	Invitrogen	# A-11029	goat 1:600

In unterschiedlichen Differenzierungsstadien befindliche VM197-Zellen wurden mittels Methanol fixiert (siehe Punkt 2.1.8.) und durchflusszytometrisch auf ihre zelltypspezifische Zusammensetzung hin charakterisiert.

Zuerst wurden die Zellen durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 284 x g und 4 °C vom Fixiermittel getrennt. Das Zellpellet wurde in 300 µl Arbeitspuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe des primären Antikörpers (Tab. 2.7.) erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min und bei 4 °C im Kühlschrank in einem Rotator. Nachfolgend wurde die Zellsuspension für 15 min bei 4 °C und 310 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift erfolgte unter Zugabe von 500 µl Arbeitspuffer und einer

Inkubation im Rotator für 30 min bei RT. Mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 310 x g und 4 °C erfolgte die erneute Pelletierung der Zellen. Dieses wurde nach Verwerfen des Überstandes in 300 µl Arbeitspuffer aufgenommen, in dem sich der sekundäre Antikörper befand, resuspendiert. Um ein Ausbleichen des, mittels Fluoreszenzfarbstoff markierten, Sekundäntikörpers zu verhindern, wurde das Eppendorfgefäß vor der einstündigen Inkubation bei RT im Rotator in Alufolie umwickelt. Diese Inkubation wurde für eine weitere Stunde bei 4 °C fortgesetzt, wonach die Zellen von der Antikörperlösung mittels Zentrifugation abgetrennt und anschließend in 300 µl frischem Arbeitspuffer aufgenommen und für 30 min gewaschen wurden. Nach Entfernen des Arbeitspuffers auf zuvor beschriebene Weise, wurde das Zellpellet in 400 µl HBS resuspendiert und für maximal 30 min bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 4 °C verwahrt. Für die Messung wurden 200 µl der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert, mit 800 µl HBS gemischt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels EXPO32 v1.2 Analysis Programm.

2.9. Untersuchungen zum Einfluss des kanonischen Wnt-Signalweges auf das Expressionsmuster Apoptose-relevanter Proteine

Die unterschiedliche Einflussnahme auf ausgewählte Zielproteine des kanonischen Wnt-Signalweges und die anschließende Analyse der Apoptoserate in differenzierenden VM197-Zellen sollte Aufschluss über einen möglichen Cross-Link dieser beiden Signalkaskaden geben.

2.9.1. Inhibierung von GSK-3 β in VM197-Zellen mittels SB216763

- SB216763 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; Cat. S3442)

Durch Zugabe des GSK-3 β -Inhibitors SB216763 zum Medium der VM197-Zellkultur sollte analysiert werden, ob diese Substanz in der verwendeten Zelllinie den neuronalen Zelltod während der Differenzierung reduziert (Cross et al., 2001).

Auf DG bzw. in Zellkulturgefäßen proliferierende VM197-Zellen wurden zu gegebenem Zeitpunkt auf Differenzierungsmedium, welches mit 10 µM des GSK-3 β -Inhibitors SB216763 versetzt war, umgestellt und zu bestimmten Differenzierungszeitpunkten fixiert (siehe 2.1.8.), mit Bisbenzimid gefärbt (siehe 2.3.1.) und hinsichtlich dem Auftreten von apoptotischen und mitotischen Zellen analysiert bzw. lysiert und für Proteinexpressionsanalysen (siehe 2.5.) verwendet.

2.9.2. Inkubation der VM197-Zellen mit rekombinantem Wnt-3a

- recombinant mouse Wnt-3a (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA; Cat. 1324-WN)

Durch Zugabe des rekombinanten Proteins Wnt-3a zu differenzierenden VM197-Zellen sollte der mögliche anti-apoptotische Effekt dieses Proteins (Almeida et al., 2005) untersucht werden. Auf DG proliferierende VM197-Zellen wurden dafür zu gegebenem Zeitpunkt auf Differenzierungsmedium, welches mit 50 ng/ml Wnt-3a versetzt war, umgestellt und zu bestimmten Diffe-

renzierungszeitpunkten (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) fixiert (siehe 2.1.8.), mit Bisbenzimid gefärbt (siehe 2.3.1.) und hinsichtlich dem Auftreten von apoptotischen und mitotischen Zellen analysiert.

2.10. Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Office Excel 2003. Auf Grundlage der Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen bzw. Standardfehlern der Mittelwerte von Kontroll- und Stichprobenergebnissen der durchgeführten Versuchsreihen war es möglich, Versuchsergebnisse grafisch darzustellen und Interpretationen zu formulieren. Durch die Gegenüberstellung der Daten von differenzierten bzw. behandelten Zellproben und proliferierenden Zellproben bzw. Negativkontrollen im Student's t-Test (zweiseitig; für zwei Stichproben ungleicher Varianz) konnten Aussagen über die Vergleichbarkeit auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$) getroffen werden.

Zusätzlich wurde als Alternative zum Student's t-Test der Rangsummentest nach Wilcoxon bei der Analyse der Proteinexpressionsdaten angewendet, wenn die Voraussetzungen dafür erfüllt waren.

Für die statistische Beurteilung der Microarraydaten wurden der One-Way ANOVA-Test und nachfolgend Tukey's Post-hoc-Test herangezogen, die ebenfalls auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgesetzt wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von differenzierenden VM197-Zellen

Zur zweifelsfreien Unterscheidung von proliferierenden und differenzierten VM197-Zellen wurden in erster Linie morphologische Charakteristika wie der Zellhabitus und die zelluläre Typisierung, sowie zusätzlich physiologische Aspekte wie der Proliferationsindex für die Beurteilung der VM197-Zellpopulationen herangezogen.

3.1.1. Morphologie von VM197-Zellen

Die morphologische Charakterisierung von proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen erfolgte unter Anwendung der Phasenkontrast- und indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie sowie mittels Durchflusszytometrie.

3.1.1.1. Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung von VM197-Zellen

Proliferierende Zellen (Kontrolle, 0 h) zeigten in der Phasenkontrastmikroskopie einen polygonalen Zellhabitus mit breiten, flachen Zellkörpern und kurzen Zellfortsätzen. Mitotisch aktive Zellen waren durch ihre abgekugelte Form gekennzeichnet. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden in diesem Stadium einige GFAP-positive, astrozytäre Zellen detektiert (Abb. 3.1.). Sechs Stunden nach Differenzierungsbeginn zeigte sich eine Zunahme der Apoptoserate in Zellpräparaten im Vergleich zur Kontrolle (0 h). Sowohl in proliferierenden, als auch in differenzierenden Kulturen wurde Mitoseaktivität beobachtet.

Ab 24 h nach Differenzierungsbeginn wurde zunehmend deutlich, dass die Zellkörper der VM197-Zellen schrumpften und die Zellausläufer länger und schmaler wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurden eine verstärkte Clusterbildung und Vernetzung der Zellen beobachtet. Neben der Zunahme GFAP-positiver Zellen (Astrozyten) wurden erste β III-Tubulin-positive Zellen (Neurone) detektiert. Ab diesem Differenzierungsstadium waren nur noch wenige mitotische Zellen in den Kulturen vorhanden.

Nach dreitägiger Differenzierung der VM197-Zellen war der Vernetzungsgrad zwischen Astrozyten und Neuronen noch höher ausgeprägt. Apoptotische Zellen waren weiterhin in den Kulturen nachweisbar. Oligodendrozyten konnten allerdings nicht mittels O4-Antikörper detektiert werden.

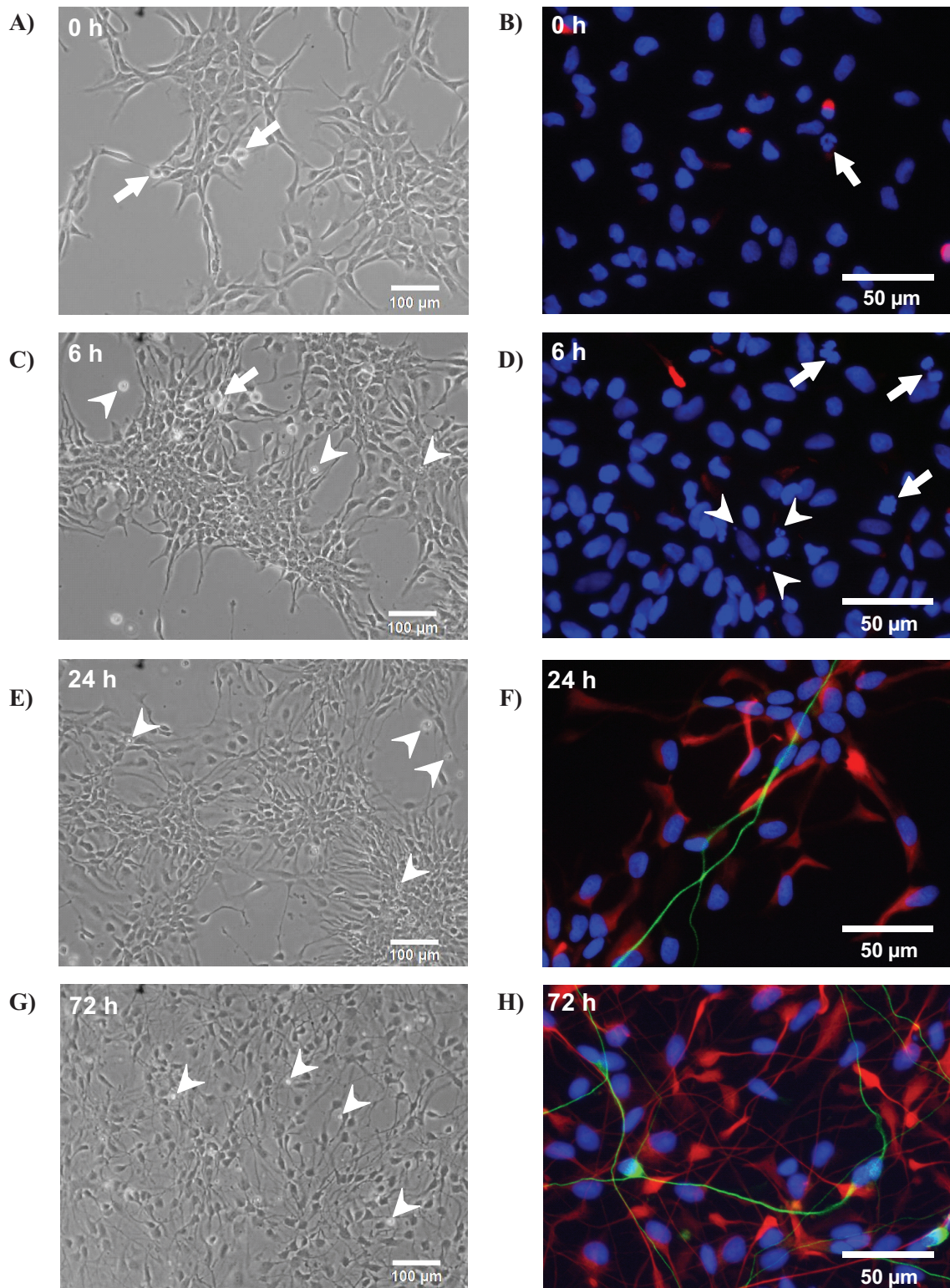


Abb. 3.1.: Differenzierungsbedingte morphologische Veränderungen von VM197-Zellen. Eine Zunahme apoptotischer Zellen (Pfeilköpfe) sowie eine Verringerung von mitotischen Zellen (Pfeile) waren mit Differenzierungsbeginn im Vergleich zur Kontrolle (0 h) erkennbar. Astrozyten (rot; GFAP-Cy3) und Neurone (grün; BIII-Tubulin-FITC) wurden ab 24 h nach Differenzierungsbeginn nachgewiesen. Lebendpräparate Abb. A, C, E, G (Phasenkontrastmikroskopie); PFA-Fixierung Abb. B, D, F, H (Fluoreszenzmikroskopie); Zellkerne, Hoechst, blau.

Sowohl Staurosporin (2 μM), als auch UV-B-Strahlung (0,45 J/cm^2) erwiesen sich als potente Apoptoseinduktoren in der Exposition von VM197-Zellkulturen (Abb. 3.2.).

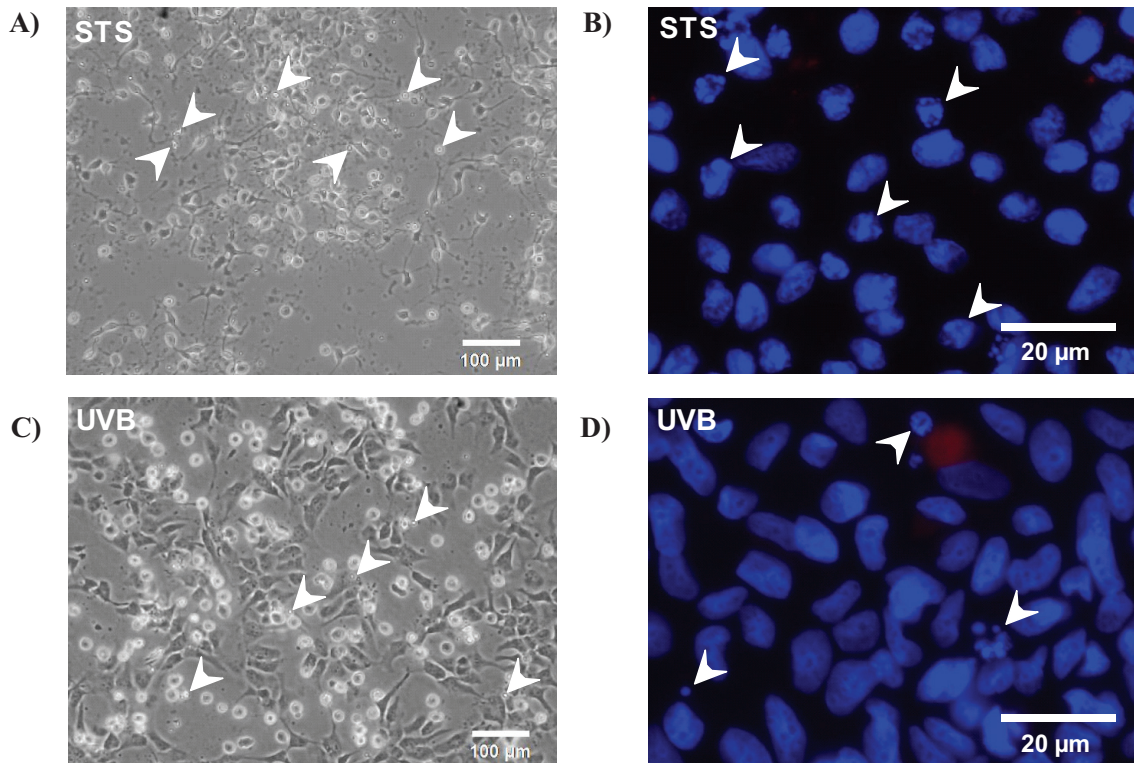


Abb. 3.2.: Apoptoseinduktion in differenzierenden VM197-Zellen mittels Staurosporin und UV-B-Strahlung. Eine Zunahme der Apoptoserate (Pfeilköpfe) in differenzierenden VM197-Zellen war nach dreistündiger Behandlung mit 2 μM Staurosporin (STS) respektive vier Stunden nach Bestrahlung mit 0,45 J/cm^2 UV-B im Vergleich zur Kontrolle (0 h) zu beobachten. Astrozyten (rot; GFAP-Cy3) und Neurone (grün; β III-Tubulin-FITC) wurden nicht nachgewiesen. Lebendpräparate Abb. A und C (Phasenkontrastmikroskopie); PFA-Fixierung Abb. B und D (Fluoreszenzmikroskopie); Zellkerne, Hoechst, blau.

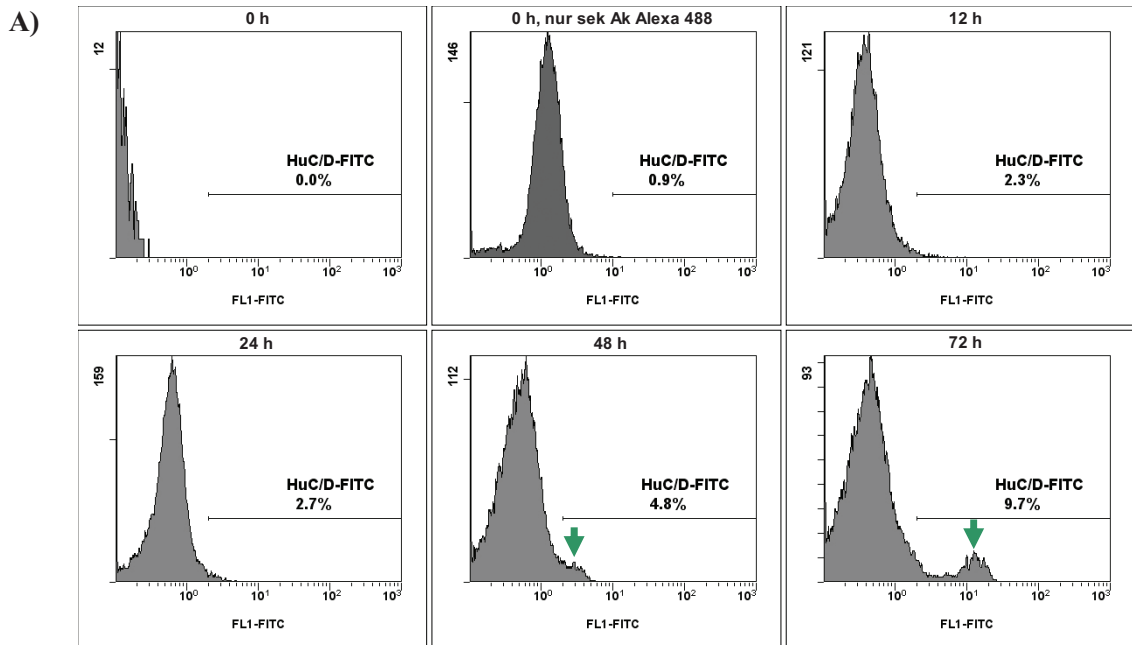
Staurosporin induzierte dabei in VM197-Zellkulturen überwiegend eine Schädigung der Zellausläufer, der Zellkernstruktur und viel Zelldebris. UV-B-Strahlung bewirkte dagegen eine Abkugelung der Zellen. Mitotische Zellen traten nach beiden Behandlungsarten nur noch vereinzelt bzw. nicht mehr auf.

3.1.1.2. Durchflusszytometrische Quantifizierung der Neuronenzahl in VM197-Zellkulturen

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass VM197-Zellen durch Entzug von Wachstumsfaktoren in den neuronalen und den glialen Zelltypus differenzieren, wurde untersucht, welchen Anteil beide Zelltypen an der Gesamtzellpopulation zu verschiedenen Zeiten nach Differenzierungsbeginn ausmachen.

Hierfür wurden VM197-Zellen des neuronalen Typs spezifisch durch einen Primärantikörper, der gegen die humanen, neuronalen Proteine HuC und HuD der ELAV-Familie (embryonic lethal abnormal visual family) gerichtet ist, markiert. Das Hu-Antigen ist ein RNA-Bindepro-

tein, dessen Expression in der frühen Entwicklungsphase von neuronalen Zellen, nämlich während diese als Neuronen den mitotischen Zellzyklus verlassen, nachweisbar wird. Die Quantifizierung des Anteils HuC-/HuD-positiver VM197-Zellen (Neurone) erfolgte durch einen sekundären FITC-Antikörper (Alexa Fluor 488) mit Hilfe der Durchflusszytometrie.



B)

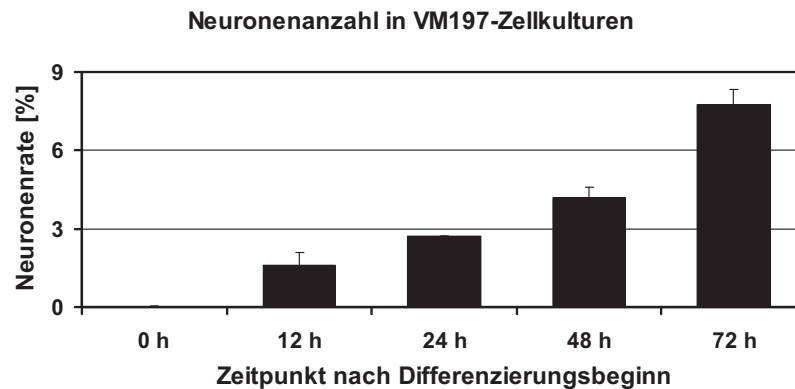


Abb. 3.3.: Durchflusszytometrische Quantifizierung der Neuronenanzahl in differenzierenden VM197-Zellen. **A)** Exemplarische Darstellung von Histogrammen der durchflusszytometrischen Messungen von HuC/D-positiven (FL1-FITC), neuronalen VM197-Zellen. Der Entzug von Wachstumsfaktoren führte zu einer Ausdifferenzierung von VM197-Zellen zu HuC/D-positiven Neuronen. Ab 48 h nach Differenzierungsbeginn zeigte sich ein schwacher, neuronenspezifischer Peak (grüner Pfeil), der sich 72 h nach Wachstumsfaktorentzug eindeutig von der Gesamtzellpopulation abgrenzen ließ. **B)** Quantifizierung der HuC/D-positiven VM197-Zellen während der Differenzierung. Ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn zeigte sich eine stetige Zunahme an neuronalen Zellen gegenüber der Kontrolle (0 h), wobei das Maximum bei durchschnittlich 7,8 % Neuronen pro 20000 analysierter Zellen lag. Methanol-Fixierung, Alexa Fluor 488-Färbung; MW \pm SD, N=2.

Aus den Histogrammen der durchflusszytometrischen Analyse der Grünfluoreszenzintensität der VM197-Zellen (Abb. 3.3. A) wurde ersichtlich, dass proliferierende Zellen (0 h) eine sehr geringe Eigenfluoreszenz aufwiesen, wobei jedoch die alleinige Zugabe des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 zu den Zellen bereits eine generelle Verschiebung des Grünfluoreszenzpeaks nach rechts und somit eine Erhöhung der Grünfluoreszenz bewirkte. Während der Proliferation der VM197-Zellen wurden keine neuronalen Zellen detektiert, wohingegen nach Einleitung der Differenzierung eine stetige Zunahme an Neuronen nachweisbar war. Zwölf Stunden bzw. 24 h nach Einleitung der Differenzierung wurde ein durchschnittlicher Anteil von 1,6 % bzw. 2,7 % an schwach grün fluoreszierenden Zellen detektiert. Ein deutlich erkennbarer und von der Gesamtpopulation abgrenzbarer Peak intensiv grün fluoreszierender VM197-Zellen (Abb. 3.3. A, grüner Pfeil) zeichnete sich ab 48 h nach Differenzierungsbeginn mit einem durchschnittlichen Anteil von 4,2 % ab. Drei Tage nach Differenzierungsbeginn betrug der durchschnittliche Anteil an Neuronen 7,8 %, wobei der restliche Zellanteil von ungefähr 92 % der Gliazellpopulation bzw. noch undifferenzierten Zellen zugeordnet wurde (Abb. 3.3. B).

3.1.1.3. Veränderungen des Zytoskeletts während der Differenzierung von VM197-Zellen

Die neurale Differenzierung von VM197-Zellen ging, parallel zu den zellmorphologischen Veränderungen (Punkt 3.1.1.1.), mit der Umstrukturierung der Zytoskelettcomponenten Actin und α -Tubulin einher (Abb. 3.4.).

Actin und α -Tubulin stellen in Form von Mikrofilamenten bzw. Mikrotubuli, Bestandteile des Zytoskeletts von VM197-Zellen dar, welches unter anderem für deren Strukturgebung, Zellkompartimentierung, intrazellulären Stofftransport und interzelluläre Konnektivität essentiell ist.

In proliferierenden VM197-Zellen (0 h) bildeten sowohl Mikrofilamente, als auch Mikrotubuli ein kompaktes Maschenwerk, welches hauptsächlich im Bereich nahe der Plasmamembran lokalisiert war. Alpha-Tubulin war gleichzeitig an der Ausbildung vereinzelter Neuriten beteiligt. Bereits 6 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn wurden Mikrofilament- und Mikrotubulistruktur weitmaschiger und durchzogen das Zytoplasma und die nun vermehrt gebildeten Zellausläufer. Nach dreitägiger Differenzierung der Zellen wurden die Zellkörper und deren Ausläufer vorwiegend von Mikrofilamenten durchzogen, wohingegen sich α -Tubulin, vergleichbar zum sehr frühen Differenzierungsstadium (6 h) der Zellen, allerdings etwas diffuser verteilt, vorwiegend auf Bereiche in Zellkernnähe konzentrierte.

Eine Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit Staurosporin bewirkte die Zerstörung des Actinmaschenwerks, wohingegen sich die Mikrotubuli zu kompakten Bündeln innerhalb radialsymmetrischer Neuriten formierten.

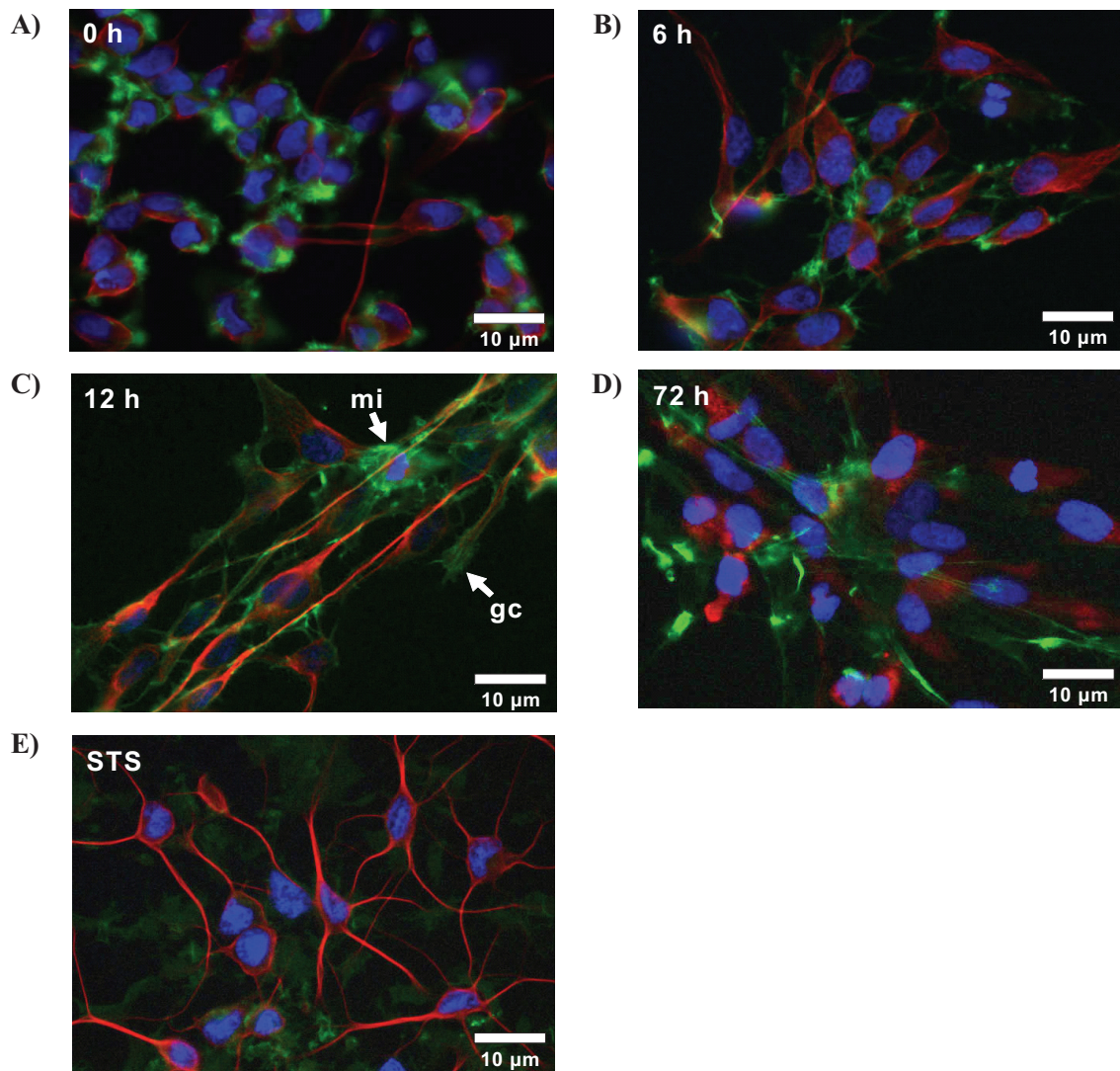


Abb. 3.4.: Veränderungen des Zytoskeletts in differenzierenden VM197-Zellen. In proliferierenden VM197-Zellen (0 h) wurden engmaschige Netzwerke aus Mikrofilamenten (Actin, grün) und Mikrotubuli (α -Tubulin, rot) vor allem im Bereich nahe der Plasmamembran lokalisiert. Zudem waren vereinzelte Neuriten erkennbar, die durch Mikrotubulistrukturen stabilisiert wurden. Im weiteren Differenzierungsverlauf der Zellen (6 h und 12 h) waren Actin und α -Tubulin verstärkt in das Neuritenwachstum involviert und an der Ausbildung von Wachstumskegeln (growth cone, gc) sowie an Mitoseprozessen (mi) beteiligt. Nach 72 h Differenzierung durchspannten die Actinstrukturen weiterhin die Zellkörper der Zellen, wohingegen α -Tubulin überwiegend in Zellkernnähe lokalisiert war. Die Behandlung differenzierender Zellen mit 2 μ M Staurosporin induzierte die Zerstörung der Mikrofilamente und stabilisierte dagegen Mikrotubulistrukturen. PFA-Fixierung; Phalloidin-FITC; Alexa Fluor 594; Zellkerne, Blaufluoreszenz, Hoechst.

3.1.2. Physiologie von differenzierenden VM197-Zellen

Im nachfolgenden Abschnitt ist beschrieben, in wieweit sich die Einleitung der Differenzierung von VM197-Zellen auf deren Proliferationsaktivität und deren Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen auswirkte.

3.1.2.1. Bestimmung der Zellzyklusverteilung in differenzierenden VM197-Zellkulturen

Die durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes proliferierender und differenzierender VM197-Zellen gab Aufschluss über die Zellverteilungen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen (Abb. 3.5.).

Dabei zeigte sich, dass sich etwa 57 % und damit der Großteil der analysierten proliferierenden VM197-Zellen (0 h) in der G0/G1-Phase (Ruhephase/postmitotisch) befanden. Der verbleibende Zellanteil teilte sich zu etwa 20 % auf die S-Phase (Synthesephase) und zu etwa 23 % auf die G2-Phase (prämitotisch) bzw. die M-Phase (Mitosephase) auf.

Dieses Zellzyklusverteilungsmuster war bis 4 h nach Differenzierungsbeginn vergleichbar mit der Kontrolle (0 h). Sechs Stunden nach Differenzierungsbeginn war hingegen der Anteil an Zellen der S-Phase um etwa 16 % signifikant gegenüber der Kontrolle verringert, wohingegen der Zellanteil in der G2/M-Phase um 15 % zunahm. Diese Tendenz der Zellzyklusverteilung war auch 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn zu beobachten. Ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn wurde eine signifikante Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase um durchschnittlich 20 % gegenüber der Kontrolle nachgewiesen, wobei sich der Anteil an Zellen in der S-Phase auf durchschnittlich 3 % signifikant verringerte. Der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase blieb dabei relativ unverändert bzw. nahm 24 h nach Differenzierungsbeginn um 10 % signifikant gegenüber der Kontrolle ab.

In den Histogrammen der Durchflusszytometermessungen war zusätzlich ein relativ kleiner Peak an apoptotischen Sub-G1-Zellen ersichtlich (Abb. 3.5. A, siehe Punkt 3.2.2.2.).

VM197-Zellen, die mit Einleiten der Differenzierung zusätzlich mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelt wurden, zeigten relativ ähnliche Zellzyklusverteilungen wie die Kontrollzellen, wobei bezüglich der Staurosporin-Behandlung ein signifikanter Abfall von Zellen der G0/G1-Phase um 21 % gegenüber der Kontrolle gemessen wurde.

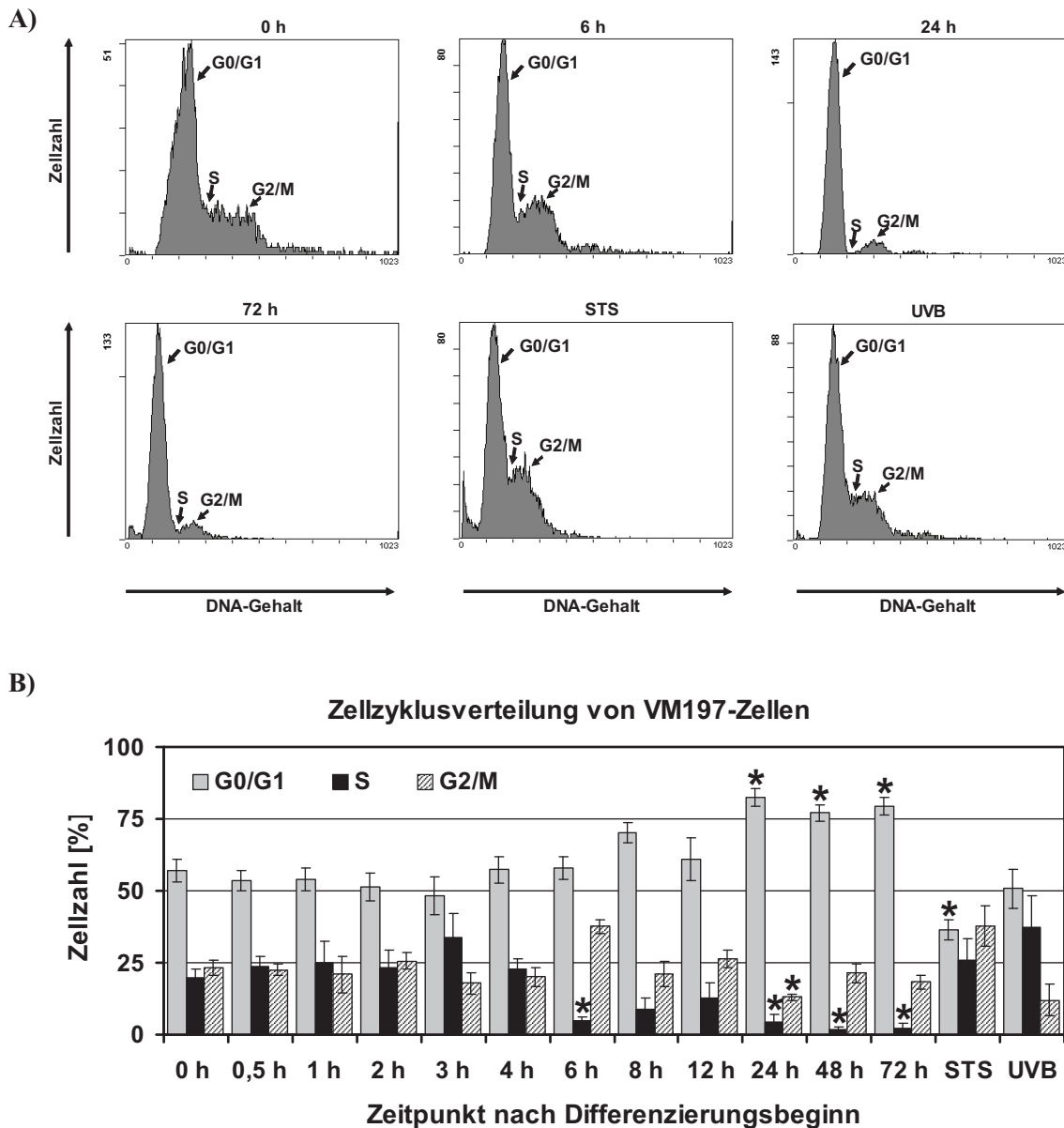


Abb. 3.5.: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung differenzierender VM197-Zellen. A) Beispielhafte Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des DNA-Gehalts differenzierender VM197-Zellen (Propidiumiodid-positiv, Rotfluoreszenz). Ab 12 h nach Differenzierungsbeginn arretierte ein Großteil der Zellen in der G0/G1-Phase, wohingegen der Anteil an Zellen in der S-Phase bzw. in der G2/M-Phase abnahm. Zudem formierte sich im Differenzierungsverlauf, sowie nach Behandlung der Zellen mit 2 μM Staurosporin (STS) bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung (UVB), ein Sub-G1-Peak aus apoptotischen Zellen. B) Quantitatives Verteilungsmuster differenzierender VM197-Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn arretierten signifikant mehr Zellen in der G0/G1-Phase, wohingegen der Zellanteil in der S-Phase bei 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt war. Der Zellanteil in der G2/M-Phase war vergleichbar mit der Kontrolle. Eine Behandlung differenzierender Zellen mit 2 μM Staurosporin bewirkte einen signifikanten Rückgang des Zellanteils in der G0/G1-Phase. Methanol-Fixierung, Propidiumiodid-Färbung; je 5000-10000 Zellen pro Ansatz analysiert; MW \pm SEM, N=5, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Wie aus Abbildung 3.6. A ersichtlich wird, waren in einigen Histogrammen der Zellzyklusanalyse von VM197-Zellen weitere flachere Peaks nach der G2/M-Phase auffällig. Das Vorliegen von tetraploiden Subpopulationen wurde jedoch durch die stichprobenhafte Analyse von Metaphaseplattenpräparaten ausgeschlossen, da die Auswertung der mikroskopischen Bilder ausschließlich diploide Chromosomensätze zeigte (Abb. 3.6. B).

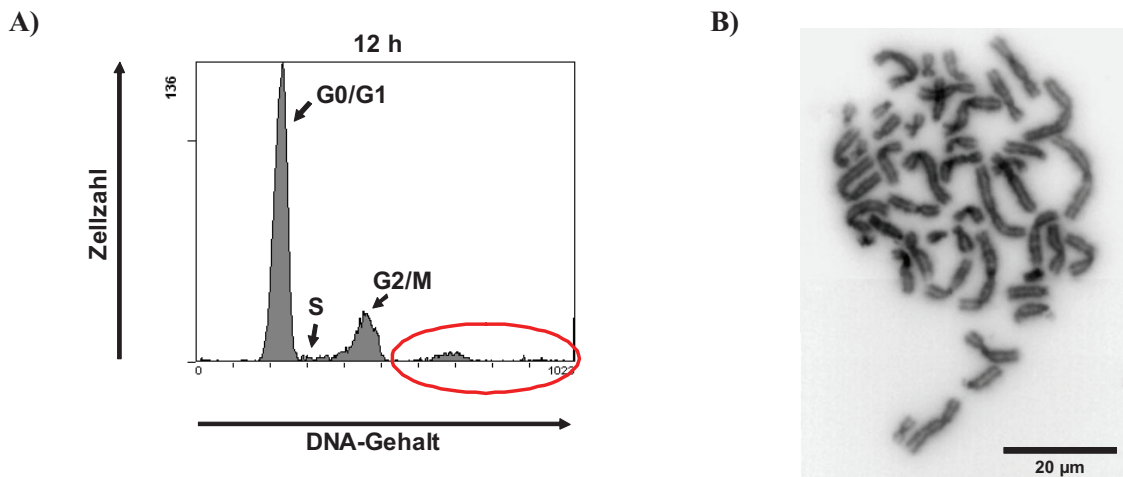


Abb. 3.6.: Analyse von VM197-Zellen hinsichtlich Tetraploidie. **A)** Beispielhaftes Histogramm der Zellzyklusanalyse von VM197-Zellen. Nach dem eigentlichen G2/M-Peak zeigten sich weitere kleinere Peaks, die Zellen mit einer intensiveren Propidiumiodid-Rotfluoreszenz darstellten (rot eingekreist). **B)** Beispielhafte Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von Metaphasechromosomen einer proliferierenden VM197-Zelle. Die stichprobenhafte Analyse des Chromosomenanteils in VM197-Zellen ergab, dass keine Zellen mit tetraploidem, sondern mit diploidem Chromosomensatz vorlagen. Methanol/Eisessig-Fixierung, Hoechst-Färbung, nachbearbeitet in Photoshop.

