

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
Direktorin Univ.-Prof. Dr. med. A. Flöel
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Einfluss von Insulin-like Growth Factor-1 auf die Differenzierung und Expansion von
fetalen mesenzephalen neuronalen Precursorzellen der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Tobias Ehle
geb. am: 29.08.1982
in: Schorndorf

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Kessler

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. G. Deuschl

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Raum D-0.30.

Tag der Disputation: 12.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Überblick	1
1.2 NPCs und NSCs in der Grundlagenforschung und in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen	3
1.3 IGF-1 in vivo	6
1.4 Der IGF-1-Rezeptor und IGF-1-abhängige Signalwege.....	8
1.5 Vorherige Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe.....	12
2 Zielsetzung	14
3 Material und Methoden	16
3.1 Materialien.....	16
3.1.1 Substanzen.....	16
3.1.2 Antikörper	17
3.1.3 ELISA FACE™ Kit (Active Motif, Carlsbad, USA)	18
3.1.4 Antikörper für ELISA-Experimente von FACE™ (Active Motif, Carlsbad, USA)	18
3.1.5 Lösungen	19
3.1.6 Hilfsmittel	21
3.1.7 Geräte	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Versuchstiere.....	23
3.2.2 Präparation des pränatalen Mesenzephalon der Ratte.....	23
3.2.3 Kultivierung von fmNPCs der Ratte	23
3.2.4 Experimentelle Bedingungen der Expansion und Differenzierung von fmNPCs der Ratte	24
3.2.5 Immunzytochemische Färbungen	26
3.2.5.1 Färbung mit PI und Hoechst 33342.....	26

3.2.5.1.1	Vorgehensweise bei der Untersuchung überlebenssteigernder Effekte von IGF-1 auf fmNPCs der Ratte	26
3.2.5.2	Färbungen mittels spezifischer Antikörper	27
3.2.5.2.1	Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das Proliferationspotential von fmNPCs der Ratte	27
3.2.5.2.2	Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das Differenzierungsverhalten von fmNPCs der Ratte	30
3.2.5.2.3	Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors von fmNPCs der Ratte	31
3.2.6	Auswertung der immunzytochemischen Färbungen	33
3.2.7	ELISA-Experimente	34
3.2.8	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	IGF-1 erhöht die Überlebensrate von fmNPCs der Ratte während der Expansion und Differenzierung	37
4.2	AG 1024 inhibiert den überlebenssteigernden Effekt von IGF-1 auf fmNPCs der Ratte während der Differenzierung, nicht aber während der Expansion	38
4.3	IGF-1 steigert das Proliferationspotential von fmNPCs der Ratte	43
4.4	IGF-1 induziert die Neurogenese, zeigt aber keinen Einfluss auf die Astro- und Oligodendrogenese von fmNPCs der Ratte	47
4.5	IGF-1 fördert die Expression des IGF-1-Rezeptors von fmNPCs der Ratte während deren Differenzierung	54
4.6	IGF-1 inhibiert den PI3-Kinase-Signalweg und fördert die Aktivität von ERK1/2 in fmNPCs der Ratte	58
5	Diskussion	63
5.1	Strategien zur Zellersatztherapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms	63
5.2	IGF-1 und Neurosurvival	74
5.3	IGF-1 und Erhalt des Proliferationspotentials	82

5.4 IGF-1 und neurale Differenzierung	86
5.5 Ausblick.....	93
6 Zusammenfassung.....	95
7 Literaturverzeichnis.....	98
Anlagen	

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
AG 1024	Tyrphostin/IGF-1-Rezeptor-Inhibitor
BrdU	Bromdesoxyuridin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNAse	DNA-abbauendes Enzym
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM-1	Serumfreies Zellkulturmedium (Expansionsmedium)
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
ESC	Embryonic Stem Cell
FGF	Fibroblast Growth Factor
fmNPC	Fetal mesencephalic neural Precursor Cell
GalC	Galactocerebrosidase
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial fibrillary acidic Protein
GH	Growth Hormone
GIGYF	Grb 10 interacting GYF Protein
Grb	Growth Factor receptor-bound Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom

IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
JNK	C-Jun-N-terminal Kinase
MAP2	Microtubule-associated Protein 2
MAP	Mitogen-activated Protein
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
mRNA	Messenger ribonucleic Acid
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-Cells
NPC	Neural Progenitor Cell/Neural Precursor Cell
NSC	Neural Stem Cell
Nurr1	Nuclear receptor related Protein 1
P4-8F	Differenzierungsmedium
PBS	Phosphat-buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3	Phosphatidylinositol 3
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat
Pitx-3	Paired-like Homeodomain Transcription Factor-3
Ras	Rat Sarcoma
SVZ	Subventrikulärzone
TH	Tyrosin Hydroxylase
U	Umdrehung
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Überblick

In den letzten Jahren haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit dem Einfluss von Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) auf verschiedene Arten peripherer Zelltypen, wie z. B. Leber-, Pankreas- und Knochenzellen, beschäftigt und dabei antiapoptotische Effekte von IGF-1 festgestellt. Auch für neurale Zellarten, wie ausdifferenzierte Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems, wurden antiapoptotische und neuroprotektive Effekte von IGF-1 beschrieben [1-9]. Darüber hinaus fand man, dass IGF-1 auch die Expansion bzw. Proliferation und Differenzierung von embryonalen Stammzellen („embryonic stem cells“ [ESCs]) beeinflusst [10] und diese Effekte insbesondere auch im Zusammenhang mit neuronalen Stammzellen („neural stem cells“ [NSCs]) und neuronalen Progenitorzellen („neural progenitor cells“ [NPCs]) beobachtet werden [11-20].

Weiterhin ist seit einigen Jahren bekannt, dass verschiedene dieser IGF-1-Effekte auf molekularer Ebene über den Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3-Kinase)/Akt (Proteinkinase B [PKB])-Signalweg vermittelt werden. Dieser beeinflusst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) oder FKHRL1, welche wiederum die Transkription apoptoserelevanter Gene regulieren [6,7,21-23]. Aber auch eine Beteiligung des Extracellular signal-regulated Kinase (ERK)-Signalweges an der IGF-1-Signaltransduktion wurde von einigen Arbeitsgruppen beobachtet [18,24-27]. Publikationen der eigenen Arbeitsgruppe konnten die Bedeutung sowohl des PI3-Kinase/Akt- als auch des ERK-Signalweges für die neuronale bzw. neurogliale Differenzierung von fetalen mesenzephalen neuronalen Precursorzellen („fetal mesencephalic neural precursor cells“ [fmNPCs]) der Ratte zeigen [28,29].

Die vorliegende Arbeit wurde ebenfalls an fmNPCs der Ratte durchgeführt. Damit knüpft sie an frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an. Untersucht wurde der Einfluss von IGF-1 auf das Überleben der fmNPCs, deren Proliferationspotential und Expression des IGF-1-Rezeptors sowie deren neurales, oligodendrogliales und astrogliales Differenzierungsverhalten. Darüber hinaus wurden IGF-1-abhängige Signaltransduktionswege in der Frühphase der Differenzierung der fmNPC verifiziert.

Durch die Untersuchungen an fmNPCs der Ratte in vitro soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen, deren Stammzellverhalten im Hinblick auf diese Fragestellungen besser zu

Einleitung

verstehen. Von besonderem Interesse ist dabei das neurale Differenzierungsverhalten der fmNPCs. Das bessere Verständnis der diesen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen kann einen Beitrag dazu leisten, zukünftige Entwicklungen kurativer Therapieansätze neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS), voranzutreiben. Auch erhofft man sich die Verbesserung pharmakologischer Therapien und neuroprotektiver Ansätze dieser Krankheitsbilder.

In der Pathogenese des IPS spielt der Untergang dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra des Mittelhirns eine entscheidende Rolle [30]. Daraus resultiert ein Verlust der nigrostriatalen Projektion dieser Neurone und es kommt zu einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Striatum, einem Teil der Basalganglien [31]. Das klinische Erscheinungsbild geht mit einer hypokinetisch-rigiden Bewegungsstörung einher und äußert sich typischerweise mit den Kardinalsymptomen Rigor, Tremor und Hypokinese [32-34], wobei nicht alle dieser Kardinalsymptome am Beginn der Krankheit vorhanden sein müssen und ein Teil der Patienten gar keinen Tremor entwickelt.

Als weiteres Kardinalsymptom des IPS wird die posturale Instabilität angesehen, welche sich durch eine Störung der Stell- und Haltereфлекse äußert [35]. Mit Fortschreiten der Erkrankung treten zudem neuropsychiatrische Symptome [36], sowie weitere nicht-motorische fakultative Symptome wie Obstipation, Blasenentleerungsstörungen, erektile Dysfunktion und sensorische Beeinträchtigungen auf [37,38]. Diese führen zusammen mit den motorischen Symptomen zu einer zunehmenden Einschränkung der Lebensqualität betroffener Patienten. Die derzeitigen Möglichkeiten der Behandlung umfassen die pharmakologische Therapie und supportive Maßnahmen wie Physiotherapie, Logopädie, Ergotherapie und psychosoziale Betreuung. Ergänzt wird dieser Maßnahmenkatalog durch eine operative Therapieoption, die jedoch lediglich bei Patienten mit schweren motorischen Defiziten oder erschöpfter konservativer Behandlungsmöglichkeiten zum Einsatz kommt. Heute wird hierbei hauptsächlich die operative Technik der Tiefenhirnstimulation angewandt, bei der Stimulationselektroden in definierte Hirnregionen eingesetzt werden. Dadurch können neuronale motorische Regelkreise moduliert werden. Somit lassen sich Spätfolgen der Krankheit und der pharmakologischen Therapie wirkungsvoll mildern [39], sowie insbesondere Tremor und Rigor deutlich reduzieren [40].

Die heutige Therapie des IPS zeigt bei frühzeitigem Beginn, im Vergleich zu nicht konsequent behandelten Patienten, durchaus eine lebensverlängernde Wirkung [41]. Mit den

genannten Behandlungsverfahren bleibt sie jedoch eine Therapie der Symptomreduktion. Als solche erweist sie sich oft als nicht zufriedenstellend, nicht zuletzt aufgrund der Limitationen und möglichen Spätfolgen einer langjährigen Levodopatherapie. So gibt es bis heute keinen etablierten kurativen Therapieansatz, der in der Lage ist, die degenerativen Prozesse auf molekularer bzw. zellulärer Ebene aufzuhalten.

In den letzten Dekaden hat sich durch intensive Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der kurativen Therapiemöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen die Zellersatztherapie als eine mögliche Option herauskristallisiert. Wie für das IPS beispielhaft erläutert, spielt in der Pathogenese der meisten dieser Erkrankungen der Untergang von neuronalen Zellpopulationen und damit der Verlust neuronaler Botenstoffe, sogenannter Neurotransmitter, eine entscheidende Rolle. Naheliegend ist deshalb der therapeutische Ersatz untergegangener Nervenzellen durch das Einbringen intakter Nervenzellpopulationen in das zentrale Nervensystem (ZNS), welche die funktionale Integrität wiederherzustellen vermögen.

Eine ausführliche Abhandlung von Strategien zu stammzellbasierten Therapieverfahren des IPS erfolgt im Kapitel 5.1.

Im restlichen Kapitel 1 wird der Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit näher vorgestellt. Im Kapitel 2 die Zielsetzung konkretisiert. Kapitel 3 und 4 bilden die Experimente ab, worauf schließlich in Kapitel 5 die Ergebnisse diskutiert und in einen breiteren Kontext gestellt werden. Kapitel 6 fasst die Arbeit abschließend zusammen.

1.2 NPCs und NSCs in der Grundlagenforschung und in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen

Wie im letzten Kapitel bereits angedeutet, sind NPCs und NSCs eine viel versprechende Zellquelle für Zellersatztherapiestrategien im ZNS [42]. So konnte gezeigt werden, dass transplantierte NPCs Synapsen ausbilden können, was für eine funktionelle Integration in das ZNS des Wirtes spricht [43]. Weiterhin führte die Transplantation von NPCs/NSCs in verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen zu einer funktionellen Verbesserung, unter anderem im Parkinson-Rattenmodell [44-47] und auch am Menschen wurden Proof-of-Principle Studien zur Transplantation von NSCs bei IPS durchgeführt [48-52]. Mittlerweile wurden darüber hinaus klinische Studien zu stammzellbasierten Therapien des IPS initiiert (siehe Kapitel 5.1).

Einleitung

NPCs/NSCs lassen sich aus dem fötalen Gehirn extrahieren [53-55] oder können u. a. aus ESCs gewonnen werden [53,56-59]. Außerdem besteht die Möglichkeit, NPCs/NSCs aus verschiedenen Bereichen des adulten Gehirns zu gewinnen. Bekannt ist, dass sich NPCs/NSCs aus der Subventrikulärzone (SVZ) in der lateralen Wand des Seitenventrikels sowie aus dem Gyrus dentatus des Hippocampus, aber auch aus einigen nicht-neurogenen Regionen isolieren lassen [53,54,60-64]. Als Abkömmlinge des neuroektodermalen Gewebes sind NSCs in der Lage, sich in alle Zelltypen des ZNS – also in Neurone, Astroglia und Oligodendroglia – zu differenzieren. Dabei durchlaufen sie verschiedene proliferative Stadien, wie in Abbildung 1.1 zu sehen ist [53,54,65].

Wichtig für die experimentelle Arbeit mit NPCs/NSCs ist die Erkenntnis, dass sie sich nach ihrer Isolation über einen längeren Zeitraum in Zellkultur expandieren lassen und während der Expansion weder ihr Proliferations- und Selbsterneuerungspotential, noch ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren [62]. Unter experimentellen Bedingungen, während der Expansion *in vitro*, wachsen NSCs in multizellulären Aggregaten, so genannten „Neurosphären“, oder als adhärenzte Kultur [54,60,63,65,66]. Durch den Entzug von Mitogenen wie Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) kann jederzeit ein spontaner Differenzierungsprozess der NSCs provoziert werden. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe mit fmNPCs der Ratte konnten zeigen, dass sich diese hauptsächlich zu Astrozyten ($37 \pm 7\%$) und zu kleineren Anteilen in Oligodendrozyten ($13 \pm 1\%$) und Neurone ($23 \pm 1\%$) differenzieren [28]. Um zukünftig das ganze Potential von NPCs/NSCs in kurativen Zellersatztherapien ausschöpfen zu können ist es von entscheidender Bedeutung, diejenigen Mechanismen noch besser zu verstehen, die dieser Differenzierung – aber auch der Expansion – zugrunde liegen.

Wie aus Stammzellen Neuronen werden

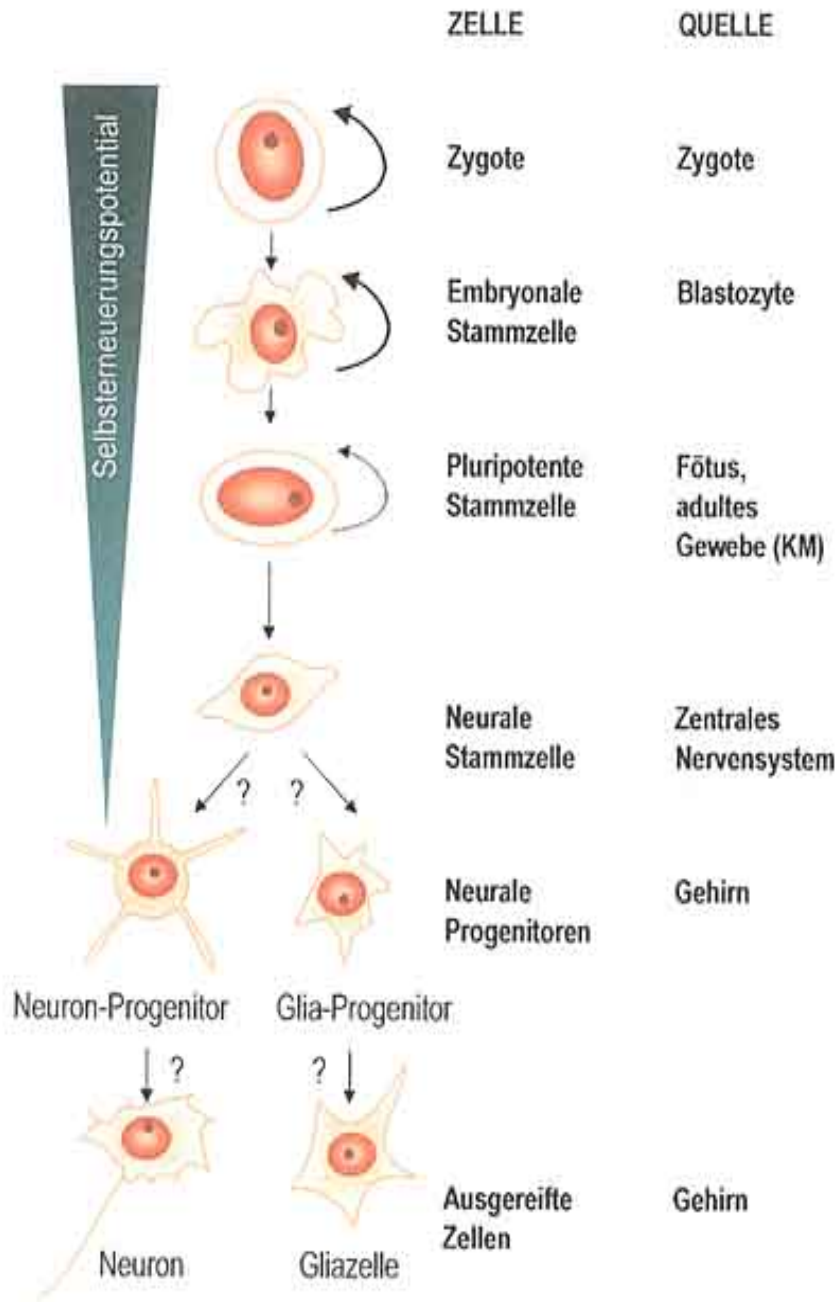


Abbildung 1.1: Differenzierung neuraler Stammzellen

(Quelle: http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/ruca3_2001/multitalente.html)

1.3 IGF-1 in vivo

IGF-1 ist ein zirkulierendes Polypeptidhormon und lokal wirksamer Wachstumsfaktor mit endokriner, parakriner und autokriner Funktion [1,67-69]. Chemisch betrachtet besteht IGF-1 aus einer einzelnen Kette von 70 Aminosäuren mit drei intramolekularen Disulfidbrücken und hat ein Molekulargewicht von etwa 7,6 kDa [70] (siehe Abbildung 1.2). Es gehört zu einer Superfamilie von strukturell ähnlichen Proteinen, zu der auch Insulin und IGF-2 gehören. Neben der lokalen Produktion von IGF-1 im Gewebe ist die Leber der wichtigste Bildungsort von zirkulierendem IGF-1 [1,67-69,71]. Dabei steht das von der Leber produzierte IGF-1 unter der Kontrolle des hypophysären Wachstumshormon („growth hormone“ [GH]), welches über spezifische Rezeptoren die Bildung und Sekretion von IGF-1 steuert [1,67-69]. Im Sinne eines hormonellen Regelkreises wirkt IGF-1 wiederum über eine Feedback-Regulation inhibierend auf die GH-Freisetzung [72]. Weiterhin sind zahlreiche gewebe- und entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren in die IGF-1-Expression involviert.

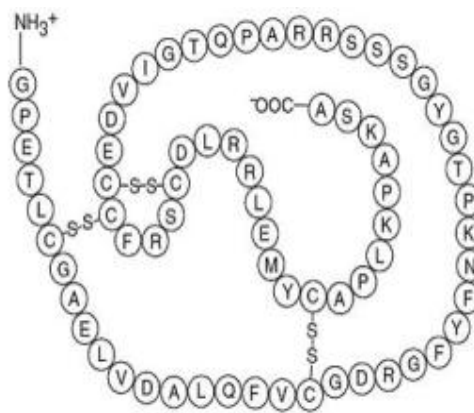


Abbildung 1.2: Chemische Struktur von IGF-1

(Quelle: <http://pblnotes.wordpress.com/2010/05/13/growth-hormone-and-igf/>)

Die Ergebnisse zahlreicher Studien belegen, dass IGF-1-/IGF-1-Rezeptor-abhängige Signalwege wichtig sind für das Zellüberleben und die Verhinderung von apoptotischem Zelltod in verschiedenen Zelltypen wie zum Beispiel Osteoblasten [73], Herzmuskelzellen [8] oder Epithelzellen [74]. Auch für Tumorzellen, wie beispielsweise Myelomzellen [5] oder Neuroblastomzellen [9] scheint IGF-1 ein wichtiges Überlebenssignal zu sein, weshalb

Einleitung

eine Rolle von IGF-1 bei der Krebsentstehung und für das Tumorwachstum vermutet wird [75,76].

Im sich entwickelnden und adulten ZNS ist IGF-1, wie auch Insulin und IGF-2 mitsamt den entsprechenden Rezeptoren, weit verbreitet [77]. In vitro-Studien mit Zellsystemen sowohl adulter Neurone, als auch NPCs adulten und embryonalen Ursprungs, konnten den Einfluss von IGF-1 auf das Überleben, die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen darlegen (siehe Kapitel 5.2 bis 5.4).

Gestützt werden diese Ergebnisse durch in vivo-Studien mit Knock-Out und transgenen Mausmodellen (siehe Kapitel 5.2). Diese haben ebenfalls gezeigt, dass IGF-1 das Zellüberleben, die Proliferation und Differenzierung von allen neuralen Zelllinien beeinflusst und während der Embryonalperiode die Proliferation der NPCs [78] sowie später die Ausbildung von Synapsen und Dendriten in Projektionsneuronen fördert [79,80].

In Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen konnte weiterhin belegt werden, dass Störungen in der IGF-1-Signalübertragung mit diesen Erkrankungen assoziiert sind [81], wohingegen die Behandlung mit IGF-1 die Reparatur und Regeneration von Nervenzellen fördert [82]. Beispielsweise konnte IGF-1 in Tiermodellen des IPS vor dem Verlust dopaminerger Neurone schützen [83]. Diese Ergebnisse lassen ein theoretisches Potential von IGF-1 vermuten von dem gegebenenfalls auch Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen profitieren könnten. Wenn auch nicht im Sinne einer kurativen Therapieoption, so möglicherweise in Form einer präventiven, neuroprotektiven oder verbesserten begleitenden pharmakologischen Behandlung [22].

Interessant ist, dass IGF-1 nicht nur den Erhalt der zellulären Integrität im ZNS fördert, sondern auch eine wichtige Rolle für höhere Gehirnfunktionen wie Gedächtnis, Lernen oder Verhalten, sowie beim Alterungsprozess des Gehirns zu spielen scheint. Diese Wirkungen werden entweder über systemisch zirkulierendes IGF-1 via Blut-Hirn-Schranke oder lokal durch eine gehirnspezifische Expression von IGF-1 innerhalb des ZNS vermittelt [84-86].

Auch für das Immunsystem scheint IGF-1 eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen. So wird es in verschiedenen Zellen des Immunsystems gebildet, wie zum Beispiel in Makrophagen [87] oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes [88], sowie in Stromazellen des Knochenmarks, welche durch die Sekretion von IGF-1 möglicherweise regulierend auf die Hämatopoese einwirken [89]. Da die Bildung von IGF-1 im Immunsystem nicht durch das GH, sondern durch Zytokine gesteuert wird [90-93], ist denkbar, dass es selbst als Teil eines Regelkreises von Zytokinen agiert, welche apoptotische Prozesse sekundär durch den

Einfluss auf das Überleben neutrophiler Granulozyten beeinflussen. Außerdem könnte IGF-1 an der Regulation entzündlicher Reaktionen beteiligt sein, beispielsweise durch die Stimulation der Bildung von Superoxid-Anionen [94], der Aufnahme von IgG-markierten Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und durch die Degranulation von Neutrophilen [95]. Des Weiteren haben sich zahlreiche Studien mit der Identifikation verschiedener Isoformen von IGF-1 beschäftigt, um deren funktionelle Bedeutung näher zu charakterisieren [4,96-101]. So konnte in der Skelettmuskulatur und im Nervengewebe eine lokal wirksame IGF-1-Isoform beschrieben werden. Diese scheint Zellreparaturmechanismen zu beschleunigen, indem sie in zahlreiche zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, die Rekrutierung von Stammzellen, die Neoangiogenese oder in Apoptoseresistenzmechanismen eingreift und somit den Regenerationsprozess unterstützt [4,96-101].

1.4 Der IGF-1-Rezeptor und IGF-1-abhängige Signalwege

Wie bereits im Kapitel 1.3 erläutert, ist IGF-1 sowohl ein zirkulierendes Polypeptidhormon als auch lokal wirksamer Wachstumsfaktor und spielt eine wichtige Rolle für die normale Entwicklung und Erhaltung der zellulären Integrität des Organismus, inklusive eines weiten Wirkungsspektrums im peripheren und zentralen Nervensystem [1,2,22,67,68,79].

Wie beim Insulin werden die biologischen Funktionen der IGFs über spezifische Rezeptoren, die Rezeptortyrosinkinasen, vermittelt. IGF-1 bindet dabei mit größter Affinität an den IGF-1-Tyrosinkinase-Rezeptor (IGF-1-Rezeptor), welcher ein Molekulargewicht von etwa 450 kDa aufweist [102] und hauptsächlich für die Vermittlung der IGF-1-Effekte verantwortlich ist [67,103]. Auf struktureller Ebene besteht dieser aus zwei extrazellulären Alpha-Ketten, die für die Ligandenbindung zuständig sind und zwei intrazellulären Beta-Ketten, die eine Tyrosinkinasedomäne aufweisen, welche die meisten intrazellulären Effekte vermittelt.

Auch Insulin vermag an den IGF-1-Rezeptor zu binden, was auf eine Kreuzreaktivität mit dem Insulin-Rezeptor, aufgrund struktureller Ähnlichkeiten der beiden Rezeptoren, zurückzuführen ist [104]. Jedoch ist die Affinität des IGF-1-Rezeptors für Insulin um den Faktor 1000 geringer als für IGF-1 [105]. Wichtig für die physiologischen Wirkungen von IGF-1 und damit auch für die Interaktion von IGF-1 mit dem IGF-1-Rezeptor, sind weiterhin sogenannte IGF-Bindungsproteine („IGF-binding proteins“ [IGFBPs]) [106]. Sie gehören zu einer Familie von bisher sechs definierten Proteinen ähnlicher Struktur (IGFBP 1-6) [107], die mit hoher Affinität an IGF-1 und IGF-2 binden und somit die IGF-1-Effekte modulieren [108]. Für alle sechs IGFBPs ist bekannt, dass sie IGF-1-Effekte inhibieren, wobei für das

Einleitung

IGFBP-1, IGFBP-3 und IGFBP-5 auch stimulierende Wirkungen nachgewiesen wurden [108].

Darüber hinaus sind die IGFBPs wichtig für die Regulation des IGF-1-Blutspiegels. Zirkulierendes IGF-1 ist zu mehr als 90 % an das IGFBP-3 gebunden, welches dadurch die Halbwertszeit von IGF-1 verlängert und somit ein IGF-1-Reservoir schafft [109]. Für die Interaktion von IGF-1 mit dem IGF-1-Rezeptor spielen die IGFBPs eine entscheidende Rolle. Durch deren Phosphorylierung oder Proteolyse wird die Affinität von IGF-1 zum IGF-1-Rezeptor moduliert [106,108].

Neben den IGFBPs sind zahlreiche weitere Proteine an der Modulation des IGF-1-Rezeptors und der IGF-1-Signalkaskade beteiligt. Eines davon ist Grb10, ein Adaptorprotein, welches an die intrazelluläre Domäne des IGF-1-Rezeptors bindet. Über Grb10 werden kurzzeitig Grb10-interacting GYF Protein 1 und Grb10-interacting GYF Protein 2 (GIGYF 1 und GIGYF 2) an den IGF-1-Rezeptor gebunden und können dadurch die IGF-1-Signaltransduktion regulieren [110]. Von großem Interesse in diesem Zusammenhang sind Hinweise darauf, dass Mutationen in jenem Park 11 Gen, das für GIGYF 2 kodiert, zu einem familiären Parkinson-Syndrom führen [111].

Bindet IGF-1 an den IGF-1-Rezeptor führt dies zur Autophosphorylierung und damit zur Stimulation der intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors. Dadurch werden intrazelluläre, mit dem IGF-1-Rezeptor assoziierte Substrate wie Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) phosphoryliert [6,103,112,113], was wiederum zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege führt.

Einer dieser Signalwege ist der PI3-Kinase/Akt-Signalweg [2,21,22,114]. Die PI3-Kinasen sind eine Familie von acht verschiedenen Enzymen, die anhand ihrer Struktur und Funktion in drei Klassen unterteilt werden können [115]. Dabei wurden bisher hauptsächlich die Klasse-1-PI3-Kinasen in Studien untersucht, da sie im Allgemeinen an der Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli beteiligt sind [115]. PI3-Kinasen sind Heterodimere, bestehend aus der katalytischen Untereinheit p110 und der regulatorischen Untereinheit p85 oder p55 [116]. In der weiteren, durch IGF-1 angeregten, Signalübertragung ist die Proteinkinase Akt der Hauptvermittler der PI3-Kinase-Aktivität [117]. Die durch das phosphorylierte IRS-1 aktivierte PI3-Kinase katalysiert zunächst die Umwandlung von Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP₃) [118]. Dann interagiert PIP₃ mit Akt, das dadurch zur Plasmamembran gelangt und dort von der

Einleitung

Phosphoinositol-dependent Kinase 1 und 2 (PDK1 und PDK2) phosphoryliert wird [119-121]. Dieser Vorgang aktiviert Akt und steigert somit deren katalytische Aktivität.

Akt hat in der weiteren Signalübertragung verschiedene antiapoptotische Substrate. Einerseits unterdrückt Akt die Apoptose transkriptionsunabhängig durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung von zellulären Bestandteilen des Apoptoseprogramms. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von BCL-2-Antagonist of Cell Death (BAD), einem Mitglied der B-Cell Lymphoma-2-Familie (BCL-2) [117,122,123] oder die Phosphorylierung der Caspase 9 [124,125], welche beide wichtige Regulatoren des programmierten Zelltodes sind, die dadurch inaktiviert werden. Andererseits gelangt Akt in den Zellkern, wo es Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und damit in der Lage ist, die Transkription apoptoserelevanter Gene zu regulieren. Für das zelluläre Apoptoseprogramm wichtige Transkriptionsfaktoren sind zum Beispiel FKHRL1, ein Mitglied der Forkhead-Familie von Transkriptionsfaktoren [124,126], sowie der NF- κ B [6]. Dieses Protein besteht aus Homo- und Heterodimeren, die Mitglieder der Rel-Protein-Familie sind. Zu dieser gehören strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren, die dahingehend gut untersucht sind, die Expression zahlreicher Gene zu regulieren, welche an immunologischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sind [127,128]. Häufig präsentiert sich NF- κ B als ein Heterodimer mit einer Untereinheit p50 von 50 kDa Molekulargewicht und einer Untereinheit p65 mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. In dieser Form wird NF- κ B von inhibitorischen Proteinen der I κ B-Familie im Zytoplasma gehalten, wobei I κ Ba das am besten untersuchte Mitglied dieser Familie ist [129,130].

Die Phosphorylierung aller beispielhaft erwähnten und gut untersuchten Transkriptionsfaktoren durch die Proteinkinase Akt führt dazu, dass diese den Zellkern verlassen und sich ihr Transkriptions-Programm ändert [124]. Das wiederum führt zu antiapoptotischen Signalwegen [1,67-69], der Vorbereitung für den Einstieg in den Zellzyklus und zum Wachstum der Zelle [131].

Neben dem PI3-Kinase/Akt-Signalweg ist der Mitogen-activated Protein (MAP)-Kinase-Signalweg ein weiterer intrazellulärer Signalweg, der durch die Bindung von IGF-1 an den IGF-1-Rezeptor aktiviert werden kann. In der weiteren Signaltransduktion steht eine mögliche Aktivierung der ERK, C-Jun-N-terminale-Kinase (JNK) und p38 im Mittelpunkt [132]. Wie bereits erläutert, führt die IGF-1-Bindung zur Autophosphorylierung des IGF-1-Rezeptors, wodurch dessen intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität angeregt wird. Dadurch werden Tyrosinreste auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors phosphoryliert.

Einleitung

Diese Phosphotyrosinreste bilden dann Andockstellen für weitere Signaltransduktionsmoleküle.

Für die Aktivierung der ERK ist das Adaptorprotein Growth Factor receptor-bound Protein 2 (Grb2) ein solches Signaltransduktionsmolekül, das an die Phosphotyrosinreste andockt. Es bildet einen Komplex mit dem Protein Son of Sevenless (SOS), welches als Guanosin-Triphosphat (GTP)-Austauschfaktor fungiert. Dieser Proteinkomplex aktiviert das Rat Sarcoma (Ras)-Protein an der Plasmamembran. Ras gehört zur Familie der G-Proteine. Es ist im GTP-beladenen Zustand aktiv und kann weitere Substrate aktivieren. Im GDP-beladenen Zustand ist Ras inaktiv. SOS ist in der Lage Ras zu aktivieren, indem es Guanindiphosphat (GDP) mit GTP austauscht und somit die Bildung von Ras-GTP induziert.

Das aktivierte Ras (Ras-GTP) kann jetzt die Signaltransduktion fortführen. Es aktiviert zunächst Raf (MAP Kinase Kinase Kinase), das wiederum MEK (MAP Kinase Kinase) phosphoryliert und damit aktiviert. Das aktivierte MEK phosphoryliert letztlich ERK. Dieses ist, wie auch Akt, in zahlreiche zelluläre Prozesse eingebunden, indem es weitere Substrate wie beispielsweise Proteinkinasen, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren beeinflusst [133,134]. Eine schematische Übersicht über die beschriebenen Signaltransduktionswege zeigt Abbildung 1.3.

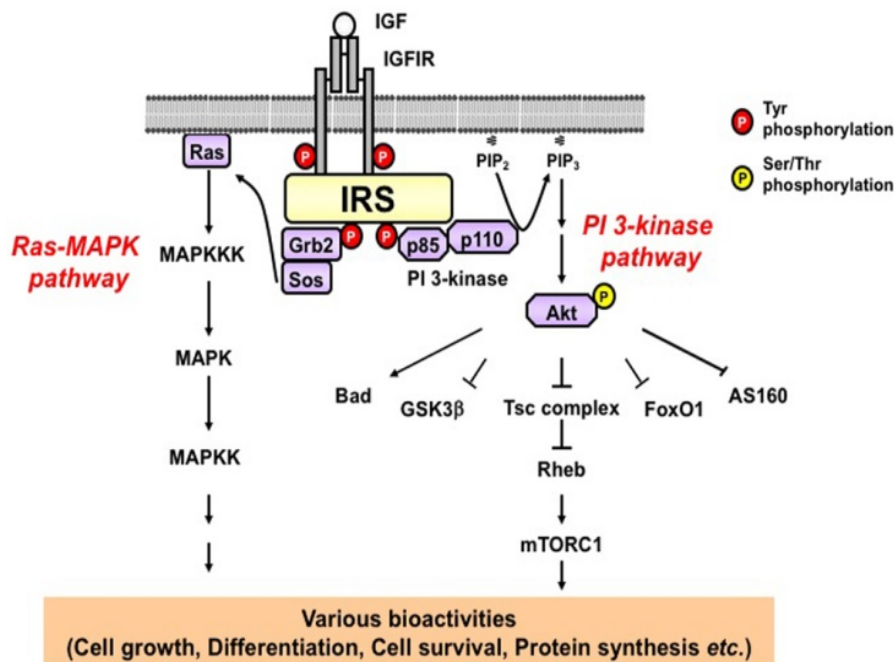


Abbildung 1.3: Intrazelluläre Signaltransduktion von IGF/Insulin (Quelle: Figure 1 [135])

Während die Vermittlung antiapoptotischer Effekte von IGF-1 über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg an vielen verschiedenen Zelltypen, auch in Neuronen, durch zahlreiche Studien belegt werden konnte [6-8,117,122,136], erscheint die Studienlage hinsichtlich antiapoptotischer und protektiver IGF-1-Effekte, die über den ERK-Signalweg vermittelt werden, widersprüchlich. Beträchtlich weniger Arbeitsgruppen berichten über eine antiapoptotische Signaltransduktion über den ERK-Signalweg, ausgelöst durch IGF-1, zum Beispiel in Herzmuskelzellen [8,137], aber auch in Nervenzellen [138], wobei, zumindest in den zitierten Studien, immer auch der PI3-Kinase/Akt-Signalweg erwähnt wird. Somit kann auch eine Interaktion beider Signalwege hinsichtlich antiapoptotischer Effekte von IGF-1 vermutet werden. Beispielsweise indem die PI3-Kinase an der Aktivierung von ERK beteiligt ist [24,139,140].