3.1.2.2. Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellkulturen

Während der Prophase der Mitose kondensieren die Chromosomen im Zellkern zunehmend und werden lichtmikroskopisch sichtbar. Eine Anfärbung der DNA-Strukturen in adhärenenten VM197-Zellen mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid ermöglichte eine quantitative Beurteilung der Mitoseaktivität dieser Zellen während der Differenzierung.

In Anbetracht der Mitoserate proliferierender VM197-Zellen bis zum Zeitpunkt 72 h nach Differenzierungsbeginn zeigte sich ein biphasischer Verlauf (Abb. 3.7.), wobei sich die festgestellten Schwankungen der Mitoseaktivität als nicht signifikant herausstellten. In der Kontrolle (0 h) waren 2,7 % der Zellen mitotisch aktiv, was auch 6 h nach Differenzierungsbeginn verzeichnet wurde. Ab 0,5 h bis 4 h nach Differenzierungsbeginn war ein geringerer Rückgang der Mitoserate gegenüber der Kontrolle erkennbar, wobei eine maximale Abnahme an Mitosezellen um 1,9 % eine Stunde nach Differenzierungsbeginn auftrat. Bei 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn lag der Anteil mitotisch aktiver Zellen mit etwa 1,8 % nah am Wert des Zeitpunktes 0,5 h nach Differenzierungsbeginn. Zum Zeitpunkt 24 h nach Differenzierungsbeginn wurde mit einem Anteil von 0,2 % die geringste Mitoserate innerhalb der Differenzierungszeitreihe verzeichnet. Bei 72 h nach Differenzierungsbeginn stieg die Mitoserate der Zellen auf 1,3 % an.

Die Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung führte zu einer drastischen Verringerung der Mitoserate auf 0,1 % bzw. 0,02 %.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an VM197-Zellen während der Differenzierungszeitreihe zeigte keine signifikanten Veränderungen, sondern blieb relativ konstant (Daten sind nicht gezeigt).

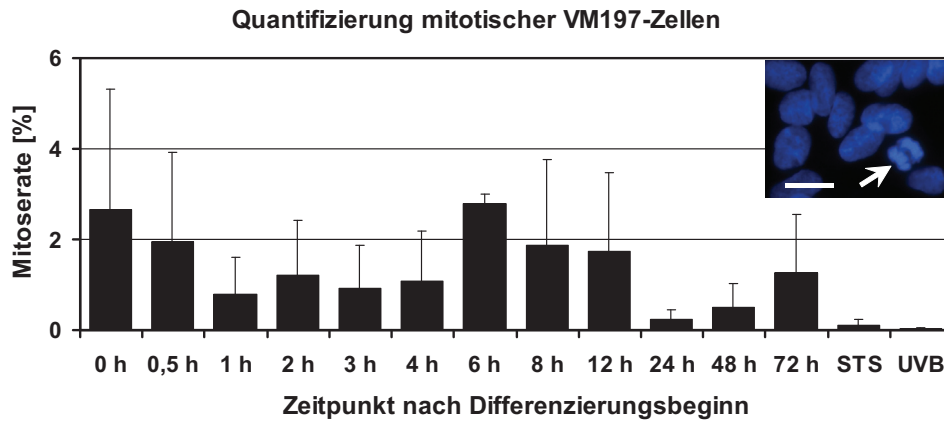


Abb. 3.7.: Mitotische VM197-Zellen während der Differenzierung. Die Mitoserate änderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung; MW \pm SD, n=6.

3.2. Charakterisierung apoptotischer Vorgänge in VM197-Zellen

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass VM197-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug zu neuronalen Zelltypen differenzierten und dabei ihre proliferative Aktivität zeitweise abnahm, geben die folgenden Ergebnisdarstellungen einen Überblick über den Apoptosestatus in proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellkulturen.

3.2.1. Quantitative mikroskopische Bestimmung apoptotischer VM197-Zellen

Parallel zur Bestimmung des Mitoseindex wurden adhärente VM197-Zellen hinsichtlich ihrer Apoptoserate analysiert. Als Marker für das Auftreten spätapoptotischer Zellfragmentierung wurde die Formation von so genannten apoptotischen Körperchen ("apoptotic bodies") herangezogen.

In proliferierenden Zellen (0 h) betrug der durchschnittliche Anteil spätapoptotischer Zellen 0,1 % bezüglich der Gesamtpopulation (Abb. 3.8.).

Ab 0,5 h bis 2 h nach Differenzierungsbeginn war die Apoptoserate von VM197-Zellen um 0,1 bis 0,04 % gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Dagegen wurde eine stetige Zunahme apoptotischer Zellen bei 3 h und 4 h nach Differenzierungsbeginn nachgewiesen, die bei letztgenanntem Zeitpunkt mit einer, um 0,5 % erhöhten, Apoptoserate gegenüber der Kontrolle ihr signifikantes Maximum erreichte. Auch 6 h nach Differenzierungsbeginn lag die Apoptoserate auf einem, um 0,3 % signifikant erhöhtem, Niveau gegenüber dem Kontrollwert. Ab 8 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn war der Anteil apoptotischer Zellen rückläufig und mit der Apoptoserate der Kontrolle vergleichbar.

Die Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung induzierte einen Anstieg der Apoptoserate um 1,7 % signifikant bzw. 0,2 % gegenüber der Kontrolle.

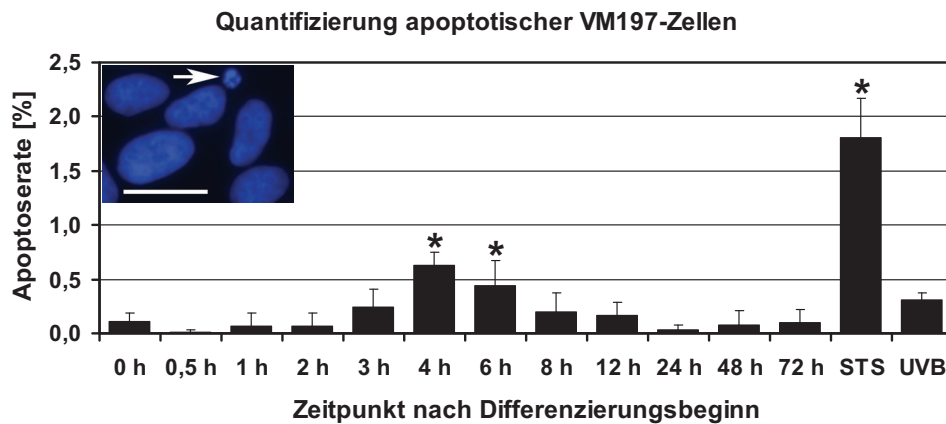


Abb. 3.8.: Apoptotische VM197-Zellen während der Differenzierung. Die Apoptoserate stieg in VM197-Zellen 4 h und 6 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin signifikant gegenüber der Kontrolle an. Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung; MW \pm SD, n=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.2.2. Durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer VM197-Zellen

Die Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen während der Differenzierung erfolgte mittels Annexin V-FITC/PI-Assay bzw. in Verbindung mit der Zellzyklusanalyse.

3.2.2.1. Annexin V-FITC/PI-Assay

Die Diskriminierung von VM197-Zellen hinsichtlich spezifischer Apoptosemarker erfolgte mittels Annexin V-FITC/Propidiumiodid-Vitalfärbung.

In den unterschiedlichen Versuchsreihen wurden nicht nur adhärenente Zellen, sondern auch der jeweilige Kulturüberstand am Durchflusszytometer gemessen.

Da sich sowohl in den Histogramm-, als auch in den Dotplotdarstellungen der durchflusszytometrischen Messergebnisse zwei Zellpopulationen aufgrund ihrer Größenverteilungen deutlich voneinander abgrenzen ließen (Abb. 3.9.), wurden diese zum Proliferationszeitpunkt und während der Differenzierung getrennt voneinander analysiert. Das gesetzte A-Gate stellte die adhärenente Zellen und das B-Gate die Zellen bzw. Zellbestandteile des Kulturüberstandes dar.

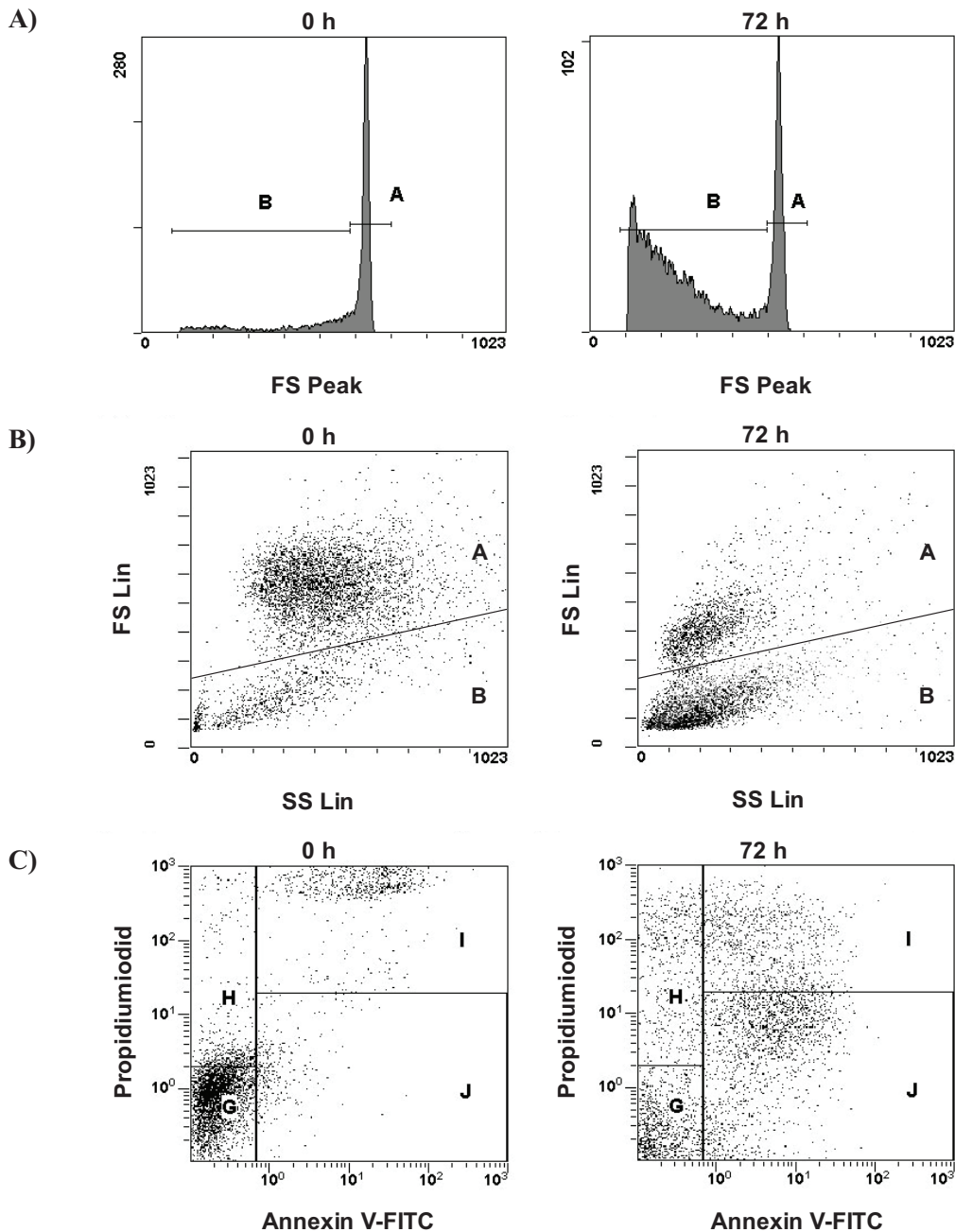


Abb. 3.9.: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate differenzierender VM197-Zellen. Beispielhafte Histogramme und Dotplots der durchflusszytometrischen Messungen Annexin V-FITC-positiver (Grünfluoreszenz) und Propidiumiodid-positiver (Rotfluoreszenz) VM197-Zellen. **A)** Beispielhafte Histogramme der Größenverteilung von VM197-Zellen. Der Anteil an Zellen und Debris im Kulturüberstand (B-Gate) nahm 72 h nach Differenzierungsbeginn deutlich im Vergleich zur Kontrolle (0 h) zu. Das A-Gate grenzte die adhärennten Zellen ein und veränderte sich dementsprechend. **B)** Im Dotplot ließen sich Zellen und Zellbestandteile des A- und B-Gates eindeutig als Populationen unterschiedlicher Größenverteilungen voneinander abgrenzen. **C)** Im Vierquadrantendotplot zeigten sich mehr vitale Zellen (G-Gate, ungefärbt) in der Kontrolle als 72 h nach Differenzierungsbeginn. Dagegen befanden sich nach 72 h Differenzierung überwiegend frühapoptotische Zellen (J-Gate; Annexin V-FITC-positiv, PI-negativ), spätapoptotische/nekrotische Zellen (I-Gate; Annexin V-FITC-positiv, PI-positiv) und Zellkernfragmente (H-Gate; Annexin V-FITC-negativ, PI-positiv) in der Kultur im Vergleich zur Kontrolle. Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen.

In Anbetracht der Peakverteilung der gemessenen Events lässt sich sagen, dass im Verlauf der Differenzierung zunehmend Zellen bzw. Zellbestandteile im Kulturüberstand akkumulierten (Abb. 3.9. A). Der Peak des B-Gates umfasste 72 h nach Differenzierungsbeginn deutlich mehr Messereignisse im Vergleich zur Kontrolle (0 h). Zudem zeichnete sich diese Verteilung der Events in den dargestellten Dotplots ab. Die adhärenenten Zellen des A-Gates waren augenscheinlich größer und strukturierter als die Zellen des Kulturüberstandes. Aus der zunächst diffuseren Zellverteilung während der Proliferationsphase formierten sich zwei distinkte Zellpopulationen, wobei durchschnittlich eine Größenreduktion der adhärenenten Zellen ersichtlich wurde (Abb. 3.9. B).

Proliferierende VM197-Zellen waren überwiegend ungefärbt und befanden sich demnach in einem stabilen Vitalitätszustand (Abb. 3.9 C). Ein demgegenüber auffällig geringer Anteil der proliferierenden Zellpopulation unterlag apoptotischen bzw. nekrotischen Absterbeprozessen.

Nach 72 h Differenzierung war die Anzahl vitaler Zellen gegenüber der Kontrolle (0 h) deutlich geringer. Zudem überwog zu diesem Differenzierungszeitpunkt der Anteil frühapoptotischer, spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellen und Zelldebris im Vergleich zu proliferierenden Zellen.

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse ergab, dass zum Proliferationszeitpunkt und bis 1 h nach Differenzierungsbeginn etwa 65 % der Zellen adhärenent waren und sich etwa 35 % im Zellkulturüberstand befanden (Abb. 3.10.).

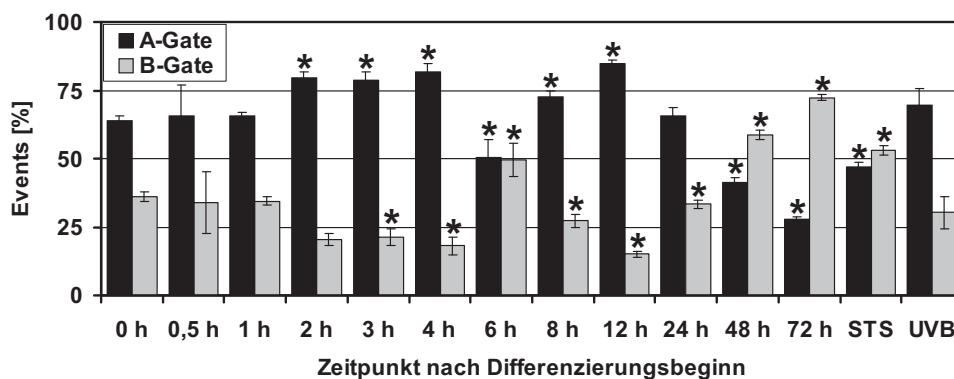


Abb. 3.10.: Quantitative Bestimmung des Anteils adhärenenten und abgelöster VM197-Zellen während der Differenzierung. Während der frühen Differenzierungsphase (0,5 h bis 24 h nach Differenzierungsbeginn) befanden sich die VM197-Zellen vorwiegend in adhärenenten Form (A-Gate). Zu späteren Differenzierungszeitpunkten (48 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn) und nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin überwog der Anteil an Zellen im Kulturüberstand (B-Gate). Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen; MW \pm SD; N=3; *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Ab 2 h bis 4 h bzw. 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn war der Anteil adhärenenten Zellen um durchschnittlich etwa 10 % signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Dahingegen war der Anteil adhärenenten Zellen 6 h, 48 h, 72 h nach Differenzierungsbeginn und nach Behandlung mit Staurosporin um durchschnittlich 24 % geringer im Vergleich zur Proliferationskultur. VM197-Zellen und Zellbestandteile im Kulturüberstand verringerten sich 3 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Differenzierungsbeginn um durchschnittlich 13 % signifikant gegenüber der Kontrolle. Dahingegen akkumulierten die Zellen 6 h, 48 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie

nach Behandlung mit Staurosporin um durchschnittlich 22 % signifikant zunehmend im Kulturüberstand gegenüber dem Proliferationsstatus.

3.2.2.1.1. Vitale (Annexin V-/PI-) VM197-Zellen während der Differenzierung

Ungefärbte und demnach vitale VM197-Zellen befanden sich während der Proliferation und der Differenzierungszeitreihe überwiegend im adhärenen Zustand. Vitale proliferierende Zellen (0 h) waren zu 84 % adhären und zu 58 % im Kulturüberstand (Abb. 3.11.). Der Anteil vitaler, adhärenter Zellen bzw. vitaler Zellen im Kulturüberstand erhöhte sich 1 h bis 4 h und 8 h nach Differenzierungsbeginn um durchschnittlich 8 % bzw. 14 % signifikant gegenüber der Kontrolle. Dahingegen verringerte sich der ungefärbte, vitale Anteil adhärenter Zellen 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn und nach Behandlung mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung um durchschnittlich 22 % im Vergleich zum Proliferationsstatus. Sechs Stunden nach Differenzierungsbeginn und nach den zuvor benannten Differenzierungszeitpunkten und Behandlungen der Zellen war der Anteil ungefärbter, vitaler Zellen im Kulturüberstand um durchschnittlich 20 % signifikant geringer als in der Kontrolle.

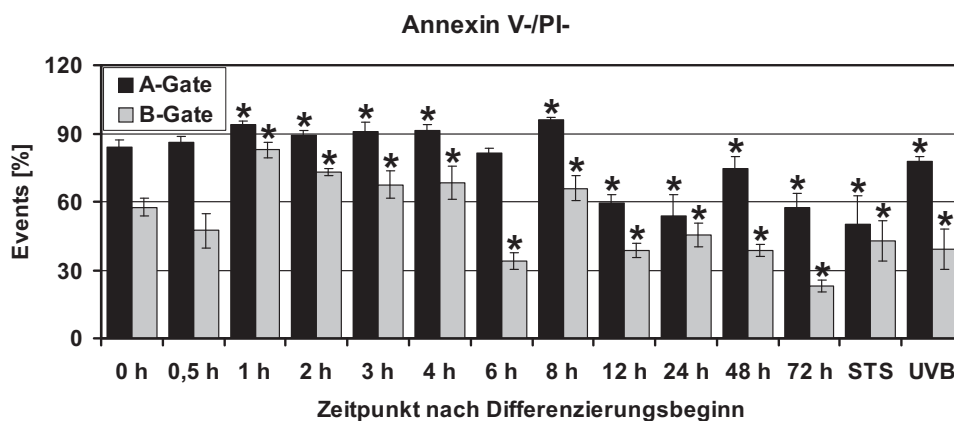


Abb. 3.11.: Quantitative Bestimmung vitaler VM197-Zellen während der Differenzierung. Während der frühen Differenzierungsphase (1 h bis 8 h nach Differenzierungsbeginn) wurde fast ausschließlich eine signifikante Zunahme vitaler VM197-Zellen in adhärenter Form (A-Gate) und im Kulturüberstand (B-Gate) gemessen. Zu späteren Differenzierungszeitpunkten (6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn) und nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung war der Anteil vitaler Zellen in adhärenem Zustand und im Kulturüberstand signifikant rückläufig. Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen; MW \pm SD; N=3; *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.2.2.1.2. Frühapoptotische (Annexin V+/PI-) VM197-Zellen während der Differenzierung

Während der Proliferation zeigten ungefähr gleiche Anteile an adhärenen (5 %) und abgelösten (4 %) VM197-Zellen Charakteristika des frühen Apoptosestadiums (Abb. 3.12.).

Nach 2 h und 6 h Differenzierung war die Rate frühapoptotischer Zellen um durchschnittlich 7 % signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Acht Stunden nach Differenzierungsbeginn wurden 3 % signifikant weniger frühapoptotische Zellen der adhärenen Form im Vergleich

zum Proliferationsstatus detektiert. Ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn und nach Staurosporinbehandlung stieg der Anteil an adhärenenten, frühapoptotischen Zellen um durchschnittlich 33 % signifikant gegenüber der Kontrolle an. Die Exposition mit UV-B-Strahlung induzierte in differenzierenden VM197-Zellen einen signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen um 13 % gegenüber der Kontrolle

In Korrelation zu den benannten Auffälligkeiten adhärenenter Zellen während der Differenzierung, erhöhten sich ebenso die Anteile frühapoptotischer Zellen in den Kulturüberständen.

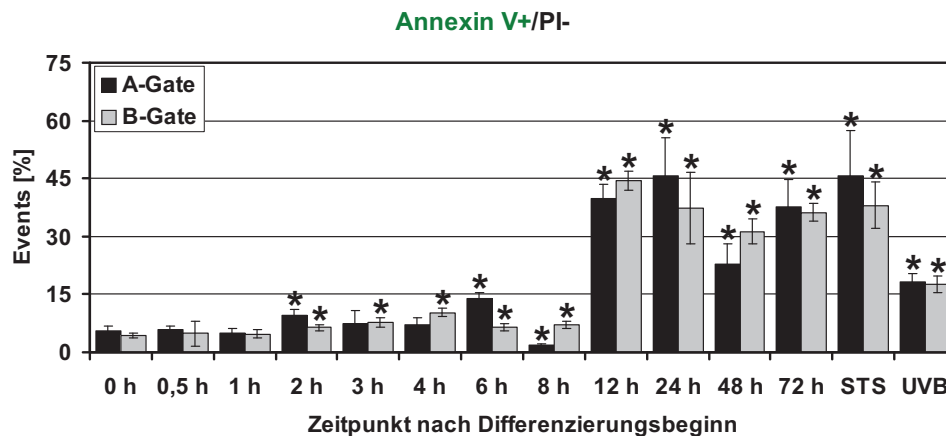


Abb. 3.12.: Quantitative Bestimmung frühapoptotischer VM197-Zellen während der Differenzierung. Der Anteil frühapoptotischer, differenzierender VM197-Zellen stieg sowohl in der adhärenenten Zellfraktion, als auch im Kulturüberstand und ebenso nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung fast durchgängig signifikant gegenüber der Kontrolle an. Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen; MW \pm SD; N=3; *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.2.2.1.3. Spätapoptotische bzw. nekrotische (Annexin V+/PI+) VM197-Zellen während der Differenzierung

Der Anteil spätapoptotischer/nekrotischer, proliferierender VM197-Zellen belief sich auf 2 % in adhärenenter Form und auf 28 % im Kulturüberstand (Abb. 3.13.).

Ab 1 h bis 4 h und ab 8 h bis 48 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach UV-B-Bestrahlung wurde eine signifikante Abnahme adhärenenter, spätapoptotischer/nekrotischer Zellen um durchschnittlich 1,5 % gegenüber der Kontrolle (0 h) detektiert.

Nach 72 h Differenzierung war ein, um 1 % signifikant erhöhter, Anteil adhärenenter, spätapoptotischer/nekrotischer Zellen im Vergleich zum Proliferationsstatus nachweisbar.

Bis auf 0,5 h und 6 h nach Differenzierungsbeginn sowie nach UV-B-Bestrahlung war der Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Zellen im Kulturüberstand um durchschnittlich 9 % bzw. 13 % signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt.

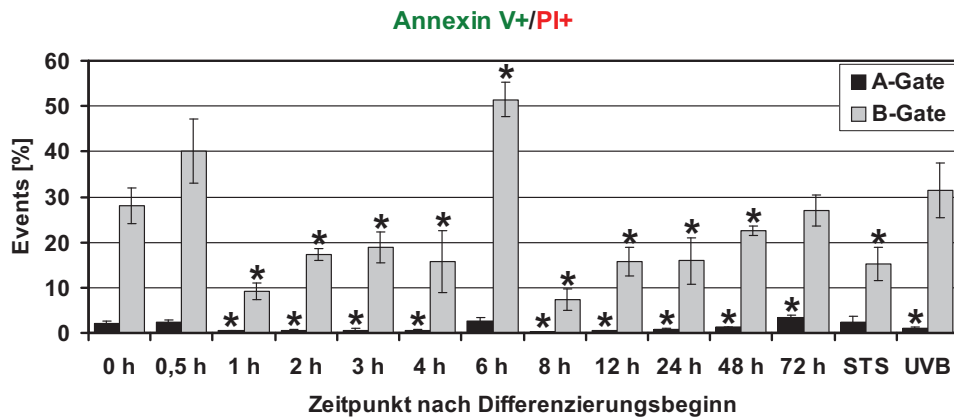


Abb. 3.13.: Quantitative Bestimmung spätapoptotischer/nekrotischer VM197-Zellen während der Differenzierung. Der Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Zellen fiel in der adhärenen Zellfraktion 1 h bis 4 h und 8 h bis 48 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Behandlung mit $0,45 \text{ J/cm}^2$ UV-B-Strahlung deutlich signifikant ab. Diese Tendenz zeigte sich gleichermaßen im Kulturüberstand. Nach 6 h Differenzierung wurde hingegen ein signifikant erhöhter Anteil spätapoptotischer/nekrotischer Zellen im Kulturüberstand nachgewiesen. Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen; MW \pm SD; N=3; * $p < 0,05$ vs Kontrolle (0 h).

3.2.2.1.4. Zellkernfragmente (Annexin V-/PI+) von VM197-Zellen während der Differenzierung

Während der Proliferation der Zellen waren 9 % bzw. 10 % an Zellkernbestandteilen in der adhärenen Zellfraktion bzw. im Kulturüberstand vorzufinden (Abb. 3.14.).

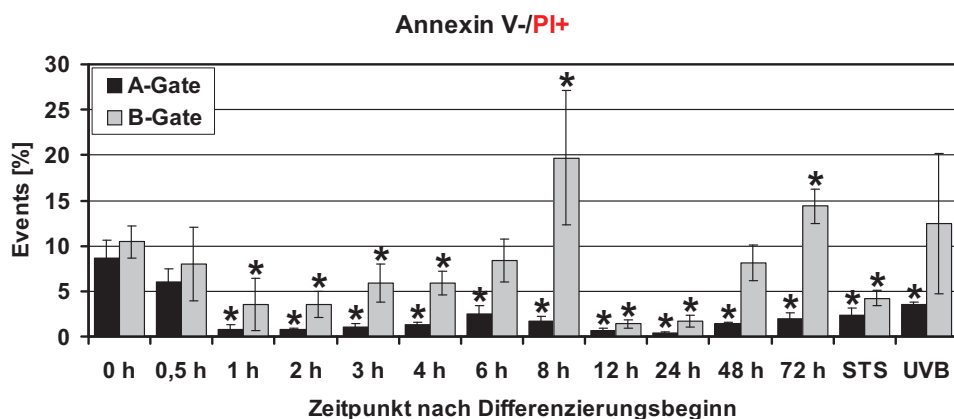


Abb. 3.14.: Quantitative Bestimmung von Zellkernfragmenten von VM197-Zellen während der Differenzierung. Der Anteil an Zellkernfragmenten der Zellen fiel in der adhärenen Zellfraktion ab 1 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Behandlung mit $2 \mu\text{M}$ Staurosporin bzw. $0,45 \text{ J/cm}^2$ UV-B-Strahlung signifikant gegenüber der Kontrolle ab. Diese Tendenz zeigte sich gleichermaßen im Kulturüberstand, wohingegen nach 8 h und nach 72 h Differenzierung der Zellen ein signifikant erhöhter Anteil an Zellkernfragmenten im Kulturüberstand nachgewiesen wurde. Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung; je 10000 Events gemessen; MW \pm SD; N=3; * $p < 0,05$ vs Kontrolle (0 h).

Ab 1 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Behandlung der Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung reduzierte sich der Anteil an Zellkernfragmenten in der adhärennten Zellfraktion um durchschnittlich 7 % signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). Eine vergleichbare Abnahme an Zellkernfragmenten wurde im Kulturüberstand beobachtet, wohingegen bei 8 h bzw. 72 h nach Differenzierungsbeginn eine signifikante Zunahme an Zellkernfragmenten um 9 % bzw. 4 % im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen wurde.

3.2.2.2. Sub-G1-Peak-Analyse

Durch die, während der Apoptose auftretende, DNA-Fragmentierung, nimmt der DNA-Gehalt im Vergleich zu vitalen Zellen ab. Deshalb zeigen Apoptosezellen nach DNA-Färbung ein geringeres Fluoreszenzsignal als die Zellpopulationen der einzelnen Zellzyklusphasen und erscheinen als so genannter Sub-G1-Peak im Histogramm (Abb. 3.15. A).

Die mittels Sub-G1-Peak-Analyse bestimmte Apoptoserate in differenzierenden VM197-Zellen scheint in mehreren Phasen zu verlaufen (Abb. 3.15. B).

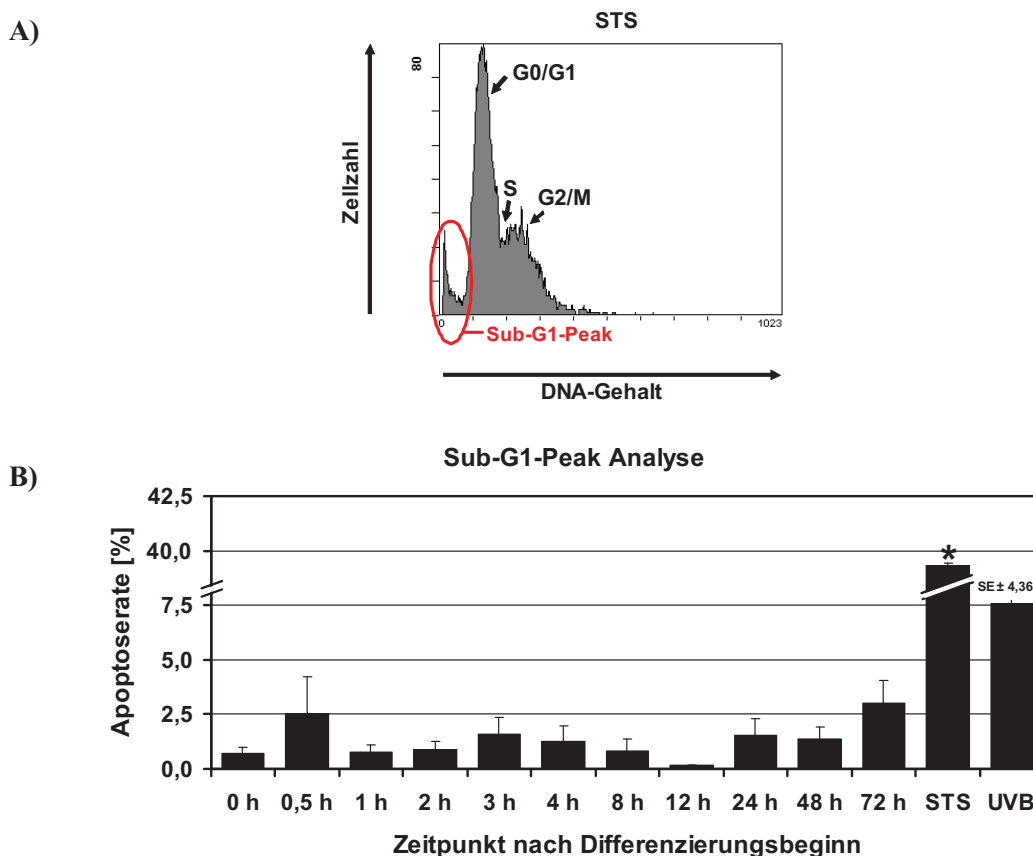


Abb. 3.15.: Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen mittels Sub-G1-Peak-Analyse.

A) Beispielhaftes Histogramm der Zellzyklusanalyse von differenzierenden Zellen nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin. Die Höhe des Sub-G1-Peaks (rot eingekreist) entspricht dem Anteil apoptotischer Zellen. B) Quantifizierung von differenzierenden Zellen mit subdiploidem Chromosomensatz (Sub-G1-Peak). Während der Differenzierung der Zellen änderte sich die Apoptoserate (Sub-G1-Peak-Zellanteil) nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Eine Behandlung differenzierender Zellen mit 2 μ M Staurosporin induzierte dagegen eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle. Methanol-Fixierung, Propidiumiodid-Färbung; MW \pm SEM, N=3, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Die Apoptoserate der Kontrolle (0 h) lag mit 0,7 % auf dem gleichem Niveau wie in Zellen, die 1 h, 2 h bzw. 8 h in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die höchsten Apoptoseraten waren mit 2,5 % bzw. mit 3 % nach 0,5 h respektive 72 h Differenzierung zu verzeichnen. Die niedrigste Apoptoserate wurde mit 0,2 % nach 12 h Differenzierung gegenüber der Kontrolle gemessen. Bei 3 h, 4 h, 24 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn lag die Apoptoserate der Zellen bei durchschnittlich 1,5 %.

Die Einleitung der Differenzierung und zusätzliche Behandlung der Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung induzierte dagegen eine Erhöhung des Anteils an Sub-G1-Peaks-Zellen um etwa 38 % signifikant bzw. 7 % gegenüber der Kontrolle.

3.3. Biochemischer Nachweis Apoptose-relevanter Proteine

Die VM197-Zelllinie wurde hinsichtlich der Expressionsmuster verschiedener pro- bzw. anti-apoptotischer Proteine untersucht. Die Ergebnisse dieses semiquantitativen Proteinscreenings sollten Aufschluss über die Funktionalität unterschiedlicher Signalkaskaden der Apoptose während der Differenzierung dieser Zellen geben.

3.3.1. Überblick des Proteinscreenings

Wie aus Tabelle 3.1. hervorgeht, werden eine Reihe pro- als auch anti-apoptotischer Proteine des intrinsischen und des extrinsischen Apoptosesignalweges in proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen exprimiert (helle Felder) und konnten mittels Western Blot-Technik semiquantitativ analysiert werden. Andere Apoptoseproteine konnten nicht oder nur unzulänglich in VM197-Zelllysaten detektiert werden (grau unterlegte Felder) und wurden in der statistischen Auswertung nicht miterfasst.

Tab. 3.1.: Übersicht des Proteinscreenings Apoptose-relevanter Proteine in VM197-Zellen

Protein	Proteinnachweis in VM197-Zellen	
	Proliferation	Differenzierung
AIF	positiv	positiv
Apaf-1	positiv	positiv (96 h negativ)
Bad	negativ	negativ
Bak	negativ	negativ
Bax	positiv	positiv
Bcl-2	positiv	positiv
Bcl-x	negativ	negativ
Bid	positiv	positiv
BRUCE	negativ	negativ
CAS	positiv	positiv
Caspase-2	positiv	positiv
Caspase-3	positiv	positiv
Caspase-7	positiv	positiv
Caspase-8	positiv	positiv
Caspase-9	positiv	positiv

Protein	Proteinnachweis in VM197-Zellen	
	Proliferation	Differenzierung
Cytochrom c	positiv	positiv
DFF45	negativ	negativ
FADD	negativ	negativ
Fas-Ligand	positiv	positiv
Fas-Rezeptor	negativ	negativ
Nip-1	positiv	positiv
p53	negativ	negativ
PARP	positiv	positiv
PUMA	positiv	positiv
Smac	positiv	positiv
Survivin	positiv	positiv
TRADD	negativ	negativ
XIAP	positiv	positiv

3.3.2. Expressionsstatus Apoptose-relevanter Proteine während der Differenzierung von VM197-Zellen

Nachdem über das Screening hinsichtlich pro- und anti-apoptischer Proteine ein breites Spektrum potentiell relevanter Apoptoseregulatoren in VM197-Zellen identifiziert wurde, folgten Zeitreihenanalysen während der dreitägigen Differenzierung. Dabei war im Besonderen von Interesse, ob sich die zeitweise erhöhte Apoptoserate in differenzierenden Zellen in signifikanten Änderungen der Expressionsmuster Apoptose-relevanter Proteine abbilden.

3.3.2.1. Pro-apoptische Proteine

Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Untersuchung der Expressionsmuster von Proteinen der Bcl-2- und der Caspase-Familie.

3.3.2.1.1. Bax (Bcl-2-associated X protein)

Es ist bekannt, dass Bax durch p53, aber auch durch tBid, Puma, Noxa und andere Proteine während der Apoptose aktiviert wird und eine Änderung der Proteinexpression zeigt.

In Abbildung 3.16. ist erkennbar, dass das 21 kDa große Bax-Protein in relativ konstanter Konzentration, sowohl in proliferierenden, als auch in differenzierenden VM197-Zellen, vorkam. Zudem nahm die Behandlung von VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung keinen Einfluss auf deren Bax-Proteingehalt.

Zusätzlich zur 21 kDa großen Bax-Proteinbande war jedoch ein 18 kDa großes Bax-Proteinfragment in allen Lysaten der Differenzierungsreihe, in der Kontrolle und in den, mit Apoptoseinduktoren behandelten, Zellen detektierbar. Dieses 18 kDa Bax-Fragment resultiert aus einer N-terminalen Spaltung von Bax durch Calpain (Gao und Dou, 2000), signalisiert eine Aktivierung der Apoptosesignalkaskade und war in einem zwei- bis dreifach signifikant erhöhtem

Maße in VM197-Zellen ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle, sowie nach Einwirkung von UV-B-Strahlung nachweisbar.

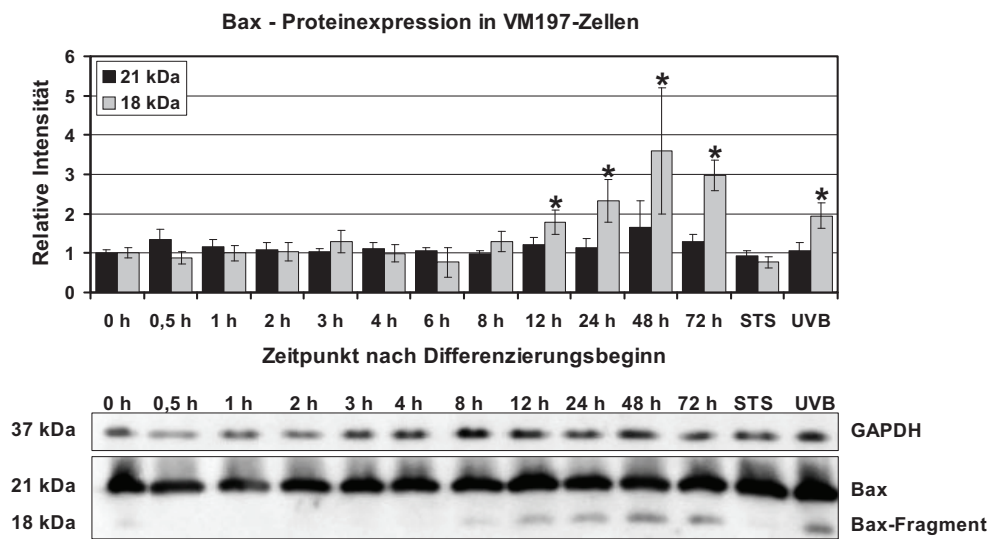


Abb. 3.16.: Relative Bax-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Bax (21 kDa) in VM197-Zellen blieb während der Differenzierung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. Daneben zeigte sich ein Bax-Fragment (18 kDa), dessen Anteil in VM197-Zellen ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Behandlung differenzierender Zellkulturen mit $0,45 \text{ J/cm}^2$ UV-B-Strahlung signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $N=12$ (Bax, 21 kDa), $N=8$ (Bax-Fragment, 18 kDa), $*p < 0,05$ vs Kontrolle (0 h).

3.3.2.1.2. AIF (apoptosis inducing factor)

Das Flavoprotein AIF ist im intermembranösen Raum der Mitochondrien lokalisiert und dort an der Katalyse von Redoxreaktionen beteiligt. Kommt es zur Auslösung der Apoptose, wird AIF aus den Mitochondrien freigesetzt und zum Zellkern transportiert, wo es eine, für Apoptose typische, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung induziert. Dieser Prozess ist gefolgt von der Freisetzung von Cytochrom c und Caspase-9 aus den Mitochondrien.

Während der Differenzierung der VM197-Zellen und nach Behandlung dieser Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung wurde das 57 kDa große AIF-Protein in gleichem Maße wie in der Kontrolle (0 h) nachgewiesen (Abb. 3.17.).

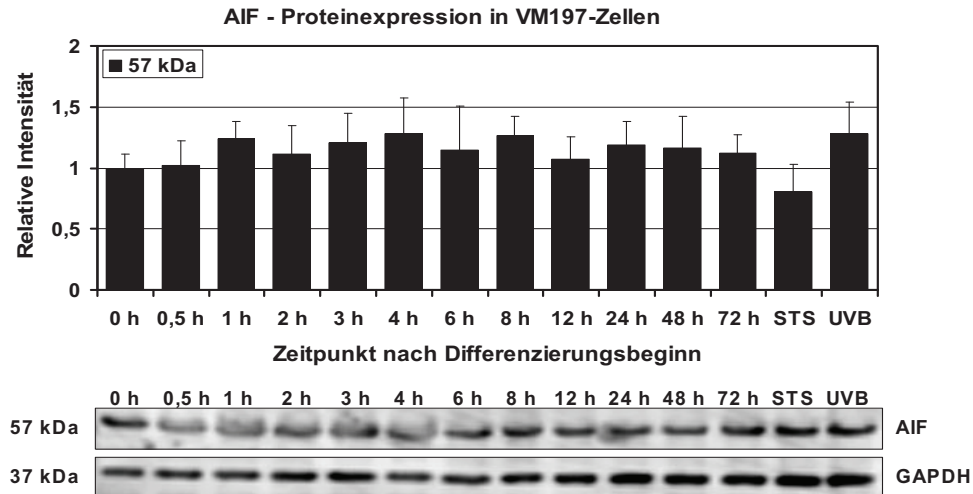


Abb. 3.17.: Relative AIF-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von AIF veränderte sich während der Differenzierung der Zellen, sowie nach Behandlung differenzierender Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW \pm SEM, N=6.

3.3.2.1.3. CAS (cellular apoptosis susceptibility protein)

Das CAS-Protein wird vor allem im Zytoplasma proliferativer Zellen hoch exprimiert und ist mit dem Mikrotubulisystem und dem mitotischen Spindelapparat assoziiert. CAS nimmt unter anderem eine wichtige Stellung in der Regulation der Zellproliferation und der Tumornekrosefaktor (TNF)-vermittelten Apoptose ein.

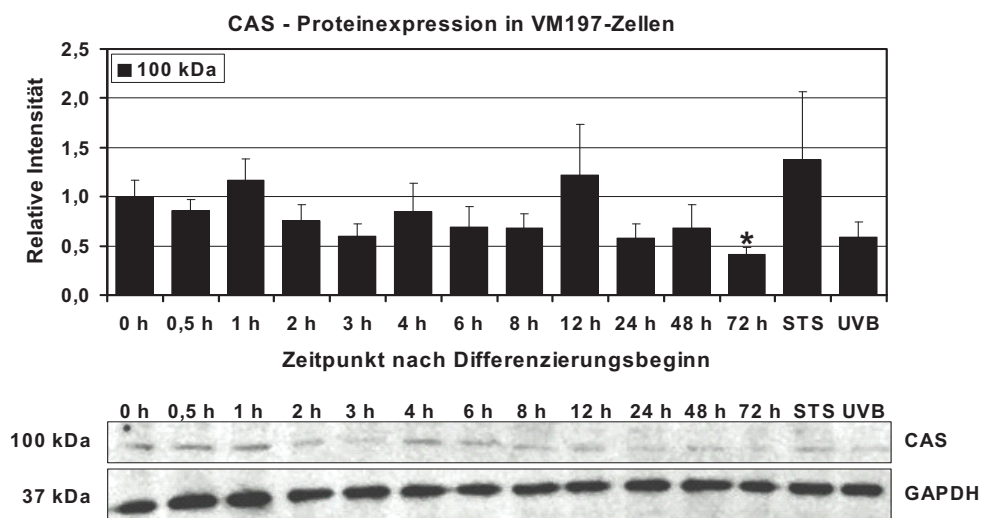


Abb. 3.18.: Relative CAS-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von CAS in VM197-Zellen war 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erniedrigt und zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten, sowie nach Behandlung differenzierender Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

In proliferierenden, differenzierenden und mit Apoptoseinduktoren behandelten Zellen wurden fast ausschließlich keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression von CAS (100 kDa) detektiert. Zum Zeitpunkt 72 h nach Differenzierungsbeginn war in VM197-Zellen allerdings ein, um die Hälfte signifikant erniedrigter, Gehalt an CAS-Protein gegenüber der Kontrolle nachweisbar (Abb. 3.18.).

3.3.2.1.4. Caspase-2 (apoptosis-related cysteine peptidase 2; neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 2)

Caspase-2 wird in die Familie der Cysteinpeptidasen eingeordnet und ist vor allem in neuronalen Vorläuferzellen hoch exprimiert, wohingegen dessen Expression im Verlauf der weiteren Zellreifung abnimmt. Caspase-2 ist zudem ein Signalprotein des extrinsischen Apoptosesignalweges, wird über Dimerisierung aktiv, interagiert in diesem Zustand mit Caspase-8 und Bid, induziert die Freisetzung von Cytochrom c, AIF und Smac aus den Mitochondrien und inaktiviert „Survival“-Proteine.

Während der Differenzierung von VM197-Zellen war eine geringe Abnahme von Caspase-2 (48 kDa) gegenüber der Kontrolle (0 h) zu erkennen. Sechs Stunden und 72 h nach Differenzierungsbeginn war die Proteinexpression von Caspase-2 signifikant erniedrigt und auf die Hälfte des Proliferationswertes gesunken. Auch in differenzierenden und mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelten Zellen war ein geringer Rückgang der Caspase-2-Proteinkonzentration detektierbar (Abb. 3.19.).

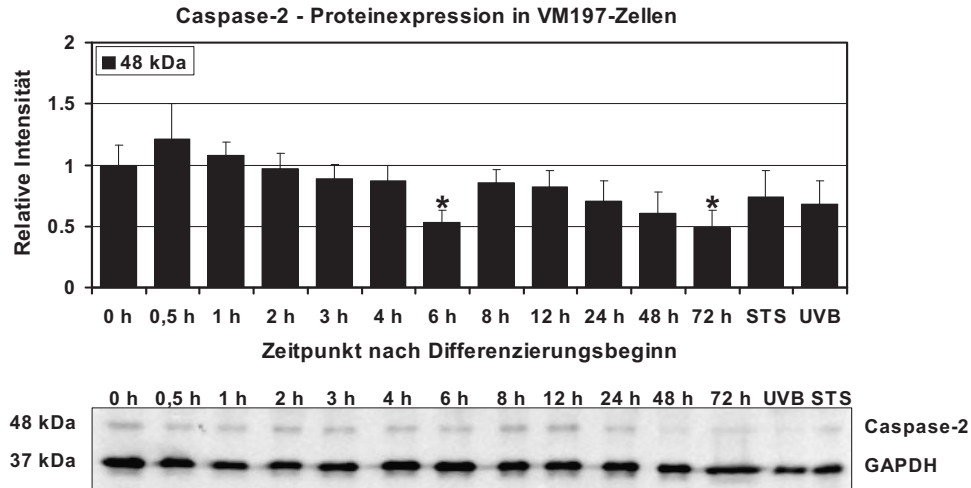


Abb. 3.19.: Relative Caspase-2-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Caspase-2 in VM197-Zellen war 6 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erniedrigt und zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten, sowie nach Behandlung differenzierender Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=10, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.3.2.1.5. Caspase-3 (apoptosis-related cysteine peptidase 3)

Caspase-3 ist eine Effektorcaspase, die durch proteolytische Spaltung aktiviert wird. Aktivierte Spaltprodukte von Caspase-3 spalten und aktivieren wiederum Caspase-6, -7 und -9, setzen die Funktion des DNA-Reparaturenzyms PARP durch dessen proteolytische Spaltung außer Betrieb und sind am Abbau des Actinzytoskeletts beteiligt.

Pro-Caspase-3 (32 kDa) und dessen Präkursorform (30 kDa) wurden in proliferierenden, differenzierenden und mit Apoptoseinduktoren behandelten VM197-Zellen in konstanter Proteinexpression nachgewiesen. Zusätzlich waren zwei Spaltprodukte der Caspase-3 (17 kDa, 11 kDa) in den zuvor genannten Zellpopulationen präsent, deren Expression ab 3 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn und in den, mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelten, Zellen stetig zunahm. Der Anteil am 11 kDa großen Caspase-3-Spaltprodukt überwog zu den genannten Zeitpunkten fast durchweg gegenüber der Expression des 17 kDa-Fragments (Abb. 3.20.).

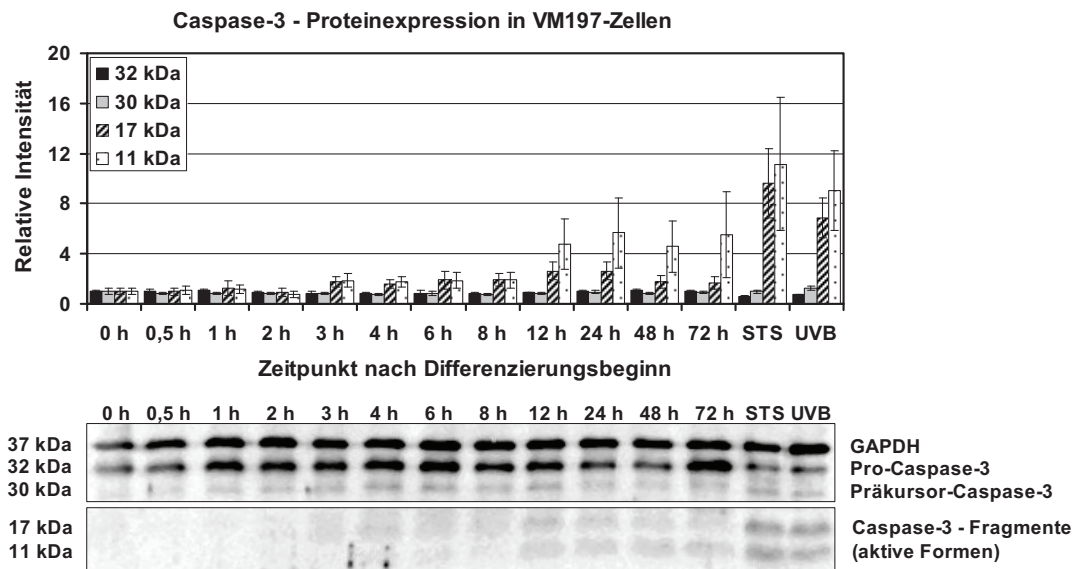


Abb. 3.20.: Relative Caspase-3-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expressionen von Pro-Caspase-3 (32 kDa) und deren Präkursorform (30 kDa) zeigten sich während der Differenzierung, sowie nach Behandlung differenzierender VM197-Zellkulturen mit $2 \mu\text{M}$ Staurosporin bzw. $0,45 \text{ J/cm}^2$ UV-B-Strahlung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. Daneben wurden zwei, Apoptose-assoziierte, Caspase-3-Fragmente (17 kDa, 11 kDa) detektiert, deren Bandenintensitäten sich im Western Blot ab 3 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie in differenzierenden Zellen nach Behandlung mit $2 \mu\text{M}$ Staurosporin bzw. $0,45 \text{ J/cm}^2$ UV-B-Strahlung zunehmend intensivierten. $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $N=6$.

3.3.2.1.6. Caspase-7 (apoptosis-related cysteine peptidase 7)

Die Effektorcaspase-7 wird während der Apoptose durch Caspase-3 oder -10 gespalten und aktiviert. Des Weiteren kann Caspase-7 mit Caspase-8, Survivin und XIAP interagieren.

Die Proteinexpression von Caspase-7 (35 kDa) war in proliferierenden, differenzierenden und mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelten VM197-Zellen nicht verändert. Zum Zeitpunkt 24 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn war ein geringer Anstieg der Caspase-7-Expression in VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 3.21.).

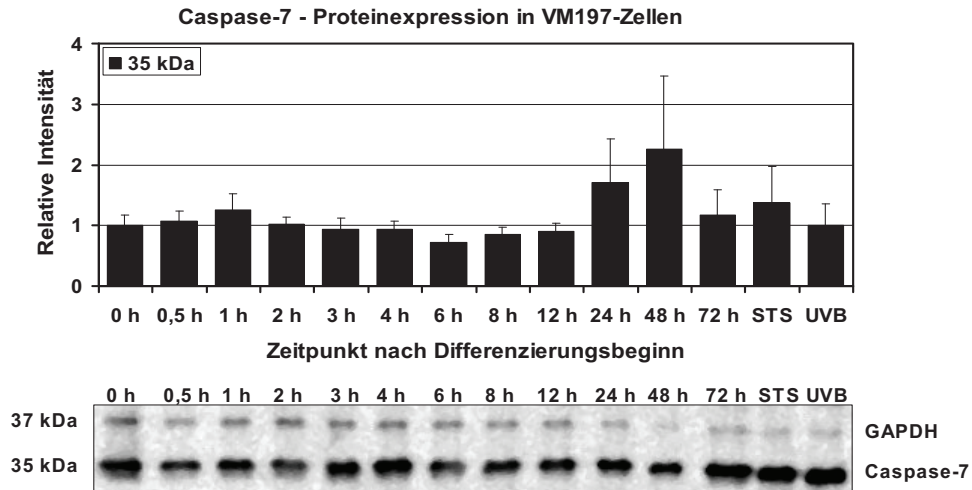


Abb. 3.21.: Relative Caspase-7-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Caspase-7 veränderte sich während der Differenzierung, sowie nach Behandlung differenzierender VM197-Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=9.

3.3.2.1.7. Caspase-8 (apoptosis-related cysteine peptidase 8)

Die Effektorcaspase-8 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des extrinsischen Apoptoseweges und aktiviert in diesem Rahmen diverse Caspasen und das pro-apoptotische Protein Bid.

Caspase-8 (55 kDa) war zum Proliferationszeitpunkt, während der dreitägigen Differenzierung und nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung in VM197-Zellen sehr schwach und nicht signifikant anders exprimiert im Vergleich zur Proliferationskontrolle (Abb. 3.22.).

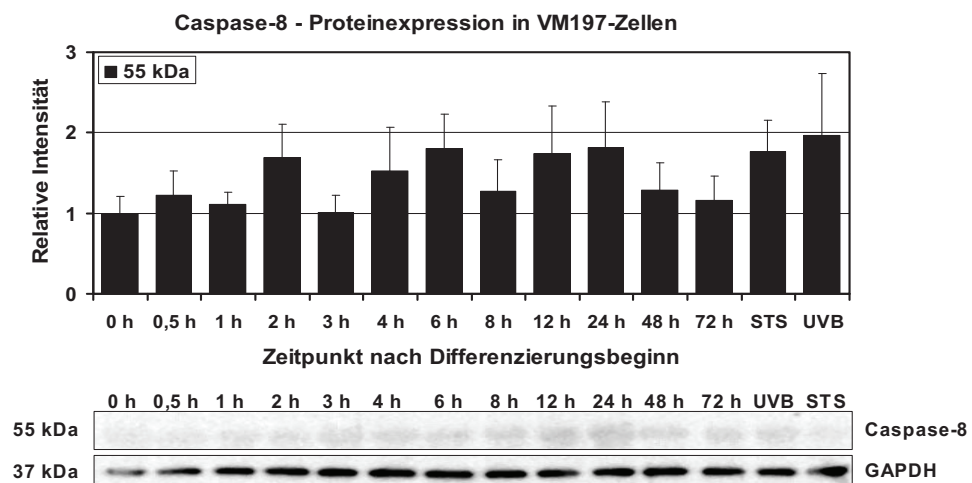


Abb. 3.22.: Relative Caspase-8-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Caspase-8 war sehr gering und veränderte sich während der Differenzierung, sowie nach Behandlung differenzierender VM197-Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=5.

3.3.2.1.8. PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)

PARP ist ein Chromatin-assoziiertes Protein, welches in die Regulation von Proliferation, Differenzierung, Tumortransformation und DNA-Reparatur eingreift. Diese Polymerase fungiert während der Apoptose als Substrat von Caspase-3 und wird durch sie gespalten. PARP kann die Konzentration von ATP in Bestrebung des DNA-Reparaturprozesses verringern, was nachfolgend zur Zyllyse und Apoptose führt.

Das 113 kDa große PARP-Protein zeigte sich in seiner Expression in proliferierenden, differenzierenden und in, mit Apoptoseinduktoren behandelten, VM197-Zellen fast durchweg unverändert. Eine halbe Stunde nach Differenzierungsbeginn war das 113 kDa große PARP-Protein signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht.

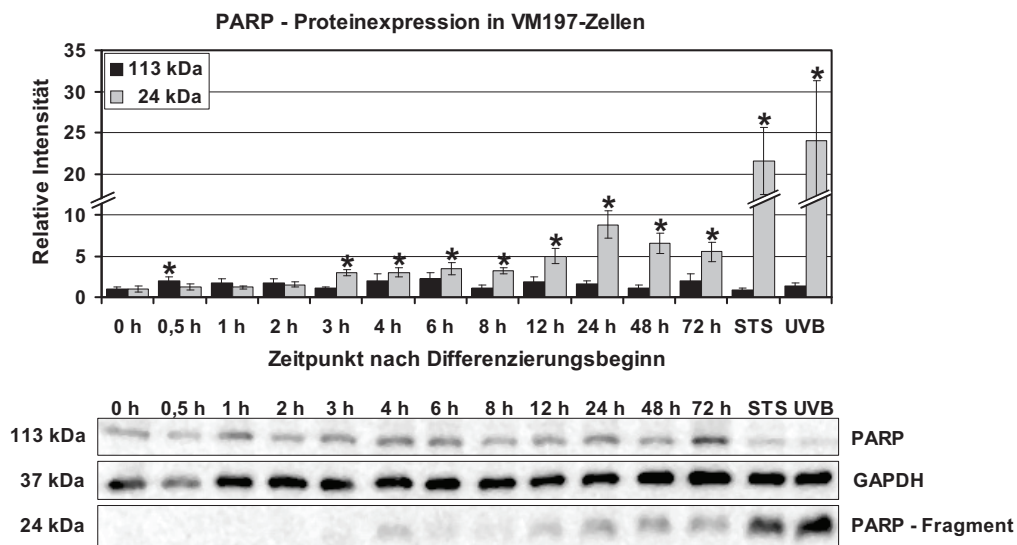


Abb. 3.23.: Relative PARP-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von PARP (113 kDa) war in VM197-Zellen 0,5 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erhöht und zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung unverändert gegenüber der Kontrolle. Zudem wurde ein Apoptose-assoziiertes PARP-Fragment (24 kDa) detektiert, dessen Konzentration ab 3 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach Exposition mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung zunehmend signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war. MW \pm SEM, N=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Das 24 kDa große PARP-Fragment wurde in allen zuvor genannten VM197-Zellpopulationen nachgewiesen, allerdings zeigte sich 3 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn ein signifikanter Anstieg, der bei 24 h nach Differenzierungsbeginn eine maximal achtfach höhere Konzentration gegenüber der Kontrolle erreichte. Nach Behandlung der Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung wurde ein, um durchschnittlich 20-fach, signifikant erhöhter Anteil des 24 kDa großen PARP-Fragments im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abb. 3.23.).

3.3.2.1.9. Nip-1 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 1)

Nip-1 hat wesentlichen Anteil an der Formation der Netzwerkstruktur des Endoplasmatischen Retikulums und übt seine pro-apoptotische Funktion durch Interaktion mit anti-apoptotischen Proteinen (z. B. Bcl-2) aus.

Die Expression des 26 kDa großen Nip-1-Proteins war in VM197-Zellen 4 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erniedrigt, wohingegen zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten und nach Behandlung mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung keine Expressionsänderungen nachgewiesen wurden (Abb. 3.24.).

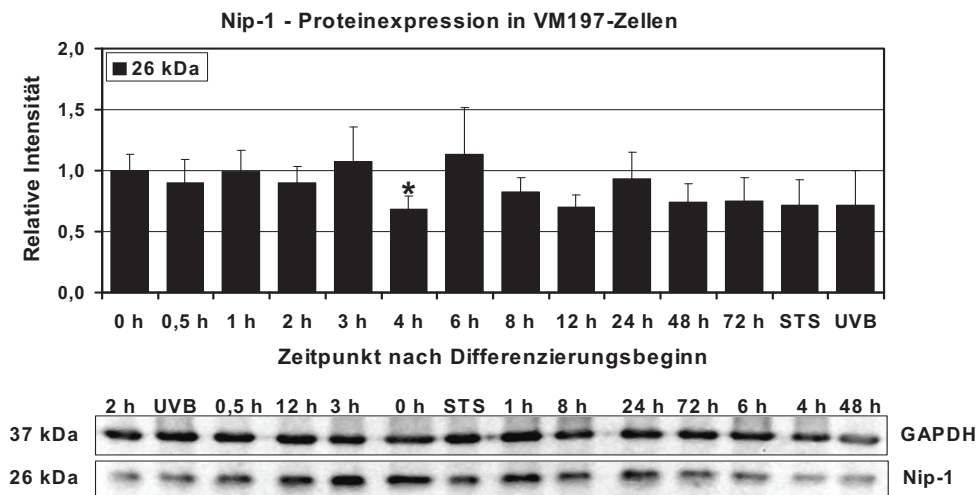


Abb. 3.24.: Relative Nip-1-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Nip-1 in VM197-Zellen war 4 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erniedrigt und zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.3.2.1.10. Bid (BH3 interacting domain death agonist)

Bid ist in die extrinsische Apoptosesignalkaskade einzuordnen. Dieses pro-apoptotische Protein wird durch Caspase-8 gespalten und vermittelt im so aktivierten Zustand die Verbindung zum intrinsischen Apoptoseweg, da es als tBid zu den Mitochondrien transportiert wird und dort die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma induziert. Des Weiteren wird Bid die Heterodimerbildung mit dem Agonisten Bax bzw. dem Antagonisten Bcl-2 zugesprochen.

Sowohl das 23 kDa große Bid-Protein, als auch dessen 15 kDa großes Spaltprodukt tBid wurden in proliferierenden, differenzierenden und in, mit Apoptoseinduktoren behandelten, VM197-Zellen in leicht biphasisch schwankendem Expressionsverlauf nachgewiesen. In allen analysierten Zelllysaten war der Anteil an Bid gegenüber tBid höher, außer in Staurosporin-behandelten Zellen, in denen mehr tBid als ungespaltenes Bid vorhanden war (Abb. 3.25.).

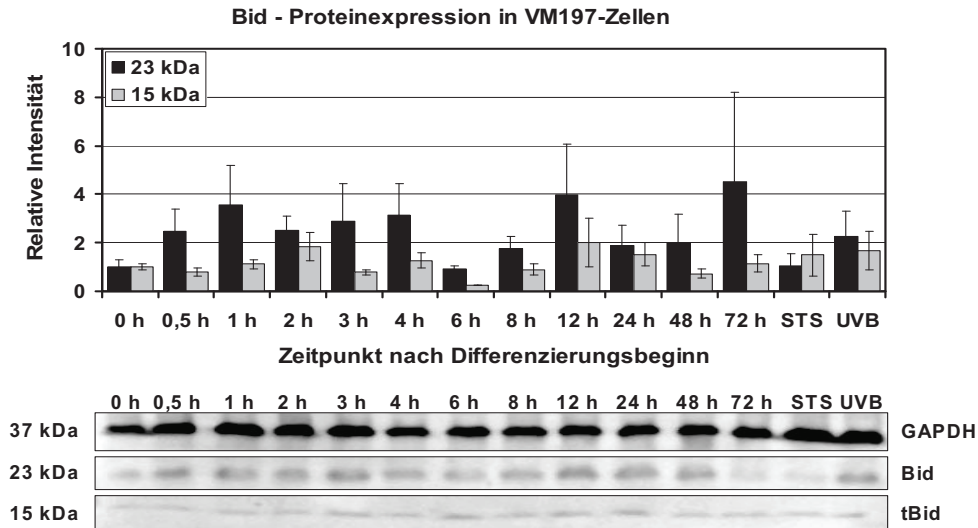


Abb. 3.25.: Relative Bid-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expressionen von Bid und dem Apoptose-assoziierten Bid-Fragment (tBid) veränderten sich in VM197-Zellen während der Differenzierung, sowie nach Behandlung differenzierender VM197-Zellkulturen mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW \pm SEM, N=6 (Bid, 23 kDa), N=5 (tBid, 15 kDa).

3.3.2.1.11. Cytochrom c

Cytochrom c ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und gewährleistet dort den Elektronentransport während der oxidativen Phosphorylierung. Außerdem stellt Cytochrom c eine wichtige Komponente des intrinsischen Apoptosesignalweges dar. Während der Apoptose wird Cytochrom c aufgrund einer veränderten Permeabilität der Mitochondrienmembran ins Zytoplasma ausgeschüttet, bindet dort an Apaf-1, wodurch unter Verbrauch von ATP-Energie Pro-Caspase-9 gespalten wird (Apoptosom-Komplex).

In VM197-Zellen zeigte sich während der Proliferation, der Differenzierung und nach Behandlung mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung eine relativ stabile Expression des 11 kDa großen Cytochrom c-Proteins, sowie dessen hochmolekulare und 22 kDa große Proteinform (Abb. 3.26.).

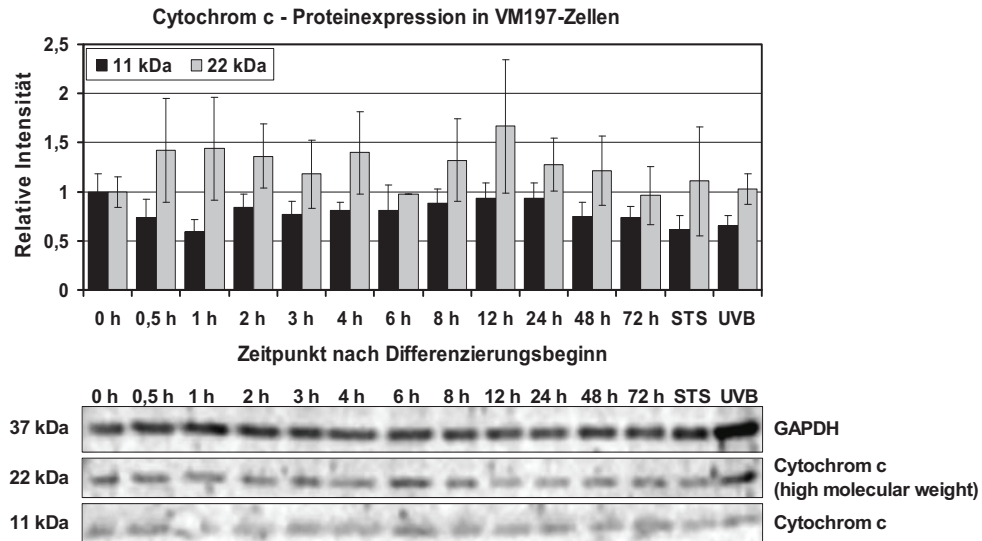


Abb. 3.26.: Relative Cytochrom c - Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expressionen von Cytochrom c (11 kDa) und dessen hochmolekulargewichtiger Form (22 kDa) veränderten sich in VM197-Zellen während der Differenzierung, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW \pm SEM, N=6.

3.3.2.2. Anti-apoptotische Proteine

Anti-apoptotische Proteine fungieren als Antagonisten zu den zuvor beschriebenen Apoptosefördernden Proteinen und sind unter anderem für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellsterben und Zellüberleben in Zellsystemen von allgemeiner Bedeutung.

3.3.2.2.1. Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2)

Das anti-apoptotische Bcl-2-Protein ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und trägt dort zur Stabilisierung der mitochondrialen Membranpermeabilität bei. Bcl-2 ist als humanes Protoonkogen zudem in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und in der Kernmembran zu finden und kann der Aktivierung von Caspasen entgegenwirken und der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien vorbeugen.

Das 26 kDa große Bcl-2-Protein wurde in proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen nachgewiesen. Während sich zu den Zeitpunkten 4 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn eine zwei- bis sechsfach signifikant erhöhte Proteinexpression von Bcl-2 gegenüber der Kontrolle (0 h) zeigte, wurden zu allen anderen Differenzierungszeitpunkten und nach Behandlung mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung keine signifikanten Veränderung im Bcl-2-Proteinstatus detektiert (Abb. 3.27.).

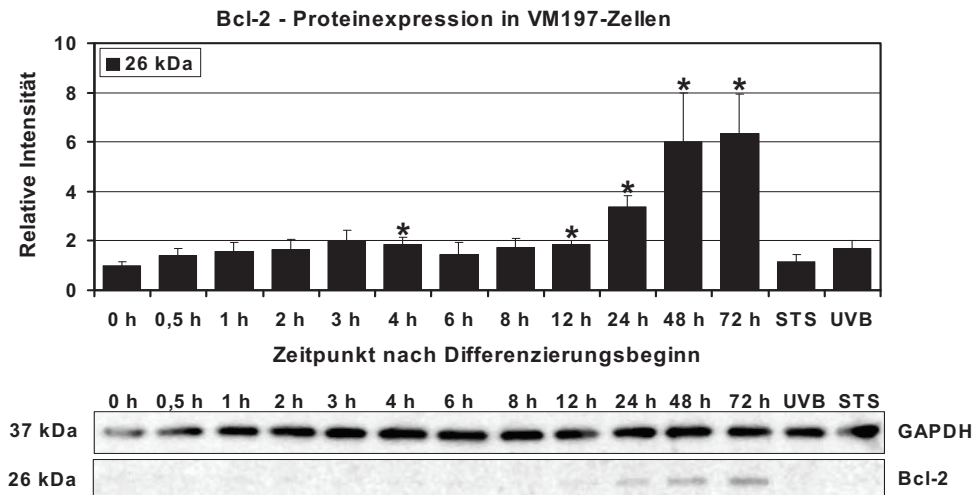


Abb. 3.27.: Relative Bcl-2-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Bcl-2 in VM197-Zellen war 4 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erhöht und zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung relativ unverändert gegenüber der Kontrolle. MW \pm SEM, N=10, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.3.2.2.2. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

XIAP gehört zur IAP-Familie (inhibitors of apoptosis protein) und inhibiert in seiner anti-apoptotischen Funktion vor allem Caspase-3, -7 und -9.

In VM197-Zellen wurde das 57 kDa große XIAP in relativ konstanter Expression während der Proliferation, der Differenzierungszeitreihe, sowie nach Behandlung mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung nachgewiesen (Abb. 3.28.).

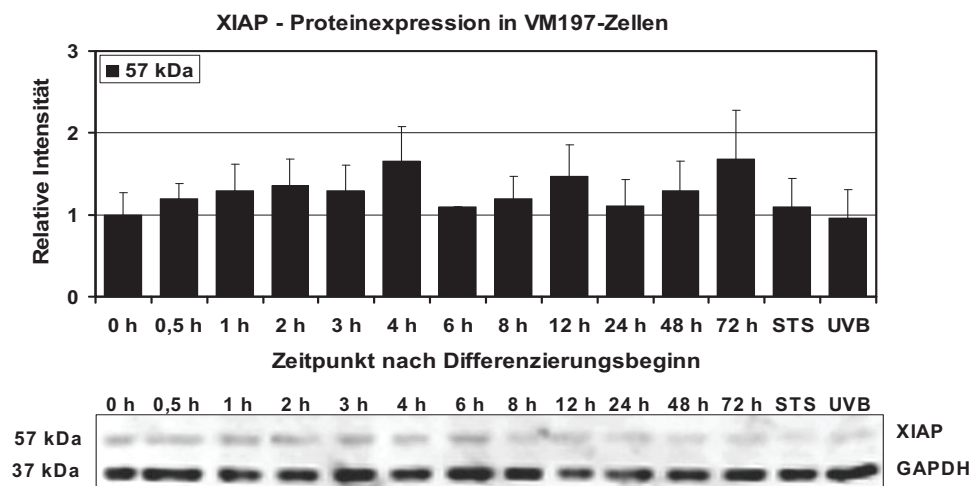


Abb. 3.28.: Relative XIAP-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von XIAP veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW \pm SEM, N=4.

3.3.2.2.3. Survivin

Survivin gehört zu der IAP-Familie, ist vor allem während der Fetalentwicklung präsent und in adultem Gewebe kaum detektierbar, sondern hier nur in Malignomen vorzufinden. Als anti-apoptotisches Protein wird Survivin eine Antagonistenrolle gegenüber dem intrinsischen Apoptosesignalweg zugesprochen, wobei es die Funktion von Caspase-9 hemmt. Zudem gilt Survivin als wichtiges Kontrollprotein der Mitose.

In proliferierenden und bis zu 12 h differenzierenden, sowie mit Staurosporin behandelten VM197-Zellen wurde das 16 kDa große Survivin-Protein in stabiler Expression nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde eine um mehr als die Hälfte signifikant verringerte Survivin-Expression ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn, sowie nach UV-B-Bestrahlung gegenüber der Kontrolle (0 h) verzeichnet (Abb. 3.29.).

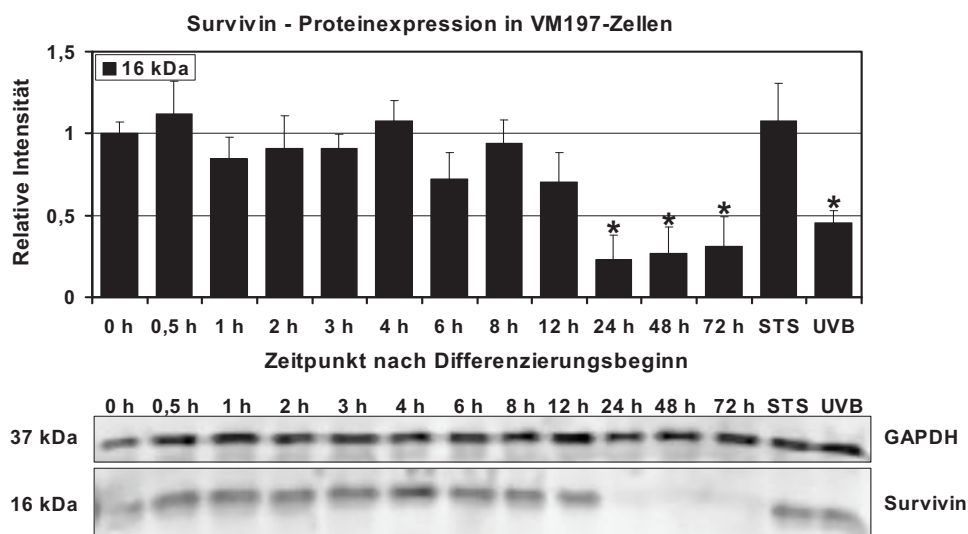


Abb. 3.29.: Relative Survivin-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von Survivin in VM197-Zellen war ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn und nach Bestrahlung mit 0,45 J/cm² UV-B signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SEM, N=3, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4. Expressionsanalysen Apoptose-relevanter Gene in VM197-Zellen

Zusätzlich zu den zuvor dargestellten Proteinexpressionsdaten Apoptose-relevanter Proteine wurden entsprechende Genexpressionsdaten von VM197-Zellen mittels Microarray-Analyse erhoben. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit Genexpressionsänderungen in VM197-Zellen bezüglich der Apoptosesignalkaskade in den zeitlichen Rahmen der Zelldifferenzierung einzuordnen sind und ob diese mit den Proteinexpressionsdaten korrelieren.

3.4.1. Zeitlicher Verlauf der Genexpressionsprofile während der Differenzierung von VM197-Zellen

Nach Qualitätskontrolle der "Whole Human Genome DNA-Microarrays" und der Normalisierung der Kontrollen (0 h) wurden noch etwa 24500 von insgesamt 40000 Genen des Gesamtgenoms bzw. deren Replikate für die weitere statistische Genexpressionsanalyse der differenzierenden VM197-Zellen herangezogen. Durch Anwendung der One-Way-ANOVA-Varianzanalyse und des Post-hoc Tests nach Tukey wurden etwa 5200 Gene selektiert, die mehr als zweifach signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrollgruppe exprimiert waren.

Aus Abbildung 3.30. geht hervor, dass 6 h nach Differenzierungsbeginn 3226 der 5200 Gene in VM197-Zellen und damit der Großteil der analysierten Gene signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrollgruppe exprimiert waren. Die geringsten Genexpressionsunterschiede zeigten sich 2 h nach Differenzierungsbeginn, wo sich immerhin 1305 Gene signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Der Vergleich der sechs unterschiedlichen Differenzierungsgruppen untereinander ergab, dass zwischen dem 6-stündigen und dem 48-stündigen Differenzierungszeitpunkt der VM197-Zellen die größte Differenz in Bezug auf 3425 unterschiedlich bzw. 1774 gleich exprimierte Gene von 5200 betrachteten Genen vorlag.