Andere Arbeitsgruppen kommen zu dem Ergebnis, dass der ERK-Signalweg nicht an der Vermittlung antiapoptotischer Effekte von IGF-1 beteiligt ist [5,7]. Vielmehr berichten mehrere Veröffentlichungen über die Bedeutung des ERK-Signalweges für den Einfluss von IGF-1 auf zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Differenzierung, Zellwachstum und Proliferation in verschiedenen Zelltypen [24-27,141-146].

1.5 Vorherige Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe

In der Forschung mit fmNPCs der Ratte konnten vorherige Untersuchungen, u. a. aus der eigenen Arbeitsgruppe, Interleukin-1 β (IL-1 β) als Schlüsselfaktor für die Induktion des dopaminergen Phänotyps identifizieren [29,66,147-150]. Weiterhin ließen sich die durch IL-1 β in fmNPCs ausgelösten Ereignisse auf zellulärer Ebene charakterisieren. Es zeigte sich, dass IL-1 β eine rasche Induktion der mRNA-Expression von dopaminergen Transkriptionsfaktoren wie Nuclear receptor related Protein 1 (Nurr1) und Paired-like Homeodomain Transcription Factor-3 (Pitx-3) sowie einen anschließenden Anstieg des Tyrosin Hydroxylase (TH)-Protein in vitro auslöst. IL-1 β führte nicht zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, sondern des Transkriptionsfaktors Activator Protein-1 (AP-1), während die Hemmung der nukleären Translokation von NF- κ B durch den Inhibitor SN50 sogar die IL-1 β -induzierte Nurr1-Expression und dopaminerge Differenzierung von fmNPCs verbesserte. Die Behandlung mit IL-1 β führte vielmehr zu einer raschen Phosphorylierung (Aktivierung) der ERK1/2 und p38 MAP-Kinase innerhalb von drei Stunden. Passend dazu konnten MAP-Kinase-Inhibitoren den Nurr1-Anstieg und die dopaminerge Differenzierung von fmNPCs blockieren [29].

Einleitung

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die astrogliale Differenzierung von fmNPCs über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird und mit spezifischen Inhibitoren der PI3-Kinase oder des NF- κ B blockiert werden kann. So wurde nach Anwendung des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin und des NF- κ B-Inhibitors SN50 eine signifikante Reduktion der astroglialen Differenzierung beobachtet [28,29].

Aufgrund der Studienlage zur IGF-1-Signaltransduktion und den Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe kann ein Einfluss von IGF-1 auf das Überleben, die Proliferation und auf das Differenzierungsverhalten von fmNPCs der Ratte vermutet werden. Daraus ergaben sich die übergeordnete Zielsetzung sowie die spezifischen Ziele der vorliegenden Arbeit, die im Folgenden vorgestellt werden.

2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von IGF-1 auf das in vitro-Zellsystem von fmNPCs der Ratte. Übergeordnetes Ziel bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten war es daher die Bedeutung von IGF-1 und der zugrundeliegenden Signalwege, insbesondere für das Überleben, den Erhalt des Proliferationspotentials und das neurale Differenzierungsverhalten der fmNPCs, zu untersuchen. Ein besseres Verständnis des Verhaltens von Stamm-, Progenitor- und Precursorzellen kann einen Beitrag zur Fortentwicklung stammzellbasierter Therapieansätze von neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem IPS, leisten. Es liefert zudem Impulse zur Verbesserung pharmakologischer und neuroprotektiver Ansätze dieser Krankheitsbilder.

Die spezifischen Ziele umfassen dabei die folgenden Arbeitsschritte:

1) Untersuchung möglicher überlebenssteigernder Effekte von IGF-1 auf fmNPCs der Ratte.

Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen nach Behandlung mit IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen. Blockade möglicher IGF-1-Effekte durch Verwendung des IGF-1-Rezeptor-Antagonisten AG 1024.

2) Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf den Erhalt des Proliferationspotentials in fmNPCs der Ratte.

Bestimmung des Anteils der Zellen mit Proliferationspotential/Teilungspotential nach Behandlung mit IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter Expansionsbedingungen. Blockade möglicher IGF-1-Effekte durch Verwendung des IGF-1-Rezeptor-Antagonisten AG 1024.

Zielsetzung

3) Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das neurale Differenzierungsverhalten von fmNPCs der Ratte.

Bestimmung des Anteils der Zellen mit astroglialem, oligodendroglialem und neuronalem Phänotyp nach Differenzierung über 7 d in Anwesenheit von IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Blockade möglicher IGF-1-Effekte durch Verwendung des IGF-1-Rezeptor-Antagonisten AG 1024.

4) Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors in fmNPCs der Ratte.

Bestimmung des Anteils der IGF-1-Rezeptor-positiven Zellen nach Behandlung mit IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen.

5) Verifizierung der IGF-1-abhängigen Signalwege in der Frühphase der neuronalen Differenzierung von fmNPCs der Ratte.

Untersuchung der Phosphorylierung (Aktivierung) verschiedener Kinasen und Transkriptionsfaktoren (PI3-Kinase, Akt, ERK1/2, JNK, p38 MAP-Kinase, NF- κ B) in der Frühphase der neuronalen Differenzierung von fmNPCs nach Behandlung mit IGF-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen

- Aqua ad iniectabilia (Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland)
- BrdU (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- BSA (Biomed, Oberschleißheim, Deutschland)
- B27 Supplement (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- DAPI (Applichem, Darmstadt, Deutschland)
- DMEM (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- DMSO (Sigma, St. Louis, USA)
- DNase I (Sigma, St. Louis, USA)
- D-Glucose (Sigma, St. Louis, USA)
- EGF (Sigma, St. Louis, USA)
- Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- F-12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Goat-Serum (Sigma, St. Louis, USA)
- HBSS (Sigma, St. Louis, USA)
- HCL (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- IGF-1 (Sigma, St. Louis, USA)
- Mounting Medium von VectaShield, mit und ohne DAPI (Vector, Burlingame, California, USA)
- PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA)
- PFA 4%ig (Sigma, St. Louis, USA)
- Poly-L-Lysin (Sigma, St. Louis, USA)
- PI (Sigma, St. Louis, USA)
- P4-8F (AthenaES, Baltimore, MD, USA)
- Tert-Amylalkohol, 2-Methyl-2-butanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Material und Methoden

- 2,2,2, Tribromethanol (Sigma, St. Louis, USA)
- TritonX (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Trypsin (Sigma, St. Louis, USA)
- Tyrphostin AG 1024 (Sigma, St. Louis, USA)

3.1.2 Antikörper

- Primäre Antikörper:

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Mouse anti-BrdU	Zellen in S-Phase des Zellzyklus	1:16	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Rabbit anti-Ki-67, polyklonal	Zellen in der Wachstumsphase	1:500	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Rabbit anti-GFAP, polyklonal	Astrogliale Zellen	1:1000	Chemicon International, Temecula, USA
Mouse anti-GalC, monoklonal	Oligodendrogliale Zellen	1:500	Chemicon International, Temecula, USA
Mouse anti-MAP2, monoklonal	Ausgereifte neuronale Zellen	1:500	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Rabbit IGF-1-Rezeptor- Antikörper (Ab-1161)	IGF-1-Rezeptor	1:200	EnoGene, New York, USA

Material und Methoden

- Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-Rabbit IgG, konjugiert mit Alexa 594	Gegen Rabbit	1:500	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Goat anti-Mouse IgG, konjugiert mit Alexa 488	Gegen Mouse	1:500	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.1.3 ELISA FACE™ Kit (Active Motif, Carlsbad, USA)

Reagenzien	Komponenten
Waschpuffer	PBS 10 % Triton X-100
Löschpuffer	Waschpuffer 10 % H ₂ O ₂
Blockierpuffer	
1 % SDS	
Entwicklungslösung	
Stopplösung	
Crystal Violetlösung	

3.1.4 Antikörper für ELISA-Experimente von FACE™ (Active Motif, Carlsbad, USA)

ERK ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-ERK Antikörper	1:500
	Phospho-ERK Antikörper	1:250
sekundärer Antikörper	HRP-konjugierter Sekundärantikörper	1:2000

JNK ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-JNK Antikörper	1:250
	Phospho-JNK Antikörper	1:500
sekundärer Antikörper	HRP-konjugierte Sekundärantikörper	1:2000

p38 ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-p38 Antikörper	1:500
	Phospho-p38 Antikörper	1:500
sekundärer Antikörper	HRP-konjugierter Sekundärantikörper	1:2000

Material und Methoden

NF-κB ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-NF-κB Antikörper	1:500
	Phospho-NF-κB Antikörper	1:500
sekundärer Antikörper	HRP- konjugierter Sekundärantikörper	1:2000

PI3-Kinase ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-PI3-Kinase Antikörper	1:500
	Phospho-PI3-Kinase Antikörper	1:500
sekundärer Antikörper	HRP-konjugierter Sekundärantikörper	1:1000
Akt ELISA	Antikörper	Verdünnung
primärer Antikörper	Total-Akt Antikörper	1:500
	Phospho-Akt Antikörper	1:250
sekundärer Antikörper	HRP-konjugierter Antikörper	1:2000

3.1.5 Lösungen

- Avertin-Lösung für die Rattennarkose:

Herstellung einer 100%igen Lösung durch Dilution von 1 g 2,2,2 Tribromethanol in 1 ml 2-Methyl-2-butanol bei +50 °C im Wasserbad.

Herstellung einer 2,5%igen Lösung für die Mausnarkose durch Dilution von 1 ml der 100%igen Lösung in 19 ml vorgewärmtem PBS. Der pH-Wert wurde auf 7,0 und 7,4 eingestellt. Lagerung bei -20 °C, aliquotiert zu je 2 ml. Für die Rattennarkose Verwendung von 1,5 ml der 2,5%igen Lösung pro 250 g Körpergewicht der Ratte.

- Blockierlösung für Immunfluoreszenz:

Dilution von 9,7 ml TritonX-PBS 0,2 % (0,5 % für Ki-67) mit 0,3 ml Serum der Spezies des Sekundär-Antikörpers.

- BrdU-Stocklösung:

Dilution von BrdU in destilliertes Wasser auf Endkonzentration von 5 mmol/l.

Material und Methoden

- Serumfreies Zellkulturmedium (EM-1)

32 % F-12

65 % DMEM high glucose

2 B27 supplement

1 % Penicillin/Streptomycin

20 ng/ml EGF

Lagerung bei +4 °C

- Dissektionslösung:

98 % HBSS ohne Ca und Mg

1 % Penicillin/Streptomycin

1 % D-Glucose

Lagerung bei +4 °C

- DNase-Lösung:

Dilution von 1,875 mg Soya bzw. Trypsin und 22,65 mg MgSO₄ in HBSS sterile Filtration und Zugabe von 0,5 mg DNase I. Auffüllen auf 12,5 ml, aliquotiert zu je 2 ml. Lagerung bei -20 °C.

- Hoechst 33342-Färbelösung:

Dilution von 100 mg Hoechst 33342 in 100 ml DMSO. (Entspricht 1000x-Stock: 1 mg/ml in DMSO). Lagerung bei -20 °C, lichtgeschützt. Verdünnung 1:1000.

- PI-Färbelösung:

Dilution von 10 mg PI in 10 ml PBS. (Entspricht 50x-Stock: 1 mg/ml in PBS).

Lagerung bei +4 °C, lichtgeschützt.

Verdünnung 1:50

- Trypsinlösung:

Dilution von 250 mg Trypsin in 100 ml HBSS, aliquotiert zu je 1 ml.

Lagerung bei -20 °C.

- Tyrphostin-Stocklösung:

Herstellung einer 100 mM Stocklösung durch Dilution von 1 mg Tyrphostin (AG 1024) in 32,8 µl DMSO.

Lagerung bei -20 °C.

- Verdünnungslösung für Immunfluoreszenz:

Dilution von 0,1 ml Serum der Spezies des Sekundärantikörpers in 9,9 ml TritonX-PBS 0,2 % (0,5 % für Ki-67).

3.1.6 Hilfsmittel

- Chamber Slide, 8 Well (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Deckgläser (R. Langenbrinck-Labor und Medizintechnik, Teningen, Deutschland)
- Einmalkanülen (Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland)
- Eppendorfgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Falconröhrchen 15 ml/50 ml (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
- Fire-polished Pasteur-Pipette (Brand GMBH und CO KG, Wertheim, Deutschland)
- Nagellack farblos
- Parafilm (EXCEL Scientific, Wrightwood, USA)
- Petrischale aus Glas 10 cm, 20 cm (VWR, Hamburg, Deutschland)
- Pinzetten, steril (Allgaier, Frittlingen/Tuttlingen, Deutschland)
- Pipetten (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Schere für Rattenpräparation (Allgaier, Frittlingen/Tuttlingen, Deutschland)

Material und Methoden

- Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
- Skalpell für Rattenpräparation (Feather, Japan)
- Skalpellklingen (Dahlhausen, Köln, Deutschland)
- Sterilpipetten 5 ml, 10 ml, 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
- Spritzen (für Rattenpräparation)
- Spritzen-/Syringe-Filter, 0,22 µm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 96 Well Platte (Sigma, St. Louis, USA)
- Zellkulturflasche klein, groß (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)

3.1.7 Geräte

- Absaugpumpe (Gardner Denver, Schopfheim, Deutschland)
- Brutschrank Hera cell 150 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Auflichtmikroskop für Tierpräparation Stemi 2000 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- Mikroskop für Immunfluoreszenz (DMI4000, Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Multiscan EX (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland)
- PC Immunfluoreszenzmikroskoparbeitsplatz
- Pippetierhilfe (Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)
- Rüttler (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
- Sterilbank, Hera safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Tiefkühlschrank -20 °C (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- Tiefkühlschrank -80 °C (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Vortex (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Waage (Adventure AR2140 OHAUS, NJ, USA)
- Zentrifuge groß, Megafuge 1. OR (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland)
- Tischzentrifuge klein, Biofuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an fmNPCs der Ratte durchgeführt. Diese wurden aus mesenzephalem Gewebe gewonnen, das aus Wistar Rattenembryonen (Charles River, Braunschweig, Deutschland) am Embryonaltag 14.5 entnommen wurde. Die Haltung der Muttertiere erfolgte in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus. Dabei hatten sie freien Zugang zu Wasser und Futter.

3.2.2 Präparation des pränatalen Mesenzephalon der Ratte

Das mesenzephalale Gewebe wurde jeweils am Tag 14 nach der Verpaarung präpariert. Hierfür wurden die trächtigen Muttertiere zunächst mit Avertin narkotisiert. Nach Desinfektion der Bauchhaut mit 70%igem Ethanol und Eröffnen der Bauchdecke wurde der Uterus entnommen und in eine Petrischale mit kalter Dissektionslösung überführt. Zur Präparation der Embryonen wurde ein kräftiger Schnitt gegenüber der Plazenta durchgeführt, so dass die Embryonen mit einer Pinzette herausgedrückt und in eine Petrischale überführt werden konnten.

Anschließend wurden die Föten dekapiert, die Schädeldecke eröffnet, das Gehirn entnommen und in einem Präparationspuffer auf Eis aufbewahrt. Dann erfolgte die Präparation des gesamten Mittelhirns unter dem Mikroskop mit 60-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Hemisphären und Kleinhirnbläschen in der Medianen durchtrennt und dann das gesamte Mittelhirn stumpf herauspräpariert.

Die so gewonnenen Gehirnteile wurden bis zur weiteren Verarbeitung in Dissektionslösung auf Eis gelagert. Die Organentnahme wurde beim zuständigen Landwirtschaftsministerium des Landes Mecklenburg-Vorpommern angemeldet.

3.2.3 Kultivierung von fmNPCs der Ratte

Zur Herstellung von Primärkulturen wurden die in Dissektionslösung gelagerten Gewebeproben in 15 ml Falconröhrchen überführt, dann herunterzentrifugiert (sechs Minuten, 1500 Umdrehungen [U]) und der Überstand abgesaugt. Die chemische Dissoziation des Hirngewebes wurde durch Zugabe von Trypsin (Endkonzentration 0,1 %) und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur erreicht. Nach erneuter Zentrifugation (drei Minuten, 1500 U) und Absaugen des Überstands wurde das Sediment

Material und Methoden

mit DNase1-Lösung in einer Konzentration von 40 mg/ml versetzt und für zehn Minuten bei einer Temperatur von +37 °C inkubiert.

Anschließend wurde nach nochmaliger Zentrifugation (drei Minuten, 1500 U) und Absaugen des Überstands das entstandene Zellpellet mit 3 ml EM-1 versetzt und durch wiederholtes Ansaugen durch eine „fire-polished“ Pasteur-Pipette homogenisiert. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde mit 12 ml EM-1 verdünnt und dann auf eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesetzt. Nach Zugabe von EGF in einer Konzentration von 15 ng/ml erfolgte die Kultivierung der Zellen bei 5 % CO₂, 92 % N₂, 3 ± 2 % O₂, einer Temperatur von +37 °C und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Nach einer Wachstumsphase von sechs Tagen ohne jegliche Manipulation wurde zweimal pro Woche die Hälfte des EM-1 abgenommen und durch frisches ersetzt sowie 15 ng/ml EGF zugegeben.

3.2.4 Experimentelle Bedingungen der Expansion und Differenzierung von fmNPCs der Ratte

Um den Einfluss von IGF-1 auf das Überleben, den Erhalt des Proliferationspotentials, das neurale Differenzierungsverhalten sowie die Expression des IGF-1-Rezeptors der fmNPCs während der Expansion und Differenzierung zu untersuchen, wurden diese zunächst der Expansionskultur entnommen und mit 1500 U pro Minute für drei Minuten herunterzentrifugiert. Für die Expansion wurden die Zellen in frisches EM-1 unter Zugabe von EGF aufgenommen, für die Differenzierung in Differenzierungsmedium (P4-8F) ohne EGF-Zusatz.

Für die Untersuchung der Überlebensrate wurden die Zellen dann auf unbeschichtete, für die Differenzierungsversuche auf mit Poly-L-Lysin beschichtete, 96-Well-Platten ausgesät (50 000 bis 150 000 Zellen pro cm²). Zur Untersuchung des Erhalts des Proliferationspotentials, des neuronalen Differenzierungsverhaltens und der Expression des IGF-1-Rezeptors erfolgte die Aussaat in entsprechendem Medium auf 8-Well-Chamber-Slides mit ca. 25 000 Zellen/Well. Zum Start der jeweiligen Versuchsreihen wurde dem Medium (EM-1 oder P4-8F) 50 ng/ml IGF-1 und/oder 25 µM AG 1024 – ein IGF-1-Rezeptor-Antagonist, der mögliche IGF-1-Effekte blockiert – zugegeben. Der Vergleich erfolgte mit einer unbehandelten Kontrolle. Unter den genannten experimentellen Bedingungen wurden die Zellen bei 5 % CO₂, 3 % O₂, einer Temperatur von +37 °C und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit expandiert bzw. differenziert. Der Zeitpunkt der Aussaat wurde jeweils als Stunde null (0 h) festgelegt.

Material und Methoden

Im Folgenden werden die verschiedenen Versuchsreihen zusammenfassend aufgeführt. Diese werden in den Kapiteln 3.2.5 und 3.2.6 ausführlich behandelt. Auf die Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Experimente zur Verifizierung der IGF-1-abhängigen Signalwege in der Frühphase der neuronalen Differenzierung wird gesondert im Kapitel 3.2.7 eingegangen.

- Um mögliche überlebenssteigernde Effekte von IGF-1 auf die fmNPCs zu untersuchen wurde die Überlebensrate der Zellen nach Expansion und Differenzierung über 24 h und 72 h in den jeweiligen Versuchsreihen (keine Behandlung = Kontrolle, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024, 25 μ M AG 1024) anhand der Propidiumiodid (PI)/Hoechst-Technik mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5.1, Kapitel 3.2.5.1.1 und Kapitel 3.2.6).
- Um den Einfluss von IGF-1 auf den Erhalt des Proliferationspotentials der fmNPCs zu untersuchen wurden die Zellen nach o. g. Procedere für die Expansion vorbereitet. Die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation und spätere Auswertung der entsprechenden Versuchsreihen (keine Behandlung = Kontrolle, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG1024, 25 μ M AG 1024) erfolgte anhand immunzytochemischer Färbung gegen den Proliferationsmarker Bromdesoxyuridin (BrdU) nach Expansion über 24 h und gegen den Proliferationsmarker Ki-67 nach Expansion über 72 h (siehe Kapitel 3.2.5.2, Kapitel 3.2.5.2.1 und Kapitel 3.2.6).
- Um den Einfluss von IGF-1 auf das neurale Differenzierungsverhalten der fmNPCs zu untersuchen, wurden die Zellen nach o.g. Procedere für die Differenzierung vorbereitet. Die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation und spätere Auswertung der entsprechenden Versuchsreihen (keine Behandlung = Kontrolle; 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024, 25 μ M AG 1024) erfolgte nach Differenzierung über 7 d anhand immunzytochemischer Färbungen gegen astrogliale (Glial fibrillary acidic Protein [GFAP]), oligodendrogliale (Galactocerebrosidase [GalC]) und neuronale (Microtubule-associated Protein 2 [MAP2]) Marker (siehe Kapitel 3.2.5.2, Kapitel 3.2.5.2.2 und Kapitel 3.2.6).
- Für die Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors der fmNPCs wurden die Zellen nach o. g. Procedere für die Expansion und

Differenzierung vorbereitet. Die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation und spätere Auswertung erfolgte nach Expansion über 72 h unter Kontrollbedingungen, sowie nach Differenzierung über 72 h und 7 d unter Kontrollbedingungen und Behandlung mit IGF-1 anhand der Färbung mit einem IGF-1-Rezeptor-Antikörper (siehe Kapitel 3.2.5.2, Kapitel 3.2.5.2.3 und Kapitel 3.2.6).

3.2.5 Immunzytochemische Färbungen

3.2.5.1 Färbung mit PI und Hoechst 33342

Um überlebenssteigernde Effekte von IGF-1 auf die fmNPCs zu untersuchen wurde die Überlebensrate der Zellen nach Expansion und Differenzierung über 24 h und 72 h in den entsprechenden Versuchsreihen (keine Behandlung = Kontrolle, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024, 25 μ M AG 1024) anhand der PI/Hoechst-Technik bestimmt. Bei PI und Hoechst 33342 handelt es sich um DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Hoechst 33342 dringt sowohl in Zellen mit intakter als auch defekter Zellmembran ein und bindet bevorzugt AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA. Das Absorptionsmaximum von Hoechst 33342 liegt bei 340 nm, das Emissionsmaximum bei 510 nm. PI zeichnet sich dadurch aus, dass es nur in Zellen mit defekter Zellmembran eindringt, so dass in Kombination mit dem alle Zellkerne anfärbenden Hoechst 33342, eine Unterscheidung zwischen nekrotischen und lebenden Zellen getroffen werden kann. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 590 nm.

3.2.5.1.1 Vorgehensweise bei der Untersuchung überlebenssteigernder Effekte von IGF-1 auf fmNPCs der Ratte

Wie bereits im Kapitel 3.2.4 beschrieben, wurden die Zellen zunächst der Expansionskultur entnommen und mit 1500 U pro Minute für drei Minuten herunterzentrifugiert. Für die Expansionsversuche wurden die Zellen dann in EM-1 auf unbeschichtete 96-well-Platten ausgesät. Für die Differenzierungsversuche erfolgte die Aussaat in P4-8F auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 96-well-Platten.

Durch die Behandlung der Zellen mit IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 μ M) oder IGF-1 (50 ng/ml) und AG 1024 (25 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollreihe wurden die Versuchsreihen zum Zeitpunkt $t = 0$ gestartet. Nach einer Expansions- bzw. Differenzierungszeit von 24 h und 72 h erfolgte die Zugabe der Färbelösung. Diese bestand aus 0,3 μ l Hoechst 33342, 6 μ l PI und 6 μ l Phosphate-buffered Saline (PBS). Dann wurden

die Zellen für fünf bis zehn Minuten bei einer Temperatur von +37 °C bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert bevor eine immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation und spätere Auswertung der entsprechenden Versuchsreihen erfolgte (siehe Kapitel 3.2.6).

3.2.5.2 Färbungen mittels spezifischer Antikörper

Um den Einfluss von IGF-1 auf das Proliferationspotential, das neurale Differenzierungsverhalten, sowie die Expression des IGF-1-Rezeptors der fmNPCs zu untersuchen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz mittels spezifischer Antikörper eingesetzt. Dieser Methode liegt eine Antikörper-Antigen-Reaktion zugrunde.

Man unterscheidet eine direkte von einer indirekten Methode. Letztere wurde für die Versuchsreihen verwendet. Dabei wird in einem ersten Schritt ein spezifischer, primärer Antikörper auf die zu untersuchenden Zellen gegeben, der an die entsprechende Zielstruktur bindet. Dies können Antigene, Oberflächenmarker bestimmter Zellen oder Proliferationsmarker sein. Im zweiten Schritt wird ein sekundärer Antikörper eingebracht, der gegen den primären Antikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. In Abhängigkeit des Absorptions- und Emissionsmaximums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes wird Licht mit einer für diesen Farbstoff spezifischen Wellenlänge absorbiert bzw. emittiert. Somit erscheint die Zielstruktur mittels entsprechender Aufnahmetechnik farbig.

Entscheidend für die Differenzierung verschiedener Zielstrukturen ist die Möglichkeit, in einem Färbeschritt mehrere primäre Antikörper gegen verschiedene Antigene und folglich auch mehrere Farbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper in einem Färbeschritt einsetzen zu können.

3.2.5.2.1 Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das Proliferationspotential von fmNPCs der Ratte

Um den Einfluss von IGF-1 auf das Proliferationspotential von fmNPCs zu untersuchen wurden die Zellen zunächst für die Expansion über 24 h (für die spätere BrdU-Färbung) und 72 h (für die spätere Ki-67-Färbung) vorbereitet. Wie im Kapitel 3.2.4 bereits beschrieben wurden die Zellen zuerst der Expansionskultur entnommen und mit 1500 U pro Minute für drei Minuten herunterzentrifugiert. Die so entstandenen Zellpellets wurden in frisches EM-1 mit EGF aufgenommen und dann auf 8-Well-Chamber-Slides mit ca. 25 000 Zellen/Well ausgesät.

Material und Methoden

Durch Behandlung der Zellen mit IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 μ M) oder IGF-1 (50 ng/ml) und AG 1024 (25 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollreihe wurden die Versuchsreihen zum Zeitpunkt $t = 0$ gestartet. Nach einem Expansionszeitraum der Zellen von 24 h erfolgte die immunzytochemische Färbung gegen den Proliferationsmarker BrdU, nach Expansion über 72 h gegen den Proliferationsmarker Ki-67. Dieses ist ein Protein, das sich im Zellkern von Zellen nachweisen lässt, die sich in der Wachstumsphase befinden, sich also vermehren bzw. teilen. Ki-67 wird dabei in allen aktiven Phasen des Zellzyklus gefunden, von der späten G1- bis zur M-Phase [151,152]. BrdU muss hingegen experimentell in die Zellen eingebracht werden. Es ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. BrdU markiert Zellen in der S-Phase des Zellzyklus indem es von den Zellen aufgenommen wird und in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids dTTP während der S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird [153].

- BrdU-Färbung:

Um BrdU in die Zellen einzubringen wurden diese nach einem Expansionszeitraum von 24 h mit einer BrdU-Stocklösung (5 mM) behandelt. Pro Well (500 μ l) wurden dabei 10 μ l der BrdU-Stocklösung eingebracht. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für ca. fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem saurem Ethanol (95 % Ethanol + 5 % Eisessig) für zehn Minuten bei -20 °C inkubiert, danach zweimal mit 2 N Salzsäure (HCL) gewaschen und erneut für 30 Minuten mit 2 N HCL bei +37 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit HCL erfolgte eine viermalige Waschung der Zellen mit PBS.

Im Anschluss wurden die Zellen durch Behandlung mit Blockierlösung für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur blockiert. Das Blockieren verhindert eine unspezifische Anlagerung des sekundären Antikörpers und soll die Bildqualität für die spätere Auswertung steigern. Im nächsten Schritt folgte die Antikörperfärbung. Zunächst wurde der Anti-BrdU Antikörper aus der Maus in Verdünnungslösung mit einer Endkonzentration von 1:16 als Primärantikörper zugegeben. Dann wurden die Zellen bei +4 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst viermal mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in Verdünnungslösung zugegeben wurde und die Zellen dann für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen wurden. Für die BrdU-Färbung

Material und Methoden

wurde der Sekundärantikörper Alexa 488 Goat-anti-Mouse in einer Konzentration von 1:500 verwendet.

Als Verdünnungslösung wurde dieselbe wie für den Primärantikörper verwendet. Anschließend erfolgte die fünfmalige Waschung der Zellen mit PBS bevor die Chamber-Slides entwandet wurden. Die restliche Flüssigkeit musste vorsichtig von der Kante der Chamber-Slides aus mit Zellstoff aufgenommen werden.

Abschließend erfolgte das „Deckeln“ der Chamber-Slides. Dazu wurde zunächst Mounting Medium (für den BrdU-Versuch ohne DAPI, d. h. die Zellkerne wurden nicht angefärbt) in zwei Tropfen am Anfang und in der Mitte der Chamber-Slides zugegeben. Dann musste das Deckglas möglichst ohne Bildung von Luftblasen aufgebracht werden, indem es schräg in den seitlichen Tropfen Mounting Medium angesetzt und dann vorsichtig gekippt wurde.

Im Anschluss wurde das Deckglas leicht angedrückt bis das Mounting Medium an allen Seiten des Chamber-Slides austrat. Im letzten Schritt wurden die Ränder mit farblosem Nagellack versiegelt, um einen Lufteintritt und das Verrutschen der Deckgläser zu verhindern. Die so hergestellten Präparate wurden vor der immunfluoreszenz-mikroskopischen Dokumentation über Nacht bei +4 °C gelagert.

- Ki-67-Färbung:

Da Ki-67 ein zelleigenes Protein ist und somit nicht experimentell in die Zellen eingebracht werden muss, konnte nach Expansion der Zellen über 72 h direkt mit deren Fixierung begonnen werden. Dazu wurden die Zellen für ca. 20 Minuten mit 4%igem PFA in PBS auf Eis behandelt. Der Arbeitsablauf unterscheidet sich von der BrdU-Färbung, da keine Säurebehandlung zur Anwendung kommt.

Es erfolgte die zweimalige Waschung der Zellen in PBS bevor sie für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur blockiert wurden. Im nächsten Schritt wurde der polyklonale Primärantikörper anti-Ki-67 aus Kaninchen in einer Konzentration von 1:500 zugegeben (Verdünnungslösung: 0,5%iges 9,9 ml TritonX-PBS versetzt mit 0,3 ml Goat-Serum) und die Zellen dann über Nacht bei +4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst viermal mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in Verdünnungslösung zugegeben und die Zellen dann für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen wurden. Für die Ki-67-Färbung wurde der Sekundärantikörper Alexa 594 Goat-anti-Rabbit in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Die Verdünnungslösung war dieselbe wie für den Primärantikörper. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, die Chamber-Slides dann entwandet und durch das

„Deckeln“ für die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation vorbereitet (die einzelnen Arbeitsschritte sind unter „BrdU-Färbung“ im selben Kapitel genauer erläutert). Im Unterschied zur BrdU-Färbung wurde für die Ki-67-Färbung Mounting Medium mit DAPI verwendet. Das DAPI färbt die Zellkerne blau an, was der späteren Bestimmung der Gesamtzellzahl diene.

3.2.5.2.2 Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das Differenzierungsverhalten von fmNPCs der Ratte

Um den Einfluss von IGF-1 auf das neurale Differenzierungsverhalten der fmNPCs zu untersuchen mussten sich diese zunächst über einen Zeitraum von 7 d bei 5 % CO₂, 3 % O₂, einer Temperatur von +37 °C und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit differenzieren.

Wie im Kapitel 3.2.4 bereits beschrieben, wurden die Zellen dafür der Expansionskultur entnommen und mit 1500 U pro Minute für drei Minuten herunter zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in P4-8F und dann die Aussaat auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 8-Well-Chamber-Slides mit ca. 25 000 Zellen in 500 µl Medium/Well. Durch die Behandlung der Zellen mit IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 µM) oder IGF-1 (50 ng/ml) und AG 1024 (25 µM) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollreihe wurden die Versuchsreihen zum Zeitpunkt t = 0 gestartet. Da sich die Differenzierungsversuche über einen Zeitraum von 7 d erstreckten, war es notwendig die Zellen zwischenzeitlich zu „füttern“. Dabei wurde jeden dritten Tag die Hälfte des Mediums (ca. 250 µl pro Well) abgenommen und durch frisches P4-8F mit IGF-1 bzw. AG 1024 ersetzt. Nach dem gewünschten Differenzierungszeitraum von 7 d erfolgten immunzytochemische Färbungen gegen den astroglialen Marker GFAP, gegen den oligodendroglialen Marker GalC und den neuronalen Marker MAP2.

- **GFAP-/GalC-/MAP2-Färbung:**

Die einzelnen Arbeitsschritte der Färbung entsprechen grundlegend den bei der Ki-67-Färbung beschriebenen. Die Besonderheit bei der Färbung gegen GFAP, GalC und MAP2 ist jedoch der Einsatz der Zweifachfärbung, also der Markierung von zwei Zielstrukturen in einem Färbeschritt. Dabei wurde die Färbung gegen GFAP entweder mit der Färbung gegen GalC oder entsprechend gegen MAP2 kombiniert. Die einzelnen Arbeitsschritte seien im Folgenden nochmal erläutert:

Material und Methoden

Nach dem gewünschten Differenzierungszeitraum von 7 d erfolgte die Fixierung der Zellen für 20 Minuten in 4%igem PFA in PBS auf Eis. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur blockiert. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Primärantikörper in Kombination gleichzeitig zugegeben: Anti-GFAP polyklonal aus Kaninchen in einer Konzentration von 1:1000 und anti-GalC monoklonal aus Maus in einer Konzentration von 1:500 oder anti-GFAP polyklonal aus Kaninchen in einer Konzentration von 1:1000 und anti-MAP2 monoklonal aus Maus in einer Konzentration von 1:500. Als Verdünnungslösung wurde 9,9 ml 0,2%iges TritonX-PBS versetzt mit 0,1 ml Goat-Serum verwendet. Nach Zugabe der Primärantikörper folgte die Lagerung der Zellen über Nacht bei +4 °C.

Am nächsten Tag wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, bevor die entsprechenden Sekundärantikörper gleichzeitig in Verdünnungslösung zugegeben und die Zellen dann für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Als Sekundärantikörper wurden der Alexa fluor 488 konjugierte Goat-anti-Mouse-Antikörper und der Alexa fluor 594 konjugierte Goat-anti-Rabbit-Antikörper jeweils in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Die Verdünnungslösung war dieselbe wie für die Primärantikörper.

Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, die Chamber-Slides entwandet und durch das „Deckeln“ für die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation vorbereitet (die einzelnen Arbeitsschritte sind im Kapitel 3.2.5.2.1 unter „BrdU-Färbung“ genauer erläutert). Im Unterschied zur BrdU-Färbung wurde, wie auch für die Ki-67-Färbung, Mounting Medium mit DAPI verwendet, um die Zellkerne blau anzufärben zur späteren Bestimmung der Gesamtzellzahl.

3.2.5.2.3 Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors von fmNPCs der Ratte

Um den Einfluss von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors der fmNPCs zu untersuchen wurden die Zellen, wie im Kapitel 3.2.4 bereits beschrieben, zunächst der Expansionskultur entnommen und mit 1500 U pro Minute für drei Minuten herunterzentrifugiert. Dann erfolgte die Aufnahme der Zellen in EM-1 und die Aussaat der Zellen auf 8-Well-Chamber-Slides (ca. 25 000 Zellen/Well) für die Expansionsreihe sowie die Aufnahme der Zellen in P4-8F und die Aussaat auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 8-Well-Chamber-Slides (ca. 25 000 Zellen/Well) für die Differenzierungsreihen. Dabei

Material und Methoden

wurden folgende Zeiträume der Expansion und Differenzierung mit oder ohne IGF-1-Behandlung angesetzt:

Die Expansion der Zellen erfolgte für 72 h unter Kontrollbedingungen, die Differenzierung der Zellen für 72 h und 7 d sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter IGF-1-Behandlung.

Wie im Kapitel 3.2.5.2.2 erläutert, musste während der Versuche, die sich über 7 d erstreckten, an jedem dritten Tag die Hälfte des Mediums (ca. 250 µl/Well) abgenommen und durch frisches Medium und IGF-1, ersetzt werden. Nach den erwähnten Zeiträumen der Expansion und Differenzierung erfolgte die immunzytochemische Färbung gegen den IGF-1-Rezeptor.

- IGF-1-Rezeptor-Färbung:

Die einzelnen Arbeitsschritte der IGF-1-Rezeptor-Färbung entsprechen den Arbeitsschritten für die Ki-67-Färbung bzw. die Färbungen gegen GFAP, GalC und MAP2 unter Verwendung des entsprechenden Primärantikörpers gegen den IGF-1-Rezeptor und werden im Folgenden nochmals erläutert:

Nach den oben genannten Expansions- und Differenzierungszeiträumen wurden die Zellen für 20 Minuten in 4%igem PFA in PBS auf Eis fixiert, dann zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur blockiert. Im nächsten Schritt wurde der Primärantikörper zugegeben. Hierfür wurde der IGF-1-Rezeptor-Antikörper aus Kaninchen in einer Konzentration von 1:200 (Verdünnungslösung: 9,9 ml 0,2%iges TritonX-PBS versetzt mit 0,1 ml Goat-Serum) verwendet.

Die Zellen wurden dann über Nacht bei +4 °C gelagert, am nächsten Tag viermal mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper zugegeben wurde. Hierfür kam wieder der Alexa fluor 594 konjugierte Goat-anti-Rabbit-Antikörper in einer Konzentration von 1:500 (Verdünnungslösung wie bei Primärantikörper) zur Anwendung. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen, anschließend fünfmal mit PBS gewaschen, die Chamber-Slides entwandet und durch das „Deckeln“ für die immunfluoreszenzmikroskopische Dokumentation vorbereitet (die einzelnen Arbeitsschritte sind im Kapitel 3.2.5.2.1 unter „BrdU-Färbung“ genauer erläutert). Um die Zellkerne blau zu färben (zur späteren Bestimmung der Gesamtzellzahl) wurde erneut Mounting Medium mit DAPI verwendet.

3.2.6 Auswertung der immunzytochemischen Färbungen

Nach der immunzytochemischen Färbung der Zellen gegen die entsprechenden Marker erfolgte die mikroskopische Dokumentation mit einem inversen Immunfluoreszenzmikroskop in 20-facher Vergrößerung. Dafür wurden für die spätere quantitative Auswertung der einzelnen Versuche immunfluoreszenzmikroskopische Bilder mithilfe einer an das Mikroskop gekoppelten Digitalkamera gewonnen und diese im Leica-Bildverarbeitungsprogramm (Leica Application Suite™) abgespeichert.

Es wurden mindestens fünf repräsentative Bereiche pro Versuch und Versuchsbedingung (IGF-1, AG 1024, IGF-1 + AG 1024, keine Behandlung = Kontrolle, Dauer der Differenzierung oder Expansion) aus dem dazugehörigen Bildmaterial ausgewählt, um den prozentualen Anteil der je nach Fragestellung markierten Zellen (PI, Antikörper) an der Gesamtzellzahl zu bestimmen. Um die Überlebensrate der Zellen nach Expansion und Differenzierung für 24 h und 72 h unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (IGF-1, AG 1024, IGF-1 + AG 1024, keine Behandlung = Kontrolle) zu bestimmen wurde der prozentuale Anteil PI-positiver, und damit nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt, welche durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst ermittelt werden konnte. Um das neurale Differenzierungsverhalten der Zellen nach 7 d Differenzierung zu quantifizieren, wurde der prozentuale Anteil GFAP-positiver, GalC-positiver oder MAP2-positiver Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl bestimmt, welche durch Färbung der Zellkerne mit DAPI ermittelt werden konnte.

Ebenso wurde für die Versuche zur IGF-1-Rezeptor-Expression verfahren, indem der prozentuale Anteil IGF-1-Rezeptor-positiver Zellen, nach den gewünschten Behandlungsbedingungen, an der Gesamtzellzahl, ermittelt durch Färbung der Zellkerne mit DAPI, bestimmt wurde. In einem typischen Versuch wurde eine Gesamtzellzahl von 500 bis 1000 Zellen pro Marker gezählt. Bei der Auswertung der Versuche zum Erhalt des Proliferationspotentials der fmNPCs wurden die Ki-67- bzw. BrdU-positiven Zellen nicht mit Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen ausgezählt, sondern ins Verhältnis zur Fläche der „Neurosphären“ gesetzt. Diese Wachstumsform der Zellen in multizellulären Aggregaten wurde insbesondere während der Versuche zum Erhalt des Proliferationspotentials beobachtet und erlaubt nur sehr schwer eine Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Deshalb wurden mithilfe des Leica-Bildverarbeitungsprogrammes pro Versuch und Versuchsbedingung die Flächen repräsentativer Neurosphären in μm^2 berechnet und die darin enthaltenen Ki-67- bzw. BrdU-positiven Zellen gezählt. Die Anzahl der pro

Material und Methoden

Neurospäre gezählten Marker-positiven Zellen wurde dann jeweils auf eine Fläche von 100 000 μm^2 hochgerechnet, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Für alle Versuche erfolgte das Zählen der markierten Zellen manuell mit einem Handzählgerät. Die Versuche zum Erhalt des Proliferationspotentials wurden dabei am PC des Mikroskoparbeitsplatzes mithilfe des Leica-Bildverarbeitungsprogramms, welches die Flächen der Neurosphären berechnete, ausgewertet.

Für die restlichen Versuche wurden die entsprechenden Bilder in dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe® Photoshop 7.0 abgespeichert und wie folgt bearbeitet: Da die Mikroskopkamera jeweils ein natives Bild, ein Bild mit der Kernfärbung (Hoechst, DAPI) sowie ein Bild mit der Marker-Färbung (PI, GFAP, GalC, MAP2, IGF-1-Rezeptor) anfertigte, musste für die Auswertung zunächst das Bild mit der Marker-Färbung mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms in das dazugehörige Bild mit der Kernfärbung hineinkopiert werden, um den Anteil Marker-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmen zu können. Die Bildverarbeitungsprogramme ermöglichten weiterhin durch Hell-Dunkel-Kontrast- und Schärfe-Einstellungen eine Nachjustierung der Bildqualität und damit eine Erleichterung beim Auszählen der Zellen. Auch die Beispielbilder, die in dieser Arbeit gezeigt werden, wurden mit Adobe® Photoshop 7.0 bearbeitet.

Auf die Auswertung der ELISA-Experimente wird im folgenden Kapitel 3.2.7 gesondert eingegangen.

3.2.7 ELISA-Experimente

Zur Verifizierung der IGF-1-abhängigen Signalwege in der Frühphase der neuronalen Differenzierung der fmNPCs wurde die Phosphorylierung (Aktivierung) der Kinasen PI3, Akt, ERK1/2, JNK und p38 MAP-Kinase, sowie des Transkriptionsfaktors NF-kB mit der (FACE) ELISA-Technik unter Verwendung der ELISA Kits FACE™ untersucht. Da sich die Kits nur durch die jeweiligen spezifischen Antikörper unterscheiden, beschränken sich die folgenden Ausführungen auf die Beschreibung des allgemeinen Versuchsaufbaus.

Zunächst erfolgte die Beschichtung der 96 Well Nunc Platten mit Poly-L-Lysin, die Inkubation für 30 Minuten bei +37 °C und anschließend die zweimalige Waschung mit PBS. Danach wurden im nächsten Schritt die Zellen, nach einer sechs-minütigen Zentrifugation bei 471 x G, aufgetragen (300 μl /Well), wobei als Medium P4-8F diente. Nach Differenzierung der Zellen mit und ohne IGF-1-Behandlung über festgelegte Zeiträume (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h und 6 h) wurden die Versuche durch Zugabe von 4%igem PFA (100 μl /Well)

Material und Methoden

gestoppt. Das PFA bewirkt eine Fixierung der Zellen, so dass die aktivierungsspezifische Protein-Phosphorylierung erhalten bleibt.

Um eine Verdunstung zu verhindern wurden die Platten mit Parafilm abgedeckt. Nach einer Lagerung von mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das PFA entfernt und die Platten zweimal für jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer (200 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits gereinigt, welcher anschließend durch Löschpuffer (100 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits ersetzt wurde.

Nach Lagerung der Platten für 20 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Entnahme des Löschpuffers sowie die zweimalige Reinigung der Platten mit oben genanntem Waschpuffer (200 μ l/Well) für jeweils fünf Minuten.

Im nächsten Schritt wurde der Antikörper-Blockierpuffer (10 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits zugegeben. Nach einer 60-minütigen Lagerung bei Raumtemperatur konnte der Blockierpuffer entsorgt und die Platten wie oben beschrieben gereinigt werden. Dann wurde der Waschpuffer entfernt und der entsprechende primäre Antikörper (40 μ l/Well) hinzugegeben (spezifisch für phosphoryliertes oder für phosphoryliertes und unphosphoryliertes Protein; siehe auch Kapitel 3.1.4). Hierbei mussten die Platten für die Lagerung von mindestens drei Stunden bei +4 °C mit Parafilm abgedichtet werden. Jetzt konnte der primäre Antikörper entsorgt und die Platte dreimal, wie oben beschrieben, gewaschen werden.

Anschließend wurde der Waschpuffer abgenommen und der sekundäre HRP-konjugierte Antikörper zugegeben (siehe auch Kapitel 3.1.4). Dieser musste für 60 Minuten bei Raumtemperatur einwirken, wobei die Platten wiederum mit Parafilm abgedichtet wurden.

Nach dieser Zeit konnte der sekundäre Antikörper entfernt und die Platten dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS für jeweils fünf Minuten gereinigt werden. Nach Entnahme des PBS wurde die Entwicklungslösung (100 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits zugegeben. Diese musste für 20 Minuten bei Dunkelheit einwirken. Durch Zugabe von Stopplösung (100 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits der Prozess beendet. Nun konnte der erste Wert im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt werden, welcher die Menge des markierten Proteins (phosphoryliert oder phosphoryliert und unphosphoryliert) spektrophotometrisch repräsentiert. Als nächstes wurden die Platten jeweils zweimal mit Waschpuffer und destilliertem Wasser (200 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits gereinigt. Anschließend wurde das destillierte Wasser entfernt und die Crystal Violettlösung (100 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits zugegeben, welche für 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte.

Im letzten Schritt wurden die Platten, wie oben beschrieben, fünfmal mit destilliertem Wasser gereinigt. Dann konnte die 1%ige SDS Lösung (100 μ l/Well) des ELISA FACE™ Kits zugegeben und die Platten für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Rüttler gelagert werden. Mithilfe der eingebrachten Crystal Violettlösung erfolgte abschließend die Bestimmung der Anzahl der eingesetzten Zellen pro Well bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer.

Die ermittelten Werte für die Menge des jeweiligen phosphorylierten Proteins und des korrespondierenden Gesamt-Proteins wurden entsprechend der Zellzahl pro Well normiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als das Verhältnis des phosphorylierten zum korrespondierenden Gesamt-Protein (siehe Kapitel 4.6).

3.2.8 Statistik

Für alle Fragestellungen wurden pro Versuchsreihe unter den entsprechenden Versuchsbedingungen mindestens drei unabhängige Versuche aus jeweils unterschiedlichen Kulturansätzen durchgeführt. Alle im Text und in den Abbildungen angegebenen Werte entsprechen den daraus berechneten Mittelwerten mit Angabe der entsprechenden Standardabweichung. Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen wurden mit einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) erfasst und anschließend der Student's t-Test durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ als Kriterium für statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 IGF-1 erhöht die Überlebensrate von fmNPCs der Ratte während der Expansion und Differenzierung

Diverse Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen verweisen auf die Rolle von IGF-1 als antiapoptotischen Faktor in vielen peripheren Zelltypen, wie Leber-, Pankreas-, oder Knochenzellen, sowie differenzierten Nervenzellen. Darüber hinaus fand man, dass IGF-1 auch die Überlebensfähigkeit, sowie die Proliferation und Differenzierung von ESCs beeinflusst und diese Effekte insbesondere auch im Zusammenhang mit NSCs und NPCs beobachtet wurden (siehe Kapitel 1.1). Des Weiteren haben Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe Signalwege der neuralen Differenzierung von fmNPCs der Ratte offengelegt (siehe Kapitel 1.5), so dass die Erörterung einer grundlegenden Beeinflussung von IGF-1 auf die Differenzierung dieser Zellen auch mit Ausblick auf eine mögliche weitere molekulare Untersuchung von Interesse war.

Vor dem Hintergrund dieser Studienlage beschäftigte sich die erste Untersuchung der vorliegenden Arbeit mit der Frage, inwiefern IGF-1 die Überlebensrate der fmNPCs während deren Expansion und Differenzierung beeinflusst, ob sich also überlebenssteigernde oder gar neurotoxische Wirkungen von IGF-1 feststellen lassen. Hierfür wurden die Zellen über einen Expansions- bzw. Differenzierungszeitraum von 24 h und 72 h entweder mit IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 μ M) oder IGF-1 (50 ng/ml) und AG 1024 (25 μ M) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrollprobe verglichen. Anschließend wurde die Überlebensrate, der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl, mit der PI/Hoechst-Technik und Auswertung immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder bestimmt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Kapitel 3.2.5.1.1 ausführlich erläutert.

Es konnten sowohl nach 24 h als auch nach 72 h der Expansion und Differenzierung eine signifikant höhere Überlebensrate der Zellen gefunden werden, die mit IGF-1 behandelt wurden im Vergleich zu den Zellen, die unter Kontrollbedingungen expandiert und differenziert wurden. Demnach fanden sich nach der Expansion für 24 h und Behandlung mit IGF-1 $12,19 \pm 1,82$ % tote Zellen verglichen mit $42,90 \pm 6,34$ % toter Zellen der Kontrollreihe ($p = 0,00$). Nach einem Expansionszeitraum über 72 h fanden sich unter IGF-1 Behandlung $8,82 \pm 2,51$ % tote Zellen gegenüber $20,63 \pm 3,58$ % toter Zellen unter Kontrollbedingungen ($p = 0,03$). Die Ergebnisse der Expansionsversuche über 24 h und 72 h sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Differenzierung der Zellen für 24 h und 72 h. Nach 24 h fanden sich unter der Behandlung mit IGF-1 $10,36 \pm 3,09$ % tote Zellen und in der Kontrollgruppe $29,73 \pm 4,50$ % tote Zellen ($p = 0,02$). Nach Differenzierung über 72 h und Behandlung mit IGF-1 fanden sich $13,14 \pm 2,41$ % tote Zellen im Vergleich zu $24,59 \pm 3,91$ % an toten Zellen in der Kontrollreihe ($p = 0,02$). Die Ergebnisse der Differenzierungsversuche über 24 h und 72 h sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

4.2 AG 1024 inhibiert den überlebenssteigernden Effekt von IGF-1 auf fmNPCs der Ratte während der Differenzierung, nicht aber während der Expansion

Um Effekte von IGF-1 auf die fmNPCs während der Expansion und Differenzierung zu blockieren wurde der IGF-1-Rezeptor-Antagonisten AG 1024 zum einen in Kombination mit IGF-1, andererseits in alleiniger Zugabe zu den Zellen eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass AG 1024 die positiven Effekte von IGF-1 auf die Überlebensrate der Zellen während deren Differenzierung signifikant inhibiert, nicht jedoch während deren Expansion. Demnach fanden sich nach Differenzierung der Zellen über 24 h und Behandlung mit AG 1024 und IGF-1 $75,80 \pm 5,62$ % tote Zellen, nach 72 h $84,48 \pm 3,62$ % tote Zellen im Vergleich zu $10,36 \pm 3,09$ % toter Zellen nach 24 h und $13,14 \pm 2,41$ % toter Zellen nach 72 h Differenzierung unter IGF-1-Behandlung (24 h: $p = 0,00$; 72 h: $p = 0,00$). Auch im Vergleich zur Differenzierung der Zellen unter Kontrollbedingungen zeigten sich mit den genannten Werten nach Behandlung mit AG 1024 und IGF-1 signifikant mehr tote Zellen (24 h: $p = 0,00$; 72 h: $p = 0,00$).

Im Gegensatz dazu konnte während der Expansion über 24 h und 72 h der überlebenssteigernde Effekt von IGF-1 auf die Zellen durch Zugabe von AG 1024 nicht signifikant blockiert werden. Als Ergebnis fanden sich hier $18,74 \pm 8,28$ % tote Zellen nach 24 h ($p = 0,27$), sowie $18,99 \pm 9,86$ % tote Zellen nach 72 h ($p = 0,15$) Expansion unter Behandlung mit AG 1024 und IGF-1.

Die alleinige Behandlung der Zellen mit AG 1024 ließ die Überlebensrate während der Differenzierung signifikant absinken mit $63,43 \pm 7,34$ % toter Zellen nach 24 h und $81,71 \pm 4,46$ % toter Zellen nach 72 h Differenzierung im Vergleich zur Kontrollreihe mit $29,73 \pm 4,50$ % toter Zellen nach 24 h ($p = 0,00$) und $24,59 \pm 3,91$ % toter Zellen nach 72 h Differenzierung in P4-8F ohne Zusatz von AG 1024.

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu konnte dieser, die Überlebensrate absenkende, Effekt auf die Zellen während der Expansion nicht gezeigt werden. Nach der Expansion über 24 h fanden sich demnach $42,88 \pm 3,98$ % tote Zellen verglichen mit $42,90 \pm 6,34$ % toter Zellen nach 24 h Expansion unter Kontrollbedingungen. Nach 72 h Expansion unter alleiniger Behandlung mit AG 1024 fanden sich $38,97 \pm 1,23$ % toter Zellen im Vergleich zu $20,63 \pm 3,58$ % toter Zellen ($p = 0,14$) nach 72 h Expansion in EM-1 ohne Zusatz von AG 1024.

Die Ergebnisse der Versuche mit AG 1024 sind für die Expansion in Abbildung 4.1 und für die Differenzierung in Abbildung 4.2 dargestellt. Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche beispielhaft den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf die Überlebensrate der fmNPCs nach Differenzierung über 24 h darstellen, zeigt Abbildung 4.3.

Ergebnisse

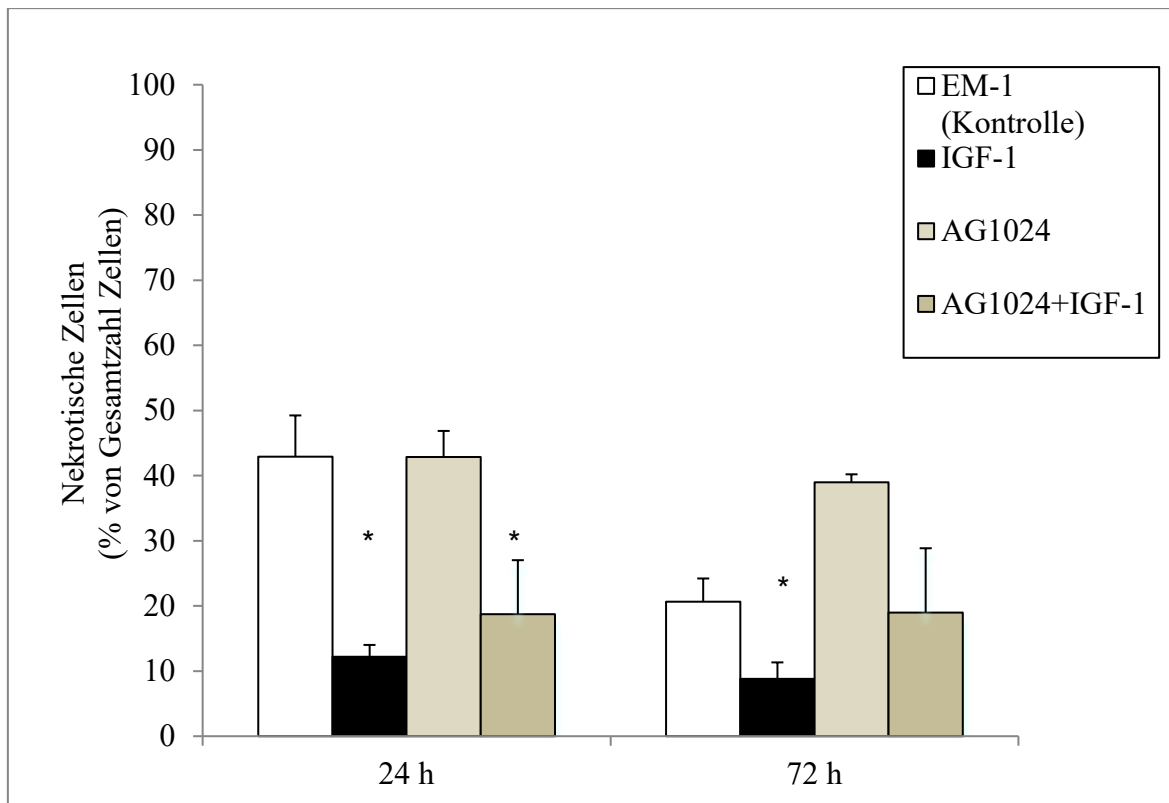


Abbildung 4.1: Überlebensrate der fmNPCs während der Expansion. Prozentualer Anteil an toten Zellen nach Expansion über 24 h und 72 h in EM-1 (= Kontrolle), in EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1, in EM-1 plus 25 μ M AG 1024 oder in EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024. Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der Kontrolle.

Ergebnisse

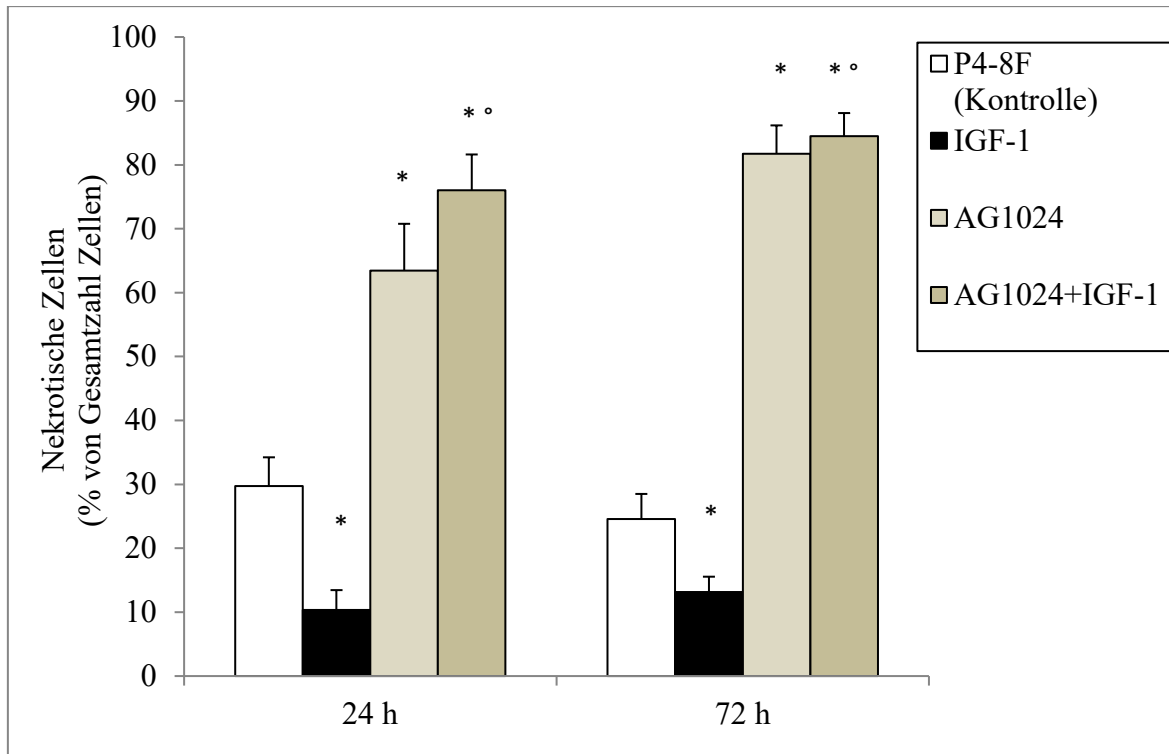


Abbildung 4.2: Überlebensrate der fmNPCs während der Differenzierung. Prozentualer Anteil an toten Zellen nach Differenzierung über 24 h und 72 h in P4-8F (= Kontrolle), in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1, in P4-8F plus 25 μ M AG 1024 oder in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024. Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der Kontrolle.

° Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der IGF-1-Versuchsreihe.

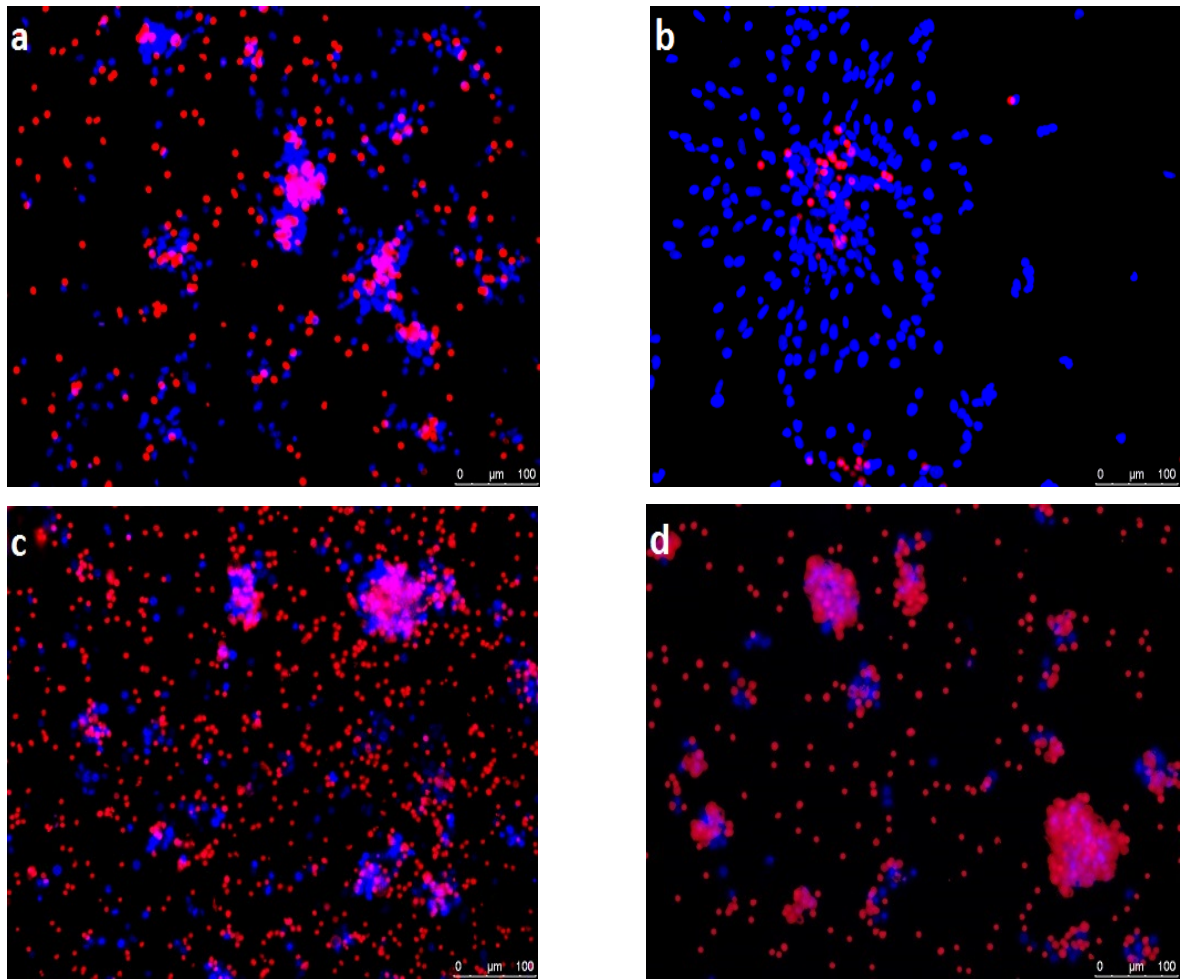


Abbildung 4.3: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf das Überleben der fmNPCs nach Differenzierung über 24 h zeigen. Nekrotische Zellen wurden mit PI (rot), die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) markiert. Überleben der Zellen nach 24 h Differenzierung in a) P4-8F (= Kontrolle). b) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1. c) P4-8F plus 25 μM AG 1024. d) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μM AG 1024.

4.3 IGF-1 steigert das Proliferationspotential von fmNPCs der Ratte

Um den Einfluss von IGF-1 auf den Erhalt des Proliferationspotentials der fmNPCs zu untersuchen wurden immunzytochemische Färbungen gegen den zelleigenen Proliferationsmarker Ki-67, sowie gegen den Proliferationsmarker BrdU, angefertigt. Im Anschluss konnten die Dokumentation und Auswertung immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder erfolgen. Dafür wurden die Zellen für die spätere BrdU-Färbung über 24 h und für die spätere Ki-67-Färbung über 72 h in EM-1 expandiert. Die Behandlung der Zellen während dieser Expansionszeiträume erfolgte mit IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 μ M) oder IGF-1 (50 ng/ml) und AG 1024 (25 μ M) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollreihe. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Kapitel 3.2.5.2.1 ausführlich erläutert. Hierbei fanden sich nach Expansion über 72 h und IGF-1-Behandlung mit $621,96 \pm 100,49$ Ki-67-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ signifikant mehr Zellen mit Proliferationspotential als nach Expansion über 72 h unter Kontrollbedingungen mit $323,63 \pm 58,30$ Ki-67-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ ($p = 0,01$). Durch Zugabe von AG 1024 konnte eine signifikante Blockade des IGF-1-Effektes beobachtet werden mit $146,91 \pm 34,06$ Ki-67-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ ($p = 0,00$). Dies waren sogar signifikant weniger Ki-67-positive Zellen als unter Kontrollbedingungen ($p = 0,00$). Auch die Behandlung der Zellen nur mit AG 1024 führte mit $105,57 \pm 27,58$ Ki-67-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ zu signifikant weniger Zellen mit Proliferationspotential als unter Kontrollbedingungen ($p = 0,00$).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Ki-67 zeigte die Auswertung BrdU-positiver Zellen nach Expansion über 24 h mit IGF-1-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf das Proliferationspotential der fmNPCs im Vergleich zur Kontrollreihe. So führte die Behandlung mit IGF-1 zu $319,84 \pm 91,28$ BrdU-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ verglichen mit $228,70 \pm 26,89$ BrdU-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ unter Kontrollbedingungen. Jedoch brachte die Zugabe von AG 1024 in Kombination mit IGF-1 mit $129,71 \pm 12,62$ BrdU-positiven Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$ eine signifikant niedrigere Zahl an Zellen mit Proliferationspotential im Vergleich zur Kontrollreihe ($p = 0,01$).

Des Weiteren führte die alleinige Behandlung der Zellen mit AG 1024 zu einer signifikanten Absenkung der Anzahl BrdU-positiver Zellen ($114,85 \pm 28,96$ Zellen pro $100\,000\ \mu\text{m}^2$) im Vergleich zur Kontrollreihe. Die Ergebnisse der Versuche mit Ki-67 und BrdU sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf das Proliferationspotential der fmNPCs nach 24 h (BrdU) und 72 h (Ki-67) der Expansion darstellen zeigen Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6.

Ergebnisse

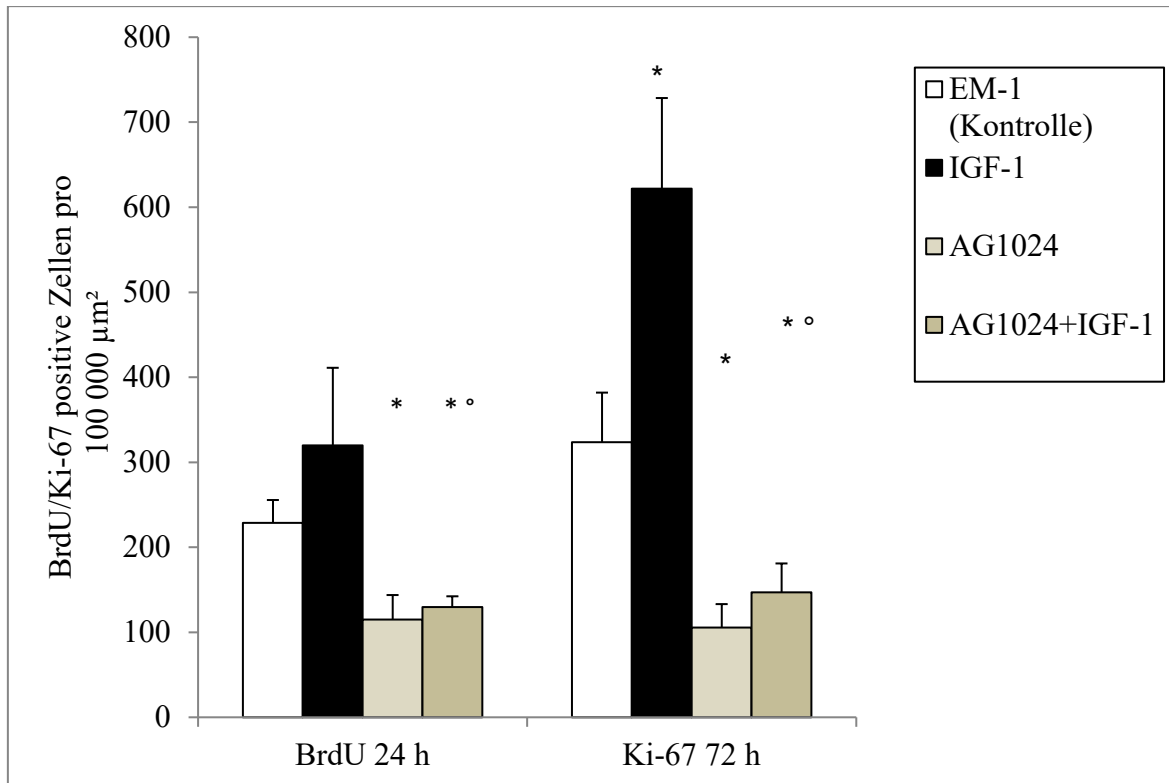


Abbildung 4.4: Proliferationspotential der fmNPCs während der Expansion. Anzahl der Zellen mit Proliferationspotential pro 100 000 μm^2 nach Expansion über 24 h (anti-BrdU) und 72 h (anti-Ki-67) in EM-1 (= Kontrolle), in EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1, in EM-1 plus 25 μM AG 1024 oder in EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μM AG 1024.

Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,05$ im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der Kontrolle.

° Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,05$ im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der IGF-1-Versuchsreihe.