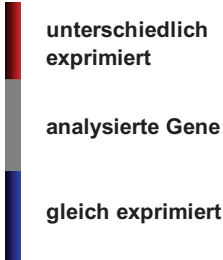
	0 h	1 h	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h	
0 h	5199	1412	1305	3226	2245	2558	1467	
1 h	3787	5199	1344	2714	2066	1951	1642	
2 h	3894	3855	5199	2782	2274	2398	1641	
6 h	1973	2485	2417	5199	2619	2313	3425	
12 h	2954	3133	2925	2580	5199	1296	2433	
24 h	2641	3248	2801	2886	3903	5199	2591	
48 h	3732	3557	3558	1774	2766	2608	5199	

Abb. 3.30.: Genexpressionsprofilanalyse von VM197-Zellen während der Differenzierung. Im Vergleich der Genexpressionsprofile von proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen zeigte sich der größte Unterschied 6 h nach Differenzierungsbeginn, wohingegen die geringsten Genexpressionsänderungen 2 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle auftraten. Tukey's Post-hoc-Test, mehr als zweifache Änderung, $p < 0,05$, $N=2$, Gene Spring GX 7.3.1 Software.

3.4.2. Genontologische Analyse der Differenzierungs-relevanten Expressionsprofile von VM197-Zellen

Mit Hilfe des Volcano-Plots wurden Gengruppen, die gleiche biologische und statistische Signifikanzen während der Differenzierung von VM197-Zellen zeigten, funktionell annotiert.

Hinsichtlich der Apoptose fielen 143 Gene und bezüglich der Zelldifferenzierung 554 Gene der 5200, mittels Varianzanalyse herausgefilterten, Gene weiter in Betracht. Dabei zeigten sich 1 h nach Differenzierungsbeginn keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen Apoptose- bzw. Zelldifferenzierungs-relevanter Gene gegenüber der Kontrollgruppe (0 h). Sechs Stunden nach Differenzierungsbeginn hingegen waren die größten Genexpressionsunterschiede hinsicht-

lich Apoptose (34 Gene) und Zelldifferenzierung (23 Gene) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten (Abb. 3.31.).

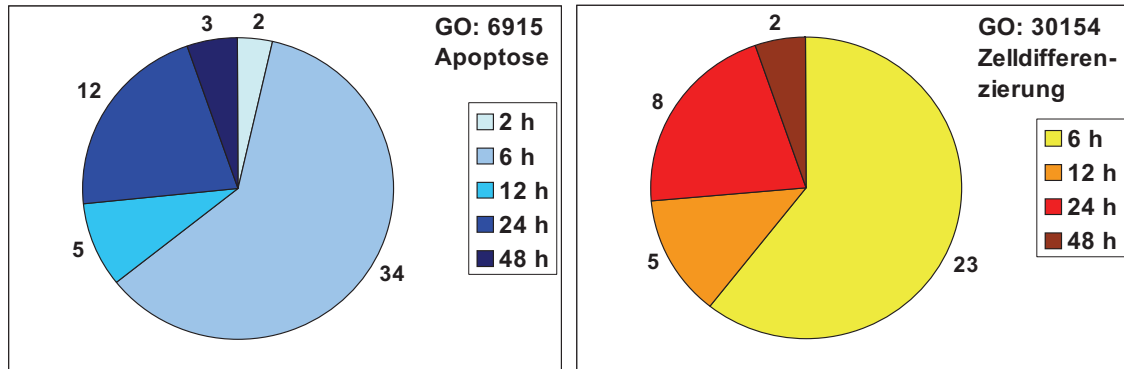


Abb. 3.31.: Signifikant veränderte Expressionen von Apoptose-relevanten und Zelldifferenzierungs-regulierenden Genen in differenzierenden VM197-Zellen. Sechs Stunden nach Differenzierungsbeginn war der Großteil der Apoptose-relevanten Gene (34/ 143 Genen) bzw. der Zelldifferenzierungs-regulierenden Gene (23/554 Genen) in VM197-Zellen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (0 h) verändert. One-Way ANOVA-Test, Volcano Plot, mehr als zweifache Änderung, $p < 0,05$, $N=2$, Gene Spring GX 7.3.1 Software.

3.4.3. Expressionsstatus Apoptose-relevanter Gene während der Differenzierung von VM197-Zellen

Expressionsanalysen pro- und anti-apoptotischer Gene wurden vergleichsweise zu den, unter Punkt 3.3.2. beschriebenen, Proteinexpressionsanalysen durchgeführt, um Aussagen über eventuell differenzierungsbedingte Genregulationseffekte in VM197-Zellen formulieren zu können.

3.4.3.1. Pro-apoptotische Gene

Im Mittelpunkt der Genexpressionsanalysen auf pro-apoptotischer Seite standen Mitglieder der Bcl-2-Familie und der Caspase-Familie.

3.4.3.1.1. Bax-Genexpression

Im Gegensatz zur relativ konstanten Proteinexpression, war die Genexpression von Bax in VM197-Zellen 6 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn um durchschnittlich die Hälfte signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erniedrigt (Abb. 3.32.).

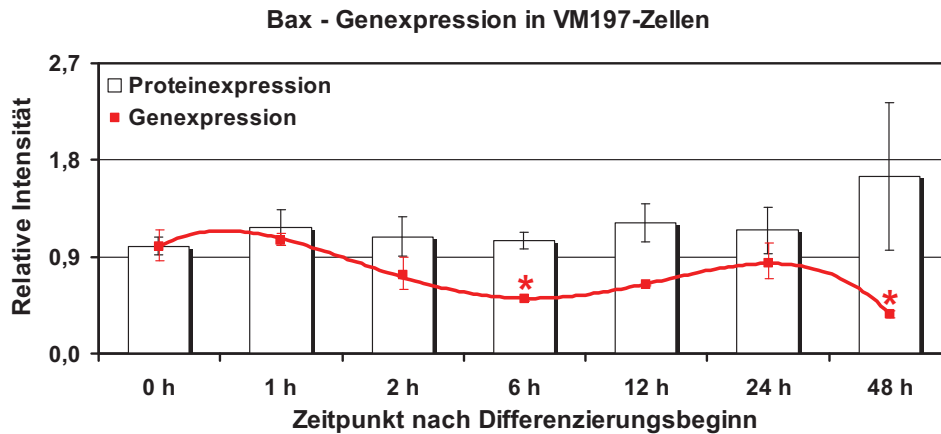


Abb. 3.32.: Relative Genexpression von Bax in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *bax* war in VM197-Zellen 6 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.2. AIF-Genexpression

Die Genexpression von AIF in VM197-Zellen war 2 h nach Differenzierungsbeginn etwa 1,3-fach signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Im weiteren Differenzierungsverlauf zeigte sich eine geringfügige Abnahme der Genexpression von AIF, wobei diese Genexpressionsunterschiede nicht auf Proteinebene zum tragen kamen (Abb. 3.33.).

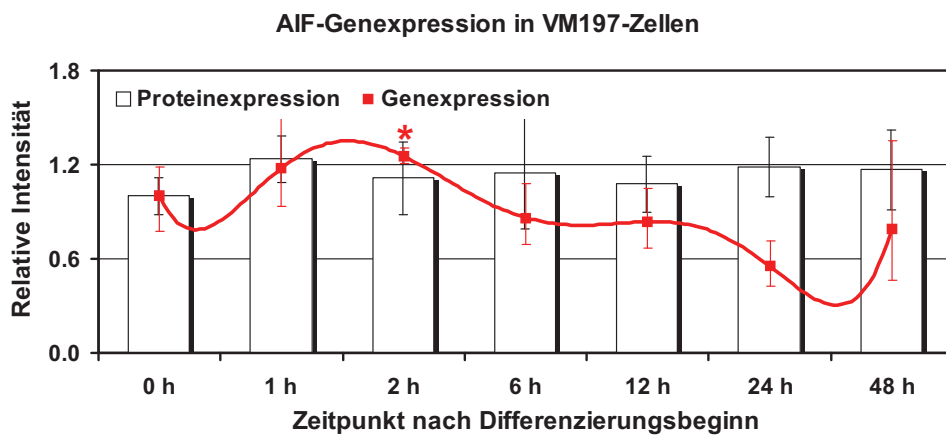


Abb. 3.33.: Relative Genexpression von AIF in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von AIF in VM197-Zellen war 2 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.3. CAS-Genexpression

Das Protein CAS war während der Differenzierung der VM197-Zellen auf genregulatorischer Ebene keinen signifikanten Expressionsänderungen im Vergleich zum Proliferationsstatus unterworfen (Abb. 3.34.). Dessen Genexpression erhöhte sich während der Differenzierung tendenziell etwas, wohingegen die Proteinexpression ein abnehmendes Expressionsmuster zeigte.

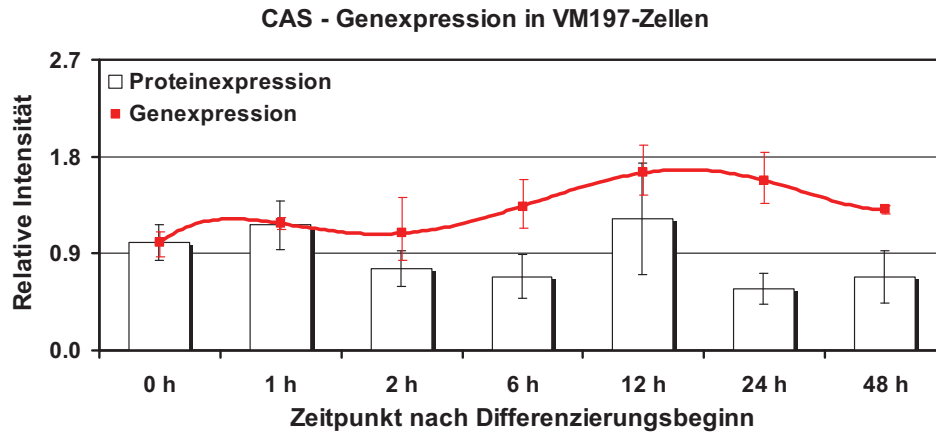


Abb. 3.34.: Relative Genexpression von CAS in differenzierenden VM197-Zellen. Die Genexpression von CAS veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.1.4. Caspase-2-Genexpression

Die Genexpression von Caspase-2 war zwar während der Differenzierung der VM197-Zellen leicht rückläufig, aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) verändert (Abb. 3.35.).

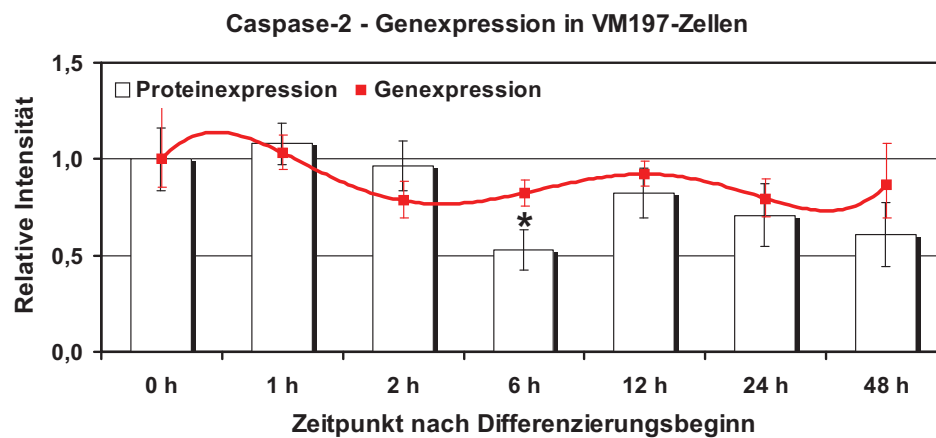


Abb. 3.35.: Relative Genexpression von Caspase-2 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *caspase-2* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.5. Caspase-3-Genexpression

Das Genexpressionsmuster von Caspase-3 in VM197-Zellen unterlag nachweislich keinen differenzierungsbedingten Veränderungen, was sich ebenfalls auf Proteinexpressionsebene zeigte (Abb. 3.36.).

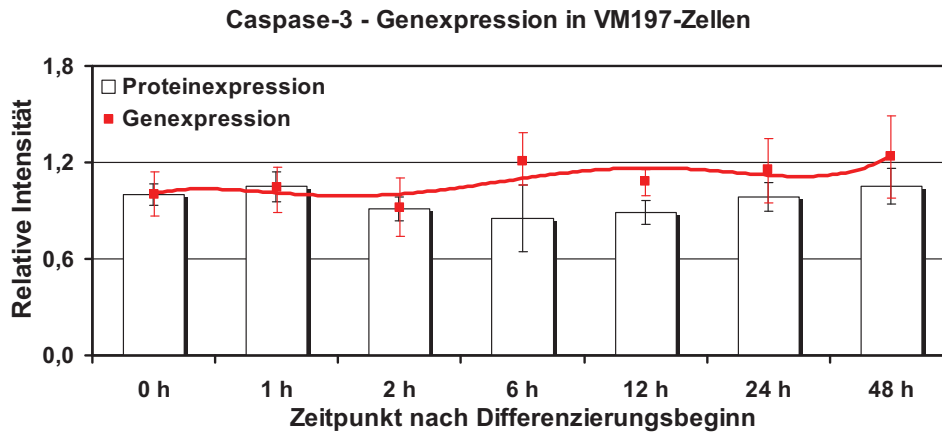


Abb. 3.36.: Relative Genexpression von Caspase-3 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *caspase-3* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.1.6. Caspase-7-Genexpression

Die Genexpression von Caspase-7 war in VM197-Zellen 6 h nach Differenzierungsbeginn um etwa 27 % signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erniedrigt, wohingegen sich zu allen weiteren Differenzierungszeitpunkten und in Korrelation zum Proteinexpressionsstatus keine signifikanten Expressionsänderungen zeigten (Abb. 3.37.).

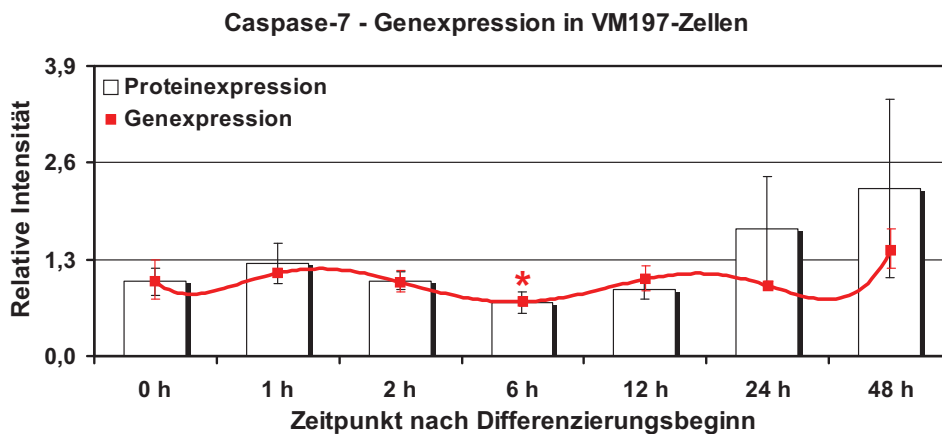


Abb. 3.37.: Relative Genexpression von Caspase-7 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *caspase-7* in VM197-Zellen war 6 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.7. Caspase-8-Genexpression

Die Genexpression von Caspase-8 blieb in differenzierenden VM197-Zellen relativ konstant gegenüber der Kontrolle (0 h), was sich in ähnlicher Weise in dessen Proteinexpression zeigte (Abb. 3.38.).

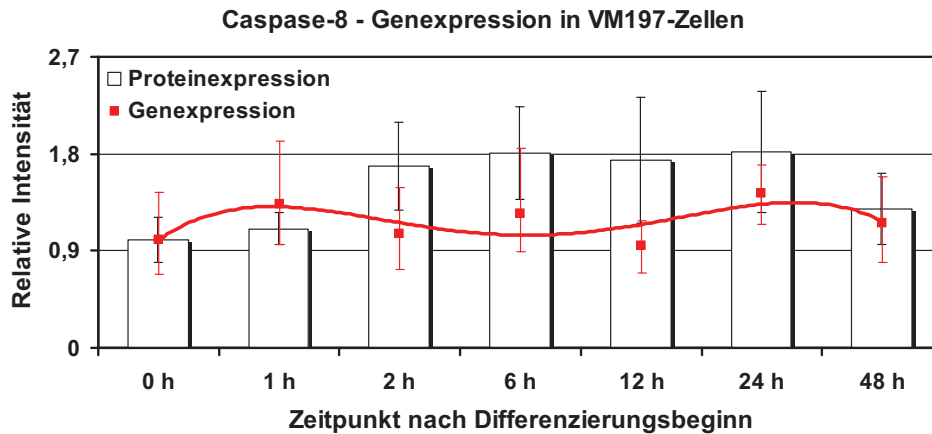


Abb. 3.38.: Relative Genexpression von Caspase-8 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *caspase-8* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.1.8. PARP-Genexpression

Die PARP-Genexpression war in VM197-Zellen 24 h nach Differenzierungsbeginn um etwa 36 % signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erniedrigt, was sich allerdings nicht auf dessen Proteinexpressionsebene zeigte (Abb. 3.39.).

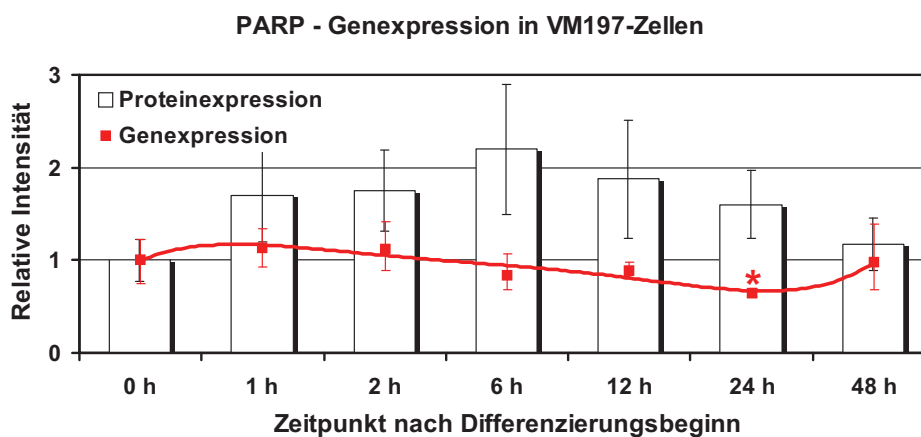


Abb. 3.39.: Relative Genexpression von PARP in differenzierenden VM197-Zellen. Die Genexpression von PARP in VM197-Zellen war 24 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.9. Nip-1-Genexpression

Die Genexpression von Nip-1 war während der Differenzierung der VM197-Zellen tendenziell leicht rückläufig, aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) verändert (Abb. 3.40.).

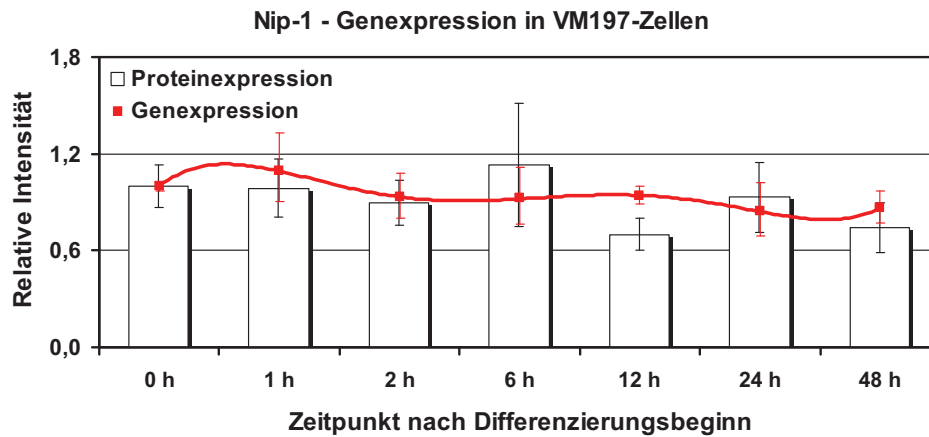


Abb. 3.40.: Relative Genexpression von Nip-1 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *nip-1* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.1.10. Bid-Genexpression

Die Genexpression von Bid lag in VM197-Zellen 24 h nach Differenzierungsbeginn um etwa 44 % signifikant unter dem Expressionsniveau der Kontrolle (0 h), wobei dieser Aspekt hinsichtlich der Proteinexpression nicht ins Gewicht fiel (Abb. 3.41.).

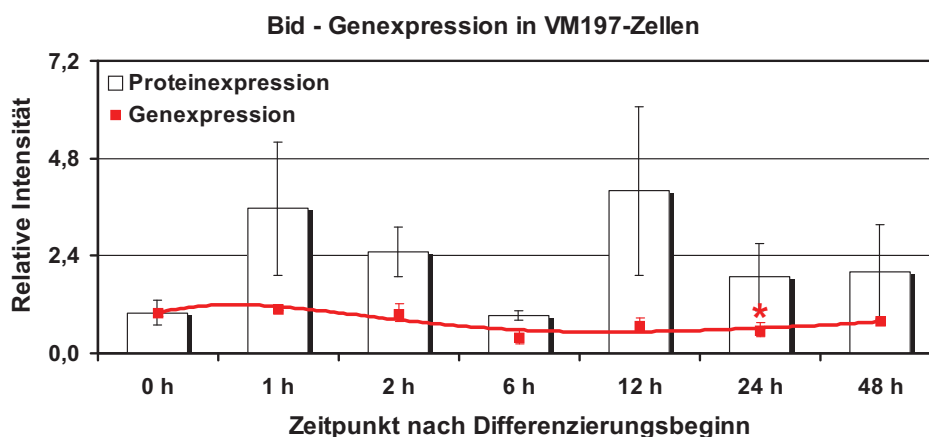


Abb. 3.41.: Relative Genexpression von Bid in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *bid* in VM197-Zellen war 24 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.1.11. Cytochrom c-Genexpression

Die Genexpression von Cytochrom c zeigte sich während der Differenzierung der VM197-Zellen als tendenziell, aber nicht signifikant rückläufig gegenüber der Kontrolle (0 h), was ebenso auf Proteinexpressionsebene verzeichnet wurde (Abb. 3.42.).

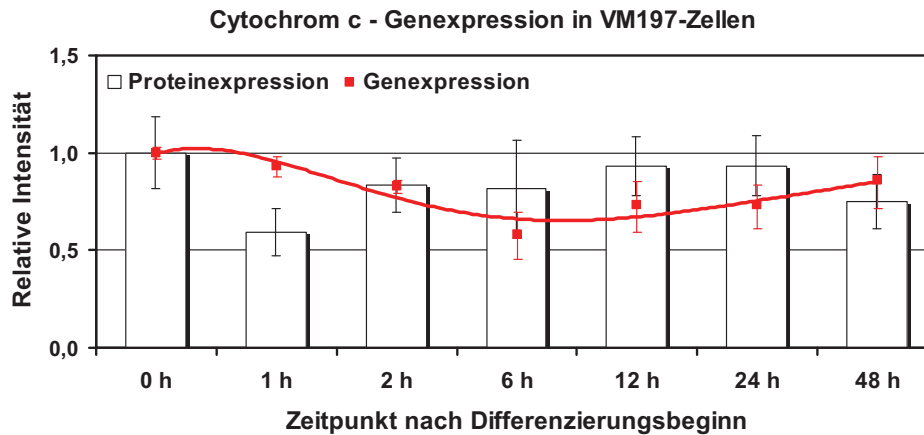


Abb. 3.42.: Relative Genexpression von Cytochrom c in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *cytochrom c* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.2. Anti-apoptotische Gene

Die Expressionsanalyse anti-apoptotischer Gene beschränkte sich auf *bcl-2*, *xiap* und *survivin*, denen regulatorische Funktionen hinsichtlich des Zellüberlebens zugeschrieben werden.

3.4.3.2.1. Bcl-2-Genexpression

Zum Zeitpunkt 6 h nach Differenzierungsbeginn wurde in VM197-Zellen eine etwa dreifach signifikant erhöhte Expression von *bcl-2* gegenüber der Kontrolle (0 h) nachgewiesen, wohingegen sich derselbe Expressionsunterschied gegenüber dem Proliferationsstatus erst 24 h nach Differenzierungsbeginn auf Proteinebene abzeichnete (Abb. 3.43.).

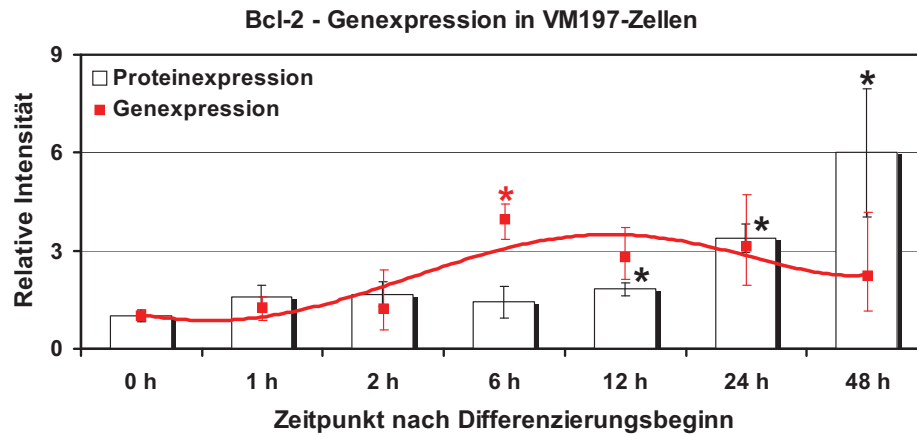


Abb. 3.43.: Relative Genexpression von Bcl-2 in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *bcl-2* in VM197-Zellen war 6 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.3.2.2. XIAP-Genexpression

Die Expression von *xiap* veränderte sich während der Differenzierung der VM197-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (0 h) nicht signifikant und korrelierte damit mit dessen Proteinexpression (Abb. 3.44.).

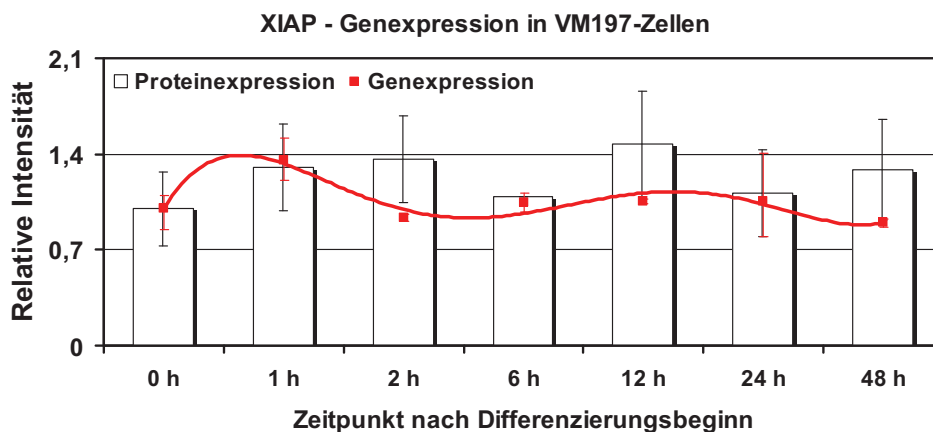


Abb. 3.44.: Relative Genexpression von XIAP in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *xiap* veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). MW±SD, N=2.

3.4.3.2.3. Survivin-Genexpression

Die durchgehend abnehmende Expression des Gens *survivin* während der Differenzierung der VM197-Zellen korrelierte mit dessen Proteinexpressionsmuster im selben Differenzierungszeitraum. Auf Genexpressionsebene war 24 h nach Differenzierungsbeginn eine signifikante Ver-

ringerung von Survivin um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrolle (0 h) zu beobachten, währenddessen die Proteinexpression dahingegen noch geringer war (Abb. 3.45.).

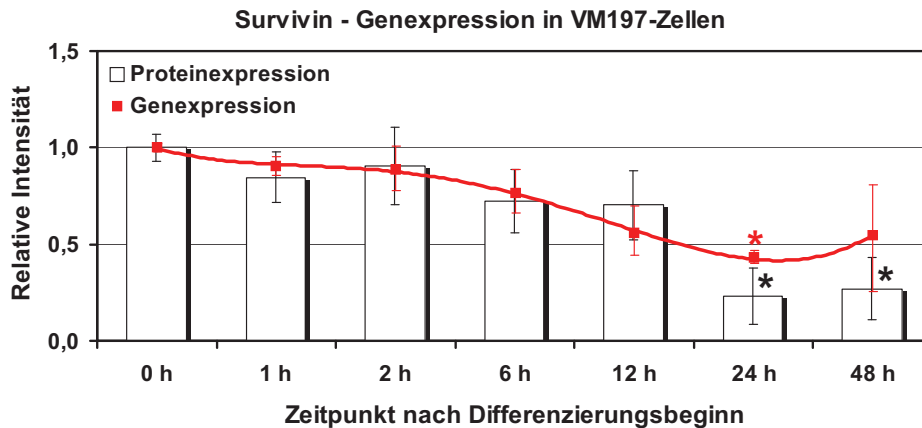


Abb. 3.45.: Relative Genexpression von Survivin in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *survivin* in VM197-Zellen war 24 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. MW±SD, N=2, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.4.4. Verifizierung ausgewählter Gene mittels RT-PCR

Um die beobachteten signifikanten Expressionsänderungen des pro-apoptotischen *bax* und des anti-apoptotischen *bcl-2* in differenzierenden VM197-Zellen stichprobenartig zu verifizieren, wurde die quantitative Real-Time PCR-Analyse durchgeführt.

3.4.4.1. *bax*-Expression in differenzierenden VM197-Zellen

Bei der Untersuchung der Expression der mRNA des pro-apoptotischen Bax in VM197-Zellen war dessen tendenziell stetige, aber nicht signifikante, Abnahme während der Differenzierungszeitreihe gegenüber der Kontrolle (0 h) auffällig (Abb. 3.46.).

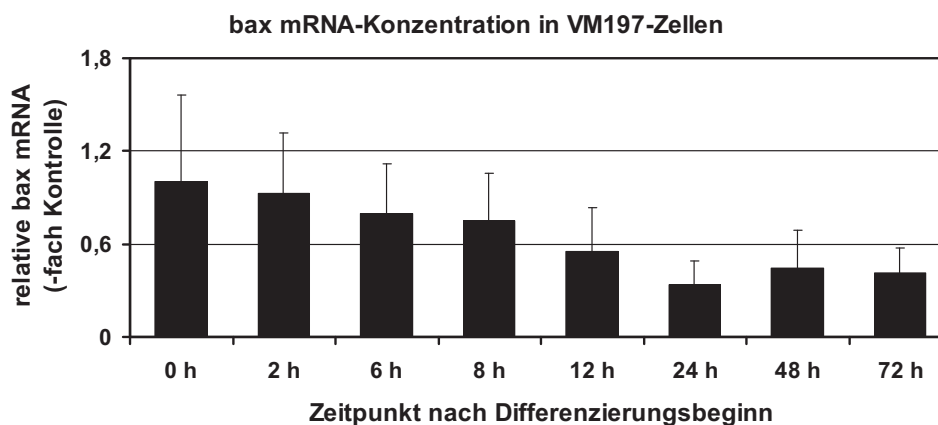


Abb. 3.46.: Relative *bax*-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *bax* nahm in differenzierenden VM197-Zellen tendenziell gegenüber der Kontrolle (0 h) ab. MW±SEM, N=3.

3.4.4.2. *bcl-2*-Expression in differenzierenden VM197-Zellen

Die mRNA-Expressionsanalyse des anti-apoptotischen Bcl-2 in VM197-Zellen zeigte dessen tendenziell stetige, aber nicht signifikante, Zunahme während der Differenzierungszeitreihe gegenüber der Kontrolle (0 h) (Abb. 3.47.).

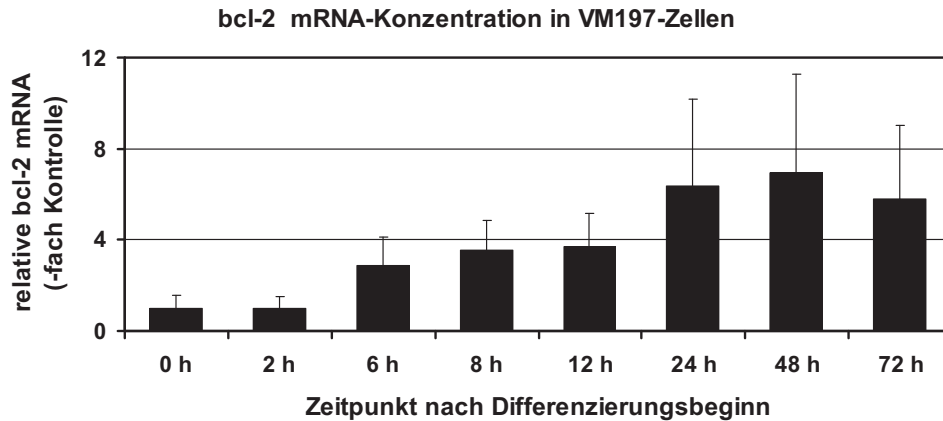


Abb. 3.47.: Relative *bcl-2*-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von *bcl-2* nahm in differenzierenden VM197-Zellen tendenziell gegenüber der Kontrolle (0 h) zu. MW±SEM, N=3.

3.5. Wnt-assozierte Proteine und ihre mögliche Beteiligung an apoptotischen Prozessen während der Differenzierung von VM197-Zellen

Wie die zuvor dargestellten Ergebnisse der morphologischen und physiologischen Studien, sowie die Resultate der Protein- und Genexpressionsstudien Apoptose-relevanter Signalkomponenten belegen, geht die, durch den kanonischen Wnt-Signalweg gesteuerte, Differenzierung von VM197-Zellen mit einer zeitabhängigen Zunahme apoptotischen Zellverlustes einher. Um diese Feststellung zu bekräftigen oder zu widerlegen, wurde die Expression einzelner Schlüsselproteine des kanonischen Wnt-Signalweges in VM197-Zellen genauer analysiert bzw. deren Funktionsweise gezielt manipuliert, um aus möglichen resultierenden Effekten gegebenenfalls Rückschlüsse auf eine Vernetzung der Apoptosesignalwege und des kanonischen Wnt-Signalweges ziehen zu können.

3.5.1. Apoptose-induziertes β -Catenin-Cleavage in VM197-Zellen

Beta-Catenin ist ein, vorwiegend im Zytoplasma von Zellen vorkommendes, Protein, welches an der Zelladhäsion beteiligt ist und zudem die Hauptkomponente des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges darstellt. Während der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges wird β -Catenin in den Zellkern transportiert, wo es an LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren bindet und nachfolgend Einfluss auf die Transkription verschiedener Zielgene hat.

Das 92 kDa große β -Catenin wurde in proliferierenden, differenzierenden und in, mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelten VM197-Zellen in relativ konstanter Proteinexpres-

sion nachgewiesen. Lediglich nach Staurosporin-Behandlung war eine geringe, aber nicht signifikante Abnahme von β -Catenin zu beobachten.

Auffällig hingegen waren Proteinfragmente im Bereich zwischen 70 kDa und 90 kDa, die am stärksten in Zelllysaten in Erscheinung traten, die mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelt wurden. Proteinfragmente der gleichen Größe traten ebenfalls, aber mit schwächerer Intensität, 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn auf. In einem Versuch wurden VM197-Zellen bis zu 14 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert, wobei sich die gleichen Proteinfragmentbänder mit fortlaufender Differenzierungszeit intensivierten und mit einer Spaltung von β -Catenin assoziiert wurden (Abb. 3.48.).

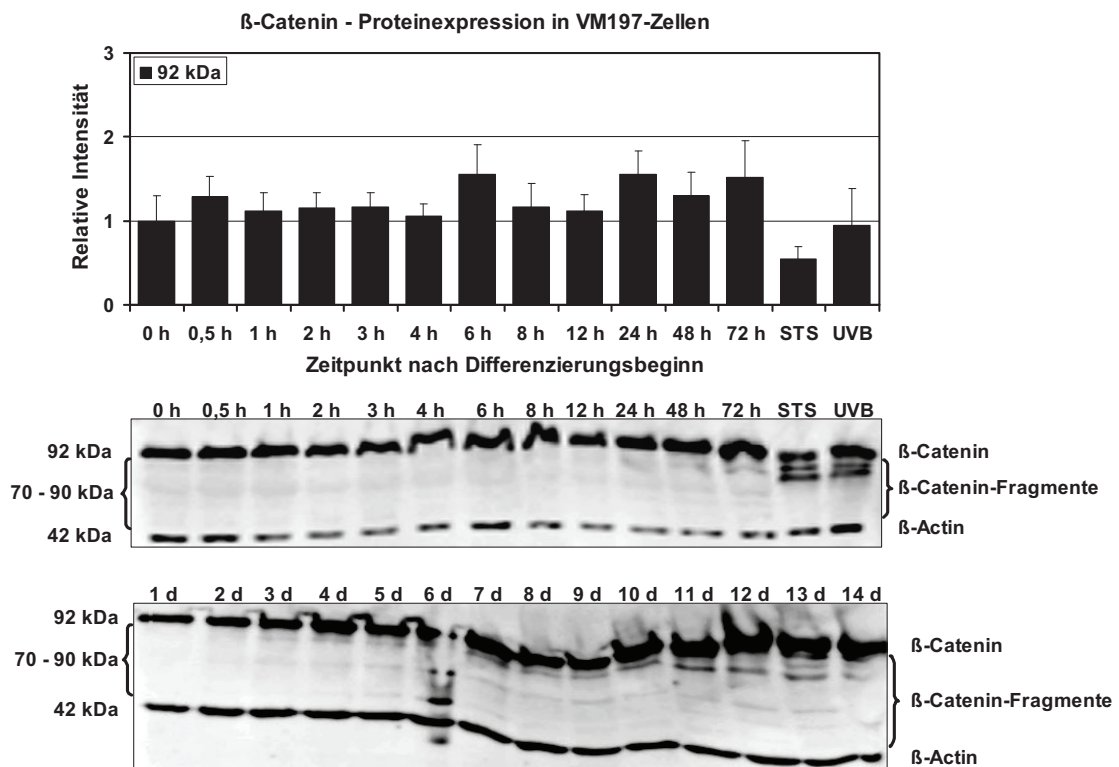


Abb. 3.48.: Relative β -Catenin-Expression in differenzierenden VM197-Zellen. Die Expression von β -Catenin (92 kDa) veränderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung, sowie nach Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). In differenzierenden VM197-Zellen, die mit 2 μ M Staurosporin bzw. 0,45 J/cm² UV-B-Strahlung behandelt wurden, zeigten sich zudem mehrere Apoptose-assoziierte β -Catenin-Fragmente (70-90 kDa), die auch ab 24 h bis 14 d nach Differenzierungsbeginn in unbehandelten VM197-Zellen nachweisbar waren. MW \pm SEM, N=7.

3.5.2. Die Behandlung von differenzierenden VM197-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 bewirkte eine Reduktion der Apoptoserate

Die Glykogensynthasekinase-3 β ist ein Enzym, welches eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes von Zellen und während der neuronalen Zellentwicklung einnimmt. Als eine Komponente des kanonischen Wnt-Signalweges phosphoryliert GSK-3 β das Protein β -Catenin, welches daraufhin degradiert wird. Zudem wird GSK-3 β eine regulatorische

Funktion bezüglich zellulärer Apoptosevorgänge zugesprochen, welche Aussage durch die nachfolgenden Versuche belegt wird.

3.5.2.1. Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung

Differenzierende VM197-Zellen wurden mit dem potenziellen und selektiven GSK-3 β -Inhibitor SB216763 behandelt und nachfolgend hinsichtlich ihrer proliferativen Aktivität und apoptotischen Prozessen analysiert. Die phasenkontrastmikroskopische Analyse der Zellen, die während der maximal 12-stündigen Differenzierung mit 10 μ M SB216763 behandelt wurden, zeigten, dass die Inhibierung von GSK-3 β keine sichtbaren Effekte auf den Differenzierungsstatus der Zellen hatte (Bilder nicht gezeigt).

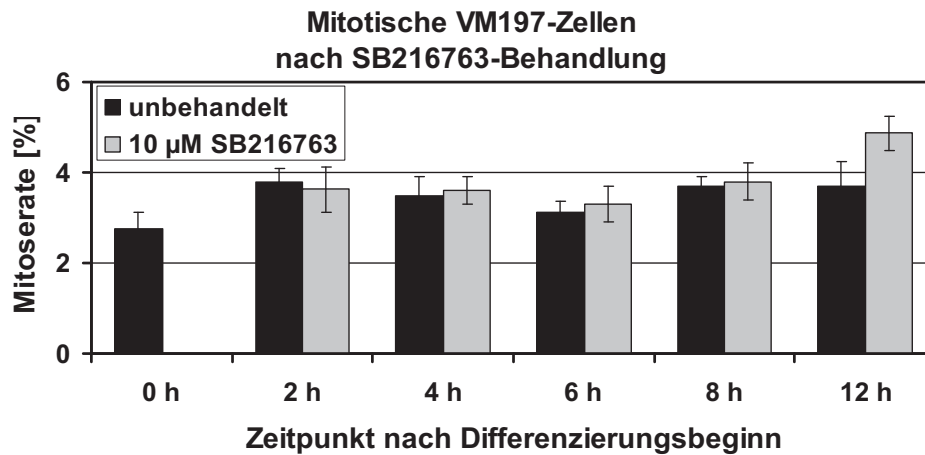


Abb. 3.49.: Mitotische VM197-Zellen nach Inhibierung von GSK-3 β während der Differenzierung. Die Mitoserate änderte sich in VM197-Zellen während der Differenzierung und gleichzeitiger Behandlung mit 10 μ M SB216763 nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) bzw. im Vergleich zu unbehandelten VM197-Zellen zu selben Differenzierungszeitpunkten. Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung, MW \pm SD, n=6.

Während der Differenzierungsreihe von VM197-Zellen zeigten sich nach Behandlung mit 10 μ M SB216763 keine signifikanten Veränderungen in der Mitoserate im Vergleich zu unbehandelten VM197-Zellen zum gleichen Differenzierungszeitpunkt bzw. zur Kontrolle (0 h). Während der Zelldifferenzierung wurden unabhängig von der Behandlung mit SB216763 durchschnittlich 1 % mehr mitotische Zellen gezählt als in der Proliferationskultur (Abb. 3.49.).

3.5.2.2. Mikroskopische Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung während der Differenzierung

Die Apoptoserate stieg in unbehandelten VM197-Zellen mit fortschreitender Differenzierung stetig an und war 6 h, 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn 0,4-fach bis 0,9-fach gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht, in der keine apoptotischen Zellen gezählt wurden. Die Behandlung der Zellen mit SB216763 resultierte 6 h nach Differenzierungsbeginn in einer, um die

Hälfte, geringeren Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu selbem Zeitpunkt. Acht Stunden und 12 h nach Differenzierungsbeginn war die Apoptoserate in Zellen, die mit SB216763 behandelt wurden, um etwa 0,7 % signifikant gegenüber unbehandelten Zellen zu selben Differenzierungszeitpunkten erniedrigt (Abb. 3.50.).

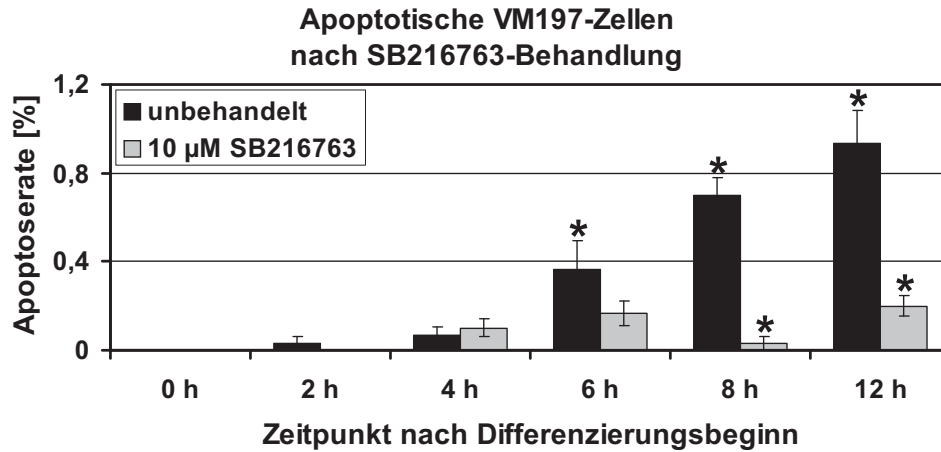


Abb. 3.50.: Apoptotische VM197-Zellen nach Inhibierung von GSK-3 β während der Differenzierung. Die Apoptoserate stieg in unbehandelten VM197-Zellen ab 6 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) an. Die Zugabe von 10 μ M SB216763 bewirkte eine signifikante Abnahme der Apoptoserate 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber unbehandelten Zellen zu selben Differenzierungszeitpunkten. Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung, MW \pm SD, n=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h) bzw. selben Zeitpunkten ohne Behandlung.

3.5.2.3. Expressionsstatus von GSK-3 β , phosphoryliertem GSK-3 β und Apoptose-relevanten Proteinen in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung

GSK-3 β war in differenzierenden VM197-Zellen nur 4 h nach Differenzierungsbeginn 1,4-fach signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht. Zu allen anderen Differenzierungszeitpunkten wurden in unbehandelten und behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von GSK-3 β gegenüber dem Kontrollwert beobachtet (Abb. 3.51.).

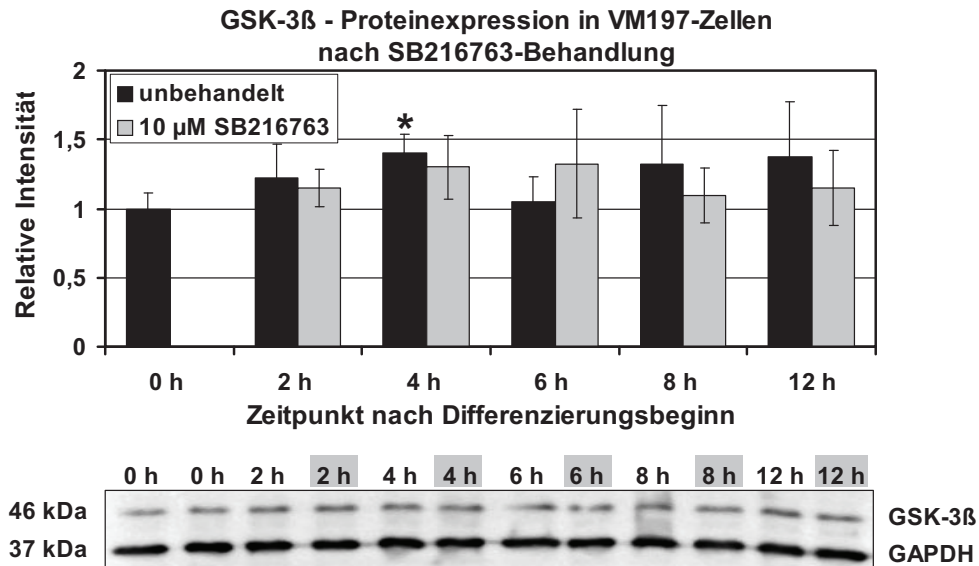


Abb. 3.51.: Relative GSK-3 β -Expression in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Die Expression von GSK-3 β war 4 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Behandlung von differenzierenden Zellen mit 10 μ M SB216763 änderte nichts am Expressionsstatus von GSK-3 β gegenüber unbehandelten Zellen zu selben Differenzierungszeitpunkten. MW \pm SEM, N=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde der Phosphorylierungsgrad am Serin 9 und demnach der Aktivierungszustand des GSK-3 β -Proteins analysiert.

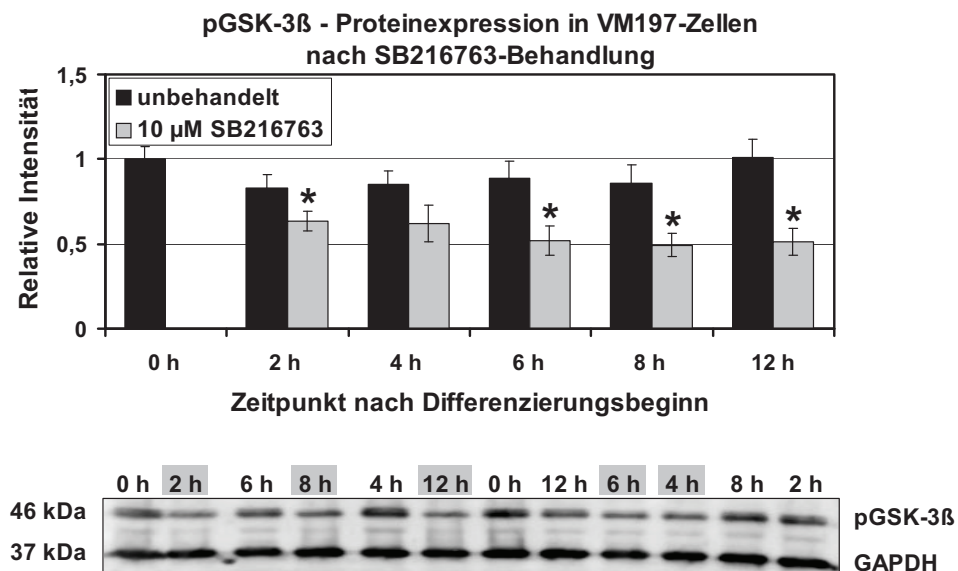


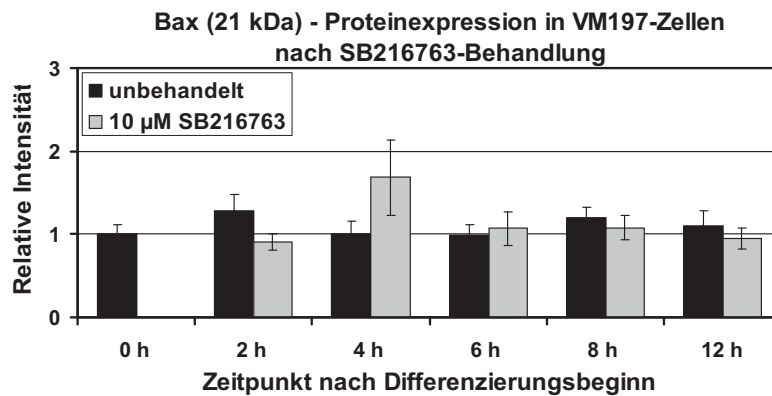
Abb. 3.52.: Relative Expression des phosphorylierten GSK-3 β (pGSK-3 β) in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Die Expression von pGSK-3 β veränderte sich nicht während der Differenzierung gegenüber der Kontrolle. Hingegen wurde 2 h, 6 h, 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn und gleichzeitiger Behandlung mit 10 μ M SB216763 eine signifikante Verringerung des Phosphorylierungsgrades am Serin 9 des GSK-3 β im Vergleich zu unbehandelten, differenzierenden Zellen nachgewiesen. MW \pm SEM, N=5, *p<0,05 vs unbehandelten VM197-Zellen desselben Differenzierungszeitpunktes.

Während der Differenzierungszeitreihe zeigten sich keine relevanten Änderungen im Phosphorylierungsstatus des Serin 9 am GSK-3 β gegenüber der Kontrolle. Eine Behandlung der differenzierenden Zellen mit 10 μ M SB216763 bewirkte hingegen eine fast durchgängig signifikante und maximal um die Hälfte verringerte Phosphorylierung des Serin 9 am GSK-3 β -Protein (Abb. 3.52.).

Nachfolgend wurde der Apoptosestatus der differenzierenden VM197-Zellen nach Behandlung mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 auf Proteinebene analysiert.

Die Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins (21 kDa) blieb während der Differenzierung der VM197-Zellen unbeeinflusst durch die Behandlung mit SB216763 und konstant gegenüber der Kontrolle (0 h) (Abb. 3.53. A).

A)



B)

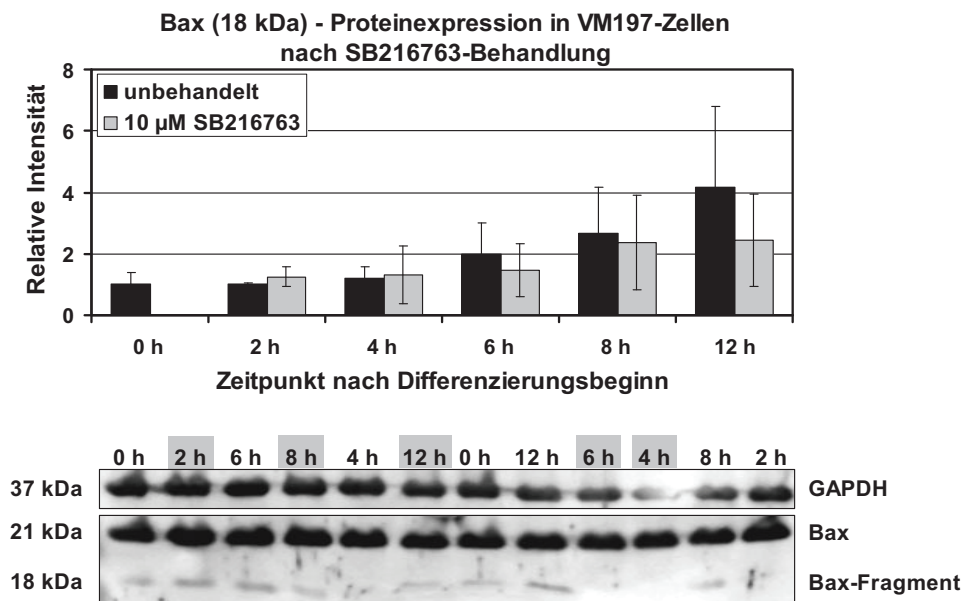


Abb. 3.53.: Relative Bax-Expression in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. A) Die Expression von Bax (21 kDa) zeigte sich, unabhängig von der Behandlung mit SB216763, unverändert während der Differenzierung von VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle (0 h). B) Der Anteil des Apoptose-assoziierten Bax-Fragments (18 kDa) erhöhte sich tendenziell in differenzierenden Zellen gegenüber der Kontrolle. Ab 6 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn und gleichzeitiger Behandlung mit 10 μ M SB216763 war ein tendenzieller Rückgang des 18 kDa großen Bax-Fragments gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte erkennbar. MW \pm SEM, N=5 (Bax, 21 kDa), N=2 (Bax-Fragment, 18 kDa).

Hinsichtlich der Expression des 18 kDa großen Bax-Fragments zeigte sich dagegen während der Differenzierung der Zellen ein bis zu vierfacher Anstieg gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.53 B). Auch nach Behandlung der differenzierenden Zellen mit SB216763 trat dieses Expressionsmuster des Bax-Fragments in Erscheinung, allerdings war 6 h, 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn der Anteil an Bax-Fragment tendenziell geringer als in unbehandelten Zellen zu selbem Differenzierungszeitpunkt. Zwölf Stunden nach Differenzierungsbeginn und SB216763-Behandlung war nur noch halb so viel gespaltenes Bax detektierbar wie im unbehandelten Vergleichsansatz.

Pro-Caspase 3 (32 kDa) zeigte sich in differenzierenden VM197-Zellen sowohl ohne, als auch mit SB216763-Behandlung konstant gegenüber der Kontrolle (0 h) exprimiert (Abb. 3.54.).

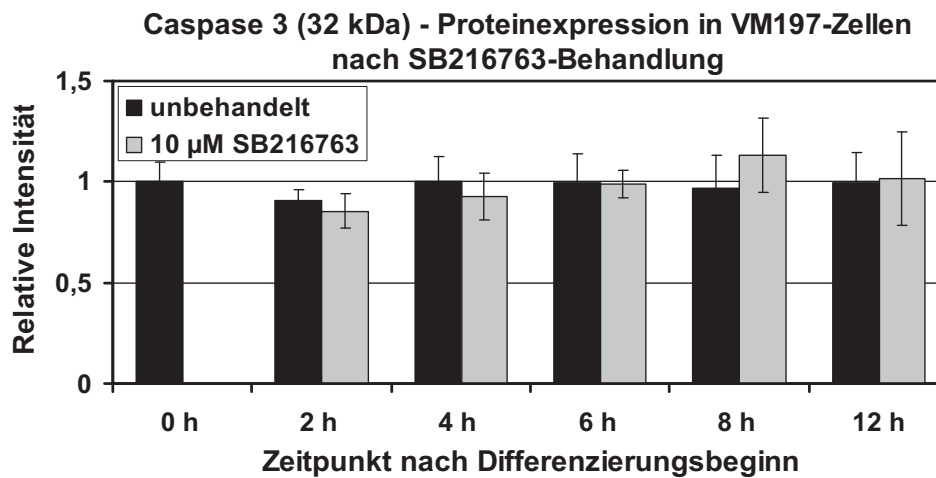


Abb. 3.54.: Relative Pro-Caspase-3-Expression in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Die Expression von Pro-Caspase-3 (32 kDa) zeigte sich, unabhängig von der Behandlung mit SB216763, unverändert während der Differenzierung von VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle (0 h). MW \pm SEM, N=5.

Die Expression der Präkursorform der Caspase-3 (30 kDa) war 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn in VM197-Zellen tendenziell geringfügig gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung differenzierender Zellen mit SB216763 kompensiert und erreichte das Expressionsniveau der Kontrolle (Abb. 3.55.).

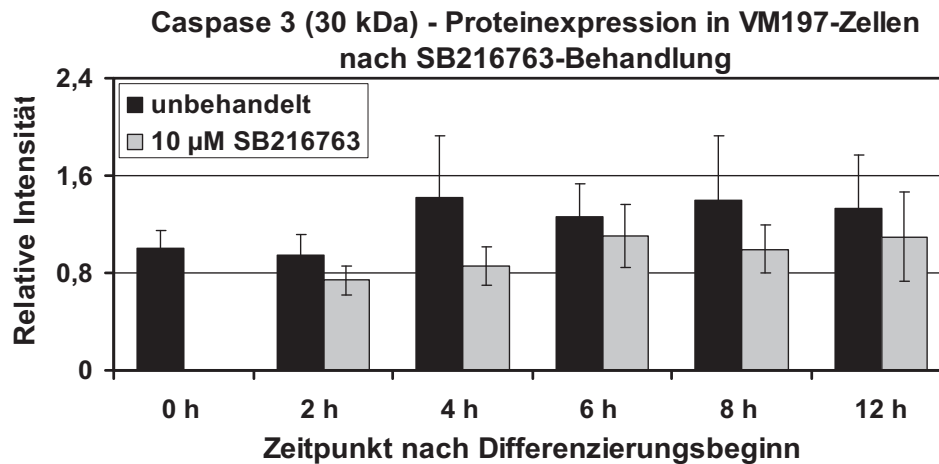


Abb. 3.55.: Relative Expression der Präkursorform von Caspase-3 (30 kDa) in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Der Anteil an der Präkursorform der Caspase-3 veränderte sich während der Differenzierung der VM197-Zellen nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h). Eine Behandlung der Zellen mit 10 μ M SB216763 bewirkte ab 2 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn einen tendenziellen Rückgang des Anteils der Caspase-3-Präkursorform gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte. MW \pm SEM, N=5.

Ab 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn wurde in VM197-Zellen ein tendenziell höherer Anteil des 17 kDa großen Caspase-3-Fragments gegenüber der Kontrolle (0 h) detektiert. Nach Behandlung von differenzierenden Zellen mit SB216763 war tendenziell eine geringere Expression des 17 kDa großen Caspase-3-Fragments im Vergleich zu unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte nachweisbar (Abb. 3.56.).

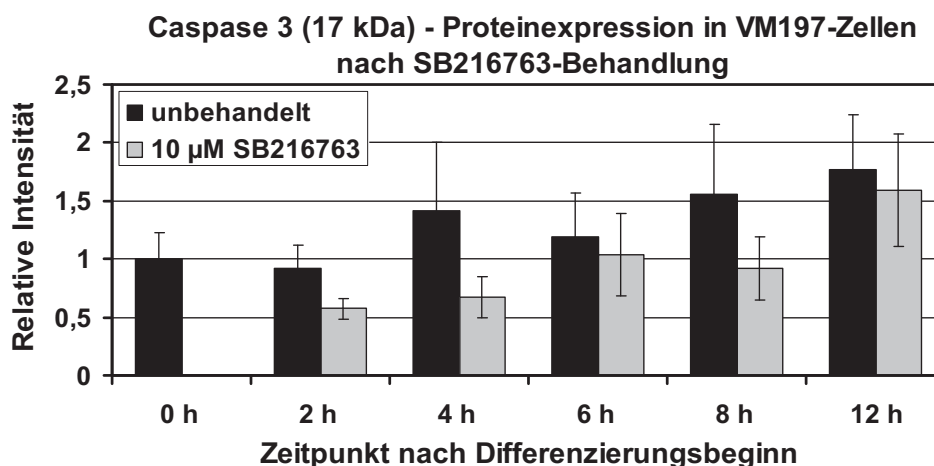


Abb. 3.56.: Relative Expression des 17 kDa großen Caspase-3-Fragments in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Der Anteil des 17 kDa großen und Apoptose-assoziierten Caspase-3-Fragments erhöhte sich während der Differenzierung der VM197-Zellen tendenziell gegenüber der Kontrolle (0 h). Die Behandlung der Zellen mit 10 μ M SB216763 bewirkte ab 2 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn einen tendenziellen Rückgang des 17 kDa-Fragments gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte. MW \pm SEM, N=4.

Auch der Anteil des 11 kDa großen Caspase-3-Fragments war ab 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn in VM197-Zellen tendenziell gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht. Die Behandlung differenzierender Zellen mit SB216763 dagegen ließ die Expression des 11 kDa-Fragments tendenziell geringfügig abfallen. Eine Ausnahme war der Zeitpunkt 6 h nach Differenzierungsbeginn, bei dem das 11 kDa-Fragment in unbehandelten Zellen stärker exprimiert war (Abb. 3.57.).

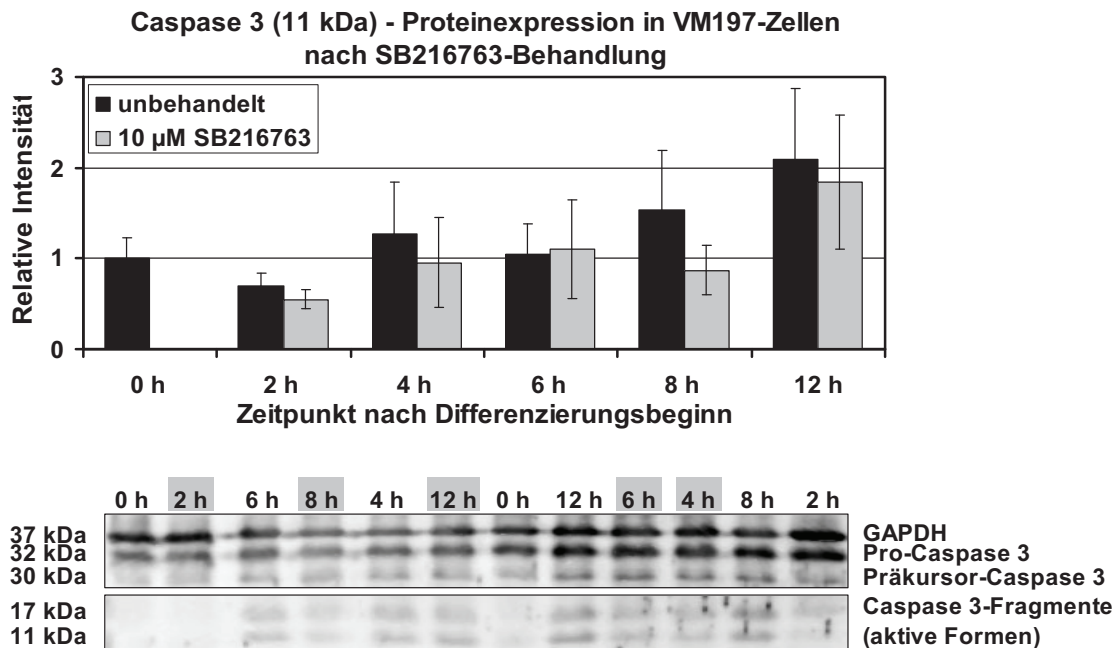


Abb. 3.57.: Relative Expression des 11 kDa großen Caspase-3-Fragments in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. Der Anteil des 11 kDa großen und Apoptose-assoziierten Caspase-3-Fragments erhöhte sich während der Differenzierung der VM197-Zellen tendenziell gegenüber der Kontrolle (0 h). Die Behandlung der Zellen mit 10 μ M SB216763 bewirkte 2 h, 4 h, 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn einen tendenziellen Rückgang des Anteils des 11 kDa-Fragments gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte. MW \pm SEM, N=4.

Die Expression des Proteins PARP (113 kDa) war in differenzierenden VM197-Zellen, unabhängig von der Behandlung mit SB216763, relativ unverändert gegenüber der Kontrolle (0 h) (Abb. 3.58. A).

Der Anteil des 24 kDa großen PARP-Fragments war hingegen ab 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn durchschnittlich 2,5-fach signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Zu selben Differenzierungszeitpunkten zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit SB216763 tendenziell ein geringerer Anteil an PARP-Fragment im Vergleich zu unbehandelten, differenzierenden Zellen (Abb. 3.58. B).

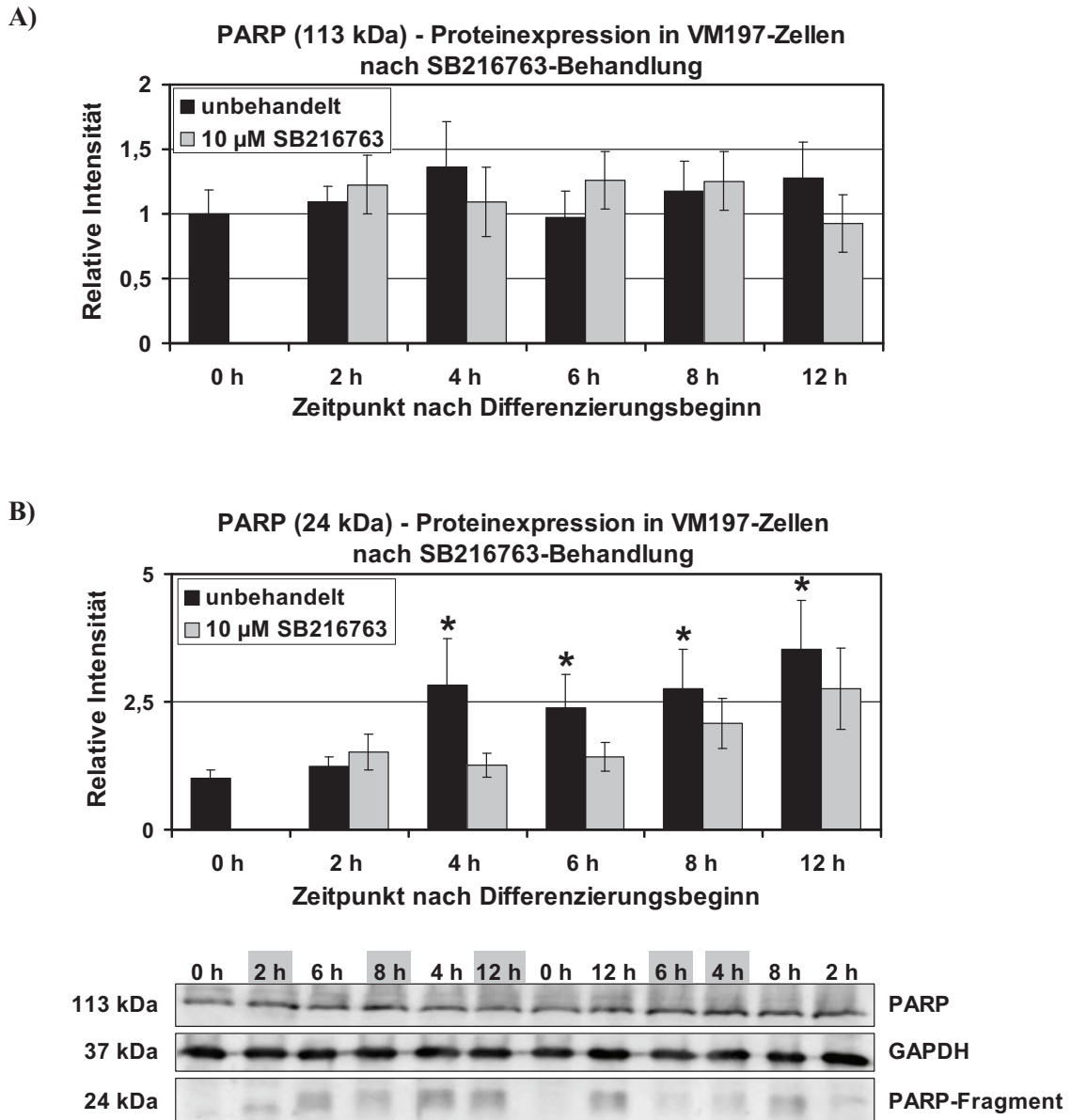


Abb. 3.58.: Relative PARP-Expression in differenzierenden VM197-Zellen nach GSK-3 β -Inhibierung. **A)** Die Expression von PARP (113 kDa) zeigte sich während der Differenzierung von VM197-Zellen und unabhängig von der Behandlung mit SB216763 unverändert gegenüber der Kontrolle (0 h). **B)** Der Anteil des Apoptose-assoziierten PARP-Fragments (24 kDa) erhöhte sich ab 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle. Ab 4 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn und gleichzeitiger Behandlung mit 10 μ M SB216763 war ein tendenzieller Rückgang des 24 kDa großen PARP-Fragments gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte erkennbar. MW \pm SEM, N=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

3.5.3. Wnt-3a führte zu keiner signifikanten Verringerung der Apoptose in VM197-Zellen

Wnt-3a ist ein, für normale Entwicklungsprozesse wichtiges, Glykoprotein der Wnt-Familie, welches die proliferative Aktivität von humanen neuronalen Progenitorzellen erhöht und im Gegenzug apoptotischen Prozessen entgegenwirkt (Davidson et al., 2007).

Gleichzeitig mit der Einleitung der Differenzierung von VM197-Zellen wurden 50 ng/ml rekombinantes Wnt-3a in das Zellkulturmedium gegeben und zu bestimmten Zeitpunkten nach Differenzierungsbeginn die Mitoserate und die Apoptoserate der VM197-Zellen bestimmt.

3.5.3.1. Bestimmung des Mitoseindex in differenzierenden VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a

Die mikroskopische Auswertung von unbehandelten VM197-Zellen zeigte eine drei- bis vierfache Erhöhung der Mitoserate zu den Zeitpunkten 6 h (signifikant) und 12 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle (0 h). Ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn war der Anteil mitotisch aktiver Zellen jedoch um die Hälfte geringer als in der Kontrolle (Abb. 3.59.).

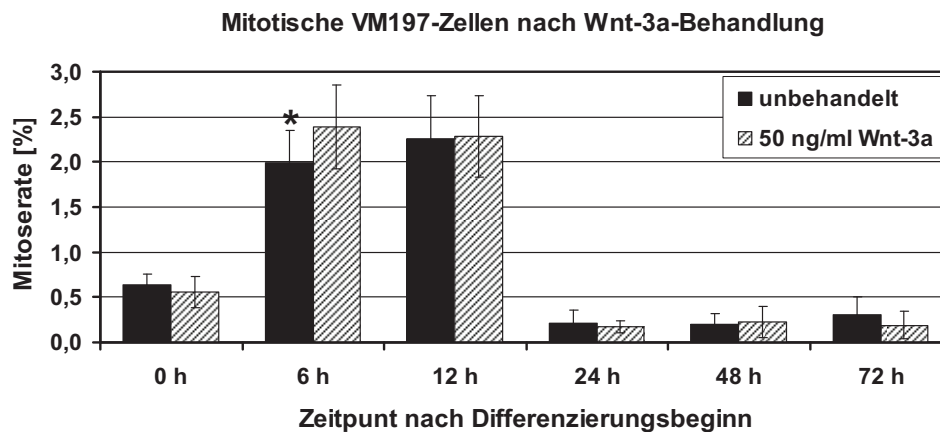


Abb. 3.59.: Mitotische VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a während der Differenzierung. Die Mitoserate war 6 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Behandlung der Zellen mit 50 ng/ml Wnt-3a veränderte die Mitoserate während der Differenzierung nicht gegenüber unbehandelten Zellen derselben Differenzierungszeitpunkte. Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung; MW \pm SD, n=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

In VM197-Zellen, die mit Wnt-3a behandelt wurden, zeigte sich hinsichtlich der Mitoserate zu selben Differenzierungszeitpunkten ein vergleichbares Bild.

3.5.3.2. Mikroskopische Quantifizierung apoptotischer VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a während der Differenzierung

In unbehandelten VM197-Zellen erhöhte sich die Apoptoserate ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle (0 h), wobei das Maximum nach 12 h Differenzierung bei 1,5 % erreicht wurde (Abb. 3.60.).

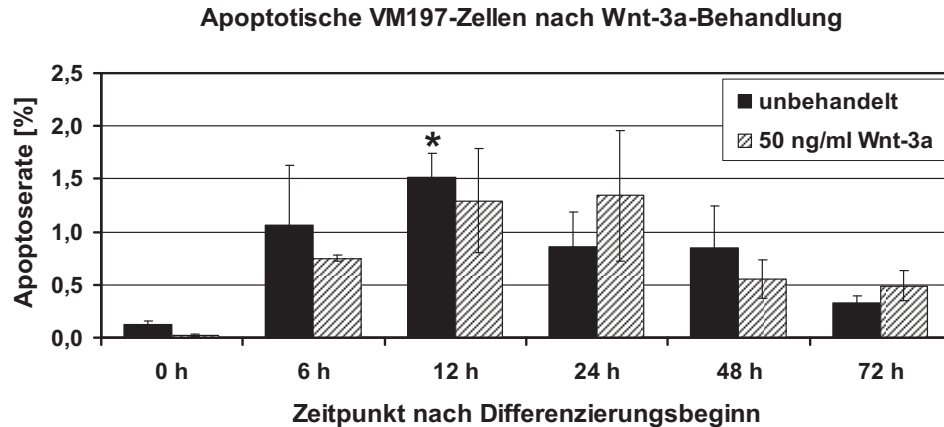


Abb. 3.60.: Apoptotische VM197-Zellen nach Behandlung mit Wnt-3a während der Differenzierung. Die Apoptoserate war 12 h nach Differenzierungsbeginn signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht. Die Behandlung mit 50 ng/ml Wnt-3a nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate während der Differenzierung. Methanol-Fixierung, Hoechst-Färbung; MW±SD, n=6, *p<0,05 vs Kontrolle (0 h).

Nach Behandlung von VM197-Zellen mit Wnt-3a war eine nicht signifikant veränderte Apoptoserate zu selben Differenzierungszeitpunkten zu verzeichnen. Nach 6-, 12- und 48-stündiger Differenzierung und gleichzeitiger Behandlung mit Wnt-3a war die Anzahl apoptotischer Zellen etwas geringer als in unbehandelten Zellkulturen. Bei 24 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn, war die Apoptoserate nach Wnt-3a-Behandlung dagegen leicht erhöht gegenüber unbehandelten Zellen.

3.6. Untersuchungen des intrinsischen Apoptosesignalweges in differenzierten VM197-Zellen

Mauer et al. (2006) zeigten, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren mit einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges einhergeht. Aufgrund dieser Tatsache wurden Untersuchungen bezüglich des Apoptosestatus proliferierender und differenzierter VM197-Zellen durchgeführt. Neben den, unter Punkt 3.3.2. benannten, Apoptose-relevanten Proteinen, wurden zusätzlich die Proteinexpressionsmuster von Smac (second mitochondrial activator of caspases), Apaf-1 und Caspase-9 untersucht. Smac ist ein mitochondriales Protein, das während der Apoptose die Cytochrom c-abhängige Aktivierung von Caspasen unterstützt und zudem ins Zytoplasma ausgeschleust wird und dort mit anti-apoptischen Proteinen der IAP-Familie interagiert. Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) ist ein zytoplasmatisches Protein, welches im Rahmen des intrinsischen Apoptoseprozesses Cytochrom c, dATP und Pro-Caspase-9 bindet. Innerhalb dieses sogenannten Apoptosomkomplexes wird Pro-Caspase-9 von Apaf-1 geschnitten und aktiviert.

3.6.1. Expressionsstatus von Proteinen des intrinsischen Apoptosesignalweges

Der Anteil der pro-apoptotischen Proteinen Smac, Pro-Caspase 9 und Pro-Caspase-3 war 96 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht (Abb. 3.61.). Das pro-apoptotische Protein Apaf-1 war 96 h nach Differenzierungsbeginn im Vergleich zur Kontrolle nicht detektierbar. Die Expression des anti-apoptotischen Proteins XIAP war in differenzierten gegenüber proliferierenden Zellen erniedrigt. Zusätzlich zeigte der Nachweis des pro-apoptotischen Proteins Apaf-1 dessen deutlichen Expressionsrückgang 96 h nach Differenzierungsbeginn im Vergleich zur Kontrolle, wobei die Nachweisgrenze im Western Blot erreicht wurde.