Ergebnisse

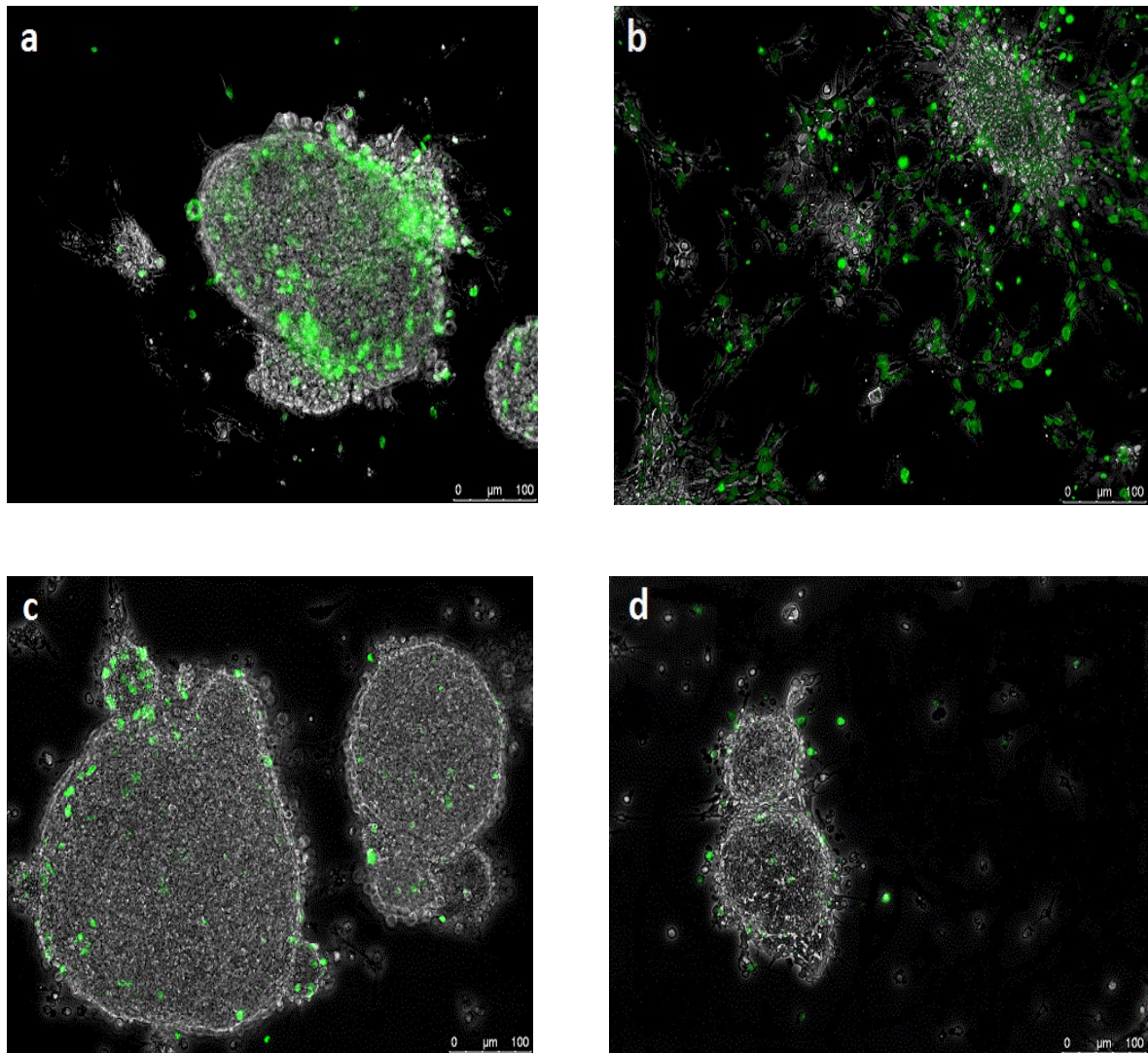


Abbildung 4.5: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf das Proliferationspotential der fmNPCs nach Expansion über 24 h zeigen. Zellen mit Proliferationspotential wurden mit anti-BrdU (grün) markiert. Zellen mit Proliferationspotential (BrdU-positiv) nach Expansion über 24 h in a) EM-1 (= Kontrolle). b) EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1. c) EM-1 plus 25 μ M AG 1024. d) EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

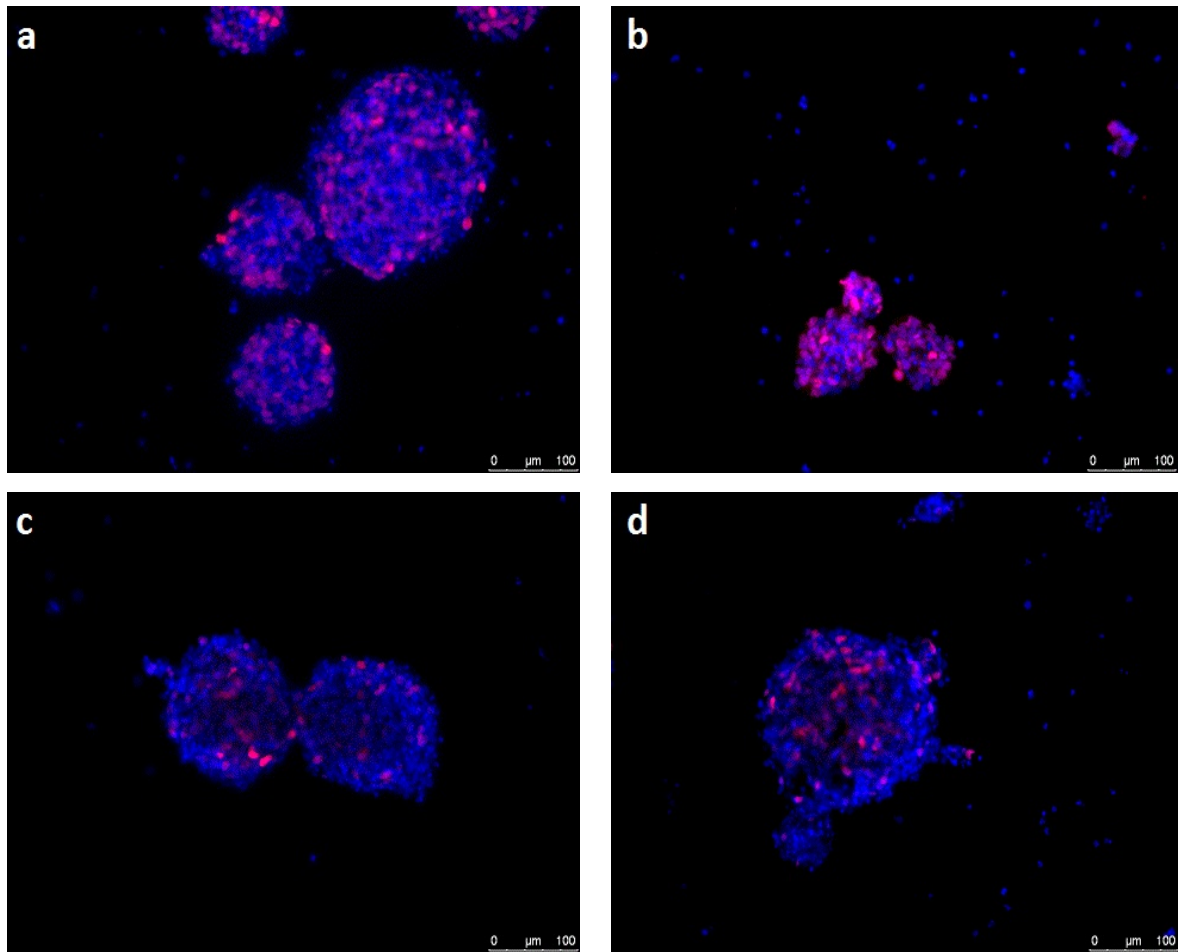


Abbildung 4.6: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf das Proliferationspotential der fmNPCs nach Expansion über 72 h zeigen. Zellen mit Proliferationspotential wurden mit anti-Ki-67 (rot), die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Zellen mit Proliferationspotential (Ki-67-positiv) nach Expansion über 72 h in a) EM-1 (= Kontrolle). b) EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1. c) EM-1 plus 25 μ M AG 1024 d) EM-1 plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

4.4 IGF-1 induziert die Neurogenese, zeigt aber keinen Einfluss auf die Astro- und Oligodendrogenese von fmNPCs der Ratte

Frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben grundlegende Daten zum Differenzierungsverhalten von fmNPCs geliefert. Demnach konnte gezeigt werden, dass sich nach Entzug der Mitogene $37 \pm 7\%$ der untersuchten fmNPCs zu Astrozyten (GFAP-positiv), $13 \pm 1\%$ zu Oligodendrozyten (GalC-positiv) und $23 \pm 1\%$ zu Neuronen (MAP2-positiv) differenzierten.

Die Ergebnisse der ersten Fragestellung der vorliegenden Arbeit, inwiefern IGF-1 die Überlebensrate der Zellen während der Expansion und Differenzierung beeinflusst, haben gezeigt, dass IGF-1 einen signifikanten positiven Effekt auf das Überleben der Zellen bewirkt, der während der Differenzierung durch den IGF-1-Rezeptor-Antagonisten AG 1024 blockiert werden konnte. Daraus ergab sich die Fragestellung des Einflusses von IGF-1 auf das neurale Differenzierungsverhalten der untersuchten Zellen, also inwiefern die Anwesenheit von IGF-1 die Astrogenese, Oligodendrogenese oder Neurogenese beeinflusst. Dafür wurden die Zellen für 7 d in P4-8F differenziert und nebst einer unbehandelten Kontrollreihe mit IGF-1 (50 ng/ml), AG 1024 (25 μ M) und IGF-1 (50 ng/ml) oder AG 1024 (25 μ M) behandelt. Danach erfolgte die immunzytochemische Färbung der Zellen gegen astrogliale (GFAP), oligodendrogliale (GalC) und neuronale (MAP2) Marker für die anschließende Dokumentation und Auswertung immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Kapitel 3.2.5.2.2 ausführlich erläutert.

Nach dem gewünschten Differenzierungszeitraum von 7 d zeigten sich für die einzelnen experimentellen Paradigmata völlig verschiedene Verteilungen der adulten neuroektodermalen Zellpopulationen. Es zeigte sich eine Induktion der Neurogenese durch IGF-1, jedoch kein Einfluss auf die Astro- und Oligodendrogenese. Demnach ließen sich nach der Behandlung mit IGF-1 $12,43 \pm 1,87\%$ MAP2-positive Zellen beobachten und damit eine signifikant höhere Rate an Zellen mit neuronalem Phänotyp als unter Kontrollbedingungen mit $5,60 \pm 0,25\%$ MAP2-positiven Zellen ($p = 0,00$). Durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit IGF-1 und AG 1024 konnte der IGF-1-Effekt signifikant blockiert werden ($2,60 \pm 0,90\%$ MAP2-positive Zellen; $p = 0,00$).

Des Weiteren führte die alleinige Behandlung der Zellen mit AG 1024 zu einem signifikanten Abfall des Anteils an MAP2-positiven Zellen ($1,54 \pm 0,48\%$ der Zellen) im Vergleich zur Kontrollreihe ($5,60 \pm 0,25\%$ der Zellen; $p = 0,00$) und Behandlung mit IGF-1

Ergebnisse

($12,43 \pm 1,87$ %; $p = 0,00$). Hinsichtlich der astroglialen Differenzierung der fmNPCs, konnten bei der Untersuchung des astroglialen Markers GFAP keinerlei signifikante Effekte, weder von IGF-1 noch von AG 1024, festgestellt werden. Demnach waren nach dem gewünschten Differenzierungszeitraum von 7 d und Behandlung mit IGF-1 $34,50 \pm 3,45$ % der Zellen GFAP-positiv verglichen mit $37,21 \pm 3,57$ % GFAP-positiver Zellen unter Kontrollbedingungen. Nach gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit IGF-1 und AG 1024 waren $33,25 \pm 3,80$ % der Zellen GFAP-positiv, $34,29 \pm 3,47$ % GFAP-positive Zellen fanden sich nach alleiniger Behandlung mit AG 1024.

Bezüglich der oligodendroglialen Differenzierung konnte bei der Untersuchung des oligodendroglialen Markers GalC nach Differenzierung der Zellen über 7 d einerseits kein signifikanter Effekt von IGF-1 gefunden werden, andererseits führte die Behandlung mit AG 1024 zu signifikant weniger GalC-positiven Zellen ($4,50 \pm 2,42$ % der Zellen) im Vergleich zur Kontrolle ($14,34 \pm 2,42$ % GalC-positive Zellen; $p = 0,00$) und Behandlung mit IGF-1 ($15,74 \pm 2,07$ % GalC-positive Zellen; $p = 0,00$). Ein ähnlicher Effekt konnte nach Behandlung der Zellen mit IGF-1 und AG 1024 festgestellt werden ($5,96 \pm 1,61$ % GalC-positive Zellen; $p = 0,00$). Die Ergebnisse der Versuche mit GFAP, GalC und MAP2 sind in den Abbildungen 4.7 bis 4.9 dargestellt. Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf das neuronale und gliale Differenzierungsverhalten der fmNPCs nach Differenzierung über 7 d darstellen, zeigen die Abbildungen 4.10 und 4.11.

Ergebnisse

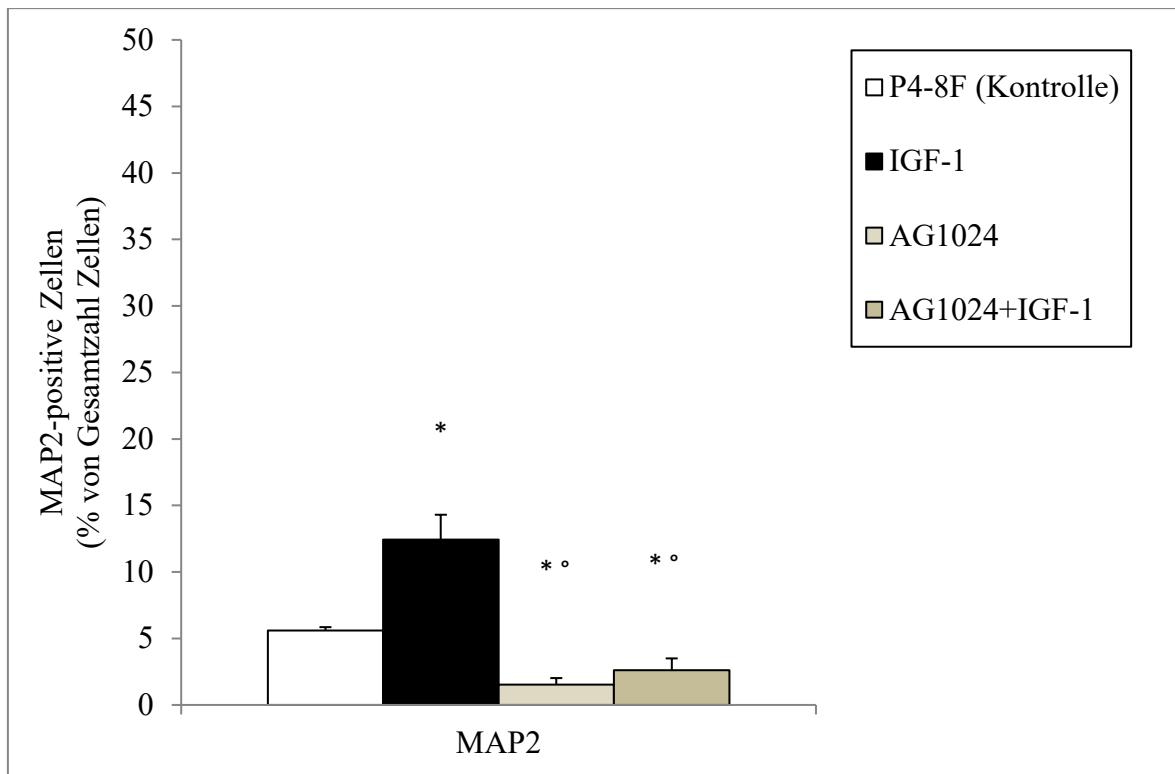


Abbildung 4.7: Neuronale Differenzierung der fmNPCs. Prozentualer Anteil MAP2-positiver Zellen nach Differenzierung über 7 d in P4-8F (= Kontrolle), in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1, in P4-8F plus 25 μ M AG 1024 oder in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024

Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,05$ im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der Kontrolle.

° Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,05$ im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der IGF-1-Versuchsreihe.

Ergebnisse

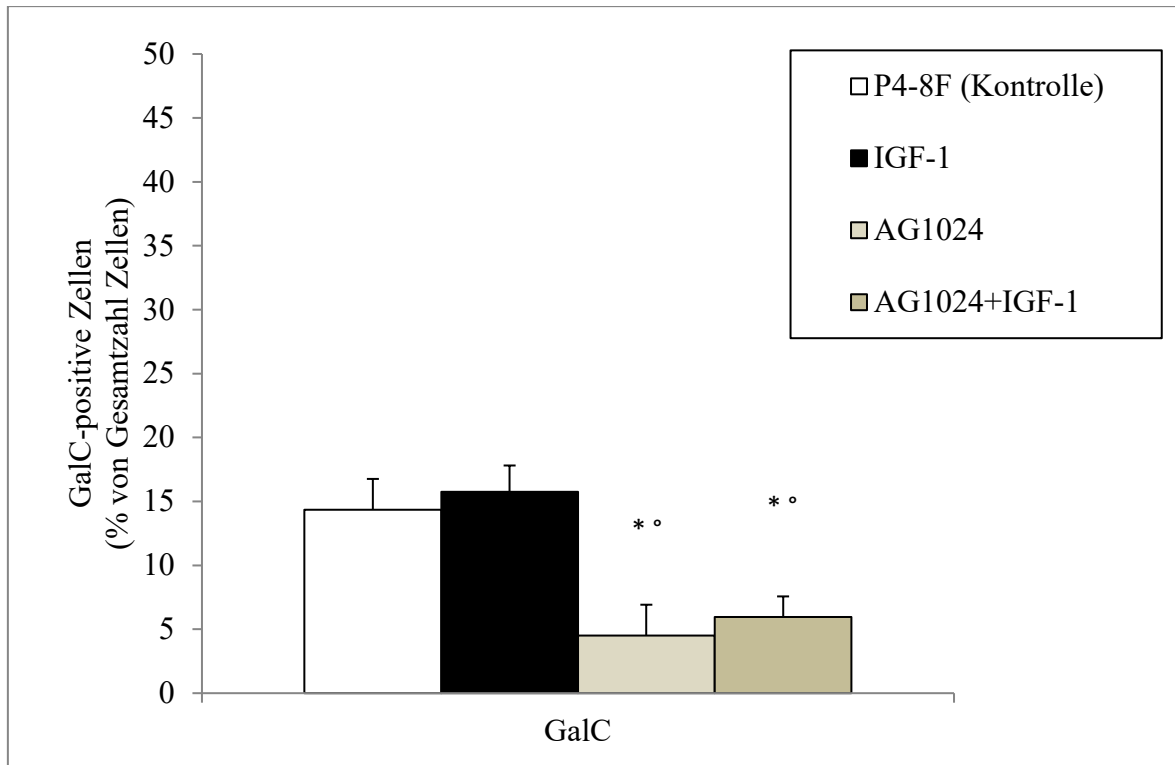


Abbildung 4.8: Oligodendrogliale Differenzierung der fmNPCs. Prozentualer Anteil GalC-positiver Zellen nach Differenzierung über 7 d in P4-8F (= Kontrolle), in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1, in P4-8F plus 25 μ M AG 1024 oder in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der Kontrolle.

° Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum entsprechenden Mittelwert der IGF-1-Versuchsreihe.

Ergebnisse

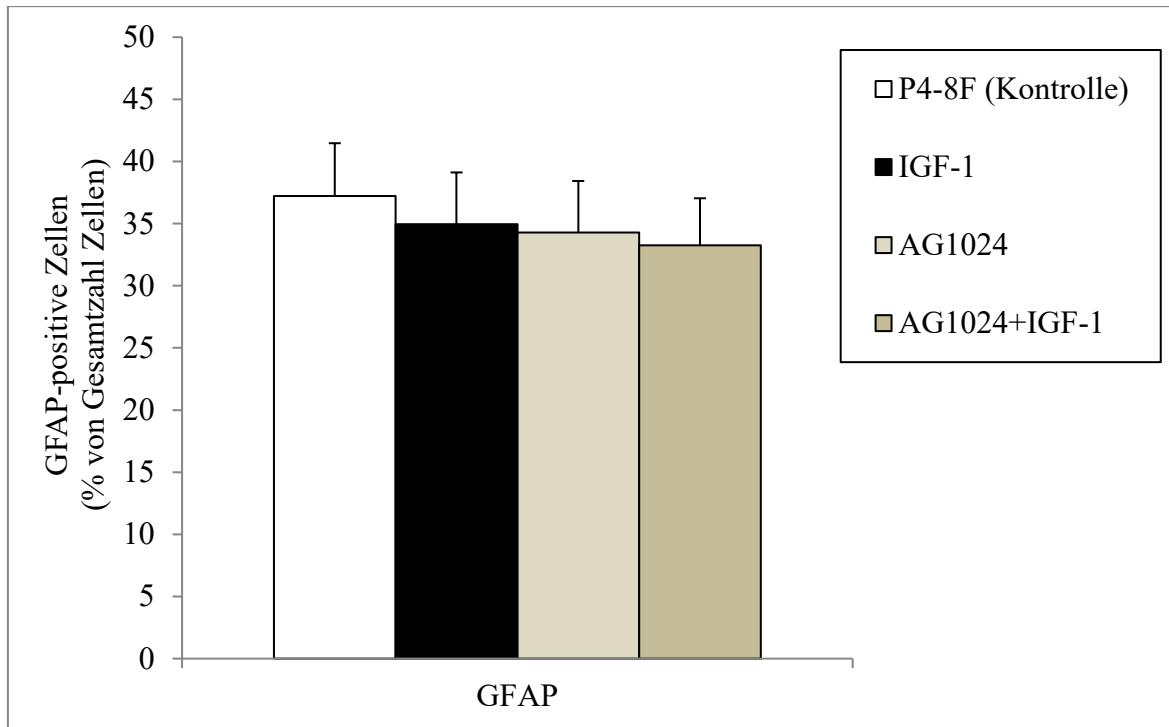


Abbildung 4.9: Astrogliale Differenzierung der fmNPCs. Prozentualer Anteil GFAP-positiver Zellen nach Differenzierung über 7 d in P4-8F (= Kontrolle), in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1, in P4-8F plus 25 μ M AG 1024 oder in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

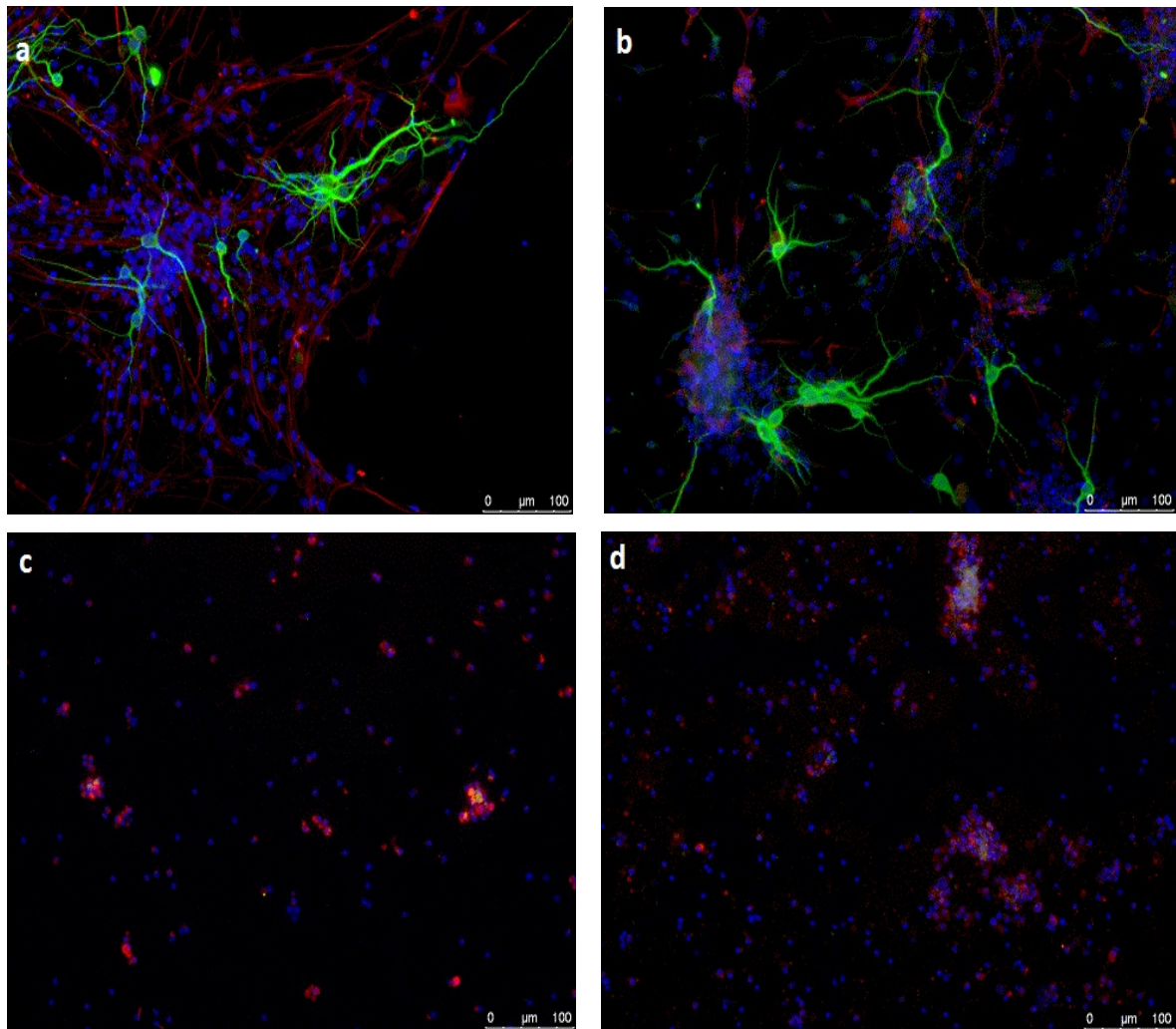


Abbildung 4.10: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf die neuronale und astrogliale Differenzierung der fmNPCs 7 d nach Beginn des Differenzierungsprozesses zeigen. Neuronale Zellen wurden mit anti-MAP2 (grün), astrogliale Zellen mit anti-GFAP (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Neuronale Zellen (MAP2-positiv) und astrogliale Zellen (GFAP-positiv) nach Differenzierung über 7 d in a) P4-8F (= Kontrolle). b) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1. c) P4-8F plus 25 μ M AG 1024. d) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

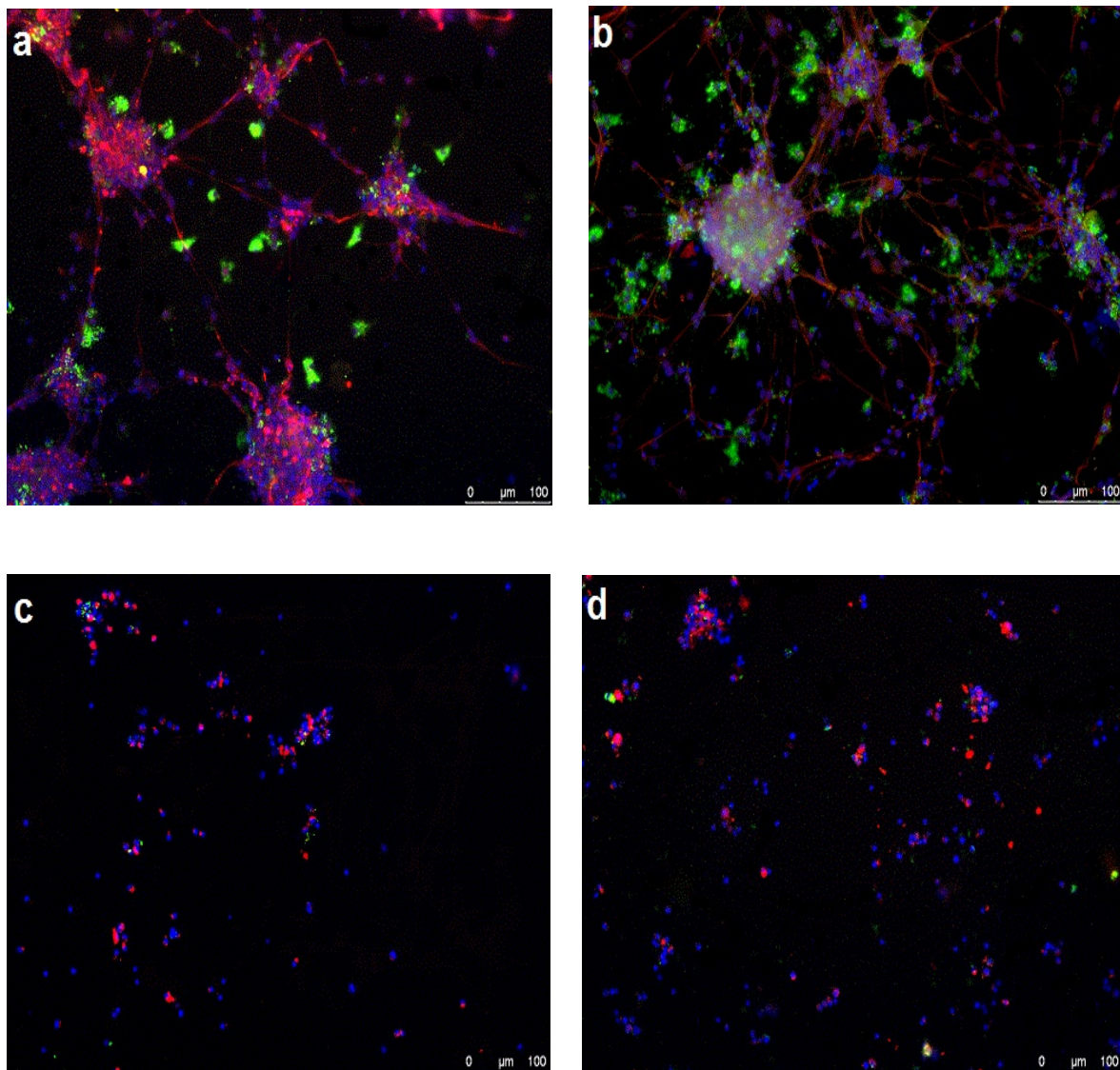


Abbildung 4.11: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 und AG 1024 auf die oligodendrogliale und astrogliale Differenzierung der fmNPCs 7 d nach Beginn des Differenzierungsprozesses zeigen. Oligodendrogliale Zellen wurden mit anti-GalC (grün), astrogliale Zellen wurden mit anti-GFAP (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Oligodendrogliale Zellen (GalC-positiv) und astrogliale Zellen (GFAP-positiv) nach Differenzierung über 7 d in a) P4-8F (= Kontrolle). b) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1. c) P4-8F plus 25 μ M AG 1024. d) P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1 plus 25 μ M AG 1024.

4.5 IGF-1 fördert die Expression des IGF-1-Rezeptors von fmNPCs der Ratte während deren Differenzierung

Um den Einfluss von IGF-1 auf die fmNPCs über eine Wirkung am IGF-1-Rezeptor bestätigen zu können, wurden immunzytochemische Färbungen gegen den IGF-1-Rezeptor mit einem IGF-1-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Kapitel 3.2.5.2.3 ausführlich erläutert. Im Anschluss erfolgten die Dokumentation und Auswertung immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder.

Die Färbungen gegen den IGF-1-Rezeptor wurden nach Differenzierung der Zellen über 72 h und 7 d in P4-8F, einerseits mit IGF-1-Behandlung, andererseits unbehandelt als Kontrollreihe durchgeführt. Zusätzlich wurde die IGF-1-Rezeptor-Expression der Zellen nach Expansion der Zellen über 72 h in EM-1 untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch dargestellt. Aufgeführt sind die ermittelten Werte für den prozentualen Anteil IGF-1-Rezeptor-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl unter den entsprechenden Versuchsbedingungen.

	EM-1	P4-8F	P4-8F plus IGF-1
72 h	0,35 ± 0,12	10,07 ± 4,26	44,40 ± 14,30
7 d	-	1,71 ± 1,61	37,54 ± 5,56

Tabelle 1: Ergebnisse der Versuche zum Einfluss von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors (Erläuterung siehe Text).

Die Ergebnisse der Versuche zur Expression des IGF-1-Rezeptors sind außerdem in Abbildung 4.12 dargestellt. Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 auf die IGF-1-Rezeptor-Expression von fmNPCs nach Expansion/Differenzierung über 72 h und Differenzierung über 7 d darstellen, zeigen Abbildung 4.13 und 4.14.

Ergebnisse

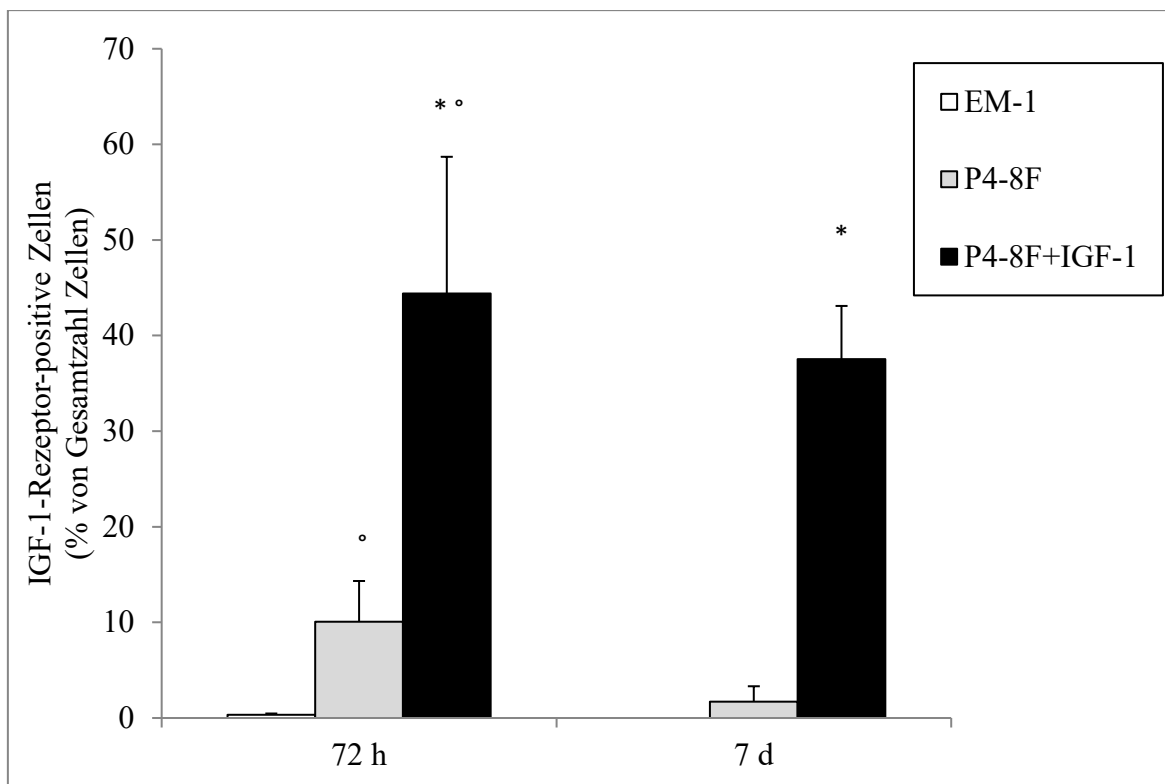


Abbildung 4.12: IGF-1-Rezeptor-Expression von fmNPCs. Prozentualer Anteil IGF-1-Rezeptor-positiver Zellen nach Expansion über 72 h in EM-1 sowie nach Differenzierung über 72 h und 7 d in P4-8F mit oder ohne Zugabe von 50 ng/ml IGF-1. Mittelwerte mit Standardabweichung für jeweils mindestens drei unabhängige Versuche.

* Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum Mittelwert der entsprechenden Versuchsreihe der Differenzierung in P4-8F.

° Signifikanzniveau mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich zum Mittelwert der Versuchsreihe der Expansion in EM-1.

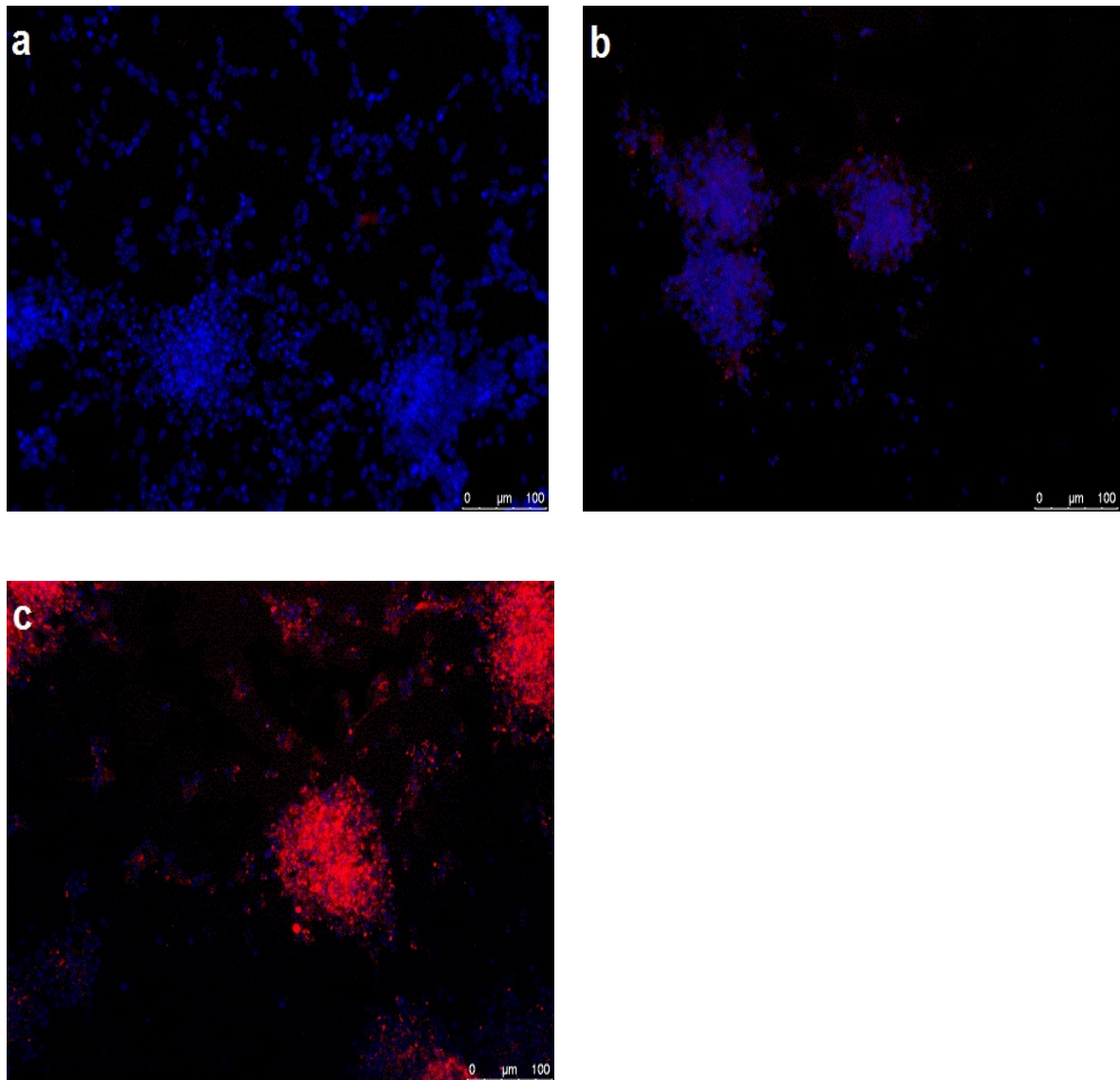


Abbildung 4.13: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors in fmNPCs zeigen. Zellen, die den IGF-1-Rezeptor exprimieren wurden mit dem IGF-1-Rezeptor-Antikörper Ab-1161 (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. IGF-1-Rezeptor-positive Zellen nach a) Expansion über 72 h in EM-1. b) Differenzierung über 72 h in P4-8F. c) Differenzierung über 72 h in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1.