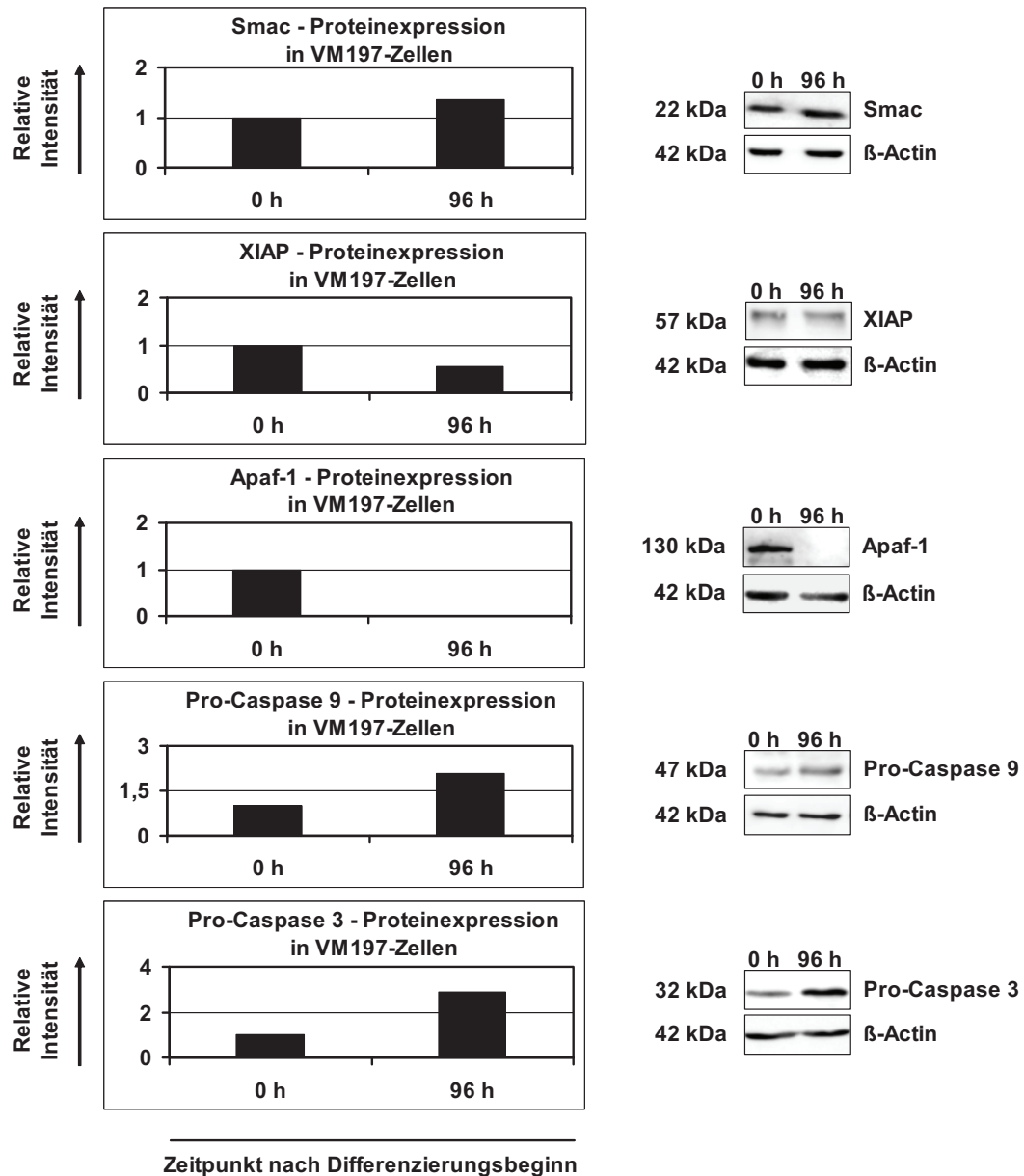


Abb. 3.61.: Relativer Expressionsstatus von Proteinen der intrinsischen Apoptosignal-kaskade in proliferierenden und differenzierten VM197-Zellen. Die Proteine Smac, Pro-Caspase-9 und Pro-Caspase-3 waren in differenzierten VM197-Zellen (96 h) stärker exprimiert als in der Kontrolle (0 h). In differenzierten Zellen waren eine geringere XIAP-Konzentration und kein Apaf-1 gegenüber dem Proliferationsstatus nachweisbar. N=2.

3.6.2. Mikroskopischer Nachweis von Apaf-1 in VM197-Zellen

Der Nachweis des pro-apoptotischen Proteins Apaf-1 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers durchgeführt und zeigte in proliferierenden Zellen ein diffus im Zytoplasma verteiltes Rotfluoreszenzsignal. Hinsichtlich dieses Verteilungsmusters von Apaf-1 in VM197-Zellen waren bis 72 h nach Differenzierungsbeginn keine signifikanten Veränderungen nachweisbar (Abbildungen nicht gezeigt). Nach viertägiger Differenzierung war Apaf-1 hingegen nur noch schwach detektierbar (Abb. 3.62.).

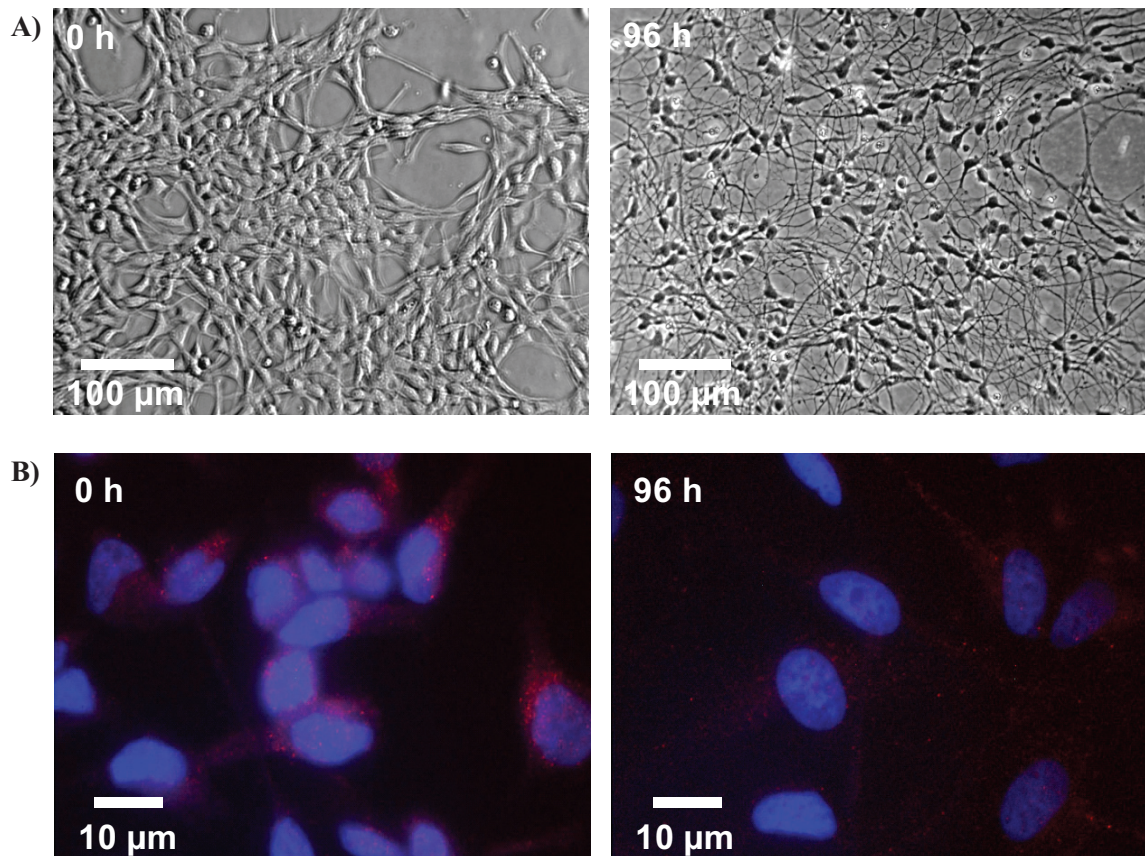


Abb. 3.62.: Mikroskopischer Vergleich des Expressionsmusters von Apaf-1 in proliferierenden und differenzierten VM197-Zellen. A) VM197-Zellen zeigten deutliche Veränderungen bezüglich der Zellmorphologie im Vergleich von proliferierenden (0 h) gegenüber differenzierten (96 h) Zellen (Phasenkontrast). **B)** In differenzierten Zellen (96 h) war nur noch eine sehr schwache Apaf-1-Rotfluoreszenz gegenüber der Kontrolle (0 h) nachweisbar. PFA-Fixierung; Alexa Fluor 594; Zellkerne, Blaufluoreszenz, Hoechst.

3.7. Untersuchungen der Apoptosesuszeptibilität in differenzierten VM197-Zellen

Nachdem proteinbiochemische Analysen von differenzierten VM197-Zellen Rückschlüsse auf eine verminderte Ausbildung des Apoptosoms hindeuteten und einen Expressionsanstieg von anti-apoptotischen Proteinen gegenüber proliferierenden Zellen zeigten, sollten die nachfolgenden Experimente mittels gezieltem Einsatz des Apoptoseinduktors Staurosporin tiefgreifende Erkenntnisse bezüglich der Apoptoseempfindlichkeit von proliferierenden und differenzierten Zellen erlauben.

Drei Stunden nach Zugabe von 1 μM Staurosporin zu proliferierenden und differenzierten VM197-Zellen wurde deren Apoptosestatus hinsichtlich der Expression von Pro-Caspase-3 und PARP untersucht (Abb. 3.63.).

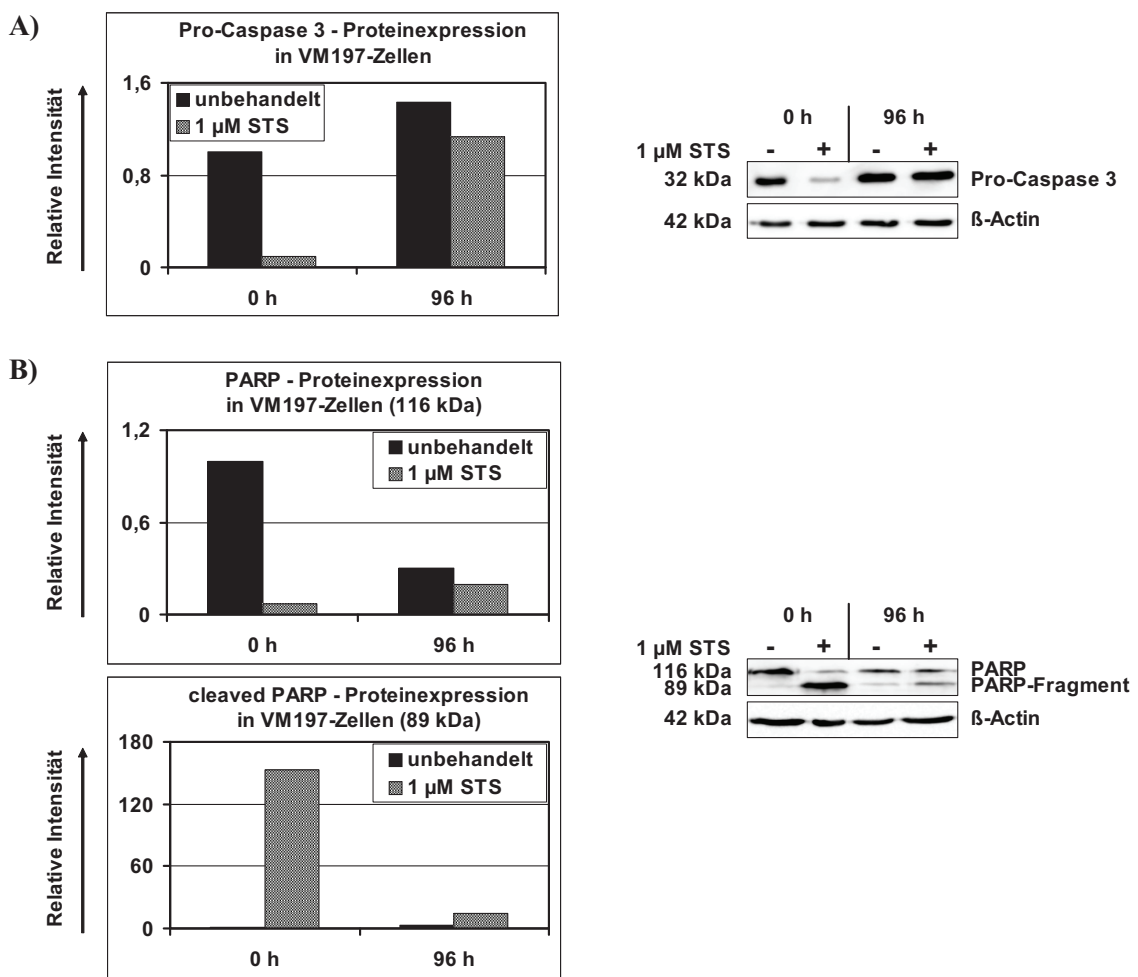


Abb. 3.63.: Relative Expressionen von Pro-Caspase-3 und PARP in Staurosporin-behandelten proliferierenden und differenzierten VM197-Zellen. A) Pro-Caspase-3 wurde in differenzierten VM197-Zellen (96 h) stärker exprimiert als in proliferierenden VM197-Zellen (0 h), wobei die Behandlung der Zellen mit 1 μM Staurosporin eine stärkere Abnahme an Pro-Caspase-3 in den Proliferationskulturen bewirkte. B) PARP war stärker in proliferierenden als in differenzierten VM197-Zellen exprimiert, wobei nach Behandlung der Zellen mit 1 μM Staurosporin der Anteil an PARP-Fragment vermehrt während des Proliferationszustandes anstieg. N=2.

Dabei zeigte sich, dass Pro-Caspase-3 in differenzierten Zellen, unabhängig von der Behandlung mit Staurosporin, in etwas höherer Konzentration gegenüber proliferierenden Zellen vorlag. Auffällig war zudem, dass die Expression von Pro-Caspase-3 in proliferierenden Zellen nach Staurosporin-Behandlung 1,5 % geringer konzentriert war als in unbehandelten Kulturen und damit um etwa 1,8 % unter der Konzentration in differenzierten, Staurosporin-behandelten Zellkulturen lag.

Das Protein PARP (116 kDa) war in unbehandelten proliferierenden Zellen dreifach höher exprimiert als in unbehandelten, differenzierten Zellkulturen. Nach Staurosporin-Behandlung verringerte sich der Anteil an PARP in proliferierenden Zellen um 33 %, wohingegen der PARP-Anteil in differenzierten Zellen sich nur um 4 % reduzierte.

Zudem war in unbehandelten proliferierenden, wie auch in differenzierten Zellen ein geringer Anteil des 89 kDa großen PARP-Fragments nachweisbar, wobei dessen Konzentration in differenzierten Zellen etwa dreimal höher im Vergleich zum Proliferationsstatus war. Die Behandlung mit Staurosporin ließ den Gehalt an gespaltenem PARP in proliferierenden Zellen allerdings um 81 % und in differenzierten Zellen um nur 6 % gegenüber der Kontrolle (0 h) ansteigen.

4. Diskussion

4.1. Morphologische und physiologische Veränderungen von VM197-Zellen während der Differenzierung

Die Differenzierung neuraler VM197-Progenitorzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten lässt sich durch den Entzug der Mitogene bFGF und EGF induzieren. Dieser Wirkmechanismus ist einerseits in morphologischer Hinsicht und im zeitlichen Ablauf bereits gut beschrieben, andererseits sind die zellulären Prozesse, die auf biochemischer Ebene zur Ausprägung der phänotypischen Zellveränderungen und letztendlich zur neuronalen Plastizität beitragen, im Detail bisher noch weitgehend unverstanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit charakterisieren das *In-vitro*-VM197-Zellmodell hinsichtlich morphologischer und physiologischer Merkmale während der Proliferation und der Differenzierung. Dabei wurden Aspekte bezüglich der Veränderungen der Zellstrukturgebung, der Proliferationsaktivität, des Apoptoseverhaltens und der Differenzierungskapazität detailliert beschrieben und im Kontext des jeweiligen Entwicklungsniveaus kritisch beurteilt.

4.1.1. Mikroskopisch sichtbare Veränderungen des Zellhabitus und der Zytoskelettstrukturen von VM197-Zellen während der Differenzierung

Bereits im mikroskopischen Bild zeichneten sich deutliche Veränderungen der Morphologie von VM197-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstatus ab. Proliferierende VM197-Zellen waren überwiegend durch einen polygonalen Zellhabitus mit breiten, flachen Zellkörpern und kurzen Zellfortsätzen gekennzeichnet, wohingegen differenzierende VM197-Zellen zunehmend kleiner waren, längere Zellausläufer bildeten, sich zu Clustern formierten und einen höheren Vernetzungsgrad zeigten. Donato et al. (2007) und Corteling & Miljan (2008) beschrieben undifferenzierte VM-Zellen ebenfalls klein und polygonal, die in einer leicht kopfsteinpflasterartigen Struktur bis zur Konfluenz proliferieren. Dabei wurde gezeigt, dass VM-Zellen in Form von Zellinseln expandieren und den neuralen Stammzellmarker Nestin exprimieren. Zudem wurde beobachtet, dass wenige VM-Zellen der Proliferationskultur spontan differenzierten, was die mikroskopischen Bilder der vorliegenden Arbeit (Punkt 3.1.1.1.) anhand des Auftretens einiger GFAP-positiver VM197-Zellen während der Proliferation bestätigen. Donato et al. (2007) beschrieben nach zwei- bis dreitägiger Differenzierung der VM-Zellen klar definierte, runde Zellkörper mit weitläufigen Neuritenauswüchsen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn ein zunehmender Zellverlust durch Apoptoseprozesse sichtbar wurde, wobei parallel ab 24 h nach Differenzierungsbeginn die Ausprägung von Differenzierungsmarkern anhand des Anstiegs GFAP-positiver (Astrozyten) und des Auftretens erster β III-Tubulin-positive VM197-Zellen (Neurone) beobachtet wurde. Letzteres konstatierten auch Donato et al. (2007) innerhalb der viertägigen Differenzierung von VM-Zellen. Arbeiten von Corteling & Miljan (2008) sowie von Hoffrogge et al. (2006) belegen, dass 0,9 % expressionell veränderter Proteine während der Differenzierung von VM-Zellen mit der Regulation von Zelltod/Apoptose assoziiert waren bzw. dass das neuroprotektive Protein Ubiquilin-1 in seiner Expression herunterreguliert vorlag. Mesner et al. (1992) beschrieben das Auftreten von Neuritenzerstörung und -degradierung in PC12-Zellen 48 h bis 72 h nach dem Entzug von NGF und Serum. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Ausdifferenzierung der VM197-Progenitorzellen zu Astrozyten und Neuronen mit einer Reorganisation der Zytoskelettcomponenten Actin und α -Tubulin einherging, die in Form von Mikrofilamenten bzw. Mikrotubuli für die mechanische

Zellstabilisierung, intrazelluläre Transportprozesse und aktive Bewegung der Zelle als Ganzes verantwortlich sind und in Form eines dynamischen Systems die Anpassung an extrazelluläre bzw. intrazelluläre Gegebenheiten ermöglichen. In proliferierenden VM197-Zellen bildeten Mikrofilamente und Mikrotubuli ein kompaktes Maschenwerk, das vorwiegend im Bereich nahe der Plasmamembran lokalisiert war und der Erhaltung der Zellform und der Vermittlung von Zellkontakten diente. Alpha-Tubulin schien zudem verstärkt an der Neuritogenese beteiligt zu sein. Ab 6 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn bildeten beide benannten Zytoskelettkomponenten ein weitmaschigeres Netzwerk und durchzogen das gesamte Zytoplasma und die Zellausläufer, wobei deren funktionale Beteiligung an Mitoseprozessen und der Ausbildung von Wachstumskegeln besonders deutlich wurde. Diese Prozesse stellen die Grundlagen für Zellproliferation und Axonaussprossung in Richtung Zielgebiet dar. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen von Corteling & Miljan (2008), die analysierten, dass 10,7 % expressionell veränderter Proteine in differenzierten VM-Zellen mit der Zytoskelettstrukturgebung assoziiert waren. Nach viertägiger Differenzierung der VM-Zellen war beispielsweise das Protein Transgelin-2, welches zur Calponin-Familie gehört und direkt mit Actin interagieren kann, in seiner Expression dreifach hochreguliert. Neurogenese, Zellmigration und terminale Differenzierung werden somit in engem Zusammenhang mit der Umstrukturierung des Zytoskeletts gesehen (reviewed in Heng et al., 2010).

Wie wichtig die Regulation von Apoptoseprozessen während der Differenzierung von VM197-Zellen ist, verdeutlichten Versuche der vorliegenden Arbeit mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung. Die Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit dem jeweiligen pro-apoptotischen Stressor zog drastische Veränderungen hinsichtlich der Ausbildung differenzierungsspezifischer Zellmorphologien nach sich. Dabei traten vor allem Schäden der Zellausläufer und der Zellkernstrukturen in differenzierenden VM197-Zellen auf. Die Behandlung von differenzierenden VM197-Zellen mit Staurosporin führte zudem zur Zerstörung der Actinstrukturen, wohingegen sich die Mikrotubuli zu kompakten Bündeln innerhalb radialsymmetrischer Neuriten formierten. Shenoy et al. (1999) wiesen in Rattenneuronen 48 h nach Bestrahlung mit 6 J/cm² bzw. 12 J/cm² einen Anstieg TUNEL-positiver Zellen und demnach einen Anstieg der Apoptoserate nach. Die Arbeit von Mobley et al. (1994) belegt, dass eine 20-minütige Behandlung von Astrozyten der Ratte mit 100 nM Staurosporin zur Ausbildung von Actin-Stressfasern führte und sich die zuvor filamentösen Actinstrukturen zu diffuseren Strukturmustern umformierten. Rasouly et al. (1994) zeigten anhand von PC12-Zellen, dass Staurosporin als potenzielles neurotropes Medikament definiert werden kann, weil es in der Anwendung das Neuritenwachstum begünstigte und Tubulin hinsichtlich seiner Konzentration, der zellulären Verteilung und der Anordnung nicht beeinflusst wurde.

4.1.2. Zunahme von neuronalen VM197-Zellen im Differenzierungsverlauf

Das Neuronen-spezifische RNA-Bindeprotein HuC/D stellt gegenüber β III-Tubulin einen sehr frühen Marker der neuronalen Differenzierung dar, wobei er verstärkt in Neuronen exprimiert wird, die den Mitosezyklus verlassen (Marusich et al., 1994).

In Proliferationskulturen der VM197-Zelllinie wurden keine HuC/D-positiven Zellen detektiert, womit eine spontane neuronale Differenzierung ausgeschlossen und der Entzug von Wachstumsfaktoren als alleiniger Differenzierungsstimulus gewertet wurde. Erste, schwach HuC/D-positiv VM197-Zellen wurden 12 h (1,6 %) und 24 h (2,7 %) nach Differenzierungsbeginn mittels Durchflusszytometrie detektiert. Ein deutlich erkennbarer und von der Gesamtpopula-

tion abgrenzbarer Neuronenpeak zeigte sich ab 48 h nach Differenzierungsbeginn mit durchschnittlich 4,2 % HuC/D-positiven VM197-Zellen. Der maximale Anteil an VM197-Zellen des neuronalen Typs wurde mit 7,8 % 72 h nach Differenzierungsbeginn gemessen. Der verbleibende und weitaus größere Anteil HuC/D-negativer Zellen wurde deshalb der Gliazellpopulation bzw. noch undifferenzierten VM197-Zellen zugeordnet.

4.1.3. Veränderung der Zellzyklusverteilung von VM197-Zellen während der Differenzierung

Wachstumsfaktoren und Zytokine sind entscheidend an der Regulation des Zellzyklusverlaufs beteiligt und vermitteln hierüber die Proliferation von Zellen, wohingegen deren Entzug die Differenzierung neuraler Stamm- und Progenitorzellen induziert (Gage, 2000). Die koordinierte Regulation des Zellzyklusstopps und der Differenzierung neuronaler Progenitorzellen ist essentiell für die Generierung einer entsprechenden Neuronenanzahl und für die exakte Verschaltung der neuronalen Netzwerke (Politis et al., 2007).

Analysen des DNA-Gehaltes differenzierender VM197-Zellen gaben deutliche Hinweise darauf, dass der Ausprägung neuraler Zelltypen, Veränderungen im Zellzyklusverhalten vorausgingen. Während der Proliferation und ab 0,5 h bis 4 h nach Differenzierungsbeginn befanden sich etwa 57 % der analysierten VM197-Zellen in der G0/G1-Phase, etwa 20 % in der S-Phase und etwa 23 % in der G2/M-Phase.

Nach sechsständiger Differenzierung verringerte sich der VM197-Zellanteil der S-Phase um etwa 16 % signifikant gegenüber der Kontrolle, wobei dieser Anteil im weiteren Differenzierungsverlauf zunehmend rückläufig war. Parallel dazu war 6 h nach Differenzierungsbeginn die Anzahl der VM197-Zellen in der G2/M-Phase um 15 % erhöht. Ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn arretierten um durchschnittlich 20 % signifikant zunehmend mehr VM197-Zellen in der G0/G1-Phase. Der Zellanteil in der G2/M-Phase nahm 24 h nach Differenzierungsbeginn um 10 % signifikant ab gegenüber proliferierenden VM197-Zellen.

Howard et al. (1993) beschrieben, dass ein, durch den Entzug von Überlebensfaktoren induzierter, Zellzyklusarrest proliferierender Zellen neuronalen Ursprungs entweder in apoptotischem Zellverlust oder in der Differenzierung zu reifen, postmitotischen, neuronalen Zellen resultiert. Liu & Greene (2001a) und Nagy (2000) konstatierten ebenfalls, dass diejenigen Zellen, die am G1/S-Kontrollpunkt (G1-Arrest) bzw. am G2/M-Kontrollpunkt (G2-Arrest), verharren, in die G0-Phase zurückkehren und differenzieren bzw. durch Apoptose eliminiert werden. Demnach lässt sich vermutlich der erhöhte Anteil von VM197-Zellen in der G2/M-Phase, 6 h nach Differenzierungsbeginn, mit einem G2-Arrest erklären, der parallel mit einer signifikanten Zunahme der Apoptoserate (Punkt 4.2.2.1.) einherging. Zudem wird ein Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von β -Catenin, dem dadurch induzierten Wiedereintritt von postmitotischen Stamm- und Progenitorzellen in den Zellzyklus und der neuronalen Apoptose während der Neurogenese und der neuronalen Degeneration postuliert (Castelo-Branco et al., 2003; Liu & Greene, 2001a; Husseman et al., 2000; Copani et al., 2001), womit ein erster Ansatzpunkt hinsichtlich der Beantwortung einer Fragestellung der vorliegenden Arbeit bezüglich der Interkonnektivität von kanonischem Wnt-Signalweg und Apoptose während der Differenzierung neuraler Progenitorzellen gegeben ist.

Die signifikante Zunahme an VM197-Zellen in der G0/G1-Phase ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn korreliert mit der, unter den Punkten 4.1.1. und 4.1.2. beschriebenen, verstärkten Ausprägung von Neuronen und Astrozyten. Collins et al. (2005) zeigten, dass der Ent-

zug von EGF in humanen MCF-10A-Brustepithelzellen einen G1-Arrest induziert, was nachfolgend zur Anoikisresistenz, d. h. zum Schutz vor Apoptose bei Verlust der Zelladhärenz führt. Andreeff et al. (2000) beschrieben, dass EGF für den Transit von Zellen über den Kompetenzpunkt in der G0-Phase und den Restriktionspunkt in der G1-Phase benötigt wird. Der Entzug von EGF in der VM197-Zellkultur wird demnach das Passieren dieser Kontrollpunkte verhindern haben, womit sich der stetige Rückgang des VM197-Zellanteils in der S-Phase während der Differenzierung erklären lässt. Zellen, die den Restriktionspunkt während der G1-Phase bereits passiert haben, benötigen hingegen keine Wachstumsfaktoren und durchlaufen S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus.

Die Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit Staurosporin induzierte einen signifikanten Abfall von VM197-Zellen der G0/G1-Phase um 21 % und eine tendenzielle Zunahme an Zellen in der S-Phase bzw. G2/M-Phase im Vergleich zur Kontrolle, wobei ähnliche Effekte in UV-B-bestrahlten VM197-Zellen während der Differenzierung auftraten. Wang et al. (2004) zeigten ebenfalls, dass die Behandlung von primären, humanen BCBL-1-Effusionslymphomzellen mit Staurosporin einen G2/M-Arrest induzierte. Andreeff et al. (review, 2000) führten den resultierenden G2/M-Arrest von Staurosporin-behandelten bzw. UV-B-bestrahlten Zellen auf eine verlangsamte DNA-Replikation zurück, weil Reparaturmechanismen induzierter DNA-Schäden an dieser Stelle greifen. Zellen, die den DNA-Schaden während der G2-Phase erleiden, arretieren demnach in dieser Zellzyklusphase.

In den Histogrammen der Zellzyklusmessungen der VM197-Zellkulturen ließen weitere flache Peaks nach dem spezifischen G2/M-Peak das Auftreten tetraploider VM197-Zellen vermuten. Dieser Verdacht konnte jedoch nach der Auswertung von Metaphasenplattenpräparaten ausgeschlossen werden, weil stichprobenhaft ausschließlich diploide Chromosomensätze nachgewiesen wurden und zudem Donato et al. (2007) VM-Zellen mit einem normalen diploiden (46, XY) Karyotyp beschrieben. Das beobachtete Erscheinungsbild wurde demnach auf unselektierte Dubletten zurückgeführt.

4.1.4. Abnahme der Mitoseaktivität von VM197-Zellen während der Differenzierung

Der Austritt von neuronalen Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus in die G0-Ruhephase stellt ein kritisches Ereignis für die Etablierung neuronaler Phänotypen und -muster dar, weil das Zellschicksal scheinbar während dieses Prozesses determiniert wird (Mc Connell & Kazunowski, 1991).

Aufgrund dieser Aussage und den, unter Punkt 4.1.3. beschriebenen, Zellzyklusveränderungen von differenzierenden VM197-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug, erscheint die tendenzielle Abnahme mitotisch aktiver VM197-Zellen während der Differenzierung plausibel. Dabei zeichnete sich eine biphasische Verlaufskurve der Mitoseaktivität ab. In den Proliferationskulturen sowie 6 h nach Differenzierungsbeginn waren 2,7 % der VM197-Zellen mitotisch aktiv. Die erste Phase des Abfalls der Mitoserate auf minimal 0,8 % zeichnete sich ab 0,5 h bis 4 h nach Differenzierungsbeginn ab. Diese Auffälligkeit lässt sich entweder mit einem ersten Differenzierungsgeschehen oder vielleicht eher mit einer zellulären Stressantwort aufgrund des Mediumwechsels begründen. Die zweite Phase der Mitoseaktivitätsabnahme wurde ab 8 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn augenscheinlich, wobei durchschnittlich 1 % weniger mitotisch aktive VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle gefunden wurden. Da in diesem Differenzierungszeitraum die zunehmende Ausprägung neuronaler VM197-Zellen nachgewiesen wurde

(Punkte 4.1.1. und 4.1.2.), ist die parallel rückläufige Mitoserate vermutlich ein Resultat dieser Prozesse. Die benannten, aber nicht signifikanten Auffälligkeiten in den differenzierenden VM197-Zellkulturen wirkten sich nicht auf die Zellanzahl aus, demnach wurde vermutlich der überwiegende VM197-Zellanteil den Differenzierungsprozessen und weniger der Apoptose zugeführt.

In differenzierenden VM197-Zellen, die mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung behandelt wurden, schienen dahingegen die Einbußen der Mitoseaktivität um jeweils etwa 2,6 % eher der induzierten Aktivierung von Apoptoseprozessen (Punkt 4.2.2.1.) geschuldet gewesen zu sein. Zudem hemmt Staurosporin die Aktivität von Proteinkinasen, die unter anderem für die Regulation der Mitose essentiell sind.

4.2. Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf zellulärer Ebene

Die Neurogenese ist eng mit dem apoptotischen Verlust von neuronalen Progenitorzellen, Neuronen und Gliazellen verbunden (reviewed in Nijhawan et al., 2000). Etwa die Hälfte der neuronalen Ausgangszellpopulation unterliegt der Apoptose aufgrund von Optimierungsprozessen synaptischer Verbindungen, des Abbaus nicht benötigter Neurone und der Formierung des neuronalen Netzwerkes (Oppenheim 1981; Burek & Oppenheim 1999). Neurone werden generell überproduziert und konkurrieren um die Innervierung über neurotrophe Faktoren ihrer Zielzellen (Cowan et al., 1984). Im Detail ist die physiologische Funktion der frühen neuronalen Apoptose allerdings noch kaum verstanden.

Unter Anwendung verschiedener Quantifizierungsmethoden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Zunahme des apoptotischen VM197-Zellverlusts mit fortschreitender Differenzierung verzeichnet, deren Ergebnisse nachfolgend im Kontext neuraler Determinierungs- und Differenzierungsprozesse diskutiert werden.

4.2.1. Zunahme spätapoptotischer VM197-Zellen im mikroskopischen Bild während der Differenzierung

Proliferierende VM197-Zellen waren durch eine hohe Vitalität gekennzeichnet, wobei nur durchschnittlich 0,1 % spätapoptotische Zellen gezählt wurden. Dagegen erhöhte sich die Apoptoserate im Verlauf der frühen Differenzierung zunehmend und erreichte ihr signifikantes Maximum 4 h nach Differenzierungsbeginn mit einem Anteil von 0,6 % spätapoptotischen VM197-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn zeigte sich eine stetige Abnahme spätapoptotischer VM197-Zellen bis auf das Kontrollniveau. Dieser Effekt beruhte vermutlich auf der Detektionsmethode, weil im mikroskopischen Bild nur adhärenz Zellen hinsichtlich apoptotischer Prozesse analysiert werden können und dabei frühapoptotische bzw. abgelöste Zellen im Kulturüberstand nicht miterfasst werden. Eom et al. (2007) begründeten den Anstieg der Apoptose-spezifischen Chromatinkondensation in murinen neuronalen Progenitorzellen 6 h nach Wachstumsfaktorentzug, mit der Aktivierung von GSK-3 β und der pro-apoptotischen Proteine Bax und Caspase-3.

Die Behandlung differenzierender VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung induzierte einen Anstieg der Apoptoserate um 1,7 % signifikant bzw. 0,2 % gegenüber der Kontrolle. Beide Apoptoseinduktoren bewirken die Zellschrumpfung, das Ausstülpen der Plasma-

membran, die Kondensation des Chromatins und die Kernpyknose (Prehn et al., 1997; Long et al., 2004).

4.2.2. Erhöhte, durchflusszytometrisch bestimmte, Apoptoserate in VM197-Zellkulturen während der Differenzierung

Die Anwendung verschiedener durchflusszytometrischer Methoden gewährleistete die Beurteilung des Apoptoseverhaltens differenzierender VM197-Zellen in hohem Durchsatz und ermöglichte die Determinierung früh- und spätapoptotischer Zellen. Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse stützen die, bereits unter Punkt 4.2.1. getroffenen, Aussagen hinsichtlich der Zunahme der Apoptoserate in VM197-Zellkulturen während der Differenzierung.

4.2.2.1. Annexin V-FITC/PI-Assay

Unter Anwendung des Annexin V-FITC/PI-Assays wurden sowohl adhärenente, als auch abgelöste proliferierende und differenzierende VM197-Zellen hinsichtlich ihres Apoptosestatus analysiert. Im Differenzierungsverlauf zeigten sich auch hier die Größenreduktion adhärenter VM197-Zellen und gleichzeitig zwei Phasen erhöhter Apoptoseaktivität. Die erste Apoptosephase wurde maßgeblich ab 2 h bis 6 h nach Differenzierungsbeginn anhand der Zunahme Annexin V-FITC-positiver VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle sichtbar. Dabei waren zuerst adhärenente VM197-Zellen betroffen, die sich zunehmend ablösten und dann im Überstand akkumulierten. Kurz darauf zeigte dieser VM197-Zellanteil die, für spätapoptotische Zellen charakteristische, Aufnahme von PI. Spätapoptotische VM197-Zellen lösten sich zunehmend aus dem Zellverband, akkumulierten im Kulturüberstand und unterlagen dort Degradationsprozessen, sodass diese in der weiteren Analyse, aufgrund des vorgelegten Messschwellenwertes, nicht mehr ins Gewicht fielen. Die Abnahme frühapoptotischer, adhärenter VM197-Zellen ab 3 h bis 4 h nach Differenzierungsbeginn sowie der signifikante Anstieg PI-positiver VM197-Zellen 6 h nach Differenzierungsbeginn signalisierte das Ende der ersten schwächeren Apoptosephase. Parallel zu diesem Zellverlust stieg trotzdem der Anteil vitaler VM197-Zellen bis 8 h nach Differenzierungsbeginn im Vergleich zur Kontrolle weiter an, was vermutlich in einer kompensatorisch leicht erhöhten Mitoserate begründet war. Der zweite und massivere apoptotische Verlust von VM197-Zellen zeigte sich ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle. Währenddessen wurden Annexin V-FITC-positiv VM197-Zellen in etwa gleichem Anteil in adhärenter Form, als auch im Kulturüberstand nachgewiesen. Dadurch lässt sich der nachfolgende relativ hohe Anteil an spätapoptotischen VM197-Zellen erklären. Der 8 h nach Differenzierungsbeginn signifikante erhöhte Anteil PI-positiver VM197-Zellen ist ein Ausdruck der zweiten Apoptosephase. Sie belegt die Relevanz der maximalen Änderungen Apoptose-relevanter Protein- und Genexpressionen für die Determinierung ausdifferenzierter VM197-Zellen 6 h nach Differenzierungsbeginn (Punkte 4.3. und 4.4.).

In der Annexin V-FITC/PI-Analyse erwiesen sich Staurosporin und UV-B-Strahlung anhand des drastisch signifikant erhöhten Auftretens früh- und spätapoptischer VM197-Zellen gegenüber der Kontrolle eindeutig als Apoptoseinduktoren.

4.2.2.2. Sub-G1-Peak-Messung

Die Induktion apoptotischer Prozesse in VM197-Zellen durch Wachstumsfaktorentzug zeigte sich auch in der Anwendung der Sub-G1-Peak-Messung, wenngleich sich hier die apoptotischen Effekte als nicht signifikant herausstellten. Auch hier zeigte sich eine mehrphasische Apoptoseverlaufskurve während der Differenzierung von VM197-Zellen. Der sehr frühe Anstieg apoptotischer VM197-Zellen bei 0,5 h nach Wachstumsfaktorentzug um 0,7 % gegenüber der Kontrolle, wurde als zelluläre Stressantwort aufgrund des Mediumwechsels interpretiert. Weiterhin zeigten sich in der Sub-G1-Peak-Analyse Zunahmen der Apoptoserate in VM197-Zellen bei 3 h und ab 24 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn gegenüber der Kontrolle. Staurosporin und UV-B-Strahlung erwiesen sich auch in der Sub-G1-Peak-Analyse als eindeutige Induktoren DNA-Schaden-vermittelter Apoptoseprozesse in VM197-Zellen.

4.3. Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf Proteinexpressionsebene

Im Hinblick auf die Beurteilung des Apoptoseverhaltens differenzierender VM197-Zellen wurden sowohl pro- als auch anti-apoptische Proteine des extrinsischen und des intrinsischen Apoptosesignalweges bezüglich ihrer Expressionsmuster untersucht und stehen nachfolgend in der Diskussion.