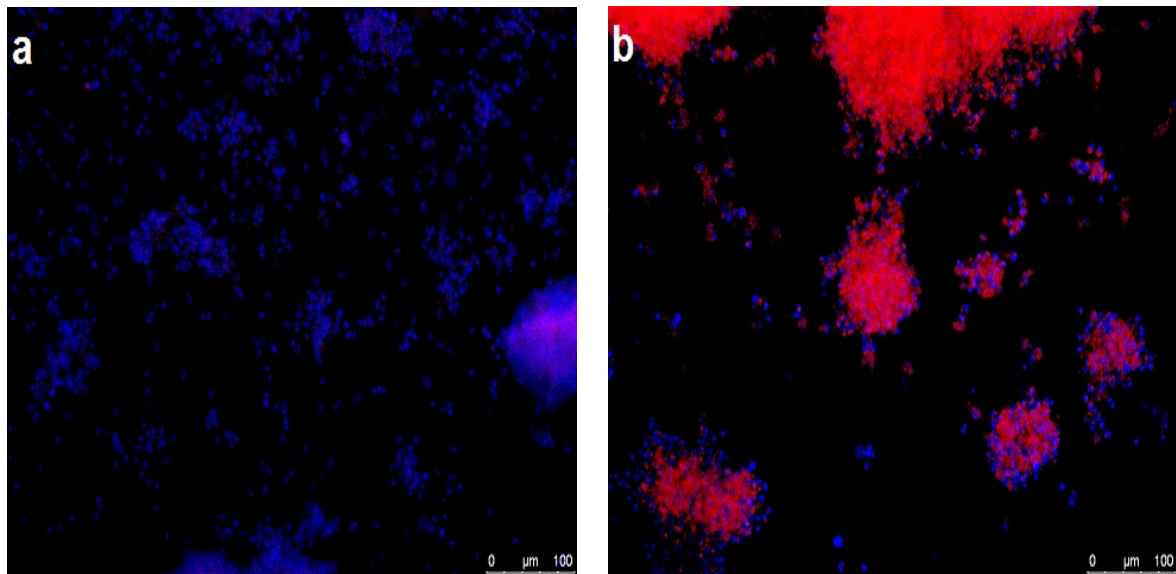


Abbildung 4.14: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Bilder, welche den Einfluss von IGF-1 auf die Expression des IGF-1-Rezeptors in fmNPCs zeigen. Zellen, die den IGF-1-Rezeptor exprimieren wurden mit dem IGF-1-Rezeptor-Antikörper Ab-1161 (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. IGF-1-Rezeptor-positive Zellen nach a) Differenzierung über 7 d in P4-8F. b) Differenzierung über 7 d in P4-8F plus 50 ng/ml IGF-1.

4.6 IGF-1 inhibiert den PI3-Kinase-Signalweg und fördert die Aktivität von ERK1/2 in fmNPCs der Ratte

Zahlreiche Publikationen beschreiben antiapoptotische und protektive Effekte von IGF-1 auf verschiedene Arten peripherer Zelltypen aber auch ausdifferenzierte neurale Zellarten sowie auf ESCs und NSCs/NPCs (siehe Kapitel 1.1). Weiterhin legen viele Studien nahe, dass eine mögliche Induktion des PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweges für diese IGF-1-Wirkungen eine große Rolle spielt, wobei einige Studien auch eine Beeinflussung des ERK-Signalweges durch IGF-1 beschreiben (siehe Kapitel 1.4). Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten für das hier verwendete Zellsystem der fmNPCs der Ratte die Bedeutung des PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalwegs für deren astrogliale Differenzierung, sowie des ERK-Signalwegs für deren dopaminerge Differenzierung aufzeigen (siehe Kapitel 1.5).

Vor dem Hintergrund dieser Studienlage wurden zum besseren Verständnis der zellulären Mechanismen, die zu den Veränderungen des neuronalen Differenzierungsverhaltens nach Behandlung mit IGF-1 (siehe Kapitel 4.4) beitragen, ELISA-Experimente durchgeführt, um verschiedene Signaltransduktionskaskaden zu beleuchten.

Zur Verifizierung der IGF-1-abhängigen Signalwege in der Frühphase der neuronalen Differenzierung von fmNPCs wurden die durch IGF-1 induzierte Phosphorylierung (Aktivierung) folgender Kinasen und Transkriptionsfaktoren untersucht: PI3-Kinase, Akt, NF- κ B, ERK1/2, JNK und p38 MAP-Kinase. Dafür wurde das „FACE“-System verwendet, das die Möglichkeit bietet, rasche Veränderungen von Kinasen und Transkriptionsfaktoren in den ersten Stunden einer Behandlung zu untersuchen. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, die Untersuchung direkt an den behandelten und fixierten Zellen, auf die jeweilige Zellzahl normiert, durchführen zu können. Betrachtet wurde der Einfluss von 50 ng/ml IGF-1 im Vergleich zu einer (pharmakologisch) unbehandelten Kontrolle zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h und 6 h nach Behandlungsbeginn.

Unter dem Einfluss von IGF-1 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Aktivität der PI3-Kinase nach 0 h ($0,165 \pm 0,016$; $p = 0,01$), 3 h ($0,109 \pm 0,046$; $p = 0,00$) und 6 h ($0,055 \pm 0,004$; $p = 0,00$) im Vergleich zur Kontrolle (0 h: $0,701 \pm 0,173$; 3 h: $0,505 \pm 0,077$; 6 h: $0,565 \pm 0,077$). Für Akt fand sich unter dem Einfluss von IGF-1 eine signifikante Abnahme der Aktivität nach 1 h ($0,538 \pm 0,177$; $p = 0,03$) und nach 6 h ($0,686 \pm 0,179$; $p = 0,00$) im Vergleich zur Kontrolle (1 h: $1,063 \pm 0,156$, 6 h: $1,603 \pm 0,102$). Für die Aktivität des Transkriptionsfaktor NF- κ B zeigte sich lediglich nach 0,5 h eine signifikante Inhibition unter Einfluss von IGF-1 ($0,516 \pm 0,047$; $p = 0,03$) im

Ergebnisse

Vergleich zur Kontrolle ($1,206 \pm 0,301$). Für die MAP-Kinase p38 konnte unter dem Einfluss von IGF-1 tendenziell eine Inhibierung beobachtet werden, mit einem signifikanten Wert nach 3 h ($0,564 \pm 0,079$; $p = 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle ($1,190 \pm 0,199$). Auf die Aktivität der MAP-Kinase JNK konnte unter dem Einfluss von IGF-1 im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fand sich unter dem Einfluss von IGF-1 eine signifikante Zunahme der ERK1/2-Aktivität nach 1 h ($0,758 \pm 0,153$; $p = 0,00$), 3 h ($0,678 \pm 0,214$; $p = 0,02$) und 6 h ($0,401 \pm 0,022$; $p = 0,00$) im Vergleich zur Kontrolle (1 h: $0,193 \pm 0,050$; 3 h: $0,090 \pm 0,011$; 6 h: $0,114 \pm 0,032$). Die Ergebnisse der ELISA-Experimente sind in den Abbildungen 4.15 bis 4.20 graphisch dargestellt (* Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,05$; Anmerkung: Zur besseren Darstellung wurden die 0 h-Werte der Versuchsreihen mit IGF-1 an die 0 h-Werte der entsprechenden Kontrollreihen angepasst).

Ergebnisse

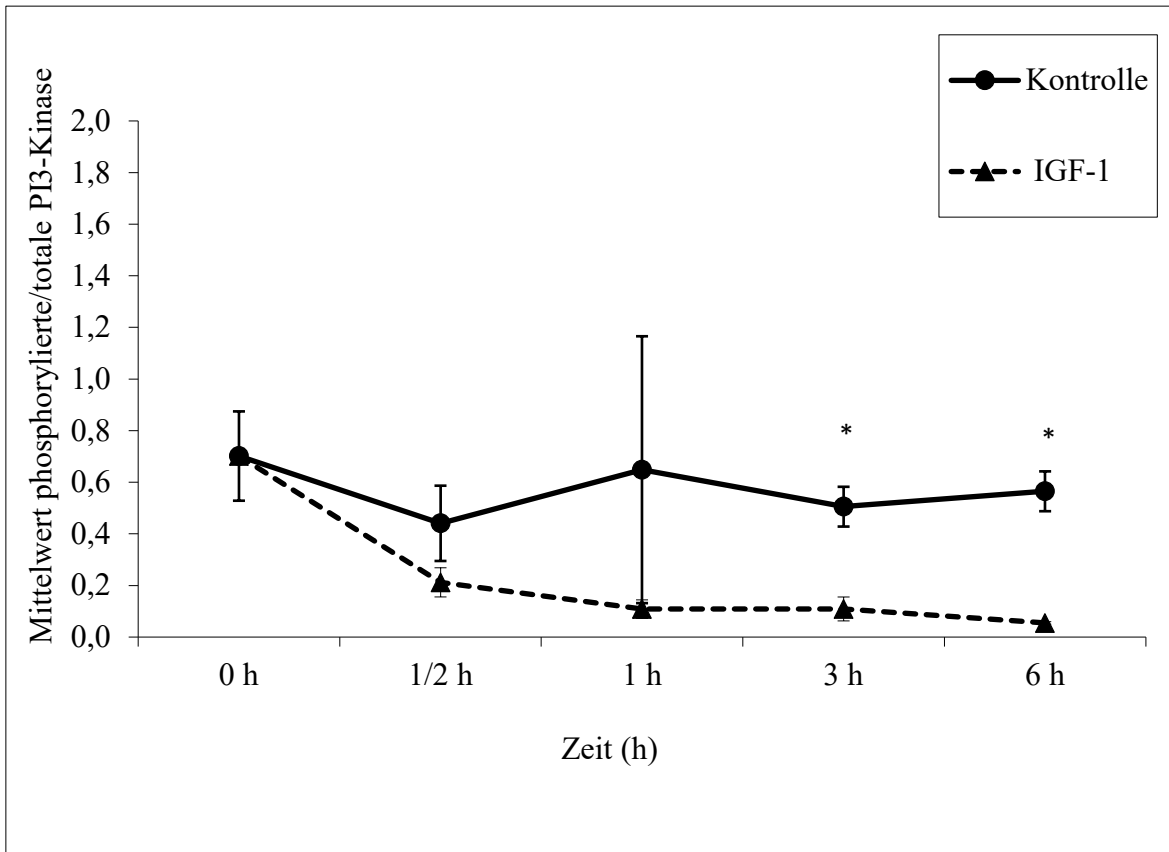


Abbildung 4.15: ELISA der PI3-Kinase

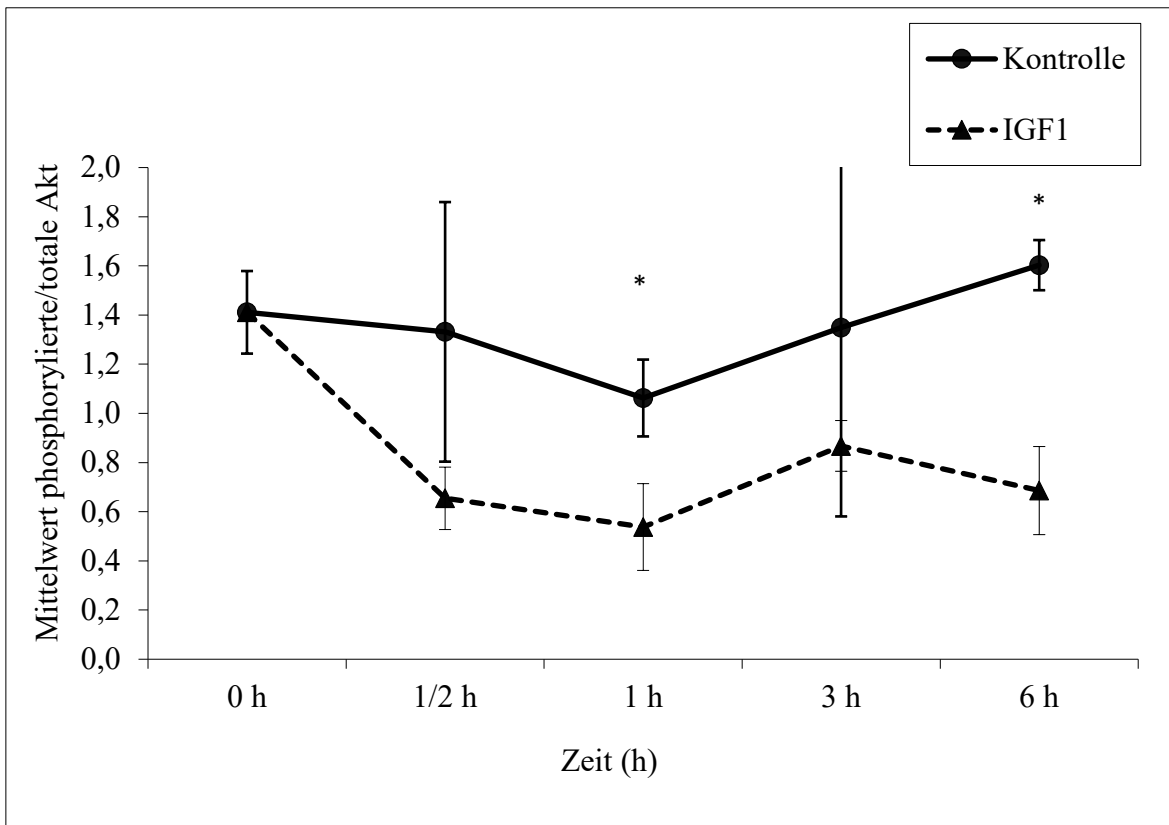


Abbildung 4.16: ELISA der Akt-Kinase

Ergebnisse

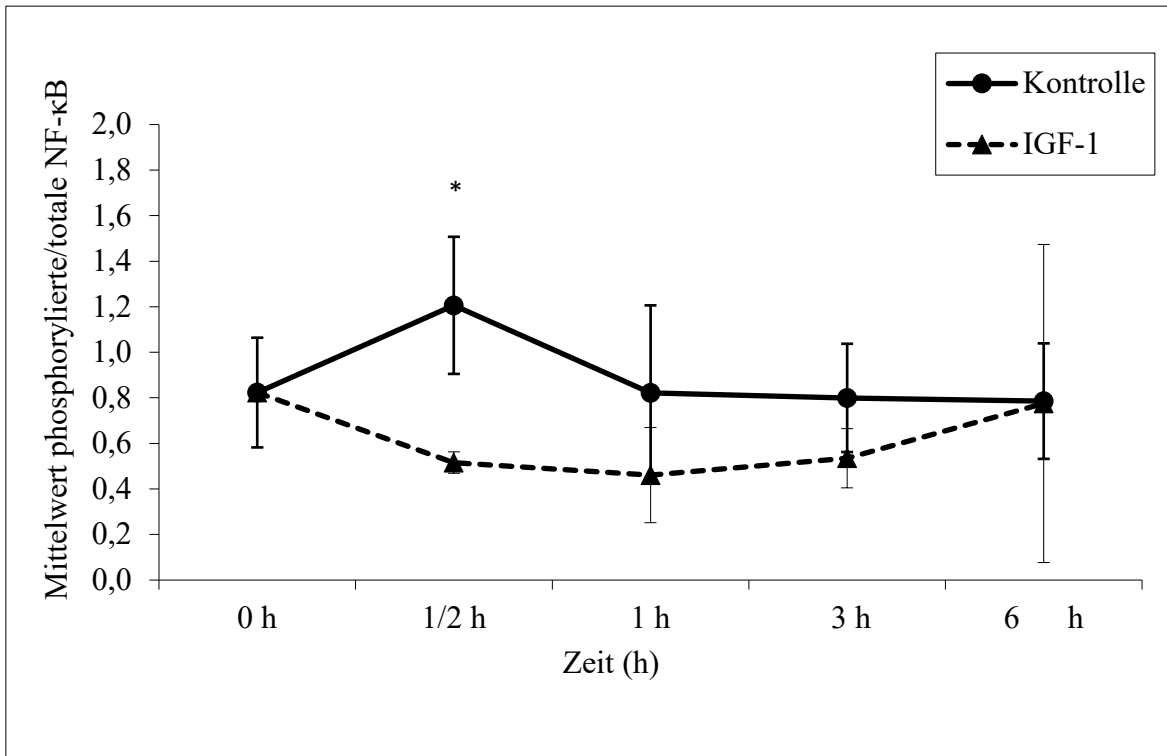


Abbildung 4.17: ELISA des Transkriptionsfaktor NF-κB

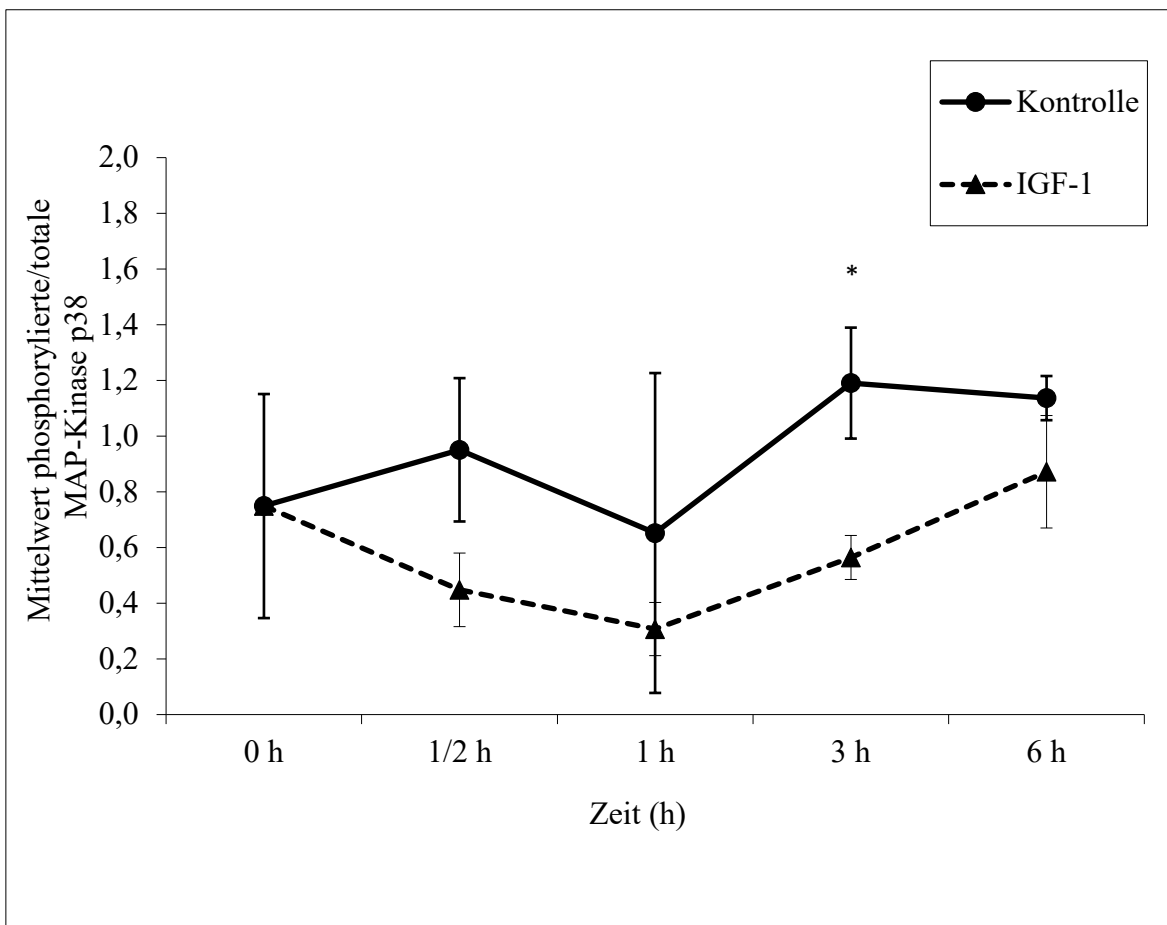


Abbildung 4.18: ELISA der MAP-Kinase p38

Ergebnisse

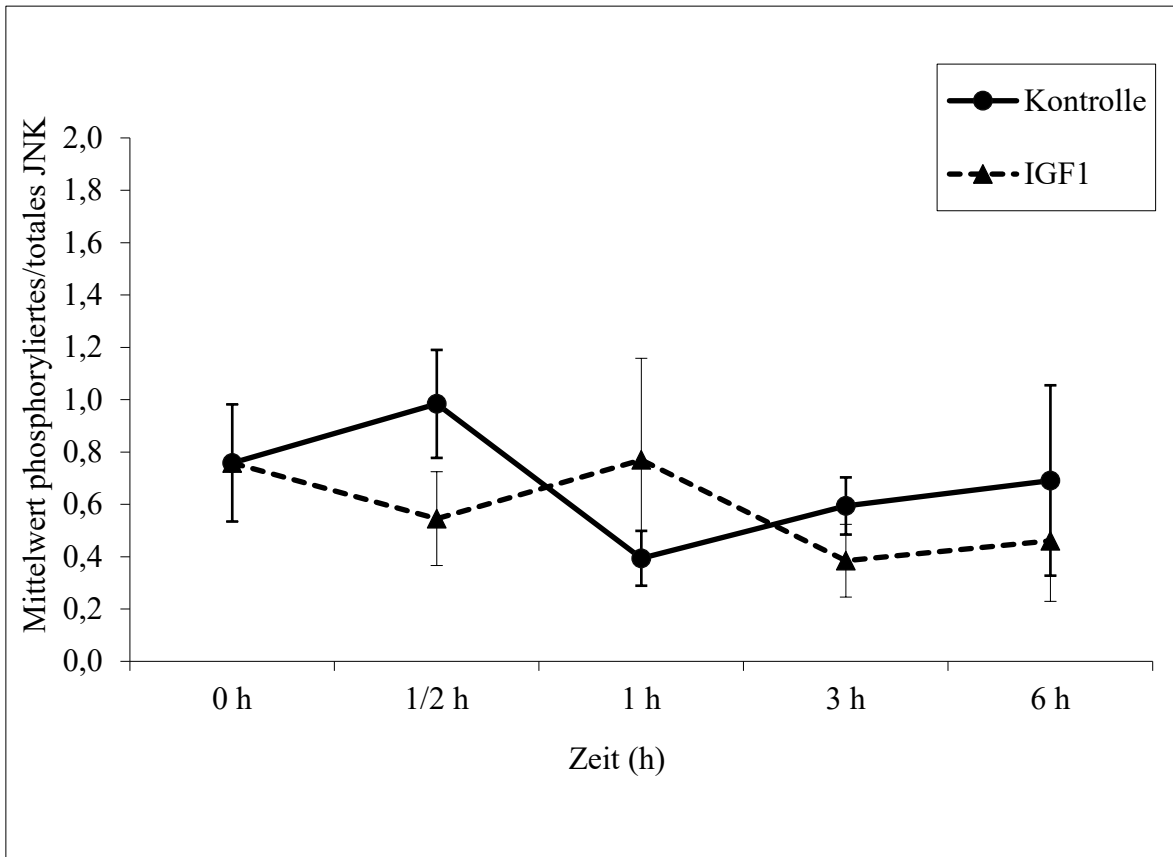


Abbildung 4.19: ELISA der MAP-Kinase JNK

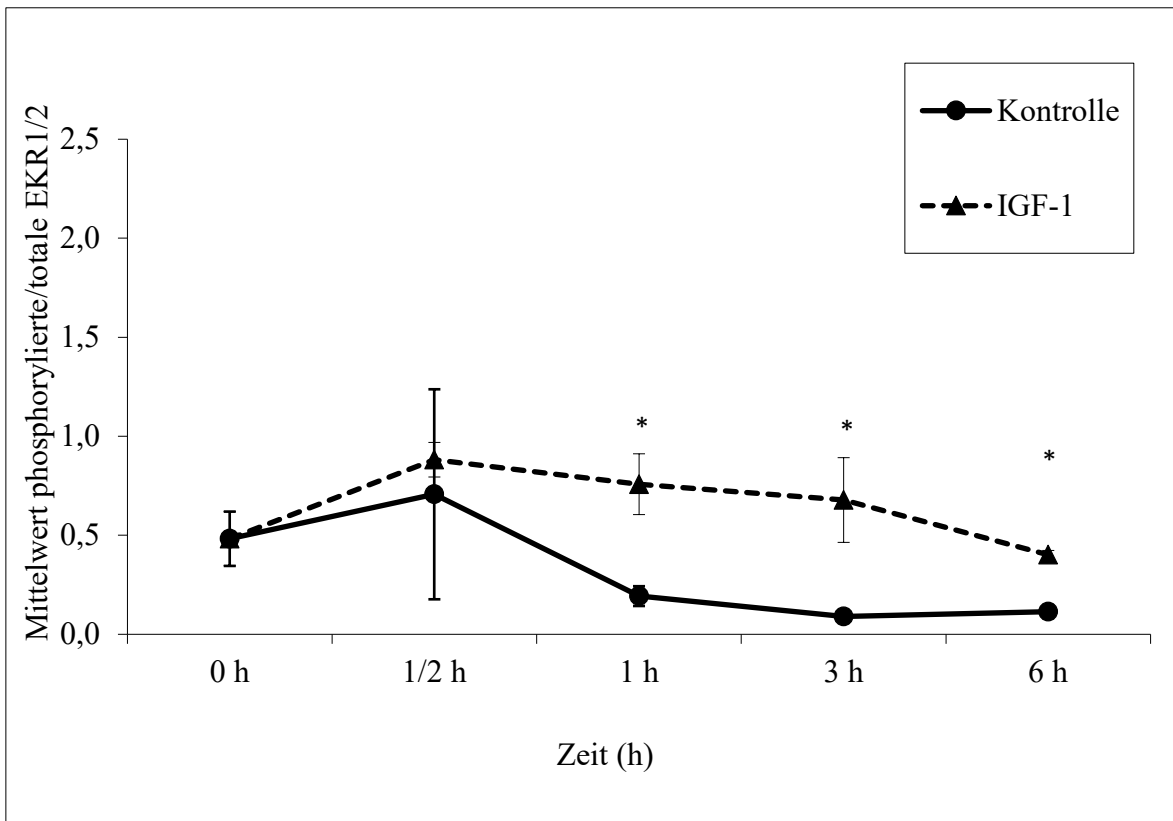


Abbildung 4.20: ELISA der ERK1/2

5 Diskussion

5.1 Strategien zur Zellersatztherapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms

Der Forschungskomplex um die Entwicklung von Zellersatztherapien für neurodegenerative Erkrankungen bildet den Hintergrund der vorliegenden Arbeit. In der Tradition der eigenen Arbeitsgruppe steht das IPS exemplarisch im Vordergrund. Ziel war es, das Stammzellverhalten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen besser zu verstehen.

Damit soll ein Beitrag zur Optimierung experimenteller Versuchsanordnungen zur Zellersatztherapie verschiedener Zellsysteme geleistet und in diesem Zusammenhang die Entwicklung kurativer Therapieansätze neurodegenerativer Erkrankungen weiter vorangetrieben werden.

Neben der Frage nach der Wahl eines geeigneten Ausgangs-Zellsystems für die Gewinnung neuronaler Zellen für entsprechende Transplantationsversuche werden im Folgenden auch die Möglichkeiten von IGF-1 als neuronalem Proliferations- und Differenzierungsfaktor und somit dessen Potential als neurotropher (Co-) Faktor für die Optimierung verschiedenster experimenteller Ansätze der Zellersatztherapie neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert.

Die Pathogenese des IPS wurde bereits in der Einleitung geschildert, ebenso die daraus resultierenden derzeitigen therapeutischen Optionen, welche vornehmlich die Pharmakotherapie sowie supportive Begleitmaßnahmen umfassen und lediglich eine Symptomreduktion bewirken (siehe Kapitel 1.1). Vor diesem Hintergrund und mit weiterwachsendem Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung eröffnete sich die Frage nach biologisch relevanteren Therapieoptionen, auch mit Ausblick auf potentiell kurative und krankheitsmodifizierende Verfahren. Naheliegend erscheint dabei das Konzept, entsprechend der Pathophysiologie des IPS untergegangene Nervenzellpopulationen zu ersetzen, neuronale Regelkreise zu reparieren oder die Überlebensfähigkeit dopaminerger Neurone zu steigern, um die funktionale Integrität des nigro-striatalen Regelkreises wiederherzustellen.

Bereits in den 1980er Jahren hatte sich die Zellersatztherapie als mögliche Therapieoption herauskristallisiert. Erste Studien nutzten autologe Transplantate aus Gewebe des Nebennierenmarks [154] oder xenologes Material aus dem ventralen Mesenzephalon des Schweins [155]. Die erfolgreichsten Arbeitsgruppen verwendeten Gewebe aus dem

Diskussion

humanen fetalen ventralen Mesenzephalon und konnten in präklinischen Studien mit Nagern zeigen, dass dopaminerge Neurone aus dem mesenzephalen Gewebe nach Transplantation nicht nur überleben und das Striatum reinnervieren konnten, sondern darüber hinaus zu einer klinischen Verbesserung im Parkinson-Tiermodell führten [156].

Vor diesem Hintergrund starteten in den späten 1980er Jahren in Mexiko und Schweden klinische Studien mit der Transplantation von humanem fetalen Gewebe aus dem ventralen Mesenzephalon in das Striatum von Patienten mit fortgeschrittenem IPS [157,158]. Bis heute erhielten geschätzt 400 [159] Parkinson-Patienten erfolgreich intrastriatale Implantate mit konsekutivem Nachweis einer klinischen Verbesserung, welche für manche Patienten sogar das Absetzen der Medikation mit L-Dopa erlaubte.

Auch neuere Studien, die das klinische Langzeit-Outcome nach Transplantation untersuchten, bestätigten diese Ergebnisse [160] und konnten zudem in histopathologischen Untersuchungen eine Reinnervation des Striatum durch die implantierten Neurone nachweisen [161,162]. In Korrelation zum klinischen Outcome konnte das Überleben sowie die funktionale Integration der Implantate durch postoperative PET-Scans, welche einen massiv gesteigerten ¹⁸F-Fluorodopa Tracer Uptake zeigten, sowie durch post-mortem Untersuchungen an transplantierten Patienten bestätigt werden [162-168].

Jedoch stellten spätere placebokontrollierte und doppelt verblindete Studien die bisherigen teilweise positiven Ergebnisse der Open-Label-Studien in Frage und warfen signifikante Zweifel am übergeordneten Ziel der Etablierung einer Zellersatztherapie des IPS auf. Diese Studien konnten einerseits keine signifikante klinische Verbesserung aufzeigen, vielmehr entwickelten eine erhebliche Anzahl transplantierte Patienten das Phänomen transplantatinduzierter schwerer Dyskinesien [169,170]. Unter anderem wurde dafür eine Verunreinigung der Transplantate mit serotonergen Zellen verantwortlich gemacht [171].

Abgesehen von diesen teilweise ernüchternden klinischen Erfolgen wurden vor allem auch erhebliche ethische und logistische Bedenken bezüglich der Bereitstellung von humanem fetalem Gewebe diskutiert. Nichtsdestotrotz konnte anhand zahlreicher Studienergebnisse im Sinne eines Proof-of-Principle gezeigt werden, dass transplantierte dopaminerge neuronale Zellen, welche aus humanem fetalen Gewebe des ventralen Mesenzephalon gewonnen wurden, im Empfänger-Gehirn überleben, das Striatum reinnervieren sowie zu einem lange anhaltenden klinischen Benefit führen können [50].

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich damit, dies zuverlässig und konsequent durch standardisierte Verfahren im Rahmen von klinischen Studien zu realisieren (TRANSEURO

Open-Label Transplant Study in Parkinson's Disease [TRANSEURO]; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01898390) [172]. Weitere offene Fragen beziehen sich in diesem Zusammenhang z. B. auf die Auswahl geeigneter Patientenkollektive, die Optimierung der Gewebepreparation/-implantation, und Immunsuppression, sowie grundlegend auf optimierte Studiendesigns [173].

Außerdem wurde, im Hinblick auf die vorab diskutierten Problemstellungen bezüglich der Nutzung von Gewebe aus dem humanen fetalen ventralen Mesenzephalon, die Frage nach einer alternativen Quelle für dopaminerge Neurone aufgeworfen.

Aufgrund dieses Forschungsbedarfs kam es im Jahr 2014 zu einer weltweiten Vereinigung von Forschergruppen (GForce-PD), die sich mit der Entwicklung und Koordinierung stammzellbasierter Therapien des IPS beschäftigen [174] und klinische Studien initiierten, die entweder humane ESCs (EUROPEAN STEM-PD [175] und NYSTEM-PD [176]) oder induzierte pluripotente Stammzellen („induced pluripotent stem cells“ [iPSCs]) (CiRA und Summit for PD [177]) als initiale Zellquelle für die Gewinnung dopaminerg neuronaler Zellen verwenden.

Nachfolgend werden verschiedene Stammzelltypen im Hinblick auf ihre Eignung als Quelle für dopaminerge neuronale Zellen anhand zahlreicher Studiendaten vergleichend diskutiert.

- **Embryonale Stammzellen (ESCs):**

Zahlreiche Studien widmeten ihr Interesse ESCs. Diese haben aufgrund ihrer Pluripotenz die Fähigkeit, sich in alle Zellen des ZNS zu differenzieren, des Weiteren stellen ESCs eine potentiell unerschöpfliche Quelle für humane dopaminerge Neurone dar, eine angemessene Auswahl neuraler Vorläuferzellen und entsprechende Techniken der Kultivierung vorausgesetzt [178].

Im Jahr 2006 konnte erstmals gezeigt werden, dass dopaminerge Neurone die aus humanen ESCs gewonnen wurden nach intrastriärer Implantation ins Parkinson-Rattenmodell überlebten und zu klinischen Verbesserungen führten [179]. Ältere Studien belegten dies bereits für dopaminerge Neurone die aus ESCs der Ratte [180] oder Primaten [181] gewonnen wurden. 2011 wurde erstmalig eine Methode zur Produktion humaner neuraler Progenitoren aus ESCs in hoher Qualität und Reinheit entwickelt, welche Neuron-spezifische Marker präsentierten und sich spontan in verschiedene neuronale Subpopulationen differenzieren konnten [182].

Eine andere Arbeitsgruppe um Kirkeby et al. konnte 2012 eine Methode entwickeln, um aus humanen ESCs neurale Progenitoren und Neurone zu generieren [183]. Zehn Tage nach Beginn ihrer Differenzierung wurden diese in das Striatum adulter Ratten transplantiert, wo sie neuronreiche und tumorfreie Gewebe ausbildeten, mit Charakteristika regionaler Spezifität. So konnten auch Zellen generiert werden, die nach der Transplantation ein Gewebe mit einem hohen Anteil an dopaminergen Neuronen aufwiesen, welche hinsichtlich ihrer Morphologie, axonalem Projektionsmuster und Protein-Expression identisch waren mit Zellen aus transplantiertem fetalem Gewebe aus dem ventralen Mesenzephalon.

Weiterhin konnten auch Kirkeby et al. zeigen, dass diese dopaminergen Zellen nach Transplantation im Parkinson-Tiermodell zu einer Verbesserung motorischer Defizite führten. Ähnliche Ergebnisse bzgl. dopaminergener Neurone, welche aus humanen ESCs gewonnen wurden konnten Kriks et al. zeigen [184]. Darüber hinaus initiierten Forschergruppen der oben erwähnten GForce-PD klinische Studien zur Zellersatztherapie des IPS, basierend auf humanen ESCs [175,176].

Neben diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden jedoch auch Bedenken bezüglich der Verwendung von ESCs geäußert, welche sich unter anderem auf die Gefahr der Tumorbildung beziehen [179,185]. Diese ergibt sich daraus, dass in der Kultivierung und Prozessierung von ESCs auch undifferenzierte Zellen persistieren, welche sich maligne transformieren können oder genetisch instabil sind [186,187]. Außerdem sehen manche Autoren die Gefahr der Immuninkompatibilität allogener humaner ESCs – bzw. deren Abkömmlingen – mit daraus resultierender Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion nach Implantation in das Empfänger-Gehirn [188].

- **Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)**

Eine interessante Entwicklung für die regenerative Medizin war die Gewinnung sogenannter iPSCs, welche aus körpereigenen adulten somatischen Zellen (z. B. Fibroblasten, adulten Neuronen) durch genetische Manipulation (z. B. retroviraler Transfer von Transkriptionsfaktoren) hergestellt werden können [189,190].

Im Jahr 2006 konnten Takahashi et al. zeigen, dass iPSCs aus embryonalen und adulten Fibroblasten der Ratte durch retrovirales Einfügen von Transkriptionsfaktoren (OSKM: Oct 3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc) generiert werden können [191]. In der Folge waren mehrere Arbeitsgruppen erfolgreich in der Bereitstellung von iPSCs aus verschiedenen humanen Somazellen [192,193]. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber ESCs besteht darin, dass die aus iPSCs gewonnenen Zellpopulationen autologes Material darstellen und somit deren

Diskussion

Transplantation keine Immunsuppression erfordert und darüber hinaus potenziell unbegrenzt und individualisiert zur Verfügung stehen, womit die mit ESCs in Verbindung stehenden ethischen Vorbehalte umgangen werden könnten [194-196]. Jedoch birgt auch die Nutzung von iPSCs als Quelle für z. B. dopaminerge Neurone die Gefahr der Tumorentwicklung.

Vierbuchen et al. gelangten 2010 [194] die direkte Transformation von adulten Fibroblasten aus der Maus in adulte Neurone ohne die Zwischenstufe der iPSCs. So konnte das Risiko der Entstehung entarteter Zellen weitgehend umgangen werden. Pang et al. konnten ähnliche Ergebnisse zeigen [195]. Caiazzo et al. zeigten, wie mit Hilfe von wenigen Transkriptionsfaktoren (Mash1, Nurr1, Lmx1a) aus humanen Fibroblasten und Fibroblasten der Maus direkt dopaminerge Neurone generiert werden können [197].

Des Weiteren ergeben sich Bedenken bzgl. der Modifikation des Genoms von Zellen des Empfängers durch Integration von z. B. Onkogenen wie c-Myc und Klf4 des viralen Vektors. Deshalb wurden neue Methoden der Reprogrammierung, wie z. B. eine Reduktion der Anzahl zu integrierender onkogener Transkriptionsfaktoren [198] oder die Verwendung von sich nicht-integrierenden Viren als Vektoren erörtert [199,200]. Darüber hinaus beschäftigten sich mehrere Studien mit nicht-viralen Vektoren wie z. B. „expressing plasmids“ [201], „episomal vectors“ [202], „synthetic modified RNAs“ [203], „minicircle vectors“ [204], „protein“ [205] oder „small molecules“ [206].

Analog zu den ESCs ist es also möglich, aus iPSCs und somatischen Zellen dopaminerge Neurone zu differenzieren. Diese wurden mit teilweise guten Ergebnissen nach Transplantation im Nager-Parkinsonmodell angewandt [207-209]. Sundberg et al. veröffentlichten 2013 eine Studie, welche die erfolgreiche autologe Transplantation von neuronalen Abkömmlingen von iPSCs aus Primaten in das Striatum beschreibt, wobei die transplantierten Zellen noch nach einem Jahr ohne Immunsuppression überlebten [210]. Hallet et al. berichteten 2015 über die autologe striatale Implantation von aus iPSCs generierten dopaminergen Neuronen in das Primaten-Parkinsonmodell. Es zeigte sich, dass die transplantierten Zellen in großer Anzahl auch nach zwei Jahren überlebten, sich morphologisch und funktionell integrierten sowie klinisch objektivierbar motorische Funktionen verbesserten [211].

Um die bereits oben aufgeführten Bedenken bzgl. der Verwendung viraler Vektoren in der Reprogrammierung somatischer Zellen in iPSCs zu entkräften, zeigen neuere Studien, dass sowohl humane als auch murine Protein-basierte iPSCs (piPSCs) effizient dopaminerge Neurone generieren können [212]. Im Ratten-Parkinsonmodell zeigen diese aus piPSCs

differenzierten dopaminergen Neurone eine signifikante Verbesserung motorischer Defizite [212,213].

Andererseits berichten Studien über das Auftreten von de novo Mutationen während der Reprogrammierung somatischer Zellen und der späteren Kultivierung von iPSCs trotz der Verwendung von nicht-viralen Vektoren [214]. Außerdem scheint die Effizienz der nicht-viralen Reprogrammierung noch deutlich unter derjenigen mit viralen Vektoren zu liegen, weshalb diese nach wie vor die erfolgreichste Methode der Reprogrammierung von somatischen Zellen mit all den damit verbundenen Problemstellungen darstellt [215]. Darüber hinaus beklagen einige Arbeiten, dass dopaminerge Neurone, welche aus humanen iPSCs generiert und ins Striatum von Nagern transplantiert wurden, kein ausreichend ausgebildetes axonales Wachstum aufweisen, welches jedoch gerade für die Effektivität in der klinischen Anwendung gefordert wird [208,210,213,216-218].

Nichtsdestotrotz lassen neuere Forschungen diverser Arbeitsgruppen auf positive Schritte hoffen, indem z. B. die Methoden der Prozessierung von dopaminergen Neuronen weiter verbessert [219,220] und darüber hinaus klinische Transplantationsstudien basierend auf dem Gebrauch, aus hiPSCs generierter, mesenzephaler dopaminergener Neurone initiiert wurden [177]. Im Oktober 2018 wurde in Japan zum ersten Mal weltweit ein Parkinson-patient mit reprogrammierten Stammzellen behandelt [221].

- **Mesenchymale Stammzellen (MSCs):**

MSCs sind multipotente Stammzellen, welche vornehmlich aus dem Knochenmark stammen [222], jedoch auch im Fettgewebe [223], der Nabelschnur [224], der Dermis [225] und im peripheren Blut [226] auftreten und sich in vivo in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten [227] differenzieren. Darüber hinaus zeigen MSCs das Potential sich in nicht-mesenchymale Zelllinien zu differenzieren [228], insbesondere auch in Neurone unter Einfluss von EGF und bFGF [226].

Viele Studien haben gezeigt, dass sich unter verschiedenen experimentellen Differenzierungsprotokollen aus MSCs dopaminerge Neurone gewinnen lassen [229-233], welche nach Transplantation ins Parkinson-Tiermodell teilweise gute Ergebnisse zeigen [234-237]. Dabei fand man, dass transplantierte MSCs verschiedene Wachstumsfaktoren sowie Proteine der extrazellulären Matrix produzieren und sekretieren, welche neurale Regenerationsprozesse unterstützen und somit ausschlaggebend sein könnten für therapeutische Effekte in verschiedenen Parkinson-Tiermodellen [238,239].

Darüber hinaus zeigten transplantierte MSCs immunmodulierende Effekte (z. B. durch Unterdrückung der Graft-versus-Host-Reaktion [240,241], sowie stimulierende Effekte auf Proliferation, Migration und Differenzierung endogener NSCs [242-244]. Somit stellen MSCs eine vielversprechende Zellquelle für die Weiterentwicklung von Zellersatztherapien bereit. Vorteile gegenüber anderen Stammzelltypen wie ESCs ergeben sich z. B. aus der besseren und ethisch unbedenklicheren Verfügbarkeit durch minimalinvasive Gewinnung aus autologem Gewebe [233].

- **Neurale Stamm-/Progenitor-/Precursorzellen (NSCs/NPCs):**

NSCs und NPCs wurden als vielversprechende alternative Quelle für Zellersatztherapien mit Einsatz im ZNS diskutiert [245] und deren potentielle Vorteile gegenüber ESCs als Startzellensystem für die Generierung transplantationsfähiger Zellen erörtert [246]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden NPCs untersucht, deshalb soll nun detaillierter auf diesen Zelltyp eingegangen werden.

Als Abkömmlinge des neuroektodermalen Gewebes sind NSCs in der Lage sich in alle Zelltypen des ZNS, d. h. in Neurone, Astroglia und Oligodendroglia zu differenzieren, wobei sie verschiedene proliferative Stadien durchlaufen [53,54,65]. Im Vergleich zu pluripotenten ESCs sind NSCs somit multipotent und in ihrer Differenzierungsfähigkeit festgelegter. Deshalb wurde NSCs einerseits ein geringeres Risiko für die Tumorbildung nach deren Transplantation zugesprochen, andererseits bieten sie eine potenziell höhere Sicherheit und Qualität in der Differenzierung und Funktionalität der gewünschten neuronalen Zielzelle [246]. NSCs lassen sich aus dem fötalen Gehirn extrahieren [53-55] oder können u. a. aus ESCs gewonnen werden [53,56-59]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, NSCs aus verschiedenen Bereichen des adulten Gehirns zu gewinnen. Bekannt ist, dass sich NSCs aus der SVZ in der lateralen Wand des Seitenventrikels sowie aus dem Gyrus dentatus des Hippocampus, aber auch aus einigen nicht-neurogenen Regionen isolieren lassen [53,54,60-64].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neuronalen Zellen wurden aus dem fötalen Mittelhirn der Ratte (ED 14.5) isoliert und anschließend in Kultur gebracht (siehe Kapitel 3.2.1 bis 3.2.3). Durch zahlreiche Vorarbeiten, unter anderem der eigenen Arbeitsgruppe, mit dem hier verwendeten Zellkultursystem und den angewandten experimentellen Methoden (Präparation des pränatalen Mesenzephalon der Ratte, Kultivierung von fmNPC der Ratte, Immunzytochemie, ELISAs), sind die Arbeitsschritte ausgehend von der Extraktion der Zellen bis zu deren Kultivierung und Bearbeitung in den jeweiligen Versuchsanordnungen ausreichend etabliert und validiert [28,29,147,150,247-249].

Diskussion

Dabei erscheint die Definition bzw. Nomenklatur der verwendeten Zellen zunächst uneinheitlich. In Anlehnung an die grundlegenden Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen beschrieben als **neurale Precursorzellen (NPCs)** und wie nachfolgend näher charakterisiert. Sie werden definiert als ein **Subtyp von neuronalen Vorläuferzellen (Progenitorzellen)**, welche noch in der Lage sind, sich selbst zu erneuern sowie alle Hauptzelltypen neuronalen Gewebes zu bilden, also Astroglia, Oligodendroglia und Neurone [28,250]. Im Vergleich zu NSCs unterliegen sie jedoch einer regionenspezifischen Determination hinsichtlich ihrer neuronalen Subspezifikation [66,148].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen werden folglich als **fetale mesenzephal neuronale Precursorzellen (fmNPCs)** bezeichnet. Diese wachsen in charakteristischen multizellulären Aggregaten („Neurosphären“) oder als adhärenzte Kultur (siehe Kapitel 1.1). Durch Entzug von Mitogenen wie EGF und FGF kann jederzeit eine spontane Differenzierung ausgelöst werden. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe berichten über eine spontane Differenzierung von fmNPCs der Ratte zu $37 \pm 7 \%$ in Astrozyten und zu kleineren Anteilen in Oligodendrozyten ($13 \pm 1 \%$) und Neurone ($23 \pm 1 \%$) [28]. Damit erfüllen fmNPCs das Kriterium der Multipotenz, sind aber in ihrer neuronalen Differenzierungskapazität regionenspezifisch determiniert.

Darüber hinaus ist die Differenzierung von fmNPCs in spezifische Neurone oder Gliazellen abhängig vom Entwicklungsstand sowie den entsprechenden Differenzierungsprotokollen in vitro [66,149,250,251]. Meint man hingegen mit NPCs neuronale Vorläuferzellen (Progenitorzellen), sind diese per definitionem hinsichtlich ihrer Differenzierung in Neurone oder Gliazellen determiniert: Neuronale Progenitorzellen differenzieren sich ausschließlich in Neurone, gliale Progenitorzellen ausschließlich in Gliazellen (siehe auch Abbildung 1.1 im Kapitel 1.2). Es wurde gezeigt, dass sich die in der vorliegenden Arbeit verwendeten fmNPCs aus dem Mittelhirn der Ratte auch in funktionale dopaminerge Neurone differenzieren können [66,147,148,150,252]. NPCs, welche aus anderen Hirnregionen isoliert wurden, waren hingegen nicht in der Lage, sich in den dopaminergen Phänotyp zu differenzieren [66,148,149]. FmNPCs scheinen also zumindest teilweise auf den dopaminergen Phänotyp hin angelegt zu sein, weshalb man sie auch als prä-dopaminerge mesenzephal NPCs (mdNPCs) bezeichnen könnte.

Als klassischen Marker für Precursorzellen/Vorläuferzellen des ZNS exprimieren fmNPCs Nestin [253], jedoch keine Marker für adulte und dopaminerge Neurone wie z. B. Nurr1, TH

Diskussion

und DAT [66,147,247,248,254]. Ling et al. und andere Arbeitsgruppen zeigten, dass IL-1 β der Schlüsselfaktor für die Induktion des dopaminergen Phänotyps in Nurr1-negativen fmNPCs in vitro ist [66,147-149]. So ausdifferenzierte dopaminerge Zellen zeigen alle morphologischen und funktionellen Kennzeichen reifer dopaminerge Neurone wie z. B. Dopamin-Produktion und -Ausschüttung [150].

Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe charakterisierten die durch IL-1 β -Behandlung in den mNPCs ausgelösten Ereignisse auf zellulärer Ebene. Dabei zeigte sich, dass IL-1 β eine rasche Induktion der mRNA-Expression von dopaminergen Transkriptionsfaktoren wie Nurr1 und Pitx3 sowie einen anschließenden Anstieg des TH-Proteins in vitro auslöste. Interessanterweise führte IL-1 β nicht, wie erwartet, zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, sondern zu einer raschen Phosphorylierung der ERK1/2- und p38 MAP-Kinase. Passend dazu konnte die vorliegende Arbeit auch für die IGF-1-vermittelte neurale Differenzierung von fmNPCs den ERK-Signalweg als einen entscheidenden zellulären Signaltransduktionsweg aufzeigen (siehe Kapitel 5.4). Weiterhin konnten Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die astrogliale Differenzierung von mNPCs über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird und mit spezifischen Inhibitoren blockiert werden kann [28].

Weitere Studien reihen sich in diese Ergebnisse ein und berichten über die erfolgreiche Gewinnung von dopaminergen Neuronen durch Differenzierung von (u. a. humanen) NSCs anhand verschiedener Protokolle unter Verwendung von Kombinationen von neurotrophen Faktoren (z. B. IL-1, IL-11, LIF, GDNF) oder Faktoren der genetischen Modifikation (z. B. Nurr1, SHH, Bcl-XL, Pitx3) [255-263]. Darüber hinaus wurden diese aus NSCs und NPCs differenzierten dopaminergen Neurone in Transplantationsversuchen mit Parkinson-Tiermodellen erprobt mit dem Ergebnis funktioneller Verbesserung motorischer Symptome [260,261,264-268].

Bereits vor einigen Jahren wurden am Menschen Proof-of-Principle Studien zur Transplantation von NSCs/NPCs bei IPS durchgeführt [48,49]. Anhand eines Fallberichtes konnte die Arbeitsgruppe um Levesque et al. zeigen, wie aus patienteneigenem Hirngewebe adulte NSCs gewonnen wurden, um diese in vitro in dopaminerge Neurone zu differenzieren. Als Bestandteil einer autologen Zellsuspension wurden diese dann in das (linke) Putamen des Patienten transplantiert. Klinisch konnte eine langanhaltende Besserung motorischer Parameter dokumentiert werden [269]. Mittlerweile wurden, unabhängig von den

Diskussion

Forschergruppen der GForce-PD (siehe oben), auch klinische Transplantationsstudien mit NPCs an Parkinsonpatienten begonnen (NCT03309514/NCT01329926) [270].

Diesen positiven Ergebnissen, welche das Potential von NSCs und NPCs für deren Nutzung als Zellquelle für Zellersatztherapien neurodegenerativer Erkrankungen nahelegen, stehen trotzdem wesentliche Bedenken und Hindernisse gegenüber. Insbesondere die Bereitstellung von humanem Hirngewebe für die Gewinnung einer ausreichenden Zahl neuronaler Progenitoren, welche für den nachhaltigen klinischen Gebrauch erforderlich wäre, ist mit ethischen und moralischen Vorbehalten konfrontiert und scheint somit praktisch kaum realisierbar zu sein. Abgesehen davon lassen sich NSCs alternativ aus ESCs differenzieren. Nistor et al. beschreiben eine Methode um humane neuronale Progenitoren in ausreichender Quantität und Reinheit aus ESCs zu gewinnen [182]. Nichtsdestotrotz ergeben sich in der Gewinnung von NSCs und NPCs aus ESCs ebenfalls die bereits oben aufgeführten praktischen und ethischen Probleme in der Nutzung von ESCs. Neuere Studien hingegen zeigen, dass NSCs auch direkt durch Reprogrammierung humaner oder muriner Fibroblasten bereitgestellt werden können, u. a. auch mit nicht-viralen Vektoren [271-274]. Solche induzierten (i)NSCs zeigten darüber hinaus therapeutisches Potenzial im Parkinson-Tiermodell [275].

Westerlund et al. zeigten, dass sich humane adulte NSCs aus der SVZ endoskopisch gewinnen und nach Expansion in vitro in neuronale und gliale Progenitoren differenzieren lassen [276]. Damit könnten diese endoskopisch gewonnenen adulten neuralen Stammzellen, da besser verfügbar, perspektivisch eine klinisch anwendbare Quelle autologer NSCs für Transplantationszwecke darstellen. Zahlreiche Arbeitsgruppen transplantierten adulte NSCs aus der SVZ in das Striatum von Nagern, wobei die Mehrzahl der Studien hinsichtlich der Endpunkte Differenzierung – die Zellen differenzierten sich vornehmlich in Glia und nicht wie erwünscht in Neurone – und Überleben sowie Migration der transplantierten Neurone nur unzureichende Ergebnisse zeigten [277-282]. Zhang et al. berichteten hingegen über den Erhalt eines hohen Anteils neuraler Vorläuferzellen nach Kultivierung von SVZ-Stammzellen, des Weiteren überlebte die Mehrzahl der Zellen nach einem Monat nach Transplantation und wies einen neuronalen Phänotyp auf [283]. Außerdem konnten Meissner et al. [279] und Richardson et al. [280] trotz spärlicher Differenzierung und Überleben eine funktionelle Verbesserung im Parkinson-Rattenmodell nach Transplantation von SVZ-Stammzellen zeigen.

Diskussion

Wie bereits oben aufgeführt können aus ESCs und iPSCs durch die entsprechenden Differenzierungsprotokolle mit geeigneten Wachstumsfaktoren dopaminerge Zellen generiert werden [284,285]; klinische Studien zur stammzellbasierten Therapie des IPS, die diesen Ansatz verfolgen, wurden mittlerweile initiiert [177]. Ähnliche Protokolle führten in der Differenzierung kultivierter adulter neuraler Stammzellen aus der SVZ zwar zu einer besseren Ausbeute neuraler Progenitoren, jedoch konnten diese nicht in Richtung einer dopaminergen Zelllinie differenziert werden [286].

Interessanterweise konnten Deleidi et al. zeigen, dass sich SVZ-Progenitoren in dopaminerge Neurone differenzieren, nachdem sie durch eine Oct4-Überexpression in pluripotente Stammzellen konvertiert wurden [286]. Oct4 ist ein Transkriptionsfaktor mit zentraler Bedeutung für die Pluripotenz und das Differenzierungsverhalten von Stammzellen und damit in der Lage, adulte NSCs in pluripotente Stammzellen umzuprogrammieren [287,288]. Die Transplantation dieser reprogrammierten dopaminergen Neurone im Parkinson-Rattenmodell führte zudem zu einer funktionalen Verbesserung [286].

Eine alternative Möglichkeit zur Steigerung der Gewinnung dopaminergener Neurone ist die genetische Modifikation der Ausgangszellen durch Überexpression von Transkriptionsfaktoren, welche für die Spezifizierung des dopaminergen Phänotyps während der normalen Entwicklung verantwortlich sind. Diese Methode der Reprogrammierung von Zellen wurde bereits im Zusammenhang mit den iPSCs und den damit verbundenen Bedenken bzgl. der Sicherheit der Verfahren erläutert. Shim et al. zeigten erfolgreich, wie aus adulten neuralen Stammzellen der SVZ durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors Nurr1 funktionale dopaminerge Neurone generiert werden können, welche auch im Parkinson-Rattenmodell zur Symptomverbesserung führten [289].

Vor dem Hintergrund der vorab aufgeführten Studienlage zur Entwicklung von Strategien zur Zellersatztherapie neurodegenerativer Erkrankungen charakterisiert die vorliegende Arbeit IGF-1 als neurotropher Faktor in seiner Wirkung auf das hier ausgewählte Zellsystem der fmNPCs. Dies mit Fokus auf die Überlebensfähigkeit, die Proliferation und das Differenzierungsverhalten der Zellen.

Im Hinblick auf die Fortentwicklung zellbasierter Therapieverfahren des IPS richtet sich das Interesse der vorliegenden Arbeit nicht zuletzt auf die Möglichkeit der Gewinnung funktionaler und integrierbarer dopaminergener Neurone bzw. deren Vorläuferzellen. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der durch IGF-1 aktivierten molekularen Signaltransduktionswege, die zu einer Präferenz der Differenzierung von

fmNPCs in adulte Neurone führen und an die Ergebnisse von Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hinsichtlich der dopaminergen Differenzierung von fmNPCs anknüpfen. Im Folgenden werden die spezifischen Ergebnisse der bearbeiteten Fragestellungen im Einzelnen und vor dem Hintergrund der übergeordneten Zielsetzung, der Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe, sowie weiteren ausgewählten Studien diskutiert.

5.2 IGF-1 und Neurosurvival

Die erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von IGF-1 auf die Überlebensfähigkeit der untersuchten fmNPCs während deren Expansion und Differenzierung über definierte Zeiträume. Die experimentellen Bedingungen und Prozeduren wurden in den Kapiteln 3.2.3 bis 3.2.5 detailliert erläutert und sind durch Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hinreichend etabliert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IGF-1 die Überlebensrate der fmNPCs nach 24 h und 72 h der Expansion und Differenzierung signifikant erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollreihen ohne Behandlung mit IGF-1. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit IGF-1 und AG 1024 konnte der überlebenssteigernde Effekt von IGF-1 jedoch lediglich während der Differenzierung der fmNPCs blockiert werden. Hingegen konnte AG 1024 den überlebenssteigernden Effekt von IGF-1 auf die fmNPCs unter Expansionsbedingungen nicht signifikant beeinflussen (siehe Kapitel 4.1 und 4.2).

Dieses Ergebnis lässt zunächst, neben einem signifikanten überlebenssteigernden Effekt während der Expansion und Differenzierung der fmNPCs, dennoch eine herausragende Bedeutung von IGF-1 für den Differenzierungsprozess der untersuchten Zellen vermuten. Diese sind somit während der Differenzierung in besonderem Maße auf funktionierende – und nicht wie im experimentellen Setting durch AG 1024 blockierte – IGF-1-Rezeptoren angewiesen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, welche die Expression des IGF-1-Rezeptors in neuralen Stamm- und Progenitorzellen beschreiben und somit die Bedeutung von IGF-1 für deren Homöostase/Funktionalität implizieren [103,290-293]. Passend dazu zeigt die vorliegende Arbeit eine Hochregulierung der Expression des IGF-1-Rezeptors während der Differenzierung der fmNPCs. Dies konnte auch ohne aktive Zugabe von IGF-1 zum Zeitpunkt 72 h nach Beginn des Differenzierungsprozesses beobachtet werden. Somit ist eine Bedeutung IGF-1-Rezeptor-abhängiger Signalwege während der Differenzierung von

Diskussion

fmNPCs naheliegend. Im Vergleich dazu ließen sich unter Expansionsbedingungen nach 72 h signifikant weniger IGF-1-Rezeptor-positive Zellen dokumentieren.

Interessant ist der Befund, dass nach 7 d der Differenzierung von fmNPCs die Expression des IGF-1-Rezeptors wieder herunterreguliert wurde. Möglicherweise könnte eine bereits weitgehende Ausdifferenzierung der Zellen, oder eine weitere Differenzierung der Zellen unter Inanspruchnahme anderer intrazellulärer Signaltransduktionswege, einen sinkenden Bedarf an IGF-1-Rezeptoren erklären. Im Gegensatz dazu scheint die signifikante Steigerung der Expression des IGF-1-Rezeptors unter Behandlung der Zellen mit IGF-1, im Vergleich zur Kontrolle ohne IGF-1-Behandlung und auch noch nach 7 d der Differenzierung, das besondere Ansprechen der Zellen auf dessen exogene Zufuhr zu bestätigen. Dies legt auch die Möglichkeit der experimentellen Beeinflussung des Differenzierungsprozesses durch IGF-1 als neurotrophem Faktor nahe.

Die fehlende Blockade des überlebenssteigernden Effekts von IGF-1 durch AG 1024 während der Expansion der Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass dem EM-1 signifikante Mengen Insulin beigelegt sind, welches in Verbindung mit IGF-1 synergistische Effekte auf die Überlebensfähigkeit der Zellen während der Expansion aufweisen könnte. Durch selektive Blockade der IGF-1-Rezeptoren durch AG 1024 kann dieser Effekt somit nicht aufgehoben werden, da Insulin primär andere Rezeptoren ansteuert. Immerhin bestätigen einige Studien neuroprotektive Wirkungen von Insulin, z. B. über Ansteuerung des PI3-Kinase-Signalwegs [294].

Andererseits ist es umgekehrt denkbar, dass die IGF-1-Wirkung während der Expansion der Zellen nicht nur über den IGF-1-Rezeptor vermittelt wird. Studien berichten diesbezüglich über die Wirkung von IGF-1 auch am Insulin- oder IGF-2-Rezeptor, allerdings mit geringerer Affinität [295]. Außerdem können der Insulin- und IGF-1-Rezeptor Heterodimere ausbilden, mit derselben Affinität für beide Wachstumsfaktoren [296-298]. Auch könnte eine Verbindung IGF-1-Rezeptor abhängiger Signalwege mit Einflüssen von EGF, welches im Expansionsmedium vorhanden ist, verantwortlich sein für synergistische Effekte hinsichtlich einer gesteigerten Überlebens- und Proliferationsfähigkeit der Zellen. Einige Studien berichten über diese „cross-talks“ zwischen IGF-1-Rezeptor abhängigen Signalwegen und z. B. EGF oder FGF-2 hinsichtlich des Einflusses auf das Überleben und die Proliferation von Stammzellen [15,299-301].

Interessant ist darüber hinaus der Nachweis einer durch EGF getriggerten autokrinen Sekretion von IGF-1 im Zusammenhang mit striatalen ESCs, nach kurzer Exposition mit experimentell zugeführtem IGF-1 [15]. Denkbar wäre somit, dass durch EGF getriggertes,

Diskussion

autokrin sezerniertes IGF-1 mit AG 1024 am IGF-1-Rezeptor konkurriert und somit die inhibierende Wirkung von AG 1024 abgeschwächt wird. Weitere Studien berichten über eine autokrine Produktion von IGF-1 durch NSCs und der damit verbundenen neuroprotektiven Effekte [302,303].

Die antiapoptotischen Effekte von IGF-1 auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten fmNPCs lassen sich in die Ergebnisse zahlreicher Veröffentlichungen einreihen, welche ebenfalls über antiapoptotische Effekte von IGF-1 berichten. Viele unterschiedliche Zellsysteme wurden dahingehend untersucht, so zum Beispiel Osteoblasten [73], Herzmuskelzellen [8] oder Epithelzellen [74]. Auch für Tumorzellen, wie beispielsweise Myelomzellen [5] oder Neuroblastomzellen [9,304] scheint IGF-1 ein wichtiges Überlebenssignal zu sein, weshalb eine Rolle von IGF-1 bei der Krebsentstehung und für das Tumorstadium vermutet wird [75,76].

Hinsichtlich neuraler Zellarten finden sich zahlreiche Studien (siehe die im Folgenden zitierten Arbeiten), die Effekte von IGF-1 auf Neurone und Neuroglia unterschiedlichen Ursprungs und Entwicklungsstands untersucht haben und dabei bezüglich des Endpunktes Überleben und Neuroprotektion überwiegend einheitlich positive Wirkungen von IGF-1 finden konnten. Dabei muss man *in vivo*- von *in vitro*-Studien unterscheiden. Außerdem ist zu differenzieren, ob es sich bei den untersuchten Zellen um Progenitorzellen/Stammzellen embryonalen oder adulten Ursprungs handelt bzw. ob ausdifferenzierte Neurone oder Gliazellen verwendet wurden. Zudem ist relevant, ob die untersuchten Zellen humanen oder tierischen Ursprungs sind.

Es ist festzuhalten, dass die Funktionen von IGF-1 im adulten oder embryonalen Gehirn stets kontextabhängig sind und vor dem Hintergrund des jeweils vorherrschenden Milieus diskutiert werden müssen. So hat IGF-1 unterschiedliche Effekte im sich entwickelnden und adulten ZNS. Unterschiede lassen sich zum einen durch Ansteuerung diverser Signaltransduktionsketten bzw. Effektormoleküle erklären, welche charakteristisch für eine spezifische Zelle oder für einen bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung sind. Weiterhin werden in der Literatur sogenannte „cross-talks“ zwischen den IGF-1-abhängigen Signaltransduktionswegen und anderen Effektoren wie Cytokinen oder Wachstumsfaktoren diskutiert, welche die vielfältigen IGF-1-Wirkungen erklären könnten. So kann derselbe biologische Effekt durch Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege in unterschiedlichen Zellen erreicht werden: Beispielsweise induziert IGF-1 die Proliferation kortikaler embryonaler NPCs der Ratte in einem ERK-unabhängigen Signalweg [305], wohingegen die IGF-1-vermittelte Proliferation adulter hippocampaler Progenitoren über

Diskussion

eine ERK-abhängige Signaltransduktion abläuft [25]. Andererseits vermittelt IGF-1 verschiedene biologische Effekte in derselben Zelle zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten: So reagieren adulte hippocampale Neurone auf IGF-1 mit Proliferation [25], wohingegen embryonale hippocampale Progenitoren IGF-1 zum Überleben benötigen [23]. Grundsätzlich ist die Expression von IGF-1 und des IGF-1-Rezeptors sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten ZNS gut belegt [77,306-308]. Eine herausragende Rolle scheint IGF-1 nicht zuletzt für die Entwicklung des ZNS während der Embryonalperiode zu spielen, was durch Studien bestätigt wird, welche die Expressionsmuster von IGF-1 untersuchten. Demnach konnte im embryonalen Mittelhirn, Rückenmark, Kortex, Hippocampus und Riechkolben eine deutlich gesteigerte IGF-1-Expression festgestellt werden, welche postnatal merklich abnahm, um im adulten ZNS niedrige Level zu erreichen [308]. Trotzdem zeigen Studien (in vivo-Studien mit Knockout und transgenen Mausmodellen; siehe nachfolgend im nächsten Abschnitt), dass IGF-1 das Zellüberleben, die Proliferation und Differenzierung auch von allen adulten neuronalen Zelllinien (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) reguliert, sowie die Ausbildung von Synapsen und Dendriten in Projektionsneuronen fördert. Es nimmt somit eine wichtige Funktion für den Erhalt der Struktur und metabolischen Funktionen des erwachsenen Gehirns ein [79,309,310].

Im adulten Individuum wird IGF-1 vornehmlich in der Leber produziert, kontrolliert durch das GH (siehe Kapitel 1.3). Darüber hinaus findet in vielen Geweben, unter anderem auch im ZNS, eine lokale IGF-1-Synthese statt, z. B. in der SVZ oder dem Kleinhirn [311]. Zudem kann im adulten Gehirn IGF-1 unabhängig vom GH produziert werden [77,308,312-314]. Systemisches IGF-1 kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird entweder von Astrozyten oder direkt von Neuronen aufgenommen [77,315].

Grundlegende Erkenntnisse zum Verständnis der Wirkung von IGF-1 auf die Entwicklung des ZNS und das adulte Gehirn liefern zahlreiche in vivo-Studien mit genetisch veränderten Mausmodellen. Diese Studien wurden mit transgenen Mäusen durchgeführt, welche IGF-1 entweder überexprimieren oder aufgrund von Null-Mutationen nicht in der Lage sind IGF-1 bereitzustellen. Die Überexpression von IGF-1 führt in den entsprechenden Mausmodellen zu übermäßigem Hirnwachstum, einer gesteigerten Myelinisierung sowie Neuro- und Synaptogenese oder zu einer erhöhten Gesamtzahl von Neuronen im Großhirn- und Kleinhirnkortex sowie im Gyrus dentatus des Hippocampus im Sinne einer anti-apoptotischen und proliferativen Wirkungsweise [79,316-334].

Diskussion

Null-Mutationen führen zu gegenteiligen Ergebnissen mit retardiertem Hirnwachstum, reduzierter Anzahl von Neuronen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns (z. B. Striatum, Hippocampus, cerebraler Kortex) oder verminderter Myelinisierung und reduziertem Dendritenwachstum [335-338]. Darüber hinaus berichten auch Studien mit KO-Mutationen des IGF-1-Rezeptors über ein vermindertes Hirnwachstum, eine verminderte Anzahl von Neuronen sowie über antiproliferative und proapoptotische Effekte in den entsprechenden Mausmodellen [79,339-346]. Beim Menschen führen Mutationen des IGF-1- und IGF-1-Rezeptor-Gens zu Wachstumsretardierung, Mikrozephalie und mentaler Retardierung [347-355].

Neben diesen *in vivo*-Studien finden sich zahlreiche *in vitro*-Studien, die den Einfluss von IGF-1 auf neurale Zellarten unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlichen Entwicklungsstandes untersucht haben. Dabei konnten nahezu einheitlich auch antiapoptotische Effekte von IGF-1 bestätigt werden. Diese stehen im Einklang mit den in diesem Kapitel diskutierten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es muss jedoch beachtet werden, dass vor dem Hintergrund der jeweils unterschiedlichen experimentellen Protokolle (z. B. Kombination von Wachstumsfaktoren, Wachstumsmedium, etc.) sowie der Wahl des untersuchten Zellsystems (bzgl. Hirnregion und/oder Spezies) direkte Vergleiche schwierig erscheinen und der Effekt von IGF-1 in erheblichem Maße kontextabhängig ist. Auch spielen die von IGF-1 angeregten intrazellulären Signalkaskaden eine entscheidende Rolle in der Vermittlung des beobachteten „Endeffektes“. Auf diese wird in Kapitel 5.4 eingegangen.

Bezüglich embryonaler bzw. früh-postnataler *in vitro*-Zellsysteme finden sich zahlreiche Studien, die überlebenssteigernde Effekte von IGF-1 zeigen konnten: auf fetale hypothalamische Zellen der Ratte [12,356], embryonale Neurone aus dem Hinterstrangganglion nach Entzug von „nerve growth factor“ (NGF) [357], postnatale neurale Progenitoren aus dem Vorderhirn der Ratte [13], embryonale Progenitoren des Bulbus olfactorius der Maus [358], otogene Neuroblasten während der Entwicklung des Innenohrs [14], neuroepitheliale embryonale Precursoren der Ratte [299], postnatale zerebelläre Precursoren der Maus [359], auf embryonale hippocampale Progenitoren der Ratte [23,360] sowie auf embryonale striatale NSCs der Ratte in der Gegenwart von EGF und FGF [17].

Auch auf ein Zellsystem mit dopaminergen Zellen aus embryonalen mesenzephalen Zellkulturen der Ratte vom Embryonaltag 15, das mit dem der vorliegenden Arbeit direkter vergleichbar ist, konnten antiapoptotische Effekte von IGF-1 gefunden werden [361].

Diskussion

Interessant ist, dass IGF-1 in dieser Studie auf dopaminerge Zellen aus mesenzephalen Zellkulturen vom Embryonaltag 17 keinen antiapoptotischen Effekt mehr zeigt im Gegensatz zu BDNF, GDNF oder FGF. Deshalb kann vermutet werden, dass die dopaminerge Entwicklung sequenziell von unterschiedlichen Kombinationen von Wachstumsfaktoren abhängt und IGF-1, zumindest in dem hier untersuchten Zellsystem, eher die frühe dopaminerge Differenzierung beeinflusst. Kummer et al. berichten über neuroprotektive Effekte von IGF-1 auf fetale mesenzephalische Zellkulturen der Ratte und untersuchten dabei auch die Bedeutung von IGFBPs [362]. In einer neueren Studie konnten Huat et al. zeigen, dass IGF-1 für die Entwicklung von MSCs in NPCs einen wichtigen Überlebensfaktor darstellt, welcher die Apoptose der NPCs signifikant reduziert [20].

Auch für NSCs und NPCs des adulten Gehirns konnten *in vitro*-Experimente antiapoptotische Effekte von IGF-1 auf die untersuchten Zellen feststellen [300], wobei überwiegend proliferative und die Differenzierung betreffende Wirkungen von IGF-1 im Vordergrund zu stehen scheinen. So konnte für adulte NSCs aus dem Hippocampus der Ratte gezeigt werden, dass IGF-1 einen dosisabhängigen Effekt entweder auf die Proliferation oder die Differenzierung der Zellen zeigt [18].