4.3.1. Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter pro-apoptotischer Proteine in VM197-Zellen während der Differenzierung

Die Einleitung der Differenzierung von VM197-Zellen mittels Wachstumsfaktorentzug ging, wie auch die Behandlung von differenzierenden VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung, mit einer Aktivierung der intrinsischen Apoptosesignalkaskade einher. Dabei wurde eine signifikante Zunahme aktiver Caspase-3 in VM197-Zellen ab 3 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn anhand des Auftretens von Caspase-3- und PARP-Spaltprodukten gegenüber der Kontrolle detektiert. Wright et al. (2004) beschrieben eine Prozessierung von Caspase-3 als Indikator für die Aktivität von Caspase-9, die an der Bildung des Apoptosomkomplexes beteiligt ist (Zou et al., 1999). Als möglichen Auslöser für diese Signalkaskade in differenzierenden VM197-Zellen könnte der Entzug von bFGF verantwortlich sein, da Miho et al. (1999) eine Aktivierung von Caspase-3 nach Entzug von bFGF in murinen, embryonalen P19-Karzinomzellen während der neuralen Entwicklung beschrieben. Fernando et al. (2005) zeigten zudem im Mausmodell, dass Caspase-3 die Genese neuraler Progenitorzellen fördert und für den Zytoskeletumbau während der Differenzierung mitverantwortlich ist, indem aktive Caspase-3 die Aktivierung differenzierungsbezogener Proteinkinasen induziert. Eom et al. (2007) zeigten in embryonalen Mausneuronen 3 h bis 8 h nach Wachstumsfaktorentzug ein zunehmendes Auftreten von gespaltenem PARP und assoziierten diesen Effekt mit der Aktivierung von Caspase-3. Zudem trat ab 12 h nach Differenzierungsbeginn der VM197-Zellen gespaltenes Bax in einer zwei- bis dreifach signifikant erhöhten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle auf, was auf die Anwesenheit von tBid während der Differenzierung zurückgeführt wurde und demnach eine parallele Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges in differenzierenden VM197-Zellen belegt. Darios et al. (2003) konstatierten einen

Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktorentzug, intrazellulärem Ceramidanstieg, Caspase-8-Aktivierung, nachfolgendem Bid-Cleavage und einem erhöhten neuronalen Zelltod. Dabei bewirkt tBid die Oligomerisierung von Bax und dessen Translokation zu den Mitochondrien, wo es nachfolgend aufgrund der mitochondrialen Dysfunktion zu einer Ausschüttung von Cytochrom c kommt (Zong et al., 2001; Henshall et al., 2001; Plesnila et al., 2001; Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000). Die Funktionalität dieser Apoptosesignalkaskade wurde in neuronalen Progenitorzellen nach Wachstumsfaktorentzug von einigen wissenschaftlichen Studien belegt, wobei die Phosphorylierung und Aktivierung von Bax über aktiviertes GSK-3 β konstatiert wurde (Eom et al., 2007; Linseman et al., 2004; Li et al., 2000; Putcha et al., 2002; Somerville et al., 2001). Zudem wurde eine Spaltung von Bax durch Calpain nachgewiesen (Gao & Dou, 2000). Bax wird als limitierende Größe des neuronalen Stammzellpools im adulten Gehirn der Maus angesehen (Lindsten et al., 2003). Die mitochondrialen, pro-apoptischen Proteine Smac und Pro-Caspase-9 zeigten sich in VM197-Zellen 96 h nach Differenzierungsbeginn erhöht gegenüber der Kontrolle, was auf eine zunehmende Apoptosomkomplexbildung schließen lässt. Allerdings war zu diesem Differenzierungszeitpunkt die dafür notwendige Komplexkomponente Apaf-1 im Western Blot kaum bzw. nicht nachweisbar, was sich zusätzlich in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte. Wright et al. (2004) beschrieben, dass Smac Mitglieder der IAP-Familie inhibieren kann und in neuronalen PC12-Zellen die Aktivierung von Caspase-3 über die Ausschüttung von Cytochrom c bewirkt. In differenzierten Neuronen wiesen sie zudem weniger aktive Caspase-9 nach, wodurch eine verringerte Apoptosomaktivität induziert wurde. Ebenfalls beschrieben sie Parallelen zwischen der neuronalen Differenzierung und der markanten Abnahme der Apaf-1-Expression in PC12-Zellen der Ratte. Apaf-1 wird als limitierender Faktor im Hinblick auf die Formation des Apoptosomkomplexes gesehen (Rehm et al., 2006), womit die, unter Punkt 4.3.3. diskutierte, Verringerung der Apoptosesuszeptibilität differenzierter VM197-Zellen begründet werden kann.

Die vorwiegend in neuronalen Progenitorzellen exprimierte und im Entwicklungsverlauf herunterregulierte Caspase-2, war in VM197-Zellen ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn um 50 % signifikant gegenüber dem Kontrollniveau verringert, was vermutlich auf gleichzeitigem Expressionsanstieg des Antagonisten Bcl-2 beruht (Punkt 4.3.2.; Haviv et al., 1998). Nach 72-stündiger Differenzierung war in VM197-Zellen ein, um die Hälfte signifikant erniedrigter, Gehalt an CAS-Protein gegenüber der Kontrolle nachweisbar, was wahrscheinlich in dessen Funktionalität als Zellzyklusregulator in proliferierenden Zellen begründet liegt (Izaguirre et al., 2006; Brinkmann et al., 1996a). Zudem ist CAS an der Stabilisierung von Zellkontakten und an Proteintransportprozessen beteiligt (Brinkmann et al., 1996a; Kutay et al., 1997; Ullman et al., 1997). Der Abbau von CAS führt zum G2-Zellzyklusarrest und einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptoseprozessen (Brinkmann, 1998).

Vier Stunden nach Differenzierungsbeginn war die Expression des, am Aufbau der Netzwerkstruktur des Endoplasmatischen Retikulums beteiligten und Apoptoseprozesse induzierenden, Proteins Nip-1 in VM197-Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt, was vermutlich mit dem gleichzeitig signifikanten Anstieg seines Antagonisten Bcl-2 zusammenhängt (Punkt 4.3.2.; Zhang et al., 1999).

4.3.2. Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter anti-apoptotischer Proteine in VM197-Zellen während der Differenzierung

Wie bereits Fröhlich et al. (2009) beschrieben, fungiert das anti-apoptotische Protein Bcl-2 als Neuronenprotektor in differenzierten VM197-Zellen, wobei die funktionelle Hemmung von Bcl-2 durch Zugabe von HA 14-1, eine zeitweise verzögerte Differenzierung, eine Reduktion der Neuronenrate und eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität zur Folge hatte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Bcl-2 4 h und 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn zwei- bis sechsfach signifikant gegenüber VM197-Kontrollzellen erhöht exprimiert wurde. Eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten belegt, dass eine Überexprimierung von Bcl-2 in neuronalen Zellen zu erhöhter Apoptoseresistenz, vermindertem β -Catenin-Cleavage, extensivem Neuritenwachstum, erhöhter Expression neuronenspezifischer Enolase und verminderter Aktivität pro-apoptotischer Proteine wie Bax und Bak führt (Martinou et al., 1994; Kranenburg et al., 1996; Brancolini et al., 1997; Zhang et al., 1996; Youle, 2007; Yin et al., 1994; Wang et al., 2006). In diesem Zusammenhang wird bisher noch diskutiert, ob eine gesteigerte Bcl-2-Expression die Konsequenz oder die Ursache der Differenzierung ist. Almeida et al. (2005) und Lonze & Ginty (2002) begründeten die Expressionssteigerung von Bcl-2 in differenzierenden Nervenzellkulturen mit einer induzierten Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges durch Wnt-3a bzw. inaktive GSK-3 β . Andererseits könnte Bcl-2 die Differenzierung neuraler Zellen eher durch seine Zellzyklus-regulierende Funktion als über die Vermittlung anti-apoptotischer Prozesse entscheidend beeinflussen, da belegt wurde, dass Bcl-2 einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase forciert (Zinkel et al., 2006; Mazel et al., 1996; Middleton et al., 1998).

Das Protein Survivin, welches vorwiegend in neurogenen Regionen vorkommt (Altura et al., 2003; Pennartz et al., 2004) und eine duale Funktion als Apoptoseinhibitor und Mitoseregulator einnimmt (Altieri, 2003; Jiang et al., 2005; Dohi et al., 2004; Shankar et al., 2001; Song et al., 2003; Chen et al., 2003), zeigte sich in seiner Expression ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn um mehr als 50 % signifikant gegenüber der Kontrolle verringert, was ebenfalls nach der Behandlung von differenzierenden VM197-Zellen mit UV-B-Strahlung in Erscheinung trat, wobei letztgenannter Effekt auch von Dallaglio et al. (2009) in UV-B-bestrahlten, humanen Keratinozyten zum Tragen kam. Dieses Ergebnis könnte Ausdruck einer gesteigerten Expression von Caveolin-1 in differenzierten VM197-Zellen sein, das über eine herabgesetzte, β -Catenin-vermittelte TCF/LEF-Transkription die Inhibierung von Survivin sowie nachfolgend eine Verminderung der Zellproliferation und der Vitalität neuraler Zellen bewirkt (Torres et al., 2007).

4.3.3. Verringerte Apoptosesuszeptibilität von differenzierten gegenüber proliferierenden VM197-Zellen bezüglich der Apoptoseinduktion durch Staurosporin

Die unter den Punkten 4.3.1. und 4.3.2. beschriebenen, erniedrigten Expressionen der pro-apoptotischen Proteine Apaf-1 und CAS, sowie die erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in differenzierten VM197-Zellen gegenüber proliferierenden Kulturen lassen vermuten, dass ausdifferenzierte VM197-Zellen vor Apoptoseprozessen geschützt sind. Diese Hypothese hielt der Beweisführung mittels Apoptoseinduktion in VM197-Zellen durch Staurosporin stand. In proliferierenden VM197-Zellen induzierte eine dreistündige Behandlung mit 1 μ M Staurosporin einen Abfall der Proteinexpression von Pro-Caspase-3 um 1,5 % gegenüber

unbehandelten Zellen und lag damit etwa 1,8 % unter dem Anteil von Pro-Caspase-3 in differenzierten, Staurosporin-behandelten VM197-Zellen. Unter selben Voraussetzungen verringerte sich der Anteil an PARP in Staurosporin-behandelten, proliferierenden VM197-Zellen um 33 %, wohingegen der PARP-Anteil in differenzierten VM197-Zellen um nur 4 % abnahm. Parallel dazu stieg der Anteil an gespaltenem PARP in proliferierenden, Staurosporin-behandelten VM197-Zellen um 81 % gegenüber der unbehandelten Proliferationskultur an. In differenzierten Zellen bewirkte die Behandlung mit Staurosporin dagegen eine, um nur etwa 6 %, erhöhte Expression von gespaltenem PARP.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass differenzierte VM197-Zellen hinsichtlich der Behandlung mit Staurosporin eine deutlich geringere Apoptosesuszeptibilität im Vergleich zu proliferierenden VM197-Zellen aufweisen.

Diese Aussagen sind konform zu Erkenntnissen von Yoshida et al. (1998), die in Apaf-1-defizienten Mäusen eine reduzierte Apoptoserate im Gehirn nachwiesen, wobei die neuronalen Zellen eine Resistenz gegenüber verschiedener Apoptosestimuli und verminderte Aktivitäten von Caspase-2, -3 und -8 zeigten. Mc Donald et al., (1997) konstatierten ebenfalls eine Abnahme apoptotischer Prozesse in der späteren Entwicklungsphase (10-18 d) kortikaler Neuronen *in vitro* nach 48-stündiger Behandlung mit Staurosporin, wobei eine maximale Zunahme der Apoptoserate 4-10 d nach Kultivierung auftrat. Gleiche Effekte in murinen Cortexkulturen begründeten Lijun et al. (2004) mit einer Abnahme von Pro-Caspase-3 und Bax während der Differenzierung, wobei diese Aussagen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit korrelieren. Die benannte Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass Neuronenkulturen eine höhere Apoptoserate aufwies als Astrozytenkulturen. Dieser Aspekt sollte in VM197-Zellkulturen in fortführenden Arbeiten untersucht werden.

4.4. Charakterisierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden VM197-Zellkulturen auf Genexpressionsebene

Die meisten Expressionsänderungen apoptotischer Regulatorproteine zeigten sich ebenfalls, aber zumeist zeitversetzt, auf Genexpressionsebene in differenzierenden VM197-Zellen wie nachfolgend diskutiert wird.

4.4.1. Zunahme von Expressionsänderungen Apoptose-relevanter Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung

Die Genexpressionsanalyse von VM197-Zellen mittels DNA-Microarrays ergab, dass 6 h nach Differenzierungsbeginn maximal 3226 von 5200 bereits vorselektierten Genen und damit der Großteil, signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrollgruppe exprimiert waren. Zu diesem Differenzierungszeitpunkt zeigten sich zudem die größten Expressionsunterschiede hinsichtlich 34 Apoptosegenen und 23 Zelldifferenzierungsgenen im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 h). Auch Anderson et al. (2007) wiesen in Langzeitkulturen humaner neuraler Progenitorzellen nach, dass ein differenzierungsbedingter Wachstumsarrest der Zellen mit fundamentalen Expressionsänderung von Genen einhergeht, die maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Immunantwort beteiligt sind. Gurok et al. (2004) belegten mit Genexpressionsstudien anhand muriner, neuraler Zellen nach Wachstumsfaktorentzug, dass vor allem Gene bezüglich der Zelladhäsion, der Zell-Matrix-Interaktion, des Zytoskeletts, der

Zellproliferation, der Signaltransduktion, des Metabolismus und der Zelldifferenzierung signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Diese Ergebnisse lassen demnach auf einen komplexen, regulatorischen Zusammenhang der benannten Signalwege schließen.

4.4.2. Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter pro-apoptotischer Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung

Auch auf Genexpressionsebene zeigten sich pro-apoptotische Proteine während der Differenzierung von VM197-Zellen verändert. Die Expression von *bax* nahm während der Differenzierung der VM197-Zellen tendenziell stetig ab und war 6 h und 48 h nach Differenzierungsbeginn um durchschnittlich 50 % gegenüber der Kontrolle (0 h) erniedrigt. Die Genexpression von AIF zeigte sich 2 h nach Differenzierungsbeginn um etwa 11 % signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht, was eine sehr frühe Apoptoseinduktion nach Wachstumsfaktorentzug belegt. Demgegenüber war die Genexpression von Caspase-7 6 h nach Differenzierungsbeginn um 27 % signifikant im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Nach 24-stündiger Differenzierung von VM197-Zellen war die Genexpression von PARP um 36 % und die von Bid um 44 % signifikant gegenüber dem Kontrollniveau verringert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass zu späteren Differenzierungszeitpunkten der VM197-Zellen überwiegend Regulationsprozesse greifen, die zu einem Schutz ausdifferenzierter Zellen vor Apoptose beitragen. Diese *in vitro* beschriebenen Genexpressionsänderungen während der Differenzierung neuraler VM197-Progenitorzellen spiegeln sich ebenso *in vivo* in Bezug auf die Regulation der klassischen mitochondrialen Apoptosesignalkaskade über Mitglieder der Bcl-2-Familie, der Caspase-Familie und über DNA-Stabilisatorgene wider (Motoyama et al., 1995; Deckwerth et al., 1996; Kuida et al., 1996; Hakem et al., 1998; Groszer et al., 2001).

4.4.3. Veränderungen von Expressionsmustern bestimmter anti-apoptotischer Gene in VM197-Zellen während der Differenzierung

Ergebnisse der DNA-Microarrayversuche und der Real-Time PCR lassen die Schlussfolgerung zu, dass Bcl-2, differenzierte VM197-Zellen, vor Apoptoseprozessen schützt. Bereits 6 h nach Differenzierungsbeginn wurde eine dreifach signifikant erhöhte Expression von *bcl-2* gegenüber der Kontrolle (0 h) nachgewiesen, wobei sich zudem im weiteren Differenzierungsverlauf eine tendenziell stetige Genexpressionszunahme zeigte. Liang et al. (2003) zeigten in neuralen PC12-Zellen der Ratte ebenfalls, dass eine Überexpression von *bcl-2* zu einer erhöhten Expression neuraler Differenzierungs-assoziiierter Gene und im Gegenzug zu einer verminderten Expression Proliferations-assoziiierter Gene führt.

Die Expression von *survivin* war hingegen 24 h nach Differenzierungsbeginn um etwa die Hälfte signifikant gegenüber der Kontrolle verringert, wobei dieses Ergebnis in erster Linie nicht mit der Inhibierung dessen anti-apoptotischer Wirkung, sondern eher mit der Abnahme der Proliferationsaktivität von VM197-Zellen im Differenzierungsverlauf assoziiert wurde. Jiang et al. (2005) vermuten, dass Survivin hauptsächlich für das Überleben proliferierender Zellen im zentralen Nervensystem von Säugern von Bedeutung ist. Survivin nimmt zudem eine zentrale Stellung in der Mitoseregulation ein, wobei es in Colokalisation mit Zentrosomen und Spindelapparat die Zytokinese steuert (Altieri, 2003). Diese Funktion kommt vor allem in hyperproliferativen Krebszellen zum Tragen, wohingegen Survivin in postembryonalen Gewebszellen im

Allgemeines fehlt. Weitere Studien hinsichtlich der Funktion von Survivin im Kontext der Entwicklung neuraler Progenitorzellen und postmitotischer Neurone sollten angestellt werden, um somit weitere Erkenntnisse bezüglich neuer Behandlungsstrategien neurodegenerativer Erkrankungen zu gewinnen.

4.5. Beteiligung Wnt-assoziiierter Proteine an apoptotischen Prozessen während der Differenzierung von VM197-Zellen

Proteinen der Wnt-Familie wird eine bedeutende Rolle während der intrazellulären Signalgebung in Invertebraten und Vertebraten zugeschrieben. In Form hochkonservierter Glykoproteine regulieren sie über den kanonischen Wnt-Signalweg die Transkription verschiedener Zielgene im Zellkern, die wiederum für die Embryonalentwicklung sowie für Proliferations- und Differenzierungsvorgänge von entscheidender Bedeutung sind. Über die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege wie den PCP-Weg (planar cell polarity) bzw. den Wnt-Kalzium-Weg werden maßgeblich Prozesse gesteuert, die für die Ausbildung der Zellpolarität und der Umstrukturierung des Zytoskeletts bzw. für Zelladhäsion und Neuritenextension verantwortlich sind (Kishida et al., 2004).

Neurowissenschaftliche Studien *in vivo* und *in vitro* belegen die Bedeutsamkeit der Wnt-Signalgebung während der Regeneration und der Expansion neuraler Progenitorzellpopulationen in Gehirn und Rückenmark. Wnt-Proteine scheinen demgegenüber nicht minder wichtig während der Regulation von Apoptoseprozessen zu sein. Der kanonische Wnt-Signalweg wirkt vermutlich durch eine Inhibierung der c-Myc-induzierten Ausschüttung von Cytochrom c und durch die Inaktivierung von Caspasen Apoptoseprozessen entgegen (You et al., 2002; Kanei-Ishii et al., 2004). Andererseits zeigte eine Stabilisierung von β -Catenin im Mausmodell einen massiven Verlust von Zellen der Neuralleiste durch Apoptose (Hasegawa et al., 2002). Diese, im Grunde widersprüchlichen, Apoptoseregulationsmechanismen über Wnt-Proteine scheinen im Kontext entwicklungsbasierter Zellveränderungen trotzdem sinnvoll zu sein. Belegt wird diese Aussage durch die Tatsache, dass Fehlregulationen der Wnt-Signalkaskade zu Entwicklungsstörungen, Zelldegeneration oder Krebsentstehung führen können (Logan & Nusse, 2004).

Die Steuerung der, miteinander gekoppelten, Vorgänge der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose ist auf molekularer Ebene noch weitgehend ungeklärt.

Die nachfolgend diskutierten Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen Ansatzpunkte dar, die eine Interaktion zwischen kanonischem Wnt-Signalweg und Apoptosevorgängen während der Differenzierung neuraler VM197-Progenitorzellen aufzeigen.

4.5.1. Apoptose-induziertes Cleavage von β -Catenin in VM197-Zellen

Das Protein β -Catenin stellt neben seiner Beteiligung an der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten, die Schlüsselkomponente des kanonischen Wnt-Signalweges dar (Olmeda et al., 2003). Ist der kanonische Wnt-Signalweg inaktiv, wird β -Catenin durch GSK-3 β phosphoryliert und nachfolgend im Proteasomkomplex degradiert, um dessen konstante Konzentration im Zytoplasma zu gewährleisten, wodurch bestimmte intra- und extrazelluläre Funktionen aufrechterhalten werden. Die Bindung von Wnt-Proteinen an spezifische Membranrezeptoren bewirkt hingegen die Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und dessen Translokation in den Zellkern, wo es die Transkription bestimmter Zielgene und die damit verbundenen Regulati-

onsmechanismen anderer Signalwege wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose beeinflusst.

Die Wirkungsweise von β -Catenin beruht demnach auf dessen Modifikation und Stabilitätszustand. Durch Phosphorylierung oder Abspaltung bestimmter Abschnitte der β -Catenin-Proteinstruktur werden einerseits regulatorische Funktionen hinsichtlich der Zelladhäsionskomplexbildung mit Cadherinen und α -Catenin vermittelt, was für die Assoziation mit Actinfilamenten ausschlaggebend ist. Andererseits kann dadurch die Interaktion von β -Catenin mit Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges wie Axin und APC und Transkriptionsfaktoren wie TCF/LEF vermittelt und das Zellschicksal vorbestimmt werden (Mosimann et al., 2006).

Olmeda et al. (2003) zeigten in den Mauszelllinien MCA3D und HaCa4, dass eine Überexpression von stabilem β -Catenin oder die Inhibierung der endogenen β -Catenin-Degradierung einen G2-Zellzyklusarrest und Apoptose induziert. Ebenfalls wiesen Hasegawa et al. (2002) einen massiven Anstieg apoptotischer Prozesse in Neuralleistenzellen der Maus nach Stabilisierung von β -Catenin nach. Dahingegen soll die Destabilisierung von β -Catenin während der Entwicklung des Rückenmarks Apoptoseprozesse induzieren (reviewed in Ille & Sommer, 2005).

Ergebnisse der Transfektionsversuche der humanen neuralen Zelllinie VM197 mit dem stabilen S33Y- β -Catenin-Konstrukt ließen im Rahmen dieser Arbeit leider keine Rückschlüsse bezüglich des Einflusses des kanonischen Wnt-Signalweges auf Apoptoseprozesse zu und wurden deshalb nicht aufgeführt.

Stattdessen wurden in einigen VM197-Zellkulturen Spaltprodukte des Proteins β -Catenin im Bereich zwischen 70 kDa und 90 kDa ab 24 h bis 14 d nach Differenzierungsbeginn sowie nach dreistündiger Behandlung mit 2 μ M Staurosporin bzw. 4 h nach Bestrahlung mit 0,45 J/cm² UV-B mittels Westernblot detektiert. Die Intensität des 92 kDa großen, ungespaltenen β -Catenins zeigte sich während der Differenzierung und nach Behandlung mit UV-B-Strahlung allerdings relativ konstant gegenüber der Kontrolle (0 h). In Staurosporin-behandelten VM197-Zellen war dagegen ein leichter Rückgang des ungespaltenen β -Catenins zu verzeichnen.

Steinhusen et al. (2000) beschrieben die proteolytische Spaltung von β -Catenin zum einen während des Vorgangs der Anoikis, einer Sonderform der Apoptose durch Verlust der Zelladhäsion und zum anderen während der Staurosporin-induzierten Apoptose in der humanen Brustepithelzelllinie H184A1. Dabei wurden 4 h bzw. 8 h nach Apoptoseinduktion fünf β -Catenin-Spaltprodukte detektiert, die Molekulargewichte von 90 kDa, 76 kDa, 72 kDa bzw. 40 kDa aufwiesen. Ein 85 kDa großes Fragment von β -Catenin war zu allen Zeitpunkten in unbehandelten Kontrollzellen nachweisbar und repräsentiert ein Apoptose-unspezifisches Degradationsprodukt von β -Catenin. Die Gesamtmenge der Spaltprodukte entsprach dabei der Konzentration der nicht-degradierten Form von β -Catenin. Identische Spaltproduktmuster von β -Catenin wurden zudem von Steinhusen et al. (2000) in der Hundenierenzelllinie MDCK detektiert. Versuche mit dem Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-fmk zeigten dabei eindeutig, dass die Entstehung der drei β -Catenin-Fragmente im 70 kDa-Bereich auf eine Aktivierung der Caspase-3 zurückzuführen war, weil diese Fragmente nach der Caspase-3-Inhibierung nicht mehr in Erscheinung traten. Im Luciferaseassay zeigte sich zudem, dass die proteolytischen Fragmente von β -Catenin um ein 3- bis 10-fach reduziertes Transkriptionsaktivatorpotenzial besaßen. Der Abbau der Transaktivator-domänen von β -Catenin durch proteolytische Spaltung könnte demnach die Aktivierung der kritischen β -Catenin-Zielgene *c-myc* und *cyclin D1* unterbinden, was somit zu einer Deregulation der Zellproliferation und demzufolge zur Induktion von Apoptoseprozesse führt. Zhang et al. (1998) beschrieben ebenfalls, dass eine Überproduktion von β -Catenin-Fehlkonstrukten, die abgespaltene N- und C-terminale Regionen aufwiesen, zu einem Anstieg der Apoptoserate in Hippocampalneuronen der Ratte führte. Steinhusen et al. (2000) nehmen an, dass die proteolyti-

sche Spaltung von β -Catenin nicht einfach nur ein Effekt aufgrund von Apoptoseprozessen ist, sondern stattdessen das Apoptoseprogramm ursächlich induziert.

Brancolini et al. (1997) zeigten in Fibroblastenzellen der Maus und in Nierenepithelzellen des Hundes, dass die Behandlung der Zellen mit aktiver Caspase-3 bzw. UV-C-Strahlung (180 J/cm^2) ein 65 kDa großes Spaltprodukt von β -Catenin induziert. Dieses Geschehen wurde mit einer Aktivierung apoptotischer Prozesse in Verbindung gebracht, weil die Spaltung von β -Catenin durch eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 unterdrückt werden konnte. Diese Arbeitsgruppe zeigte die Spaltung von β -Catenin in beiden Zelllinien ebenfalls 6 h nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren, woraufhin eine Umorganisation des Mikrofilamentsystems während der Apoptose zu beobachten war. Nakamoto et al. (2005) wiesen eine Spaltung von β -Catenin in der humanen G401 Wilms' Tumorzelllinie nach, die allerdings nicht mit Apoptoseprozessen, sondern mit einer Reduktion der Zelladhäsionsaktivität begründet wurde.

Aufgrund der benannten Literatur ist anzunehmen, dass die Spaltung von β -Catenin während der Differenzierung und nach Exposition der VM197-Zellen mit Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung auf einer Induktion von Apoptoseprozessen beruht. Mit Hilfe mikroskopischer, durchflusszytometrischer und proteinbiochemischer Versuche konnte gezeigt werden, dass Apoptose in VM197-Zellen durch Wachstumsfaktorentzug, Staurosporinanwendung und UV-B-Strahlung induziert werden kann. Ein Anstieg früh- und spätapoptotischer VM197-Zellen (Punkt 4.2.2.) und die Aktivierung pro-apoptotischer Proteine wie Caspase-3 und Bax (Punkt 4.3.1.) unterstützt diese Aussage. Die Spaltung von β -Catenin könnte wiederum für die Umorganisation des Zytoskeletts und das Herauslösen von VM197-Zellen aus dem Zellverband verantwortlich sein, wie sie unter Punkt 4.1.1. beschrieben wurde.

Ungeachtet dessen wird ausreichend stabiles β -Catenin im Zytoplasma von differenzierenden VM197-Zellen vorgelegen haben, da diese nach Wachstumsfaktorentzug Änderungen im Zellzyklusverhalten zeigten (Punkt 4.1.3.), an Proliferationsaktivität verloren und zu Neuronen und Gliazellen differenzierten (Punkt 4.1.2.).

Demnach kann der Entzug von Wachstumsfaktoren einen direkten Einfluss auf die Induktion von Apoptoseprozessen haben und nachfolgend Regulationsänderungen der Wnt-gesteuerten Differenzierung von VM197-Zellen bewirken. Andererseits könnte die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade durch Stabilisierung von β -Catenin eine Induktion von Apoptoseprozessen in differenzierenden VM197-Zellen bewirken.

Um diese Aussagen belegen zu können, sollten weitere Versuche hinsichtlich der Interkonnektivität zwischen kanonischem Wnt-Signalweg und der Apoptose in VM197-Zellen angestellt werden, wobei idealerweise Einzelzellanalysen zur Anwendung kommen sollten.

4.5.2. Korrelation von GSK-3 β -Phosphorylierungsgrad und Apoptosestatus in differenzierenden VM197-Zellen

Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) ist eine multifunktionale Serin/Threonin Protein Kinase, die im Zytoplasma, im Zellkern und in den Mitochondrien lokalisiert (Bijur & Jope, 2003) und an der Regulation des Glykogenstoffwechsels, der Zellpolarität, der Zytoskelettformation, des Zellüberlebens und der Transkriptionskontrolle verschiedener Gene wie *NF κ B*, *CREB*, *Snail*, *p53* und *myc* beteiligt ist (Woodgett, 2001; Frame und Cohen, 2001; Jope und Johnson, 2004; Hoeflich et al., 2000; Grimes & Jope, 2001; Zhou et al., 2004). Die Wirkungsweise von GSK-3 β selbst wird über die Komplexbildung mit anderen Proteinen und ihrem Phosphorylie-

rungsgrad am Serin 9 bestimmt (Linseman et al., 2004). Der inaktive Zustand von GSK-3 β ist dadurch gekennzeichnet, dass der PI3K/Akt-Signalweg die Phosphorylierung von GSK-3 β am Serin 9 vermittelt, wodurch dessen Bindung an alternative Substrate verhindert wird (Almeida et al., 2005).

Dieser Effekt tritt beispielsweise während der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in Anwesenheit von Wnt-Proteinen in Erscheinung. Dabei kann die phosphorylierte, inaktive Form von GSK-3 β keinen Degradationskomplex mit den Proteinen Axin, APC und β -Catenin bilden, wodurch β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert, in den Zellkern transportiert wird und die Transkription verschiedener Zielgene beeinflusst (Woodgett, 2001). In Abwesenheit von Wnt-Proteinen hingegen initiiert die unphosphorylierte, aktive Form von GSK-3 β im Zusammenspiel mit den Proteinen Axin und APC die Phosphorylierung und nachfolgende Degradierung von β -Catenin (Ciani & Salinas, 2005; Wodarz & Nusse, 1998; Miller & Moon, 1996), worüber Prozesse der Zellentwicklung koordiniert werden.

Beurel & Jope (2006) beschrieben die paradoxe pro- und anti-apoptische Funktionsweise von GSK-3 β . Einerseits kann GSK-3 β das Protein Bax direkt phosphorylieren, wodurch dieses und damit der mitochondriale, intrinsische Apoptose-signalweg aktiviert wird. In diesem Zusammenhang werden zudem das pro-apoptische Protein Bim aktiviert und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert, was die Aktivierung von Caspase-3 und -9 nach sich zieht (Bijur et al., 2000; Watcharasit et al., 2003; Eom et al., 2007). Diese pro-apoptische Wirkungsweise von GSK-3 β kommt unter anderem während der Apoptoseantwort nach Wachstumsfaktorentzug oder Inhibierung des PI3K/Akt-Signalweges zum Tragen (Pap & Cooper, 1998; Hetman et al., 2000; Crowder & Freeman, 2000; Bhat et al., 2000; Li et al., 2000; Cross et al., 2001; Somerville et al., 2001; Culbert et al., 2001; Bhat et al., 2003; Hongisto et al., 2003; Sanchez et al., 2003; Linseman et al., 2004; Chin et al., 2005; Enguita et al., 2005; Jin et al., 2005b; Sinha et al., 2005). Unter diesem Aspekt gesehen, spielt GSK-3 β eine entscheidende Rolle während der Induktion von Apoptoseprozessen in neuronalen Progenitorzellen nach Wachstumsfaktorentzug (Eom et al., 2007; Hetman et al., 2000; Linseman et al., 2004). Andererseits inhibiert GSK-3 β den Todesrezeptor-vermittelten, extrinsischen Apoptose-signalweg, indem es Caspase-8 inhibiert (Beurel & Jope, 2006).

Verschiedene pharmakologische Inhibitoren von GSK-3 β werden in präklinischen Studien auf ihre therapeutische Wirksamkeit hinsichtlich der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer getestet. Das niedermolekulare und strukturell distinkte Maleimid SB216763 stellt dabei einen potenziellen, spezifischen und selektiv ATP-kompetitiven Inhibitor von GSK-3 β dar (Smith et al., 2001; Cross et al., 2001).

Eom et al. (2007) zeigten, dass die Behandlung von neuronalen Progenitorzellen der Maus mit 5 μ M SB216763 die Aktivierung von Bax und Caspase-3 nach Wachstumsfaktorentzug inhibierte. Die Arbeitsgruppe Maurer et al. (2007) indentifizierte GSK-3 β als zentralen Regulator hinsichtlich der Differenzierung und des Überlebens adulter neuronaler Stammzellen der Ratte. Nach dreitägiger Anwendung von 10 μ M SB216763 nahm der Anteil an GSK-3 β im Zellkern um das 2,5-Fache ab, wohingegen die Konzentration im Zytoplasma konstant blieb. Zudem war der Phosphorylierungsgrad von GSK-3 β am Serin 9 nach SB216763-Behandlung höher als in unbehandelten Zellen, was sich vor allem im zytoplasmatischen Anteil von GSK-3 β zeigte. Gleichzeitig wurde eine SB216763-dosisabhängige Abnahme an vitalen Zellen um 70 % festgestellt, was aber nicht ursächlich in einer gesteigerten Apoptoserate, sondern in einer Abnahme der Proliferationsaktivität begründet zu liegen schien, da eine verminderte Apoptoserate um 40 % im Caspase-3/-7 Assay nachgewiesen wurde. Zudem zeigte ein Proteomscreening von 24 differenzierungsgesteuerten Metabolismusproteinen, dass 17 davon nach GSK-3 β -Inhibierung

um durchschnittlich 2,5-fach in ihrer Expression hochreguliert waren. GSK-3 β wurde demnach eher eine entscheidende Funktion während der Differenzierung als während der Zellzykluskontrolle oder der Selbstregeneration zugeschrieben (Maurer et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von GSK-3 β bezüglich der Apoptoseinduktion in humanen neuronalen VM197-Progenitorzellen nach Wachstumsfaktorentzug untersucht. Unabhängig von der Behandlung mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 zeigten sich in proliferierenden und differenzierenden VM197-Zellen keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Mitoserate. Die Apoptoserate stieg in unbehandelten VM197-Zellen mit fortschreitender Differenzierung stetig an und war 6 h, 8 h und 12 h nach Differenzierungsbeginn 0,4 % bis 0,9 % signifikant gegenüber der Kontrolle (0 h) erhöht. Die Behandlung von VM197-Zellen mit 10 μ M SB216763 bewirkte 6 h nach Differenzierungsbeginn eine Reduktion apoptotischer VM197-Zellen um etwa die Hälfte gegenüber unbehandelten Zellen zu selbem Zeitpunkt. Nach 8 h und 12 h Differenzierung und gleichzeitiger Behandlung mit SB216763 war die Apoptoserate in VM197-Zellen um 0,7 % signifikant im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu selben Differenzierungszeitpunkten erniedrigt. Diese Ergebnisse korrelieren somit mit den Aussagen von Maurer et al. (2007), die eine Apoptose-regulierende Funktion von GSK-3 β in neuronalen Rattenzellen nachwiesen.

Ein Rückgang apoptotischer Aktivität konnte ebenfalls auf Proteinebene in differenzierenden, SB216763-behandelten VM197-Zellen anhand reduzierter Konzentrationen an gespaltenem Bax (6 h bis 12 h), Caspase-3-Fragmenten (2 h bis 12 h) und PARP-Fragment (4 h bis 12 h) gegenüber unbehandelten Vergleichsansätzen detektiert werden. Zu gleichen Erkenntnissen gelangten Eom et al. (2007), die in murinen, neuronalen Vorläuferzellen 4 h und 8 h nach dem Entzug trophischer Faktoren und gleichzeitiger GSK-3 β -Inhibierung durch Lithium bzw. SB216763 eine reduzierte Aktivierung von Bax und Caspase-3 sowie eine deutlich verminderte PARP-Proteolyse nachwiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen demnach eindeutig, dass GSK-3 β eine regulatorische Funktion in humanen neuronalen Progenitorzellen während der Apoptoseinduktion nach Wachstumsfaktorentzug einnimmt. Dabei wurden zudem vermutlich eher Differenzierungsprozesse als Proliferationsvorgänge entscheidend beeinflusst.

Ungeachtet der Behandlung mit SB216763 blieb die Konzentration an GSK-3 β während der Differenzierungszeitreihe relativ konstant. Nur 4 h nach Differenzierungsbeginn wurde eine 40 % signifikant höhere Konzentration an GSK-3 β in unbehandelten VM197-Zellen nachgewiesen. Obwohl alle bisherigen wissenschaftlichen Publikationen eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades am Serin 9 und demnach eine Inaktivierung von GSK-3 β nach Behandlung mit SB216763 zeigten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine fast ausschließlich signifikant und maximal um die Hälfte verringerte GSK-3 β -Phosphorylierung am Serin 9 detektiert. Das kann einerseits bedeuten, dass SB216763 in der angewandten Konzentration eventuell eine weitere Wirkungsweise in VM197-Zellen hat und/oder nicht ausschließlich der Phosphorylierungsgrad von GSK-3 β am Serin 9 für dessen regulatorische Funktion bezüglich anderer Signalwege ausschlaggebend ist. Hongisto et al. (2008) konstatierten in ihrer Arbeit, dass eine Dephosphorylierung von GSK-3 β am Serin 9 nicht allein für dessen pro-apoptotische Funktion verantwortlich sein kann, weil Neurone aus GSK3 α/β ^{S21A/S9A} Knock-in Mäusen nach Behandlung mit SB216763 immer noch vor Apoptoseprozessen, induziert durch Wachstumsfaktorentzug, geschützt waren.

Davon abgesehen lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang von GSK-3 β -Dephosphorylierung und anti-apoptotischen Effekten in VM197-Zellen erklären. Wie Hasegawa et al. (2002) bereits zeigten und in der vorliegenden Arbeit ebenfalls teilweise

beschrieben wurde, bewirkt ein Entzug von Wachstumsfaktoren die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges und somit die Aktivierung von GSK-3 β , woraufhin β -Catenin stabilisiert wird und unter anderem an der Vermittlung der Zelldifferenzierung, einhergehend mit einem gesteigerten Zellverlust durch Apoptose, beteiligt ist. Demnach kann die signifikante Abnahme der Apoptoserate in differenzierenden VM197-Zellen nach Behandlung mit SB216763 damit erklärt werden, dass die nachweislich signifikante Dephosphorylierung am Serin 9 von GSK-3 β eine Destabilisierung von β -Catenin nach sich gezogen haben könnte, wodurch Prozesse zu Gunsten eines gesteigerten Zellüberlebens induziert wurden. Um diesen Sachverhalt zu klären müssten weitere detaillierte Untersuchungen hinsichtlich der Interaktionspartner von GSK-3 β angestellt werden.