In vivo-Studien mit IGF-1-defizienten Ratten legten hingegen auch überlebenssteigernde Effekte von IGF-1 auf sich entwickelnde Neurone des Hippocampus nahe. Darüber hinaus wurde die Proliferation in diesem Modell nicht beeinflusst [363]. Andererseits zeigten Hsieh et al., dass IGF-1 die Differenzierung adulter hippocampaler neuraler multipotenter Stammzellen in Richtung des oligodendroglialen Phänotyps bewirkt [364]. Auch für adulte NPCs aus der SVZ der Ratte konnten proliferative und differenzierende Effekte von IGF-1 gefunden werden [365,366].

Für kultivierte adulte Stammzellen aus dem Maus-Vorderhirn konnte belegt werden, dass deren Differenzierung nach Entzug des proliferativ wirkenden FGF-2 wesentlich durch IGF-1 reguliert wird [367]. Nicht zuletzt konnte aber auch für ausdifferenzierte adulte Neurone IGF-1 als Überlebensfaktor definiert werden, so für zerebelläre oder kortikale Neurone *in vitro* [368,369].

Darüber hinaus soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass zahlreiche Studien antiapoptotische Effekte von IGF-1 im Zusammenhang mit Neuroprotektion aufzeigen konnten, z. B. hinsichtlich der Exposition von Zellen gegenüber Toxinen oder in Verbindung mit Verletzungen und neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS. Die Arbeitsgruppe um

Diskussion

Trejo et al. untersuchte grundlegend die IGF-1-Signaltransduktion in neurodegenerativen Erkrankungen und zeigte im Umkehrschluss, dass eine Unterbrechung der IGF-1-Kaskade mit einer Progression neurodegenerativer Erkrankungen einhergeht. Dabei wird unterschieden zwischen einer sekundär durch die mit der Erkrankung einhergehenden (z. B. entzündliche oder exzitotoxische) Prozesse alterierten IGF-1-Signaltransduktion und einer primären IGF-1-Fehlregulation, welche sekundär neurologische Erkrankungen bedingt. Als Beispiel für letzteren Fall wird die Ataxia teleangiectatica aufgeführt, bei welcher aufgrund einer die Expression des IGF-1-Rezeptors betreffenden Mutation ein fehlendes Ansprechen von Neuronen auf IGF-1 resultiert. In der Folge konnten erhöhte IGF-1-Serumlevel als Zeichen einer systemischen IGF-1-Resistenz detektiert werden [81].

Im pränatalen Gehirn sind hypoxische bzw. ischämische Zellverluste ein Hauptgrund für Lähmungen, Epilepsie, kognitive Defizite oder Wachstumsretardierung betroffener Kinder [370]. Innerhalb von 24 Stunden nach einem hypoxischen bzw. ischämischen Hirnschaden geht in den betroffenen Arealen die Expression von IGF-1 zunächst rapide zurück. Damit korrelierend die Apoptose von Neuronen [371-377], gefolgt von einer progressiven Zunahme der Expression von IGF-1 und sekundär von IGF-2 in Astrozyten und Mikroglia [374,378] im Zusammenhang mit der Erholung des geschädigten Gewebes.

Direkt in das ischämische Nager-Gehirn appliziertes IGF-1 schützt vor Verlust von Neuronen und Oligodendrozyten [379-381], erhöht die Anzahl neu entstehender Zellen [382] und verbessert kognitive Funktionen [383]. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch peripher appliziertes IGF-1, subkutan oder nasal, ischämischen Hirnschäden neonataler Ratten entgegenwirkt durch fördernden Einfluss auf das Überleben von Neuronen und die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen [383,384]. Zhong et al. zeigten diesbezüglich, dass die subkutane Injektion von IGF-1 auch 24 und 48 Stunden nach dem Zeitpunkt der ischämischen Läsion effektiv bleibt, was einen möglicherweise klinischen Nutzen von IGF-1 in der Behandlung ischämischer Hirnschädigungen nahelegt. Bereits 1997 zeigten klinische Studien von Hatton et al., dass intravenös appliziertes IGF-1 das klinische Outcome von Patienten mit traumatischem Hirnschaden zu verbessern scheint [385].

Zurückkommend auf das Thema der Erforschung neuer Therapiestrategien neurodegenerativer Erkrankungen ist neben der Zellersatztherapie die Gentherapie mit Wachstumsfaktoren ein interessanter Ansatz. Dabei werden durch vektorales Einbringen genetischer Information in die Zellen des Empfängers (z. B. stereotaktische intrazerebrale

Diskussion

Injektion viraler Vektoren) diese dazu angeregt, Wachstumsfaktoren zu exprimieren, welche neuroprotektiv wirken und somit vor Neurodegeneration schützen sollen.

In den letzten Jahrzehnten waren die Wachstumsfaktoren GDNF (intraputaminale Injektion) und Neurturin (adenoviraler Vektor) Gegenstand zahlreicher Studien, die zunächst in Phase-1 vielversprechende Ergebnisse zeigten [386-389], jedoch aufgrund eines nicht zufriedenstellenden klinischen Langzeit-Outcome oder aufgrund von Bedenken bzgl. praktisch-technischer Belange Phase-2 nicht erreichten [390-392]. In der Folge wurden bessere Techniken des Gen-Transfers untersucht, so z. B. „convection-enhanced delivery“ (CED) [393]. Des Weiteren berichten neuere Studien über nicht-invasive Methoden des Gentransfers im Parkinson-Tiermodell durch die nasale Applikation [394,395] oder über einen nicht-viralen Gentransfer mittels „microbubbles“ als Gen-Transporter („bubble-GDNF gene complex“) [396].

Auch IGF-1 könnte vor dem Hintergrund des nachgewiesenen Wirkspektrums als neurotropher Faktor interessant sein. Lu-Ngyen et al. konnten zeigen, dass eine lentiviral getriggerte IGF-1-Expression zwar neuroprotektive Effekte *in vitro* aufweist, jedoch keine positiven Effekte im Parkinson-Rattenmodell erzielen konnte [397]. Im Gegensatz dazu belegen Studien den erfolgreichen Einsatz von IGF-1 im Rahmen pharmakologischer Interventionsstudien bezüglich Erkrankungen des ZNS [398].

Zusammenfassend lässt sich zunächst festhalten, dass IGF-1 multiple Effekte auf unterschiedliche Zellarten des zentralen und peripheren Nervensystems, sowohl während der Entwicklung als auch im adulten ZNS, aufweist. Dabei stand in diesem Kapitel die antiapoptotische Wirkungsweise im Vordergrund, die sich nahezu einheitlich in den vorab zitierten Studien bestätigte und somit im Einklang steht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zum Überleben der fmNPCs unter dem Einfluss von IGF-1.

Unterschiede ergeben sich vielmehr in den zugrundeliegenden intrazellulären Signaltransduktionswegen und weiteren Effektormolekülen, die zelltypspezifisch oder entwicklungspezifisch, durch die Bindung von IGF-1 an seinen Rezeptor angeregt werden. Für die Vermittlung antiapoptotischer bzw. neuroprotektorer Wirkungen kristallisiert sich in den zitierten Studien eine große Bedeutung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges heraus. Im Kapitel 5.4 wird dieser Themenkomplex ausführlicher aufgegriffen und im Zusammenhang mit dem Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung der hier untersuchten fmNPCs diskutiert.

Auch scheint die Wechselwirkung von IGF-1 mit anderen Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, FGF, GDNF, etc.) im Sinne eines „cross-talks“ für unterschiedliche biologische Effekte desselben Stimulus eine wichtige Rolle zu spielen. Letztlich wurde IGF-1 als neurotropher Faktor charakterisiert mit therapeutischem Potential für neue Behandlungsstrategien neurodegenerativer Erkrankungen – wie der Zellersatztherapie – aber auch zellunabhängiger Verfahren.

5.3 IGF-1 und Erhalt des Proliferationspotentials

Die zweite Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von IGF-1 auf den Erhalt des Proliferationspotentials von fmNPCs. Dafür wurden immunzytochemische Färbungen gegen den zelleigenen Proliferationsmarker Ki-67 sowie gegen den Proliferationsmarker BrdU durchgeführt. Sowohl Ki-67 als auch BrdU sind in der Literatur gut charakterisiert und im experimentellen Setting als Proliferationsmarker etabliert [399,400]. Ki-67 ist ein Protein, das sich im Zellkern von Zellen nachweisen lässt, die sich in der Wachstumsphase befinden, sich also vermehren bzw. teilen. Ki-67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus gefunden, von der späten G1- bis zur M-Phase [151,152]. BrdU muss hingegen experimentell in die Zellen eingebracht werden und ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. BrdU markiert Zellen in der S-Phase des Zellzyklus indem es von den Zellen aufgenommen wird und in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids dTTP während der S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird [153]. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Kapitel 3.2.5.2.1 ausführlich erläutert.

Ein signifikanter mitogener Effekt von IGF-1 auf die untersuchten fmNPCs konnte nach 72 h der Expansion durch eine entsprechend höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. AG 1024 konnte diesen proliferationsfördernden Effekt von IGF-1 signifikant blockieren. Im Gegensatz dazu zeigte die Auswertung BrdU-positiver Zellen nach 24 h der Expansion und IGF-1-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf das Proliferationspotential der fmNPCs im Vergleich zur Kontrolle. Die Wahl der unterschiedlich lange dauernden Expansionszeiträume hatte u. a. technische Gründe, da vor Einbringen des BrdU-Antikörpers die Zellen idealerweise 24 h mit BrdU behandelt werden müssen. Für die Ki-67-Färbung wurde ein späterer Zeitpunkt gewählt, um auch eine entsprechend erweiterte Behandlungsperiode abzudecken. Somit sind die oben aufgeführten Ergebnisse am ehesten darin begründet, dass IGF-1 seinen proliferativen Effekt

Diskussion

nach 24 h noch nicht signifikant entfalten konnte, sich zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits eine Tendenz hin zu dem dann nach 72 h signifikanten Effekt abzeichnet.

Abgesehen davon ist darauf hinzuweisen, dass BrdU und Ki-67 aufgrund ihres Wirkungsprinzips prinzipiell eine unterschiedliche Aussagekraft haben. BrdU ist ein exogener Marker der S-Phase und somit der DNA-Synthese und kennzeichnet „neugeborene“ Zellen. Ki-67 ist ein zelleigenes nukleäres Protein, das eine aktive Rolle in der Regulation des Zellzyklus einnimmt und dessen Expression signifikant mit der Zellproliferation korreliert [153,401]. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Verfahren angewandt, um über alternative experimentelle Prozeduren proliferative Effekte zu bestätigen und zur Diskussion zu stellen.

Interessant ist, dass die Behandlung der Zellen mit AG 1024 (entweder alleine oder in Kombination mit IGF-1) zu signifikant weniger sowohl BrdU-positiver als auch Ki-67-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollreihe führte. Dies impliziert eine besondere Bedeutung IGF-1-Rezeptor abhängiger Signalwege für die Proliferation der fmNPCs auch ohne die experimentelle Zugabe von IGF-1. Hierbei könnte eine autokrine Sekretion von IGF-1 durch die fmNPCs eine Rolle spielen. Arsenijevic et al. postulierten eine autokrine Sekretion von IGF-1 in embryonalen striatalen neuronalen Stammzellen [15]. In dieser Studie war die autokrine Sekretion von IGF-1 abhängig von einer kurz andauernden externen IGF-1-Exposition und dem Vorhandensein von EGF. Arsenijevic et al. konnten weiterhin zeigen, dass IGF-1 nur in Verbindung mit EGF in der Lage war die Proliferation und das Überleben der in dieser Studie untersuchten striatalen NSCs zu fördern. IGF-1 und EGF alleine verursachten keine mitogenen Effekte.

Bereits 1991 konnten Drago et al. zeigen, dass FGF die Proliferation neuroepithelialer Precursoren der Maus fördert. Dieser Effekt war jedoch obligat abhängig von IGF-1, welches endogen von den untersuchten Zellen gebildet wurde [299]. Darüber hinaus wurde in dieser Studie ein überlebenssteigernder Effekt von IGF-1 hervorgehoben, der auch ohne Co-Wirkung von FGF nachweisbar war und wiederum gut zu den Ergebnissen der ersten Fragestellung der vorliegenden Arbeit passt. Auch lässt sich hierbei gut darstellen, dass IGF-1 im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren und in Abhängigkeit der Zeitachse der Entwicklung unterschiedliche Effekte wie Überleben, Proliferation oder Differenzierung fördert. In der vorliegenden Arbeit lassen sich synergistische Effekte von IGF-1 und EGF immerhin vermuten, da dem Expansionsmedium signifikante Mengen an

Diskussion

EGF beigemischt sind, um die Zellen per se an einer spontanen Ausdifferenzierung zu hindern.

Unabhängig von den vorab aufgeführten Überlegungen zu Co-Wirkungen von IGF-1 und anderen Wachstumsfaktoren, berichten zahlreiche *in vitro*-Studien mit experimentellen Anordnungen neuraler Zellsysteme über proliferationsfördernde Effekte von IGF-1, und stehen somit im Einklang zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Bereits 1988 untersuchte z. B. die Arbeitsgruppe um DiCicco-Bloom mitogene Einflüsse von Insulin, IGF-1 und IGF-2 auf das Zellsystem kultivierter embryonaler (ED 15.5) sympathischer Neuroblasten aus dem superioren Halsganglion.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Insulin und die IGFs den Eintritt der Zellen in den aktiven Zellzyklus regulieren, wobei speziell für IGF-1 eine signifikant potentere Wirkung auf die DNA-Synthese festgestellt werden konnte [402]. Für embryonale kortikale NPCs der Ratte konnten Mairet-Coello et al. mitogene Effekte von IGF-1 durch dessen Kontrolle zellzyklussteuernder Proteine aufzeigen (Hochregulation von G1-Phase Cyklinen, Herunterregulation von CKIs), wobei auf zellulärer Ebene der PI3-Kinase/Akt-Signalweg als Vermittler dieser mitogenen Wirkungen nachgewiesen werden konnte [305].

Auch auf adulte NSCs und NPCs, z. B. des Hippocampus, hat IGF-1 einen proliferativen Effekt wie Aberg et al. zeigten [18]. In dieser Studie wurden die mitogenen Effekte von IGF-1 sowohl über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg wie auch über MAP-Kinase-abhängige Signalwege vermittelt, wobei die Aktivierung der MAP-Kinase obligat für die mitogenen IGF-1-Effekte war. Außerdem war die maximale proliferationsfördernde Aktivität von IGF-1 abhängig vom Vorhandensein von FGF-2.

Eine neuere Studie konnte zeigen, dass IGF-1, durch proliferationsfördernde Wirkung auf die Zwischenstufen der neuralen Vorläuferzellen, eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von MSCs in neurale Zelllinien spielt [20]. Wie im Kapitel 5.1 bereits erwähnt stellen MSCs eine viel diskutierte Zellquelle für die Erforschung von Zellersatztherapien neurodegenerativer Erkrankungen dar. Supeno et al. untersuchten die Langzeitkultivierung embryonaler striataler Stammzellen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren. Dabei fand sich eine durch IGF-1 induzierte gesteigerte Proliferation während der frühen Phase der Neurogenese und zudem ein verlängertes Überleben der untersuchten Zellen in der *in vitro*-Kultur. Die IGF-1-Effekte waren wiederum abhängig von einer Co-Inkubation mit EGF und FGF [17].

Diskussion

In diesem Zusammenhang konnten Wang et al. die Bedeutung der IGF-1-Rezeptor Signaltransduktion für die Selbsterneuerung und den Erhalt von humanen ESCs in der in vitro-Kultur darlegen. Eine Blockade des IGF-1-Rezeptors führte in dieser Studie zur Ausdifferenzierung von humanen ESCs. In der weiteren intrazellulären Signaltransduktion konnte der PI3-Kinase/Akt-Signalweg als Vermittler der durch den IGF-1-Rezeptor initiierten proliferativen Effekte aufgezeigt werden [10]. In vivo-Studien mit genetisch veränderten Tiermodellen, welche die Bedeutung von IGF-1 für die embryonale Entwicklung des ZNS sowie für den Erhalt der Struktur und metabolischen Funktionen des erwachsenen Gehirns belegen, wurden bereits im vorherigen Kapitel zahlreich zitiert. Sie bestätigen außerdem die in vivo-Relevanz der Ergebnisse der zitierten in vitro-Studien, sowie der vorliegenden Arbeit.

Im Vergleich der diskutierten Studien zeigt sich, wie bereits im letzten Kapitel erläutert, eine zellspezifische Wirkung von IGF-1 durch die fakultative Abhängigkeit von verschiedenen anderen Wachstumsfaktoren, der zellulären Signaltransduktionsketten sowie vom Entwicklungsstand des untersuchten Zellsystems. Eine Verbesserung des Langzeitüberlebens und der Aufrechterhaltung der Proliferation von adulten oder embryonalen neuronalen Zellen in Kultur durch Optimierung der Kulturbedingungen, vermittelt durch Wachstumsfaktoren, spielt eine wichtige Rolle für die Bereitstellung von funktionalen Zellen für klinische therapeutische Vorhaben, wie der Zellersatztherapie. IGF-1 hat sich als vielversprechender mitogener und überlebenssteigernder Faktor erwiesen. Wie im Kapitel 5.1 dargestellt, rücken auch NSCs und NPCs in das Interesse der Entwicklung von Zellersatztherapien neurodegenerativer Erkrankungen.

Neuere Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit dem hier behandelten Zellsystem in vitro-kultivierter fmNPCs zeigten, dass weder Liquor cerebralis („cerebrospinal fluid“ [CSF]) noch Valproat einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der fmNPCs haben [249,403,404]. Insbesondere hinsichtlich der Gewinnung dopaminergener Neurone bzw. deren Vorläuferzellen zur weiteren Entwicklung von Zellersatztherapien des IPS sind die untersuchten fmNPCs interessant. Die vorliegende Arbeit konnte einen mitogenen sowie überlebenssteigernden Effekt von IGF-1 auf in vitro-kultivierte fmNPCs aufzeigen und knüpft damit an die Ergebnisse vieler anderer Studien an, welche diese Eigenschaften von IGF-1 ebenfalls feststellen konnten. Weitere Studien sind nötig, um die zellulären Transduktionsketten dieses mitogenen Effektes auf das verwendete Zellsystem aufzuzeigen sowie Interaktionen mit anderen Wachstumsfaktoren, wie z. B. EGF oder Insulin, näher zu charakterisieren.

5.4 IGF-1 und neurale Differenzierung sowie zugrundeliegende intrazelluläre Signaltransduktion

Die im Kapitel 5.1 diskutierten Versuche zur Überlebensfähigkeit der fmNPCs konnten bereits eine besondere Bedeutung von IGF-1 für deren Differenzierungsverhalten aufzeigen. Dies wurde durch den Nachweis einer gesteigerten Expression des IGF-1-Rezeptors während der Differenzierung der Zellen bestätigt. Der mesenzephal Ursprung der untersuchten neuronalen Progenitorzellen impliziert deren intrinsisches Potential, sich in einen dopaminergen Phänotyp zu differenzieren. Die dopaminerge Differenzierung von fmNPCs wurde durch Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe auf zellulärer Ebene untersucht (siehe Kapitel 1.5).

Die vorliegende Arbeit charakterisiert darüber hinaus IGF-1 als neurotrophen Faktor, welcher diesen Differenzierungsprozess beeinflusst. Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit den Erkenntnissen dieser früheren Studien diskutiert. Dabei werden auch die, der neuronalen Frühdifferentiation zugrundeliegenden, zellulären Signaltransduktionswege näher betrachtet.

Frühere Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe haben grundlegende Daten zum Differenzierungsverhalten von fmNPCs offengelegt. Es konnte gezeigt werden, dass sich nach Entzug der Mitogene $37 \pm 7 \%$ der untersuchten fmNPCs zu Astrozyten (GFAP-positiv), $13 \pm 1 \%$ zu Oligodendrozyten (GalC-positiv) und $23 \pm 1 \%$ zu Neurone (MAP2-positiv) differenzierten [28]. Ling et al. und andere Arbeitsgruppen zeigten, dass IL-1 β der Schlüsselfaktor für die Induktion des dopaminergen Phänotyps von fmNPCs ist. So ausdifferenzierte Zellen zeigen alle morphologischen und funktionellen Kennzeichen reifer dopaminergere Zellen wie z. B. Dopamin-Produktion und -Ausschüttung [150]. Dabei zeigte sich, dass der Schlüsseffekt von IL-1 β in der Induktion der Nurr1-Expression liegt, die weitere post-mitotische dopaminerge Ausdifferenzierung jedoch weiterer neurotropher Faktoren wie GDNF oder Wnt5a bedarf, welche während der Entwicklung vermutlich von Gliazellen bereitgestellt werden [405,406].

Des Weiteren konnte auf zellulärer Ebene eine herausragende Rolle des ERK-Signalweges im Zusammenhang mit der dopaminergen Differenzierung von fmNPCs festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass die astrogliale Differenzierung von fmNPCs über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird und mit spezifischen Inhibitoren der PI3-Kinase oder des

Diskussion

NF- κ B blockiert werden kann, wohingegen die neuronale Differenzierung dadurch nicht beeinflusst wurde (siehe Kapitel 1.5 und 5.1).

Vor dem Hintergrund der vorab aufgeführten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage aufgeworfen, inwiefern IGF-1 als neurotropher Faktor auf den Differenzierungsprozess der fmNPCs Einfluss nehmen kann. Das experimentelle Setting wurde im Kapitel 3.2.5.2.2 ausführlich erläutert und ist durch die zitierten Vorarbeiten fundiert und etabliert. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Induktion der Neurogenese durch Behandlung der fmNPCs mit IGF-1 festgestellt werden, wohingegen auf die Astro- und Oligodendrogenese kein signifikanter Effekt beobachtet werden konnte. Bezüglich der oligodendroglialen Differenzierung der fmNPC konnten jedoch durch eine Blockade des IGF-1-Rezeptors mit AG 1024 signifikant weniger Zellen mit oligodendroglialem Phänotyp gefunden werden als unter Kontrollbedingungen (siehe Kapitel 4.4). Bevor diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe und weiterer Studien diskutiert werden, soll an dieser Stelle auf die IGF-1-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion eingegangen werden.

Eine detaillierte Kenntnis bezüglich der von IGF-1 angesteuerten intrazellulären Signaltransduktionswege liefern zahlreiche Studien, welche den Einfluss von IGF-1 auf unterschiedliche periphere Zellen sowie Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems auf molekularer Ebene untersucht haben (siehe nachfolgend).

Eine Schlüsselrolle spielen dabei im Wesentlichen der PI3-Kinase/Akt-Signalweg sowie der Ras/MAP-Kinase/ERK-Signalweg, welche bereits im Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben wurden. Am besten untersucht erscheint der antiapoptotische Effekt von IGF-1 auf viele verschiedene Zellarten. Die Vermittlung dieser antiapoptotischen Effekte von IGF-1 über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg konnte anhand zahlreicher Studien mit verschiedenen Zelltypen, u. a. Neuronen belegt werden [6-8,117,122,136,407].

Demgegenüber ist die Studienlage hinsichtlich antiapoptotischer IGF-1-Effekte, die über den ERK-Signalweg vermittelt werden, unübersichtlicher und teilweise widersprüchlich: Beträchtlich weniger Arbeitsgruppen berichten über eine antiapoptotische Signaltransduktion über den ERK-Signalweg, ausgelöst durch IGF-1, zum Beispiel in Herzmuskelzellen [8,137], aber auch in Nervenzellen [138]. Da in den zitierten Studien immer auch der PI3-Kinase/Akt-Signalweg erwähnt wird, kann eine Interaktion beider Signalwege bezüglich antiapoptotischer Effekte von IGF-1 vermutet werden. Beispielsweise indem die PI3-Kinase an der Aktivierung von ERK beteiligt ist [24,139,140]. Andere Arbeitsgruppen

Diskussion

kommen wiederum zu dem Ergebnis, dass der ERK-Signalweg nicht an der Vermittlung antiapoptotischer Effekte von IGF-1 beteiligt ist [5,7]. Vielmehr berichten mehrere Veröffentlichungen über die Bedeutung des ERK-Signalweges für den Einfluss von IGF-1 auf zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Differenzierung, Zellwachstum und Proliferation in verschiedenen Zelltypen [25-27,141-146].

In der vorliegenden Arbeit wurden die an der IGF-1-vermittelten neuronalen Differenzierung der fmNPCs beteiligten intrazellulären Signaltransduktionswege näher charakterisiert und in den Mittelpunkt des Interesses gestellt. Hierfür wurden ELISA-Experimente durchgeführt, um die Aktivierung ausgewählter Kinasen und Transkriptionsfaktoren in der Frühphase der Differenzierung der fmNPCs zu untersuchen. Zusammengefasst fand sich unter IGF-1-Behandlung während der Frühphase der Differenzierung eine signifikant verringerte Aktivität der PI3-Kinase sowie von Akt und NF- κ B, wohingegen die Aktivität der ERK während der Frühphase der Differenzierung der fmNPCs signifikant gesteigert wurde (siehe auch Kapitel 4.6).

Diese Ergebnisse lassen somit eine durch den MAP-Kinase/ERK-Signalweg getriggerte von IGF-1 induzierte Neurogenese der untersuchten fmNPCs vermuten, wohingegen der PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweg während der Differenzierung unter IGF-1-Einwirkung gehemmt wird. Dazu passend konnte kein signifikanter Effekt von IGF-1 auf die astrogliale Ausdifferenzierung der Zellen gefunden werden, für welche, wie in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, der PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt [28]. Hingegen zeigen die vorliegenden Ergebnisse erhöhte PI3-Kinase-Level während der Differenzierung unter Kontrollbedingungen, mutmaßlich korrelierend mit dem bereits oben aufgeführten Differenzierungsverhalten nach Entzug von Mitogenen zugunsten der Astrozyten. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass in der Frühphase der neuronalen Differenzierung von fmNPCs die ERK1/2 und JNK jedoch nicht die p38 MAP-Kinase aktiviert werden [29].

Übereinstimmend zeigen die vorliegenden Ergebnisse auch eine Aktivierung der ERK unter Kontrollbedingungen unabhängig von IGF-1, welche mit der Zeitachse jedoch rasch rückläufig ist, wohingegen die PI3-Kinase aktiviert bleibt. Hingegen fanden sich unter IGF-1-Behandlung konstant und im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte ERK-Level auch nach 6 h der Differenzierung, während die Aktivität der PI3-Kinase herunterreguliert wurde. Interessant ist, dass die in fmNPCs durch IL-1 β induzierte dopaminerge Differenzierung ebenfalls wesentlich durch die Aktivierung der ERK vermittelt wird, welche

Diskussion

die mRNA-Expression von entscheidenden dopaminergen Transkriptionsfaktoren wie Nurr1 und Pitx3 sowie einen anschließenden Anstieg des TH-Proteins bewirkt.

Inhibitorstudien zeigten durch Blockade der ERK1/2 und p38 MAP-Kinase einen signifikanten Rückgang der Nurr1-Expression und somit der dopaminergen Spezifizierung der fmNPCs, jedoch konnte kein negativer Effekt auf die Differenzierung der fmNPCs in MAP2-positive Neurone festgestellt werden. Versuche mit Inhibitoren des PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signal-wegs zeigten eine Erleichterung der IL-1 β -induzierten Expression von Nurr1 und der darauffolgenden dopaminergen Differenzierung der fmNPCs [29]. Für IGF-1 hat sich hingegen ein signifikanter Effekt auf die Differenzierung der fmNPCs in MAP2-positive Neurone gezeigt, der durch den ERK-Signalweg vermittelt zu sein scheint.

Es gilt anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit keine Experimente mit Inhibitoren des ERK-Signalweges durchgeführt wurden um einen ERK-vermittelten Effekt sicher zu bestätigen, sondern mit dem Inhibitor AG 1024 lediglich eine IGF-1-Wirkung am IGF-1-Rezeptor sicher verifiziert wurde.

Die wesentliche Frage, die im Vergleich der vorab zitierten Studien mit der vorliegenden Arbeit aufgeworfen wird ist, ob IGF-1 im Rahmen des nachgewiesenen neurogenen Effektes auch in die dopaminerge Differenzierung der fmNPCs eingreift. Wie bereits erläutert, beschränkt sich die ERK-vermittelte Wirkung des IL-1 β ausschließlich auf die dopaminerge Spezifizierung der fmNPC ohne signifikante Effekte auf die generelle Ausreifung der Zellen in mature Neurone und Gliazellen. Das bedeutet, dass unter den MAP2-positiven Neuronen signifikant mehr Zellen zu finden waren, die zusätzlich Nurr1-positiv waren, im Vergleich zur Kontrolle jedoch insgesamt nicht mehr MAP2-positive Zellen als unter Kontrollbedingungen zu verzeichnen waren.

Im Gegensatz dazu scheint IGF-1 eine quantitativ signifikante Ausdifferenzierung der fmNPCs zugunsten maturer (MAP2-positiver) Neurone zu bewirken und vermittelt diesen Effekt ebenfalls über den ERK-Signalweg. Um der Frage nachzugehen ob IGF-1 auch in die dopaminerge Differenzierung der fmNPCs eingreift, sind weitere Experimente notwendig, welche die Expression dopaminerger Transkriptionsfaktoren (wie Nurr1 oder TH) unter dem Einfluss der gefundenen neurogenen Wirkung von IGF-1 untersuchen. Weiterhin würde eine detailliertere Charakterisierung der intrazellulären Signalwege bezüglich der Interaktion zwischen den verschiedenen Kinasen weiterführende Erkenntnisse bringen. Dafür wären weitere Experimente, insbesondere Inhibitorstudien, sinnvoll. So zeigen sich bereits im

Diskussion

orientierenden Vergleich der aufgeführten Studien, insbesondere in der zellvermittelten Wirkung von IGF-1 und IL-1 β , Unterschiede in der Aktivierung weiterer Signaltransduktoren neben ERK.

Für die IL-1 β vermittelte dopaminerge Differenzierung der fmNPC ist weiterhin die p38 MAP-Kinase von Bedeutung, welche nach drei Stunden der Differenzierung signifikant aktiviert wurde [29]. Im Gegensatz dazu vermittelt IGF-1 seine neurogene Wirkung neben der ERK-Aktivierung durch eine Abnahme der Aktivität der p38 MAP-Kinase welche ebenfalls nach drei Stunden als signifikant registriert werden konnte. Übereinstimmend erfuhr die JNK-Kinase weder durch IL-1 β , noch durch IGF-1 eine signifikante Änderung ihres Aktivitätsmusters.

Unabhängig von der Frage eines möglichen Einflusses von IGF-1 auf die dopaminerge Differenzierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen, lässt sich zusammenfassend ein signifikanter Effekt von IGF-1 auf die Differenzierung der fmNPCs in Neurone, vermittelt durch den ERK-Signalweg, festhalten. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse zahlreicher Studien, die sich ebenfalls mit dem Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung von neuronalen Zellarten beschäftigt haben (siehe nachfolgend).

Die Präsenz von IGF-1 und seines spezifischen Rezeptors während der neuronalen Entwicklung des Säugerorganismus [80,106,408,409] lässt bereits dessen herausragenden Einfluss auf die Neurogenese vermuten. Bestätigend konnten in-vivo Studien zeigen, dass eine Eliminierung von IGF-1 durch „genetischen Knock-Out“, oder eine Reduktion des verfügbaren IGF-1 durch Antikörper-Elimination, zu einer verminderten Anzahl von Neuronen führt [336,410]. Andererseits konnten Aberg et al. zeigen, dass die periphere IGF-1-Infusion in Ratten zu einer erhöhten Anzahl neu gebildeter Neurone und Oligodendrozyten führt [411,412]. O’Kusky et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von IGF-1 in transgenen Mäusen die Anzahl an Neuronen und synaptischen Verbindungen im sich entwickelnden postnatalen Hippocampus erhöht [413,414]. Yuan et al. fanden, dass die IGF-1-Überexpression die Proliferation und Differenzierung von NSCs in adulten Mäusen fördert [309]. In dieser Studie wurden auch die zugrundeliegenden Signalwege charakterisiert. Interessant ist, dass hierbei die Differenzierung der NSCs über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg, die Proliferation der adulten NSCs hingegen durch den ERK-Signalweg vermittelt wird, also den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen widerspricht.

Diskussion

Bereits ältere Studien berichten über eine neurogene Wirkung von IGF-1 auf neurale Stamm- und Precursorzellen *in vitro*. So konnten Arsenijevic et al. zeigen, dass bereits eine kurze IGF-1-Exposition die neuronale Differenzierung von embryonalen striatalen Precursoren bewirkt, ohne Einfluss auf deren Überleben oder Proliferation zu zeigen [16]. Ebenfalls konnte Arsenijevic einen synergistischen Effekt von IGF-1 und Insulin auf die neuronale Differenzierung der untersuchten Precursoren und Brooker et al. einen neurogenen Effekt von IGF-1 auf NSCs aus dem adulten Frontalhirn von Mäusen zeigen. In dieser Studie wurden die Zellen FGF-2 abhängig kultiviert. Bereits der Entzug von FGF-2 führte zu einer neuronalen Ausdifferenzierung der untersuchten Zellen, die experimentelle Zugabe von IGF-1 konnte die Anzahl der Neurone weiterhin signifikant steigern. Interessant ist, dass die spontane Differenzierung der untersuchten Stammzellen in Neurone nach Entzug von FGF durch eine endogene IGF-1-Produktion erklärt werden konnte. Des Weiteren konnte diese Studie zeigen, dass hohe IGF-1-Level Einfluss auf die Reifung und die phänotypische Ausbildung von Neurotransmittern haben [367].

Sehr wahrscheinlich ist ein komplexes Zusammenspiel diverser Wachstumsfaktoren im Prozess der neuronalen und dopaminergen Differenzierung der fmNPCs. Beispielsweise konnten Choi et al. zeigen, dass die Kombination von Wachstumsfaktoren einen additiven Effekt auf die Differenzierung von NSC der Ratte hat. Untersucht wurden in dieser Arbeit bFGF, IGF-1, BDNF und NGF in ihrer singulären sowie kombinierten Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation der NSCs. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierung von NSCs erzielten dabei Kombinationen von IGF-1 und bFGF, wobei ein Synergismus einer mitogenen Aktivität von bFGF sowie einer postmitotischen Beeinflussung der Differenzierung durch IGF-1 zugrunde gelegt wurde [366].

Die zitierten Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe schreiben IL-1 β zwar eine Schlüsselrolle in der Induktion der dopaminergen Differenzierung der fmNPCs zu, jedoch wurden für die Differenzierung in mature dopaminerge Neurone die Bedeutung weiterer neurotropher Faktoren, wie z. B. GDNF oder Wnt5a, eingeräumt [29]. Während der neuronalen Entwicklung werden diese Wachstumsfaktoren u. a. von Gliazellen bereitgestellt. Vor dem Hintergrund der durch zahlreiche Studien *in vivo* und *in vitro* nachgewiesenen positiven Effekte von IGF-1 auf die Entwicklung des ZNS kann eine Wirkung von IGF-1 auch auf die Ausdifferenzierung dopaminerge Neurone vermutet werden, einschlägige Studien finden sich diesbezüglich jedoch nicht. In diesem Zusammenhang seien die Ergebnisse von Studien erwähnt, die eine Bedeutung von IGF-1 für die Entwicklung von Oligodendroglia aufzeigen

Diskussion

konnten [364,415]. Dabei konnte unter anderem eine autokrine/parakrine IGF-1-Sekretion von Oligodendrozyten nachgewiesen werden [364].

Zwar erbrachte die vorliegende Arbeit keinen Nachweis eines signifikanten Effekts von IGF-1 auf die Oligodendrogenese der fmNPCs, jedoch führte die Blockade des IGF-1-Rezeptors zu signifikant weniger Oligodendrozyten als unter Kontrollbedingungen. Dieses Ergebnis lässt zumindest eine Abhängigkeit der Oligodendrozyten von funktionierenden IGF-1-Rezeptoren vermuten. Ob Oligodendrozyten in der Lage sind, durch eine parakrine Sekretion von IGF-1 auch auf die (dopaminerge) Differenzierung von Neuronen einzuwirken, wird an dieser Stelle zur Diskussion gestellt.

Bekannt ist, dass IGF-1 in der Lage ist, dopaminerge Neurone gegen oxidativen Stress zu schützen [416]. Wilkins et al. beschreiben in diesem Zusammenhang einen neuroprotektiven Einfluss von oligodendrogialen Precursoren und ausdifferenzierten Oligodendrozyten auf embryonale kortikale Neurone der Ratte, der zum einen durch direkten Zellkontakt vermittelt wird, andererseits aber auch durch lösliche Substanzen wie IGF-1 [417].

Interessant ist die Verknüpfung der vorliegenden Ergebnisse mit einer Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe, welche in einem vergleichbaren experimentellen Setting den Einfluss von adultem humanem CSF auf das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von fmNPCs untersuchte [249]. Ziel dieser Arbeit war es, alternative Konzepte der Zellersatztherapie neurodegenerativer Erkrankungen zu diskutieren, welche, unabhängig von einem chirurgischen Eingriff, das intrathekale Einbringen von Zellen in das ZNS und in der Folge deren Fähigkeit der Migration an den gewünschten Wirkort beschreiben.