4.5.3. Wnt-3a führte zu keiner signifikanten Verringerung der Apoptoserate in VM197-Zellen

Wnt-3a ist eines von 19 Mitgliedern der Wnt-Familie der Vertebraten und an der Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges beteiligt. Lee et al. (2000) beschrieben die Funktion von Wnt-3a während der Entwicklung des Hippocampus in Säugern, wobei dieses Protein durch die Regulation des Progenitorzellpools und/oder die Aufrechterhaltung von Stammzellen, die Größe des caudomedialen Cortex mitbestimmt. Andererseits unterstützt Wnt-3a die Differenzierung in den neuronalen und astrozytären Zelltypus, wobei die Stammzellregeneration inhibiert wird (Muroyama et al., 2004). Zudem ist Wnt-3a an der Determinierung der proneuralen Domänen des dorsalen Neuralrohrs in dessen späteren Entwicklungsstadien beteiligt (Cauthen et al., 2001; Muroyama et al., 2002). Neben der Beeinflussung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen wird Wnt-3a eine regulatorische Funktion hinsichtlich des programmierten Zelltods zugesprochen. Almeida et al. (2005) wiesen in verschiedenen murinen Osteoblastenvorläuferzellen einen Rückgang der Apoptoserate nach Zugabe von Wnt-3a nach. Wnt-3a induzierte dabei die Phosphorylierung von GSK-3 β und nachfolgend die Aktivierung der β -Catenin-vermittelten Transkription von benötigten ERK-, PI3K- und Akt-Signalwegkomponenten. Die anti-apoptotische Funktion von Wnt-3a kam durch eine induzierte ERK-vermittelte Expressionssteigerung von Bcl-2 6 h nach Zugabe von 50 ng/ml Wnt-3a zum Ausdruck. Außerdem wird eine Beteiligung von Wnt-3a an β -Catenin-unabhängigen anti-apoptotischen Regulationsmechanismen vermutet, da eine Transfektion von murinen Osteoblastenvorläuferzellen mit dem stabilen S33Y- β -Catenin-Konstrukt in Abwesenheit von Wnt-3a keinen Schutz vor, durch Serumentzug induzierten, Apoptoseprozessen bot. Castelo-Branco et al. (2003) wiesen in Vorläuferzellen des ventralen Mittelhirns der Maus eine gesteigerte Proliferation nach drei- bis sieben-tägiger Inkubation mit 10 Units rekombinantem Wnt-3a nach, wobei dieses Ergebnis mit einer gesteigerten β -Catenin-vermittelten Regeneration der Zellen begründet wurde.

In differenzierenden VM197-Zellen waren 6 h bis 72 h nach Inkubation mit 50 ng/ml Wnt-3a keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Mitose- und der Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen sichtbar. Nach 6-, 12- und 48-stündiger Differenzierung und gleichzeitiger Behandlung mit Wnt-3a der VM197-Zellen war die Anzahl apoptotischer Zellen lediglich um durchschnittlich 0,3 % geringer als in unbehandelten Zellen. Demgegenüber war 24 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn die Apoptoserate in VM197-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung sogar leicht gegenüber den unbehandelten VM197-Zellen erhöht. Fundierte Aussagen hinsichtlich des Einflusses von Wnt-3a auf Apoptoseprozesse während der Differenzierung von VM197-Zellen können anhand der erhobenen Daten nicht getroffen werden. Im

Vergleich zu der, von Almeida et al. (2005) beschriebenen, Wnt-3a-induzierten Expressionssteigerung von Bcl-2, könnte dieser Effekt in differenzierenden VM197-Zellen ausgeblieben sein, weil Bcl-2 in diesen Zellen bereits ohne Behandlung, 6 h nach Differenzierungsbeginn, signifikant erhöht war. Zudem sollte Wnt-3a in einer höheren Anwendungskonzentration getestet werden, um dessen Wirksamkeit in Abhängigkeit von Dosis und Anwendungsdauer nachzuweisen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die humane neurale VM197-Progenitorzelllinie hinsichtlich apoptotischer Prozesse während der Differenzierung zu charakterisieren und zu untersuchen, inwieweit die Wnt-gesteuerte neurale Zelldeterminierung an Apoptoseprozesse gekoppelt ist. Im Rahmen der Arbeit wurden proliferierende Zellen (Kontrolle) und Zellen während ihrer dreitägigen Differenzierung hinsichtlich des Apoptosestatus, des Expressionsstatus Apoptose-relevanter Gene und Proteine, sowie das Verhalten der Zellen nach Inhibierung von Schlüsselproteinen des Wnt-Signalweges qualitativ und quantitativ beschrieben.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lauten wie folgt:

- Ab 6 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn zeigten sich deutliche Veränderungen des Zellhabitus und eine Umstrukturierung der Zytoskelettkomponenten Actin und α -Tubulin.
- Die Proliferationsaktivität von VM197-Zellen verringerte sich im dreitägigen Differenzierungsverlauf zunehmend, wobei ab 6 h nach Differenzierungsbeginn ein signifikanter Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase nachgewiesen wurde.
- Neuronale VM197-Zellen konnten anhand der spezifischen Differenzierungsmarker HuC/D bzw. β III-Tubulin ab 12 h bzw. ab 24 h nach Differenzierungsbeginn detektiert werden.
- Mittels Annexin V-FITC/PI-Assay, Sub-G1-Peak-Analyse und der Detektion von „apoptotic bodies“ wurde eine signifikante Zunahme von VM197-Zellen in verschiedenen Apoptosestadien zwischen 2 h und 6 h, sowie massiv ausgeprägt zwischen 6 h und 72 h nach Differenzierungsbeginn nachgewiesen.
- Unmittelbar nach Differenzierungsbeginn zeigten sich eine zunehmende Aktivierung von Caspase-3 und die Spaltung von dessen Substrat PARP.
- Die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bid wurde ab 12 h bzw. während der gesamten Differenzierung von VM197-Zellen nachgewiesen. Dahingegen war die Expression von Apaf-1 96 h nach Differenzierungsbeginn kaum bzw. nicht nachweisbar. Die Proteinexpressionen von Nip-1 und Caspase-2 sowie CAS waren ab 6 h bzw. bei 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erniedrigt.
- Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 war 4 h und ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant erhöht. Dagegen war die Proteinexpression von Survivin ab 12 h bis 72 h nach Differenzierungsbeginn signifikant verringert.
- Die Genexpressionsprofile der benannten Proteine korrelierten signifikant mit den beschriebenen Proteinexpressionsmustern. Die Analyse der DNA-Microarraydaten zeigte, dass 6 h nach Differenzierungsbeginn 3226 von 5200 vorselektierten Genen signifikant verändert exprimiert vorlagen. Darunter befanden sich 34 Gene mit Apoptoserelevanz und 23 Gene mit spezifischer Differenzierungsfunktion.
- Ab 24 h bis 14 d nach Differenzierungsbeginn wurde in einigen VM197-Zellansätzen eine Spaltung von β -Catenin in mehrere Fragmente nachgewiesen, die sich ebenfalls, aber in stärkerem Ausmaß, nach der Behandlung mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin bzw. UV-B-Strahlung zeigte.
- Die Behandlung von VM197-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 induzierte eine signifikante Dephosphorylierung von GSK-3 β am Serin 9 ab 2 h bis 12 h nach Differenzierungsbeginn. Parallel dazu wurden eine signifikant erniedrigte Apoptoserate und tendenziell abnehmende Proteinexpressionen aktiver Caspase-3 sowie der Spaltprodukte von Bax und PARP nachgewiesen.

- Die Apoptoserate differenzierender VM197-Zellen blieb unbeeinflusst von der Behandlung mit rekombinantem Wnt-3a.

Als Fazit resultiert, dass sich das *In-vitro*-VM197-Zellmodell für die Charakterisierung und Analyse apoptotischer Prozesse während der neuralen Determinierungs- und Differenzierungsvorgänge generell als gut geeignet erwies. Dabei ging die Differenzierung von VM197-Zellen mit einer Aktivierung sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Komponenten der extrinsischen und der intrinsischen Apoptosesignalkaskade einher. Differenzierte Zellen wiesen eine geringere Apoptosesuszeptibilität gegenüber proliferierenden Zellen auf. Erste Aussagen bezüglich der Interkonnektivität zwischen Proteinen des kanonischen Wnt-Signalweges und der Apoptosesignalkaskaden bedürfen weiterer detaillierter Analysen, die vornehmlich auf Einzelzellbasis durchgeführt werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. Feb; 9(2):423-32.
- Akhtar RS, Roth KA. (2006) Regulation of Neural Stem Cell Death. *Neural Development and Stem Cells*, Second Edition, Edt. Mahendra S. Rao, Humana Press, ISBN 978-1-58829-481-4; DOI 10.1385/1592599141; 97-122.
- Alberghina L, Colangelo AM. (2006) The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. *BMC Neurosci*. Oct 30; 7 Suppl 1:S2.
- Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. (2005) Wnt Proteins Prevent Apoptosis of Both Uncommitted Osteoblast Progenitors and Differentiated Osteoblasts by β -Catenin dependent and -independent Signaling Cascades Involving Src/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT. *The Journal of Biological Chemistry* Dec 16; 280(50):41342–41351.
- Altieri DC. (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* Nov 23; 22(53):8581– 8589.
- Altura RA, Olshefski RS, Jiang Y, Boue DR. (2003) Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade. *Br J Cancer* Nov 3; 89(9):1743–1749.
- Anderson L, Burnstein RM, He X, Luce R, Furlong R, Foltynie T, Sykacek P, Menon DK, Caldwell MA. (2007) Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential *in vivo*. *Exp Neurol*. Apr; 204(2):512-24.
- Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. (2000) Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. *Cancer Medicine* e.5.
- Arenas E, Persson H. (1994) Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons *in vivo*. *Nature* 367 Jan 27; 367(6461):368-371.
- Arends MJ, Wyllie AH. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254.
- Ashwell, JD, Berger NA, Cidlowski JA, Lane DP, Korsmeyer SJ. (1994) Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunol Today* Apr; 15(4):147-151.
- Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Arnold W, Daniel PT, Mapara MY, Grinstein E, Royer HD, Dorken B. (1996) Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. *J Exp Med* Mar 1; 183(3):1205-1213.
- Beurel E, Jope RS. (2006) The Paradoxical Pro- and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. *Prog Neurobiol*. Jul; 79(4): 173–189.
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Sep 26; 97(20):11074-11079.
- Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J. (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem* 278, Nov 14; 278(46):45937-45945.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience Letters* Sep 8; 291(1):17-20.
- Bijur GN, Jope RS. (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* Dec 19; 14(18):2415-9.
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS. (2000) Glycogen synthase kinase-3 β facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis: protection by lithium. *J. Biol. Chem*. Mar 17; 275(11):7583–7590.
- Bonzon C, Bouchier-Hayes L, Pagliari LJ, Green DR, Newmeyer DD. (2006) Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell*. May; 17(5):2150–2157.

- Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. (1997) Dismantling Cell-Cell Contacts during Apoptosis Is Coupled to a Caspase-dependent Proteolytic Cleavage of b-Catenin. *The Journal of Cell Biology* Nov 3; 139(3):759-771.
- Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Scherf U, Pastan I. (1996a) Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and TNF mediated apoptosis. *Biochemistry* May 28; 35(21):6891-6899.
- Brinkmann U. (1998) HUMAN GENETICS '98: APOPTOSIS CAS, the Human Homologue of the Yeast Chromosome-Segregation Gene CSE1, in Proliferation, Apoptosis, and Cancer. *Am. J. Hum. Genet.* Mar; 62(3):509-513.
- Burek MJ, Oppenheim RW. (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* Oct; 6(4):427-446.
- Burek MJ, Oppenheim RW. (1999) Cellular interactions that regulate programmed cell death in the developing vertebrate nervous system. In *Cell Death and Disease of the Nervous System*, ed. V Koliatsos, R Ratan, 1:145-80. Totowa: Humana.
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E. (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Oct 28; 100(22):12747-12752.
- Castelo-Branco G, Rawal N, Arenas E. (2004) GSK-3 β inhibition/ β -catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J Cell Sci.* Nov 15; 117(Pt 24):5731-5737.
- Cauthen CA, Berdough E, Sandler J, Burrus LW. (2001) Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech Dev.* Jun; 104(1-2):133-138.
- Chen J, Jin S, Tahir SK, Zhang H, Liu X, Sarthy AV, McGonigal TP, Liu Z, Rosenberg SH, Ng SC. (2003) Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem.* Jan 3; 278(1):486-490.
- Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, Vanderluit JL, Ferguson KL, McIntosh WC, Park DS, Bennett SA, Slack RS. (2005) Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci.* Feb 9; 25(6):1324-1334.
- Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR. (2005) Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res.* Jun 13; 137(1-2):193-201.
- Ciani L, Salinas PC. (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci.* May; 6(5):351-62.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* Nov 3; 127(3):469-480.
- Cohen S, Levi-Montalcini R. (1956) *In vitro* and *in vivo* effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42:571.
- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. (1992) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* Sep 1; 286(Pt 2):331-334.
- Collins NL, Reginato MJ, Paulus JK, Sgroi DC, LaBaer J, Brugge JS. (2005) G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-Mediated Bim suppression. *Mol Cell Biol.* Jun; 25(12):5282-5291.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M. (2001) Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci.* Jan; 24(1):25-31.
- Corteling RL and Miljan EA. (2008) ReNcell™ VM Cell Line - A Model of Human Neural Development and Differentiation. Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB. (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* Sep 21; 225(4668):1258-65.

- Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD. (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* Apr; 77(1):94–102.
- Crowder RJ, Freeman RS. (2000) Glycogen synthase kinase-3 β activity is critical for neuronal death caused by inhibiting PI 3-kinase or Akt but not for death caused by NGF withdrawal. *J. Biol. Chem* 275(44):34266–34271.
- Culbert AA, Brown MJ, Frame S, Hagen T, Cross DA, Bax B, Reith AD. (2001) GSK3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and β -catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity. *FEBS Lett.* Nov 2; 507(3):288–294.
- Dallaglio K, Palazzo E, Marconi A, Dumas M, Truzzi F, Lotti R, Bontè F, Pincelli C. (2009) Endogenous survivin modulates survival and proliferation in UVB-treated human keratinocytes. *Experimental Dermatology* May; 18(5):464-471.
- Darios F, Lambeng N, Troadec JD, Michel PP, Ruberg M. (2003) Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *J Neurochem.* 84(4):643-654.
- Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM Jr, Snider WD, Korsmeyer SJ. (1996) BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron.* Sep; 17(3):401–11.
- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. (2004) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* Oct; 114(8):1117–1127.
- Donato R, Miljan EA, Hines SJ, Aouabdi S, Pollock K, Patel S, Edwards FA, Sinden JD. (2007) Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* May 25; 8:36.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* Jul 7; 102(1):33-42.
- Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. (1991) Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* Sep; 129(1):79-94.
- Engidawork E, Gulesserian T, Seidl R, Cairns N, Lubec G. (2001) Expression of apoptosis related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* May 4; 303(2):79-82.
- Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R. (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol.* Apr 67(4):1237–1246.
- Eom TY, Roth KA, Jope RS. (2007) Neural Precursor Cells Are Protected from Apoptosis Induced by Trophic Factor Withdrawal or Genotoxic Stress by Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3. *J Biol Chem.* Aug 3; 282(31):22856–22864.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* Nov; 4(11):1313-7.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* Feb; 20(3):929–935.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* Apr 1; 148 (7):2207-2216.
- Fernando P, Brunette S, Megeney LA. (2005) Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase-3 activity. *FASEB J.* Oct; 19(12):1671-3.
- Frame S, Cohen P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* Oct 1; 359(Pt 1):1-16.
- Fröhlich M, Jaeger A, Weiss DG, Kriehuber R. (2009) Specific inhibition of Bcl-2 leads to diminished neuronal differentiation in VM197 cells. 19th Annual Conference of the German Society for Cytometry (DGFZ), Leipzig, Germany, Oct 14-16, Abstract Book, p.63.
- Gage FH. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* Feb 25; 287(5457):1433-8.

- Gao G, Dou QP. (2000) N-Terminal Cleavage of Bax by Calpain Generates a Potent Proapoptotic 18-kDa Fragment that Promotes Bcl-2-Independent Cytochrome C Release and Apoptotic Cell Death. *J Cell Biochem. Sep* 18; 80(1):53–72.
- Gougeon ML. (1997) Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1:S33-9.
- Grimes CA, Jope RS. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol. Nov*; 65(4):391–426.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H. (2001) Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene *in vivo*. *Science Dec* 7; 294(5549):2186–2189.
- Gurok U, Steinhoff C, Lipkowitz B, Ropers HH, Scharff C, Nuber UA. (2004) Gene Expression Changes in the Course of Neural Progenitor Cell Differentiation. *J Neurosci. Jun* 30; 24(26):5982–6002.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell. Aug* 7; 94(3):339–52.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R. (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool. Aug*; 111(3):457-501.
- Hasegawa S, Sato T, Akazawa H, Okada H, Maeno A, Ito M, Sugitani Y, Shibata H, Miyazaki JJ, Katsuki M, Yamauchi Y, Yamamura KK, Katamine S, Noda T. (2002) Apoptosis in neural crest cells by functional loss of apc tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. Jan* 8; 99(1):297-302.
- Haviv R, Lindenboim L, Yuan J, Stein R. (1998) Need for caspase-2 in apoptosis of growth-factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res. Jun* 1; 52(5):491-497.
- Hemmati-Brivanlou A, Melton D A. (1994) Inhibition of activin signalling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell. Apr* 22; 77(2):273–281.
- Heng JI, Chariot A, Nguyen L. (2010) Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Trends Neurosci. Jan*; 33(1):38-47.
- Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature Oct* 12; 407(6805):770–776.
- Henshall DC, Bonislowski DP, Skradski SL, Lan JQ, Meller R, Simon RP. (2001) Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis. Aug*; 8(4):568–580.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z. (2000) Role of Glycogen Synthase Kinase-3b in Neuronal Apoptosis Induced by Trophic Withdrawal. *J Neurosci. Apr* 1; 20(7):2567–2574.
- Hoffrogge R, Beyer S, Völker U, Uhrmacher AM, Rolfs A. (2006) 2-DE Proteomic Profiling of Neuronal Stem Cells. *Neurodegenerative Dis. 3(1-2)*:112–121.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature Jul* 6; 406(6791):86–90.
- Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET. (2008) The Wnt Pool of Glycogen Synthase Kinase 3 β Is Critical for Trophic-Deprivation Induced Neuronal Death. *Mol Cell Biol. Mar*; 28(5):1515-1527.
- Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET. (2003) Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol. Sep*; 23(17):6027–6036.
- Howard MK, Burke LC, Mailhos C, Pizzey A, Gilbert CS, Lawson WD, Collins MK, Thomas NS, Latchman DS. (1993) Cell cycle arrest of proliferating neuronal cells by serum deprivation can result in either apoptosis or differentiation. *J Neurochem. May*; 60(5):1783-91.
- Husseman, JW, Noehlin D, Vincent I. (2000) Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging. Nov-Dec*; 21(6):815–828.
- Ille F, Sommer L. (2005) Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci. May*; 62(10):1100-8.

- Izaguirre MF, Vergara MN, Casco VH. (2006) CAS role in the brain apoptosis of *Bufo arenarum* induced by Cypermethrin. *Biocell (Mendoza)* Aug; 30(2):309-20.
- Jiang Y, de Bruin A, Caldas H, Fangusaro J, Hayes J, Conway EM, Robinson ML, Altura RA. (2005) Essential Role for Survivin in Early Brain Development. *J Neurosci.* Jul 27; 25(30):6962– 6970.
- Jin N, Kovacs AD, Sui Z, Dewhurst S, Maggirwar SB. (2005b) Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* Mar; 48(4):576–583.
- Jope RS, Johnson GV. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* Feb; 29(2):95-102.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T. (1996) *Neurowissenschaften: Eine Einführung.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford, ISBN-10: 3-86025-391-3; 73-115.
- Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K, Ishii S. (2004) Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* Apr 1; 18(7):816-29.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* Apr 3; 386(6624):493-5.
- Kempermann G. (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* Feb 1; 22(3):635-8.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug; 26(4):239-57.
- Kishida S, Yamamoto H, Kikuchi A. (2004) Wnt-3a and Dvl Induce Neurite Retraction by Activating Rho-Associated Kinase. *Mol Cell Biol.* May; 24(10):4487-4501.
- Klum S. (2008) Untersuchungen zur Caspase-Aktivierung in der humanen neuronalen Progenitorzelllinie ReNcell VM 197 *in vitro*. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Universität Rostock, Germany.
- Krammer PH. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* Oct 12; 407(6805):789-95.
- Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A. (1996) Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J.* Jan 2; 15(1):46-54.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* Nov 28; 384(6607):368-72.
- Kukekov V, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA. (1999) Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol.* Apr; 156(2):333-344.
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.* Sep 19; 90(6):1061–1071.
- Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP. (2000) A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development.* Feb; 127(3):457–467.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1951) Selective growthstimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* Mar; 116(2):321-361.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1953) A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool.* 123(2):233-287.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol.* Dec; 20(24):9356–9363.
- Li Y, Song YH, Mohler J, Delafontaine P. (2006) ANG II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May; 290(5):H2116-H2123.
- Liang Y, Mirmics ZK, Yan C, Nylander KD, Schor NF. (2003) Bcl-2 mediates induction of neural differentiation. *Oncogene* Aug 21; 22(35):5515–5518.

- Lijun X, Chock VY, Yibo Yang E, Giffard RG. (2004) Susceptibility to apoptosis varies with time in culture for murine neurons and astrocytes: changes in gene expression and activity. *Neurol Res. Sep*; 26(6):632-643.
- Lindholm D, Arumae U. (2004) Cell differentiation: reciprocal regulation of apaf-1 and the inhibitor of apoptosis proteins. *J Cell Biol. Oct*; 167(2):193-5.
- Lindsten T, Golden JA, Zong WX, Minarcik J, Harris MH, Thompson CB. (2003) The Proapoptotic Activities of Bax and Bak Limit the Size of the Neural Stem Cell Pool. *J Neurosci. Dec 3*; 23(35):11112–11119.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. (2004) Glycogen Synthase Kinase-3 Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization during Neuronal Apoptosis. *J Neurosci. Nov 3*; 24(44):9993–10002.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell. Jul 12*; 86(1):147-57.
- Liu DX, Greene LA. (2001a) Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res. Aug*; 305(2):217–228.
- Logan CY, Nusse R. (2004) The WNT Signaling Pathway In Development And Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol. 20*:781–810.
- Long AC, Colitz CMH, Bomser JA. (2004) Apoptotic and Necrotic Mechanisms of Stress-Induced Human Lens Epithelial Cell Death. *Exp Biol Med (Maywood). Nov*; 229(10):1072–1080.
- Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS, MacDougald OA. (2002) Wnt signaling protects 3t3-l1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J Biol Chem. Oct 11*; 277(41):38239-38244.
- Lonze BE, Ginty DD. (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron. Aug 15*; 35(4):605–623.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell. Aug 21*; 94(4):481-90.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, et al. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron. Oct*; 13(4):1017–1030.
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA. (1994) Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol. Feb*; 25(2):143-55.
- Maurer MH, Brömme JO, Feldmann RE Jr, Järve A, Sabouri F, Bürgers HF, Schelshorn DW, Krüger C, Schneider A, Kuschinsky W. (2007) Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3-beta) regulates differentiation and proliferation in neural stem cells from the rat subventricular zone. *J Proteome Res. 6(3)*:1198-208.
- Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H. (1997) Apoptosis in neural development and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. Nov*; 77(3):F165-F170.
- Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. (1996) Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med. May 1*; 183(5):2219-2226.
- McConnell SK, Kaznowski CE. (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science. Oct 11*; 254(5029):282-285.
- McDonald JW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW. (1997) Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res. Jun 6*; 759(2):228-232.
- Mesner PW, Winters TR, Green SH. (1992) Nerve Growth Factor Withdrawal-induced Cell Death in Neuronal PC12 Cells Resembles That in Sympathetic Neurons. *J Cell Biol. Dec*; 119(6):1669-1680.
- Middleton G, Piñón LGP, Wyatt S, Davies AM. (1998) Bcl-2 Accelerates the Maturation of Early Sensory Neurons. *J Neurosci. May 1*; 18(9):3344-3350.

- Miho Y, Kourokui Y, Fujita E, Mukasa T, Urase K, Kasahara T, Isoai A, Momoi MY, Momoi T. (1999) bFGF inhibits the activation of caspase-3 and apoptosis of P19 embryonal carcinoma cells during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* May; 6(5):463-470.
- Miller JR, Moon RT. (1996) Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev.* Oct 15; 10(20):2527-2539.
- Mobley PL, Hedberg K, Bonin L, Chen B, Griffith OH. (1994) Decreased phosphorylation of four 20-kDa proteins precedes staurosporine-induced disruption of the actin/myosin cytoskeleton in rat astrocytes. *Exp Cell Res. Sep;* 214(1):55-66.
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K. (2006) Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell.* Apr 21; 125(2):327-41.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, et al. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science.* Mar 10; 267(5203):1506-10.
- Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, Kondoh H, Takada S. (2002) Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* Mar 1; 16(5):548-553.
- Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. (2004) Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 23; 313(4):915-921.
- Nagy Z. (2000) Cell cycle regulatory failure in neurones: causes and consequences. *Neurobiol Aging.* Nov-Dec; 21(6):761-769.
- Nakamoto K, Kuratsu J, Ozawa M. (2005) Beta-catenin cleavage in non-apoptotic cells with reduced cell adhesion activity. *Int J Mol Med.* Jun; 15(6):973-9.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. (2000) Apoptosis In Neural Development And Disease. *Annu Rev Neurosci.* 23:73-87.
- Nusse, R. (1999) Wnt targets: repression and activation. *Trends Genet.* Jan 1; 15(1):1-3.
- Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. (2003) Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell.* Jul; 14(7):2844-2860.
- Oppenheim RW. (1981) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. V. Evidence on the role of cell death and neuromuscular function in the formation of specific peripheral connections. *J Neurosci.* Feb; 1(2):141-51.
- Oppenheim RW. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 14:453-501.
- Pap M, Cooper GM. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* Aug 7; 273(32):19929-19932.
- Parone P, Priault M, James D, Nothwehr SF, Martinou JC. (2003) Apoptosis: bombarding the mitochondria. *Essays Biochem.* 39:41-51.
- Pennartz S, Belvindrah R, Tomiuk S, Zimmer C, Hofmann K, Conradt M, Bosio A, Cremer H. (2004) Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. *Mol Cell Neurosci* 25:692-706.
- Pettmann B, Henderson CE. (1998) Neuronal cell death. *Neuron.* Apr; 20(4):633-647.
- Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA. (2001) BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 18; 98(26):15318-15323.
- Politis PK, Makri G, Thomaidou D, Geissen M, Rohrer H, Matsas R. (2007) BM88/CEND1 coordinates cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 6; 104(45):17861-6.
- Prehn JH, Jordán J, Ghadge GD, Preis E, Galindo MF, Roos RP, Kriegstein J, Miller RJ. (1997) Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem.* Apr; 68(4):1679-85.

- Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson EM Jr. (2002) Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol.* Apr 29; 157(3):441-53.
- Rado M. (2006) Neurogenese - Unser Gehirn kann sich regenerieren. IKC-Conference "Kommunikation, Bewusstsein und Gesundheit" Sep; 14-17.
- Raff MC. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* Apr 2; 356(6368):397-400.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* Oct 29; 262(5134):695-700.
- Rasouly D, Rahamim E, Ringel I, Ginzburg I, Muarakata C, Matsuda Y, Lazarovici P. (1994) Neurites induced by staurosporine in PC12 cells are resistant to colchicine and express high levels of tau proteins. *Mol Pharmacol.* Jan; 45(1):29-35.
- Rehm M, Huber HJ, Duessmann H, Prehn JHM. (2006) Systems analysis of effector caspase activation and its control by X-linked inhibitor of apoptosis protein. *EMBO J.* Sep 20; 25(18):4338-4349.
- Sanchez JF, Sniderhan LF, Williamson AL, Fan S, Chakraborty-Sett S, Maggirwar SB. (2003) Glycogen synthase kinase 3 β -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor κ B signaling. *Mol Cell Biol.* Jul; 23(13):4649-4662.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont L K, De Robertis E M. (1994) *Xenopus* chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell.* Dec 2; 79(5):779-790.
- Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B. (2001) Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem.* Oct.; 79(2):426-436.
- Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, Summers C. (1999) Angiotensin II Type 2 Receptor-Mediated Apoptosis of Cultured Neurons from Newborn Rat Brain. *Endocrinology.* Jan; 140(1):500-509.
- Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, Schwartz JH, Borkan SC. (2005) Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288:F703-F713.
- Smith WC, Harland RM. (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell.* Sep 4; 70(5):829-840.
- Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, Ward RW. (2001) 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett.* Mar 12; 11(5):635-9.
- Snider WD. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* Jun 3; 77(5):627-638.
- Somerville TC, Linch DC, Khwaja A. (2001) Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood.* Sep 1; 98(5):1374-81.
- Song Z, Yao X, Wu M. (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during Taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* Jun 20; 278(25):23130-23140.
- Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dörken B, Bommert K. (2000) Apoptosis-induced Cleavage of b-Catenin by Caspase-3 Results in Proteolytic Fragments with Reduced Transactivation Potential. *J Biol Chem.* May 26; 275(21):16345-53.
- Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AF. (2007) E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* Nov; 27(21):7703-17.
- Ullman KS, Powers MA, Forbes DJ. (1997) Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell.* Sep 19; 90(6):967-970.

- Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J. (1997) Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development*. Mar; 124(6):1239-1249.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. Jul 7; 102(1):43-53.
- Wang YF, Hsieh YF, Lin CL, Lin JL, Chen CY, Chiou YH, Chou MC. (2004) Staurosporine-induced G2/M arrest in primary effusion lymphoma BCBL-1 cells. *Ann Hematol*. Dec; 83(12):739-44.
- Wang CX, Song JH, Song DK, Yong VW, Shuaib A, Hao C. (2006) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ*. Jul; 13(7):1203-12.
- Watcharasi P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem*. Dec 5; 278(49):48872-9.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. Aug 15; 14(16):2060-2071.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. Nov; 16(9):1681-1689.
- Wodarz A, Nusse R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:59-88.
- Woodgett JR. (2001) Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE*. Sep 18; 2001(100):re12.
- Wright KM, Linhoff MW, Potts PR, Deshmukh M. (2004) Decreased apoptosome activity with neuronal differentiation sets the threshold for strict IAP regulation of apoptosis. *J Cell Biol*. Oct 25; 167(2):303-13.
- www.medscape.com, 2006
- www.rientraclinic.com, 2007
- Wyllie AH, Duvall E. (1992) Cell injury and death. In McGee JO'D, Isaacson PG, Whright NA, eds. *Oxford Textbook of Pathology*. Vol 1. Principles of Pathology. Oxford, UK, Oxford University Press 141-157.
- Yeo W, Gautier J. (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol*. Oct; 274(2):233-44.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*. May 26; 369(6478):321-3.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. Sep 18; 94(6):739-50.
- You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL et al. (2002) Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol*. Apr 29; 157(3):429-440.
- Youle RJ. (2007) Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science*. Feb 9; 315(5813):776-7.
- Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenberg M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA. (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*. Oct 15; 395(6703):698-702.
- Zhang KZ, Westberg JA, Hölttä E, Andersson LC. (1996) BCL2 regulates neural differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 30; 93(9):4504-8.
- Zhang H, Heim J, Meyhack B. (1999) Novel BNIP1 variants and their interaction with BCL2 family members. *FEBS Lett*. Apr 1; 448(1):23-27.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. (2004) *Nat. Cell Biol*. 6:931-940.

- Zinkel S, Gross A, Yang E. (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* Aug; 13(8):1351-9.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* Jun 15; 15(12):1481–1486.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* Aug 8; 90(3):405-13.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* Apr 23; 274(17):11549 –11556.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des interdisziplinären DFG-Graduiertenkollegs „dIEM oSiRiS – Die integrative Entwicklung von Modellierungs- und Simulationsmethoden für regenerative Systeme“ (1387/1) und in Zusammenarbeit mit einer Reihe engagierter Menschen der Universität Rostock sowie anderer Institute im In- und Ausland, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle gebührt mein größter Dank Herrn Dr. Ralf Kriehuber, der meine Promotionsarbeit betreute und mir auch nach seinem beruflichen Wechsel an das Forschungszentrum Jülich stets kompetent mit Rat und Tat zur Seite stand. Er gab mir das Rüstzeug für ein erfolgreiches, wissenschaftliches Arbeiten mit auf den Weg und förderte zugleich meine Fähigkeiten wie Selbständigkeit, Verantwortungsbewusstsein und Zielstrebigkeit. Ich weiß diese Unterstützung äußerst zu schätzen.

Meinem Erstgutachter Prof. Dr. Dieter G. Weiss danke ich für die Durchführbarkeit meiner Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Rostock und für den nötigen Freiraum, den er mir in der Umsetzung eigener Ideen gewährte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Universität Rostock danke ich für die finanzielle Förderung meiner Promotionsarbeit. In gleichem Atemzug danke ich den Organisatoren, Stipendiaten und Assoziierten des Graduiertenkollegs, allen voran der Sprecherin Prof. Dr. Adelinde M. Uhrmacher, für die sehr guten Rahmenbedingungen, den interessanten Erfahrungsaustausch und die attraktiven Weiterbildungsmöglichkeiten während meiner Promotion.

Einen unerlässlichen Beitrag für das Gelingen meiner Promotionsarbeit leisteten die technischen Assistentinnen Birgit Wobith und Bärbel Redlich sowie die Studenten Dipl.-Biol. Nicole Reich, Dipl.-Biol. Susanne Klum, Dipl.-Biol. Michael Fröhlich, Jana Baake und Dipl.-Biol. Benjamin Bader, die mich in der praktischen Arbeit unterstützten und zu einem sehr guten Arbeitsklima beitrugen. Zudem danke ich den Sekretärinnen des Lehrstuhls Tierphysiologie Maren Bagrowski und Annegret Mahrwald für ihre Allround-Tätigkeiten.

Für die Unterstützung bei der technischen Umsetzung bezüglich der Beantwortung fachlicher Fragestellungen danke ich Dr. Ralf Kriehuber und Dominik Oskamp (FZ Jülich GmbH), Dr. Margareta Lantow (Uni Rostock), Dr. Jana Frahm und Dipl.-Biol. Rayk Hübner (Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration, Rostock), Dr. Torsten Viergutz und Mitarbeitern (FBN Dummerstorf) und der Abteilung Genetik sowie dem Mikroskopiezentrum der Universität Rostock.

Der Arbeitsgruppe „Physiology and Medical Physics“ unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Prehn am RCSI in Dublin/Irland und insbesondere dem dortigen Mitarbeiter Dr. Hans-Georg König danke ich für den mir ermöglichten Forschungsaufenthalt, wodurch sich unter anderem mein wissenschaftlicher Horizont immens erweitert hat.

Wer wäre ich ohne meine Familie und Freunde? Ich danke Euch auf das Herzlichste für Eure Rückenstärkung in jeder Lebenssituation! Meinen Eltern widme ich meine Promotionsarbeit, weil ich es Ihnen zu verdanken habe, dass ich mir dieses gesetzte Lebensziel erfüllen konnte.

Lebenslauf

Studium

- 10/2001 – 10/2006 Biologiestudium und Diplomarbeit an der Universität Rostock, Thema: „Die Induktion der "common deletion" in Säugerzellen nach Exposition mit UV-A und ultrafeinen Partikeln als Marker für oxidativen Stress“, betreut durch Dr. Ralf Kriehuber und Prof. Dr. Dieter G. Weiss
- 11/2006 – 01/2010 Promotion an der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Tierphysiologie, Graduiertenkolleg „dIEM oSiRiS“, DFG-Stipendium und ergänzende Förderung der Universität Rostock, Thema: „Charakterisierung von Apoptoseprozessen während der Differenzierung von humanen neuronalen VM197-Progenitorzellen *in vitro*“, betreut durch Dr. Ralf Kriehuber (Forschungszentrum Jülich GmbH) und Prof. Dr. Dieter G. Weiss

Forschungsaufenthalte

- November 2007 Dr. Ralf Kriehuber, Geschäftsbereich Sicherheit und Strahlenschutz, Teamleiter S-US Strahlenbiologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich; “DNA-Microarray-basierte Genexpressionsanalysen anhand der humanen neuronalen Progenitorzelllinie VM197 während der Differenzierung“
- Mai - Juli 2009 Prof. Jochen Prehn, Chair of Physiology, Head of Department Physiology & Medical Physics, Royal College of Surgeons in Ireland (RCSI), 123 St Stephens Green, Dublin 2, Ireland; “Analysis of cellular susceptibility to apoptosis of VM197 cells by using APOPTO-CELL - a simulation tool and interactive database”

Publikationen

Jaeger A, Characterization of apoptosis-pathways in human neuronal progenitor cells. Dagstuhl Meeting “zehn plus eins” 2007 (event 07232), June 3rd - 7th 2007, Dagstuhl-Band, p. 161-162; Book, Aachen: Verlag Mainz, 2007.-II, 208 S., ISBN: 3-86130-882-7.

Jaeger A, Klum S, Weiss DG, Kriehuber R. Expression of apoptosis-related proteins during differentiation in the human neuronal progenitor cell line VM 197. GBM Fall Meeting – Molecular Life Sciences 2007, Hamburg, September 16th - 19th 2007, Abstract Book, Edt. T. Apel; University of Hamburg; Germany; p.37 (2007); online reference [DOI: 10.1240/sav_gbm_2007_h_001975].

Jaeger A, Klum S, Weiss DG, Kriehuber R. The differentiation of human neuronal progenitor cells is accompanied by apoptotic cell death – a protective role of Bcl-2? Apoptosis World 2008 – From mechanisms to applications, Luxembourg, January 23rd - 26th 2008, Abstract Book, Edt. M. Diederich; European Conference Center Kirchberg-Luxembourg, Luxembourg; p.88 (2008).

Jaeger A, Klum S, Weiss DG, Kriehuber R. Expression profile of apoptosis-related genes during differentiation in the human neuronal progenitor cell line VM197. 31st Annual Meeting of the German Society for Cell Biology 2008, Marburg/Lahn, Germany, March 12th - 15th 2008, European Journal of Cell Biology, Volume 87S1, Suppl. 58, p.18, ISSN 0171-9335 (2008).

Jaeger A, Bader BM, Weiss DG, Kriehuber R. Apoptosis in the human neural progenitor VM197 cell line – a life or death decision during the early differentiation process. 2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation 2008, Dresden, July 6th - 9th 2008, Abstract Book, International Congress Center Dresden, Germany; p.251 (2008).

Jaeger A, Klum S, Kriehuber R. Apoptosis susceptibility is reduced in differentiated VM197 cells. 1st Joint Congress of the Swiss and German Societies for Cell Biology – 32nd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ), Konstanz, Germany, March 24th – 27th 2009, European Journal of Cell Biology 88S1, Suppl. 59, p.41 (2009).

Jaeger A, Fröhlich A, Viergutz T, Weiss DG, Kriehuber R. Activation of apoptosis pathways during the on-set of differentiation of human neural progenitor cells *in vitro*. 19th Annual Conference of the German Society for Cytometry (DGFZ), Leipzig, Germany, October 14th - 16th 2009, Abstract Book, p.62 (2009).

Fröhlich M, Jaeger A, Weiss DG, Kriehuber R. Specific inhibition of Bcl-2 leads to diminished neuronal differentiation in VM197 cells. 19th Annual Conference of the German Society for Cytometry (DGFZ), Leipzig, Germany, October 14th – 16th 2009, Abstract Book, p.63 (2009).

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 08.04.2010

Alexandra Jaeger