Es konnte dort im Wesentlichen ein antiapoptotischer Effekt von CSF auf die fmNPCs sowohl während der Differenzierung als auch Expansion gefunden werden. Jedoch konnte einerseits keine proliferative Wirkung des CSF auf die fmNPCs festgestellt werden, andererseits differenzierten sich die fmNPCs zugunsten der Astrozyten. Die Neurogenese in MAP2-positive Neurone wurde inhibiert. Diese Effekte des CSF auf die fmNPCs wurden im Zusammenhang mit Proteinen, wie „bone morphogenic protein“ (BMP), diskutiert, welche im CSF nachgewiesen werden können und ein Anheften der injizierten Stammzellen an der Ventrikelwand am Ort der Injektion, sowie eine insuffiziente Migration in das ZNS bewirken können. Weiterhin behindert die erleichterte Astrogenese die Differenzierung der neuralen Stammzellen in die erforderlichen funktionsfähigen Neurone.

Eine neuere Studie der Arbeitsgruppe von Zhu et al. konnte nachweisen, dass IGF-1 in humanem CSF enthalten ist und die Migrationskapazität, sowie die Proliferation und das Überleben von humanen fetalen NPCs und humanen MSCs positiv beeinflusst [418]. Diese

Ergebnisse passen gut zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen neurotrophen Effekten von IGF-1. Bezüglich des therapeutischen Potentials neuraler Stammzellen durch deren Fähigkeit, zum Ort der Schädigung zu migrieren um degeneriertes Gewebe des ZNS zu reparieren, ist es neben dem Verständnis der Stammzellbiologie auch wichtig, das Milieu näher zu charakterisieren, in dem dieses Potential, z. B. durch den Einsatz neurotropher Faktoren wie IGF-1, gefördert werden kann [418]. Hier könnte IGF-1 einen Beitrag dazu leisten, die vorab beschriebene, durch CSF präferierte Gliogenese in Richtung der gewünschten Neurogenese von transplantierten Stammzellen zu lenken.

5.5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zu leisten zum Forschungskomplex experimenteller Strategien zur Zellersatztherapie neurodegenerativer Erkrankungen. IGF-1 konnte in diesem Zusammenhang als potenter neurotropher Faktor in seiner Wirkung auf die untersuchten fmNPCs charakterisiert werden.

Es bestätigte sich ein antiapoptotischer und proliferationsfördernder Effekt von IGF-1. Dieser stellt einerseits eine wichtige Voraussetzung für die Vorbereitung und Etablierung von Zellkulturen für Transplantationszwecke dar, andererseits auch für alternative Therapieansätze. So sind neurotrophe Faktoren für den Erhalt der funktionalen Integrität neuronalen Gewebes oder für transplantierte Zellen interessant.

Des Weiteren fand sich ein neurogener, die Differenzierung fördernder Effekt, welcher insbesondere vor dem Hintergrund derjenigen experimentellen Fragestellungen interessant ist, welche sich mit der Bereitstellung von funktionalen Neuronen für Transplantationszwecke befassen.

Die Problematik der Etablierung eines geeigneten Ausgangzellsystems zur Generierung dopaminergener Neurone wurde im Kapitel 5.1 detailliert diskutiert. Im Mittelpunkt stehen dabei weiterhin ethische sowie logistisch-praktische Bedenken bezüglich der Bereitstellung funktionsfähiger dopaminergener Neurone auch mit Ausblick auf die klinische Anwendbarkeit.

Unabhängig davon zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Potential von IGF-1, in die neuronale Differenzierung von fmNPCs der Ratte einzugreifen. Weitere Studien müssen zeigen, ob dieser Effekt auch für klinisch potentiell verwendbare neurale humane Stammzelltypen reproduzierbar ist, und inwiefern IGF-1 Einfluss auf die dopaminerge Differenzierung von mesenzephalen neuralen Zellen nehmen kann. Bereits vorab zitierte

Diskussion

Studien berichten über Erfolge in der Gewinnung dopaminergener Neurone bzw. Progenitoren, z. B. aus humanen ESCs oder iPSCs (siehe Kapitel 5.1). Inwiefern die Anwendung von IGF-1 diese Verfahren weiter verbessern kann, steht zur Diskussion.

In diesem Zusammenhang wird weiterhin wichtig sein, die der neuronalen und dopaminergen Differenzierung zugrundeliegenden intrazellulären Signalwege (z. B. durch Inhibitorstudien) noch genauer zu charakterisieren, um damit das Verständnis des Entwicklungsprozesses von NPCs in transplantationsfähige dopaminerge Neurone zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit konnte eine herausragende Bedeutung des ERK-Signalweges für die IGF-1-vermittelte Neurogenese unter gleichzeitiger Herunterregulierung der PI3-Kinase während der Frühphase der Differenzierung von fmNPCs aufzeigen. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da in der Mehrzahl der Studien zur Wirkung von IGF-1 auf diverse Zelltypen wesentlich der PI3-Kinase-Signalweg im Mittelpunkt steht oder eine synergistische Wirkung des PI3-Kinase-Signalweges und von MAP-Kinasen.

Des Weiteren knüpft dieses Ergebnis an die Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe an, welche einen entscheidenden Schritt in der dopaminergen Differenzierung von fmNPCs ebenfalls als ERK-vermittelt aufzeigen konnten.

Ergänzend zur Zellersatztherapie wurde eine mögliche Bedeutung von IGF-1, als neurotrophem Faktor, für alternative krankheitsmodifizierende Therapieansätze neurodegenerativer Erkrankungen angesprochen. Dazu gehören auch die Gentherapie oder pharmakologische Interventionen.

6 Zusammenfassung

In der Vergangenheit ergaben sich aus zahlreichen Untersuchungen vermehrt Hinweise für eine wichtige Rolle von Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) für das Überleben, den Erhalt, sowie das Differenzierungsverhalten von verschiedenen Zelltypen. Hierbei wurden Effekte von IGF-1 auf Zellen unterschiedlicher Gewebearten, u. a. auch des Zentralen Nervensystems, festgestellt. Für viele der beobachteten IGF-1-Wirkungen konnte eine Vermittlung über den PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweg bestätigt werden. Aber auch der ERK-Signalweg scheint an der IGF-1-vermittelten Signaltransduktion beteiligt zu sein.

Aus früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellsystem ist bekannt, dass der PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweg die astrogliale Differenzierung der fetalen mesenzephalen neuralen Precursorzellen („fetal mesencephalic precursor cells“ [fmNPCs]) maßgeblich beeinflusst.

Hingegen wird die durch Interleukin-1 β (IL-1 β) induzierte dopaminerge Differenzierung von fmNPCs über den ERK/MAP-Kinase-Signalweg vermittelt und durch die Hemmung des PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalweges erleichtert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich vor diesem Hintergrund mit dem Einfluss von IGF-1 auf langzeitexpandierte fmNPCs der Ratte. Dazu wurde das in vitro-Modell der primären Dissoziationskultur aus mesenzephaalem Gewebe 14 Tage alter embryonaler Ratten herangezogen. Es wurde der Frage nachgegangen, inwieweit IGF-1 die Überlebensfähigkeit, das Proliferationspotenzial, die Expression des IGF-1-Rezeptors, sowie das neuronale, astrogliale und oligodendrogliale Differenzierungsverhalten dieser fmNPCs der Ratte beeinflussen kann. Weiterhin sollten an der Differenzierung beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen näher charakterisiert werden.

Bei der Untersuchung der Überlebensfähigkeit der Zellen zeigte sich, dass die Behandlung mit IGF-1 (50 ng/ml) sowohl während der Expansion als auch während der Differenzierung über 24 h und 72 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrollreihe zu einer signifikanten Steigerung der Überlebensrate führte. Dieser überlebenssteigernde Effekt von IGF-1 auf die fmNPCs konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit AG 1024 – einem Inhibitor des IGF-1-Rezeptors – während der Differenzierung, nicht jedoch während der Expansion, aufgehoben werden. Dies spricht für eine besondere Rolle von IGF-1 für den Differen-

Zusammenfassung

zierungsprozess der fmNPCs, welche folglich während ihrer Differenzierung in höherem Maße auf die Expression des IGF-1-Rezeptors angewiesen sind als während der Expansion. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis zeigte sich bei den Untersuchungen zur Expression des IGF-1-Rezeptors eine signifikante Hochregulierung der IGF-1-Rezeptor-Expression während der Differenzierung im Vergleich zur Expansion der Zellen. Weiterhin konnte unter IGF-1-Behandlung und Differenzierung der Zellen wiederum eine signifikante Hochregulierung der IGF-1-Rezeptor-Expression im Vergleich zur Differenzierung unter Kontrollbedingungen beobachtet werden.

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von IGF-1 auf den Erhalt des Proliferationspotentials der fmNPCs konnte bezüglich der Ki-67-markierten Zellen nach der Expansion über 72 h ein signifikanter Effekt von IGF-1 beobachtet werden, mit einer höheren Anzahl Ki-67-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollreihe. Allerdings konnte dieser, das Proliferationspotential steigernde, Effekt nach der Expansion über 24 h und anschließender Markierung der Zellen mit BrdU nicht beobachtet werden. Trotzdem zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle mehr Zellen mit Proliferationspotential (BrdU-positiv) und somit eine Tendenz in Richtung des Ergebnisses nach der Expansion über 72 h.

Ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf das neuronale und gliale Differenzierungsverhalten von fmNPCs. Hierbei zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit IGF-1 über einen Differenzierungszeitraum von 7 d zu signifikant mehr Zellen mit neuronalem Phänotyp (MAP2-positiv) im Vergleich zur Kontrollreihe führte. Bezüglich der astroglialen und oligodendroglialen Differenzierung der fmNPCs konnte eine Behandlung mit IGF-1 keine signifikanten Ergebnisse zeigen.

Schließlich beschäftigte sich die vorliegende Arbeit auch damit, die an der Differenzierung beteiligten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen näher zu charakterisieren. Dazu wurden ELISA-Experimente durchgeführt, um die Aktivierung ausgewählter Kinasen und Transkriptionsfaktoren in der Frühphase der Differenzierung der fmNPCs zu bestimmen. Hierbei zeigte sich unter IGF-1-Behandlung, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollreihe, ein Abfall der Aktivität der PI3-Kinase, Akt und von NF- κ B mit signifikanten Werten nach 0 h, 3 h und 6 h für die PI3-Kinase, nach 1 h und 6 h für Akt und nach 0,5 h für NF- κ B. Im Gegensatz dazu konnte die Aktivität der ERK unter IGF-1-Behandlung nach 1 h, 3 h und 6 h signifikant gesteigert werden. Für die p38 MAP-Kinase zeigte sich nach 3 h Behandlung mit

Zusammenfassung

IGF-1 eine signifikante Reduktion der Aktivität im Vergleich zur Kontrollreihe. Auf die JNK-Aktivität zeigte die Behandlung mit IGF-1 hingegen keinen signifikanten Effekt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- IGF-1 erhöht die Überlebensrate von fmNPCs während deren Expansion und Differenzierung in vitro über 24 h und 72 h.
- AG 1024 inhibiert diesen überlebenssteigernden Effekt während der Differenzierung von fmNPCs, nicht aber während deren Expansion.
- IGF-1 steigert das Proliferationspotenzial von fmNPCs in vitro.
- IGF-1 induziert die Neurogenese von fmNPCs in vitro.
- Effekte von IGF-1 auf die fmNPCs werden vermittelt über den IGF-1-Rezeptor, welcher während der Differenzierung durch die Behandlung mit IGF-1 hochreguliert wird.
- IGF-1 führt in der weiteren zellulären Signaltransduktion während der Differenzierung von fmNPCs zu einer Herunterregulierung des PI3-Kinase/Akt/NF- κ B-Signalwegs und zu einer Hochregulierung von ERK1/2 des MAP-Kinase-Signalwegs.

7 Literaturverzeichnis

1. Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*. 2001;142(5):1685-8.
2. Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;121(1):19-26.
3. Froment P, Dupont J, Christophe-Marine J. Mdm2 exerts pro-apoptotic activities by antagonizing insulin-like growth factor-I-mediated survival. *Cell Cycle*. 2008;7(19):3098-103.
4. Gatto M, Drudi-Metalli V, Torrice A, Alpini G, Cantafora A, Blotta I, Alvaro D. Insulin-like growth factor-1 isoforms in rat hepatocytes and cholangiocytes and their involvement in protection against cholestatic injury. *Lab Invest*. 2008;88(9):986-94.
5. Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*. 2000;96(8):2856-61.
6. Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9828-35.
7. Himpe E, Degallier C, Coppens A, Kooijman R. Insulin-like growth factor-1 delays Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J Endocrinol*. 2008;199(1):69-80.
8. Hong F, Kwon SJ, Jhun BS, Kim SS, Ha J, Kim SJ, Sohn NW, Kang C, Kang I. Insulin-like growth factor-1 protects H9c2 cardiac myoblasts from oxidative stress-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Life Sci*. 2001;68(10):1095-105.
9. Van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J Cell Physiol*. 2000;182(1):24-32.
10. Wang L, Schulz TC, Sherrer ES, Dauphin DS, Shin S, Nelson AM, Ware CB, Zhan M, Song CZ, Chen X, Brimble SN, McLean A, Galeano MJ, Uhl EW, D'Amour KA, Chesnut JD, Rao MS, Blau CA, Robins AJ. Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood*. 2007;110(12):4111-9.
11. Zhang X, Zhang L, Cheng X, Guo Y, Sun X, Chen G, Li H, Li P, Lu X, Tian M, Qin J, Zhou H, Jin G. IGF-1 promotes Brn-4 expression and neuronal differentiation of neural stem cells via the PI3K/Akt pathway. *PLoS One*. 2014;9(12):e113801.
12. Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ. Trophic effects of insulin-like growth factor-I on fetal rat hypothalamic cells in culture. *Neuroscience*. 1990;35(3):601-8.
13. Gago N, Avellana-Adalid V, Baron-Van Evercooren A, Schumacher M. Control of cell survival and proliferation of postnatal PSA-NCAM(+) progenitors. *Mol Cell Neurosci*. 2003;22(2):162-78.
14. Aburto MR, Magarinos M, Leon Y, Varela-Nieto I, Sanchez-Calderon H. AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors. *PLoS One*. 2012;7(1):e30790.
15. Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, Aebischer P. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci*. 2001;21(18):7194-202.

Literaturverzeichnis

16. Arsenijevic Y, Weiss S. Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1998;18(6):2118-28.
17. Supeno NE, Pati S, Hadi RA, Ghani AR, Mustafa Z, Abdullah JM, Idris FM, Han X, Jaafar H. IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells. *Int J Med Sci.* 2013;10(5):522-31.
18. Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(1):23-40.
19. Nieto-Estevez V, Oueslati-Morales CO, Li L, Pickel J, Morales AV, Vicario-Abejon C. Brain Insulin-Like Growth Factor-I Directs the Transition from Stem Cells to Mature Neurons During Postnatal/Adult Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells.* 2016;34(8):2194-209.
20. Huat TJ, Khan AA, Pati S, Mustafa Z, Abdullah JM, Jaafar H. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci.* 2014;15:91.
21. Allard D, Figg N, Bennett MR, Littlewood TD. Akt regulates the survival of vascular smooth muscle cells via inhibition of FoxO3a and GSK3. *J Biol Chem.* 2008;283(28):19739-47.
22. Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *J Neural Transm Suppl.* 2000(60):261-72.
23. Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol.* 2002;62(2):225-33.
24. Menu E, Kooijman R, Van Valckenborgh E, Asosingh K, Bakkus M, Van Camp B, Vanderkerken K. Specific roles for the PI3K and the MEK-ERK pathway in IGF-1-stimulated chemotaxis, VEGF secretion and proliferation of multiple myeloma cells: study in the 5T33MM model. *Br J Cancer.* 2004;90(5):1076-83.
25. Choi YS, Cho HY, Hoyt KR, Naegele JR, Obrietan K. IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia.* 2008;56(7):791-800.
26. Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Vasilcanu D, Girnita A, Lefkowitz RJ, Larsson O. Beta-arrestin and Mdm2 mediate IGF-1 receptor-stimulated ERK activation and cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11329-38.
27. Hematulin A, Sagan D, Eckardt-Schupp F, Moertl S. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Cell Signal.* 2008;20(12):2276-85.
28. Sabolek M, Herborg A, Schwarz J, Storch A. Dexamethasone blocks astroglial differentiation from neural precursor cells. *Neuroreport.* 2006;17(16):1719-23.
29. Sabolek M, Baumann B, Heinrich M, Meyer AK, Herborg A, Liebau S, Maisel M, Hermann A, Ventz K, Schwarz J, Wirth T, Storch A. Initiation of dopaminergic differentiation of Nurr1(-) mesencephalic precursor cells depends on activation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Stem Cells.* 2009;27(8):2009-21.
30. Gibb WR, Lees AJ. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1991;54(5):388-96.
31. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
32. Blaszczyk JW. Motor deficiency in Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1998;58(1):79-93.

Literaturverzeichnis

33. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 1991;114 (Pt 5):2283-301.
34. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002;14(2):223-36; discussion 2.
35. Bloem BR, Van Dijk JG, Beckley DJ, Roos RA, Remler MP, Bruyn GW. Altered postural reflexes in Parkinson's disease: a reverse hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992;39(3):243-7.
36. Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL. Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S3-12; discussion S-5.
37. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 2009;8(5):464-74.
38. Shulman LM, Taback RL, Bean J, Weiner WJ. Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2001;16(3):507-10.
39. Krack P, Limousin P, Benabid AL, Pollak P. Chronic stimulation of subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Lancet*. 1997;350(9092):1676.
40. Volkmann J. Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol*. 2004;21(1):6-17.
41. Diamond SG, Markham CH, Hoehn MM, McDowell FH, Muentner MD. Multi-center study of Parkinson mortality with early versus later dopa treatment. *Ann Neurol*. 1987;22(1):8-12.
42. Sievertzon M, Wirta V, Mercer A, Meletis K, Erlandsson R, Wikstrom L, Frisen J, Lundeberg J. Transcriptome analysis in primary neural stem cells using a tag cDNA amplification method. *BMC Neurosci*. 2005;6:28.
43. Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, Han SS, Liu Y, Daniels MP, Rao MS, Fischer I. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience*. 2006;142(1):287-304.
44. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Fortunato F, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain*. 2007;130(Pt 5):1289-305.
45. Kitayama T, Onitsuka Y, Song L, Morioka N, Morita K, Dohi T. Assessing an eating disorder induced by 6-OHDA and the possibility of nerve regeneration therapy by transplantation of neural progenitor cells in rats. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2007;27(3):109-16.
46. Martin LJ, Liu Z. Adult olfactory bulb neural precursor cell grafts provide temporary protection from motor neuron degeneration, improve motor function, and extend survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(11):1002-18.
47. Wei P, Liu J, Zhou HL, Han ZT, Wu QY, Pang JX, Liu S, Wang TH. Effects of engrafted neural stem cells derived from GFP transgenic mice in Parkinson's diseases rats. *Neurosci Lett*. 2007;419(1):49-54.
48. Deierborg T, Soulet D, Roybon L, Hall V, Brundin P. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2008;85(4):407-32.
49. McKay R, Kittappa R. Will stem cell biology generate new therapies for Parkinson's disease? *Neuron*. 2008;58(5):659-61.
50. Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease--give up or move forward? *Mov Disord*. 2013;28(3):268-73.

Literaturverzeichnis

51. Lindvall O. Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease. *J Intern Med.* 2016;279(1):30-40.
52. Dhivya V, Balachandar V. Cell replacement therapy is the remedial solution for treating Parkinson's disease. *Stem Cell Investig.* 2017;4:59.
53. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287(5457):1433-8.
54. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997;276(5309):66-71.
55. Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmioli S, Dunnett SB. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 1997;148(1):135-46.
56. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* 1995;168(2):342-57.
57. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* 2000;28(1):31-40.
58. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1580-5.
59. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2000;18(6):675-9.
60. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999;96(1):25-34.
61. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature.* 2000;405(6789):951-5.
62. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992;255(5052):1707-10.
63. Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature.* 2001;412(6848):736-9.
64. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 2000;20(23):8727-35.
65. Storch A, Sabolek M, Milosevic J, Schwarz SC, Schwarz J. Midbrain-derived neural stem cells: from basic science to therapeutic approaches. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):15-22.
66. Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol.* 2001;170(2):317-25.
67. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16(1):3-34.
68. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;47(3):235-53.
69. Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev.* 1998;19(6):717-97.
70. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978;253(8):2769-76.

Literaturverzeichnis

71. Han VK, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(2):422-9.
72. Brazeau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Ying SY, Guillemin R. Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(24):7909-13.
73. Tumber A, Meikle MC, Hill PA. Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. *J Endocrinol.* 2000;167(3):383-90.
74. Chen H, Yan GC, Gishizky ML. Identification of structural characteristics that contribute to a difference in antiapoptotic function between human insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. *Cell Growth Differ.* 1998;9(11):939-47.
75. Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, Jacobs S, Kull FC, Jr., Allred DC, Osborne CK. Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1418-23.
76. Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFbps. *Prog Growth Factor Res.* 1995;6(2-4):319-27.
77. Fernandez AM, Torres-Aleman I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):225-39.
78. Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci.* 2004;24(45):10201-10.
79. Joseph D'Ercole A, Ye P. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology.* 2008;149(12):5958-62.
80. LeRoith D. Insulin-like growth factors and the brain. *Endocrinology.* 2008;149(12):5951.
81. Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J Mol Med (Berl).* 2004;82(3):156-62.
82. Torres-Aleman I. Mouse models of Alzheimer's dementia: current concepts and new trends. *Endocrinology.* 2008;149(12):5952-7.
83. Godau J, Herfurth M, Kattner B, Gasser T, Berg D. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81(5):536-8.
84. van Dam PS, Aleman A. Insulin-like growth factor-I, cognition and brain aging. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):87-95.
85. Fernandez S, Fernandez AM, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I. Emerging roles of insulin-like growth factor-I in the adult brain. *Growth Horm IGF Res.* 2007;17(2):89-95.
86. Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal.* 2006;6:53-80.
87. Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Crysal RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J Clin Invest.* 1988;82(5):1685-93.
88. Nyman T, Pekonen F. The expression of insulin-like growth factors and their binding proteins in normal human lymphocytes. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1993;128(2):168-72.
89. Abboud SL, Bethel CR, Aron DC. Secretion of insulinlike growth factor I and insulinlike growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells. *J Clin Invest.* 1991;88(2):470-5.

Literaturverzeichnis

90. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest.* 1992;90(2):439-46.
91. Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DW. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-I expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2368-77.
92. Arkins S, Rebeiz N, Brunke-Reese DL, Biragyn A, Kelley KW. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Mol Endocrinol.* 1995;9(3):350-60.
93. Fournier T, Riches DW, Winston BW, Rose DM, Young SK, Noble PW, Lake FR, Henson PM. Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol.* 1995;155(4):2123-33.
94. Fu YK, Arkins S, Wang BS, Kelley KW. A novel role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. Priming neutrophils for superoxide anion secretion. *J Immunol.* 1991;146(5):1602-8.
95. Bjerknes R, Aarskog D. Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by insulin-like growth factor I: increased phagocytic capacity, complement receptor expression, degranulation, and oxidative burst. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(6):1948-55.
96. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* 2001;27(2):195-200.
97. Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, Harridge SD. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol.* 2003;547(Pt 1):247-54.
98. McCall GE, Allen DL, Haddad F, Baldwin KM. Transcriptional regulation of IGF-I expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(4):C831-9.
99. Wang X, Yang Y, Adamo ML. Characterization of the rat insulin-like growth factor I gene promoters and identification of a minimal exon 2 promoter. *Endocrinology.* 1997;138(4):1528-36.
100. Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;22(2):91-102.
101. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 2002;157(1):137-48.
102. Pilch PF, O'Hare T, Rubin J, Boni-Schnetzler M. The ligand binding subunit of the insulin-like growth factor I receptor has properties of a peripheral membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;136(1):45-50.
103. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995;16(2):143-63.
104. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986;5(10):2503-12.
105. D'Ercole AJ. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996;25(3):573-90.

Literaturverzeichnis

106. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem.* 2008;114(1):17-22.
107. Bach LA. IGF-binding proteins. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(1):T11-T28.
108. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(6):E967-76.
109. Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(13):972-80.
110. Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(34):31564-73.
111. Lautier C, Goldwurm S, Durr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):822-33.
112. Myers MG, Jr., Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, White MF. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology.* 1993;132(4):1421-30.
113. Sasaoka T, Rose DW, Jhun BH, Saltiel AR, Draznin B, Olefsky JM. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13689-94.
114. Niu XL, Li J, Hakim ZS, Rojas M, Runge MS, Madamanchi NR. Leukocyte antigen-related deficiency enhances insulin-like growth factor-1 signaling in vascular smooth muscle cells and promotes neointima formation in response to vascular injury. *J Biol Chem.* 2007;282(27):19808-19.
115. Foukas LC, Okkenhaug K. Gene-targeting reveals physiological roles and complex regulation of the phosphoinositide 3-kinases. *Arch Biochem Biophys.* 2003;414(1):13-8.
116. Anderson KE, Jackson SP. Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(7):1028-33.
117. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(2):177-82.
118. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene.* 2005;24(50):7455-64.
119. Tokar A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006;66(8):3963-6.
120. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(2):161-70.
121. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411(6835):355-65.
122. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91(2):231-41.
123. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997;278(5338):687-9.
124. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96(6):857-68.
125. Ness JK, Scaduto RC, Jr., Wood TL. IGF-I prevents glutamate-mediated bax translocation and cytochrome C release in O4+ oligodendrocyte progenitors. *Glia.* 2004;46(2):183-94.

Literaturverzeichnis

126. Zheng WH, Kar S, Quirion R. FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem.* 2002;80(6):1049-61.
127. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996;87(1):13-20.
128. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79.
129. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
130. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995;9(22):2723-35.
131. Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C. The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res.* 2003;35(11-12):740-50.
132. Gehart H, Kumpf S, Ittner A, Ricci R. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 2010;11(11):834-40.
133. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006;24(1):21-44.
134. Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? *J Biol.* 2006;5(5):13.
135. Hakuno F, Takahashi SI. IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(1):T69-T86.
136. Feldman EL, Sullivan KA, Kim B, Russell JW. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis.* 1997;4(3-4):201-14.
137. Vivar R, Humeres C, Varela M, Ayala P, Guzman N, Olmedo I, Catalan M, Boza P, Munoz C, Diaz Araya G. Cardiac fibroblast death by ischemia/reperfusion is partially inhibited by IGF-1 through both PI3K/Akt and MEK-ERK pathways. *Exp Mol Pathol.* 2012;93(1):1-7.
138. Willaime-Morawek S, Arbez N, Mariani J, Brugg B. IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;142(2):97-106.
139. Haddad F, Adams GR. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol.* 2004;96(1):203-10.
140. Shelton JG, Steelman LS, White ER, McCubrey JA. Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle.* 2004;3(3):372-9.
141. Bibollet-Bahena O, Almazan G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *J Neurochem.* 2009;109(5):1440-51.
142. Chattopadhyay S, Shubayev VI. MMP-9 controls Schwann cell proliferation and phenotypic remodeling via IGF-1 and ErbB receptor-mediated activation of MEK/ERK pathway. *Glia.* 2009;57(12):1316-25.
143. Du J, Cai S, Suzuki H, Akhand AA, Ma X, Takagi Y, Miyata T, Nakashima I, Nagase F. Involvement of MEKK1/ERK/P21Waf1/Cip1 signal transduction pathway in inhibition of IGF-1-mediated cell growth response by methylglyoxal. *J Cell Biochem.* 2003;88(6):1235-46.
144. Jia G, Mitra AK, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. Angiotensin II and IGF-1 regulate connexin43 expression via ERK and p38 signaling pathways in vascular smooth muscle cells of coronary artery bypass conduits. *J Surg Res.* 2007;142(1):137-42.

Literaturverzeichnis

145. Zhang W, Lee JC, Kumar S, Gowen M. ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J Bone Miner Res.* 1999;14(4):528-35.
146. Walker JL, Zhang L, Zhou J, Woolkalis MJ, Menko AS. Role for alpha 6 integrin during lens development: Evidence for signaling through IGF-1R and ERK. *Dev Dyn.* 2002;223(2):273-84.
147. Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2001;171(1):98-108.
148. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol.* 1998;149(2):411-23.
149. Potter ED, Ling ZD, Carvey PM. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res.* 1999;296(2):235-46.
150. Storch A, Lester HA, Boehm BO, Schwarz J. Functional characterization of dopaminergic neurons derived from rodent mesencephalic progenitor cells. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(2):133-42.
151. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
152. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1):13-20.
153. Eisch AJ, Mandyam CD. Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"? *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(3):147-65.
154. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg.* 1985;62(2):169-73.
155. Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology.* 2000;54(5):1042-50.
156. Brundin P, Strecker RE, Widner H, Clarke DJ, Nilsson OG, Astedt B, Lindvall O, Bjorklund A. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res.* 1988;70(1):192-208.
157. Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* 1990;247(4942):574-7.
158. Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martinez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 1987;316(14):831-4.
159. Irion S. Cell Therapies for Parkinson's Disease. *Clin Transl Sci.* 2019;12(2):95-7.
160. Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, Mencacci N, Bhatia K, Jahanshahi M, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Bjorklund A, Lindvall O, Limousin P, Quinn N, Foltynie T. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol.* 2014;71(1):83-7.
161. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008;14(5):504-6.
162. Mendez I, Vinuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, Tierney T, Holness R, Dagher A, Trojanowski JQ, Isacson O. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med.* 2008;14(5):507-9.

Literaturverzeichnis

163. Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehnrcrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain*. 1999;122 (Pt 6):1121-32.
164. Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Bjorklund A, Brooks D, Brundin P, Frackowiak R, Marsden CD, Odin P, et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1994;35(2):172-80.
165. Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnrcrona S, Widner H, Lindvall O. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 1999;2(12):1137-40.
166. Remy P, Samson Y, Hantraye P, Fontaine A, Defér G, Mangin JF, Fenelon G, Geny C, Ricolfi F, Frouin V, et al. Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Ann Neurol*. 1995;38(4):580-8.
167. Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehnrcrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, Gustavii B, Hagell P, Jahanshahi M, Sawle G, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1997;42(1):95-107.
168. Widner H, Tetrud J, Rehnrcrona S, Snow B, Brundin P, Gustavii B, Bjorklund A, Lindvall O, Langston JW. Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*. 1992;327(22):1556-63.
169. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2001;344(10):710-9.
170. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;54(3):403-14.
171. Politis M, Wu K, Loane C, Quinn NP, Brooks DJ, Rehnrcrona S, Bjorklund A, Lindvall O, Piccini P. Serotonergic neurons mediate dyskinesia side effects in Parkinson's patients with neural transplants. *Sci Transl Med*. 2010;2(38):38ra46.
172. Moore SF, Guzman NV, Mason SL, Williams-Gray CH, Barker RA. Which patients with Parkinson's disease participate in clinical trials? One centre's experiences with a new cell based therapy trial (TRANSEURO). *J Parkinsons Dis*. 2014;4(4):671-6.
173. Barker RA, Barrett J, Mason SL, Bjorklund A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2013;12(1):84-91.
174. Barker RA, Studer L, Cattaneo E, Takahashi J, consortium GFP. G-Force PD: a global initiative in coordinating stem cell-based dopamine treatments for Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2015;1:15017.
175. Kirkeby A, Parmar M, Barker RA. Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: A European approach (STEM-PD). *Prog Brain Res*. 2017;230:165-90.
176. Studer L. Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic-The NYSTEM trial. *Prog Brain Res*. 2017;230:191-212.
177. Barker RA, Parmar M, Studer L, Takahashi J. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell*. 2017;21(5):569-73.
178. Cho MS, Lee YE, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim DS, Kang SM, Lee H, Kim MH, Kim JH, Leem JW, Oh SK, Choi YM, Hwang DY, Chang JW, Kim DW. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3392-7.

Literaturverzeichnis

179. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med.* 2006;12(11):1259-68.
180. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature.* 2002;418(6893):50-6.
181. Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest.* 2005;115(1):102-9.
182. Nistor G, Siegenthaler MM, Poirier SN, Rossi S, Poole AJ, Charlton ME, McNeish JD, Airriess CN, Keirstead HS. Derivation of high purity neuronal progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2011;6(6):e20692.
183. Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, Lindvall O, Parmar M. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep.* 2012;1(6):703-14.
184. Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V, Studer L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature.* 2011;480(7378):547-51.
185. Brederlau A, Correia AS, Anisimov SV, Elmi M, Paul G, Roybon L, Morizane A, Bergquist F, Riebe I, Nannmark U, Carta M, Hanse E, Takahashi J, Sasai Y, Funa K, Brundin P, Eriksson PS, Li JY. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells.* 2006;24(6):1433-40.
186. Lefort N, Feyeux M, Bas C, Feraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, Peschanski M, Perrier AL. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol.* 2008;26(12):1364-6.
187. Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Transl Res.* 2010;156(3):155-60.
188. Tomaskovic-Crook E, Crook JM. Human embryonic stem cell therapies for neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011;10(4):440-8.
189. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4(6):472-6.
190. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
191. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
192. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451(7175):141-6.
193. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010;143(4):508-25.
194. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010;463(7284):1035-41.

Literaturverzeichnis

195. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Sudhof TC, Wernig M. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011;476(7359):220-3.
196. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(1):51-9.
197. Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A, Broccoli V. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*. 2011;476(7359):224-7.
198. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):101-6.
199. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008;322(5903):945-9.
200. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(34):14234-9.
201. Hartung S, Schwanke K, Haase A, David R, Franz WM, Martin U, Zweigerdt R. Directing cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells by plasmid-based transient overexpression of cardiac transcription factors. *Stem Cells Dev*. 2013;22(7):1112-25.
202. Doweck SN, Huang X, Chou BK, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc*. 2012;7(11):2013-21.
203. Yoshioka N, Gros E, Li HR, Kumar S, Deacon DC, Maron C, Muotri AR, Chi NC, Fu XD, Yu BD, Dowdy SF. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell*. 2013;13(2):246-54.
204. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*. 2010;7(3):197-9.
205. Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, Kim Y, Kang HJ, Park YB, Kim HS. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*. 2010;116(3):386-95.
206. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651-4.
207. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5856-61.
208. Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hockemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15921-6.
209. Han F, Wang W, Chen B, Chen C, Li S, Lu X, Duan J, Zhang Y, Zhang YA, Guo W, Li G. Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cytotherapy*. 2015;17(5):665-79.

Literaturverzeichnis

210. Sundberg M, Bogetofte H, Lawson T, Jansson J, Smith G, Astradsson A, Moore M, Osborn T, Cooper O, Spealman R, Hallett P, Isacson O. Improved cell therapy protocols for Parkinson's disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, hiPSC-, and non-human primate iPSC-derived dopaminergic neurons. *Stem Cells*. 2013;31(8):1548-62.
211. Hallett PJ, Deleidi M, Astradsson A, Smith GA, Cooper O, Osborn TM, Sundberg M, Moore MA, Perez-Torres E, Brownell AL, Schumacher JM, Spealman RD, Isacson O. Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):269-74.
212. Kwon YW, Chung YJ, Kim J, Lee HJ, Park J, Roh TY, Cho HJ, Yoon CH, Koo BK, Kim HS. Comparative study of efficacy of dopaminergic neuron differentiation between embryonic stem cell and protein-based induced pluripotent stem cell. *PLoS One*. 2014;9(1):e85736.
213. Rhee YH, Ko JY, Chang MY, Yi SH, Kim D, Kim CH, Shim JW, Jo AY, Kim BW, Lee H, Lee SH, Suh W, Park CH, Koh HC, Lee YS, Lanza R, Kim KS. Protein-based human iPSC cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2326-35.
214. Ji J, Ng SH, Sharma V, Neculai D, Hussein S, Sam M, Trinh Q, Church GM, McPherson JD, Nagy A, Batada NN. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(3):435-40.
215. Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, DeVine A, Ettenger A, Fitzgerald K, Godfrey M, Gupta D, McPherson J, Malwadkar P, Gupta M, Bell B, Doi A, Jung N, Li X, Lynes MS, Brookes E, Cherry AB, Demirbas D, Tsankov AM, Zon LI, Rubin LL, Feinberg AP, Meissner A, Cowan CA, Daley GQ. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):58-63.
216. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*. 2014;2(3):337-50.
217. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Miyamoto S, Takahashi J. Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(4):395-412.
218. Swistowski A, Peng J, Liu Q, Mali P, Rao MS, Cheng L, Zeng X. Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells*. 2010;28(10):1893-904.
219. Fedele S, Collo G, Behr K, Bischofberger J, Muller S, Kunath T, Christensen K, Gundner AL, Graf M, Jagasia R, Taylor V. Expansion of human midbrain floor plate progenitors from induced pluripotent stem cells increases dopaminergic neuron differentiation potential. *Sci Rep*. 2017;7(1):6036.
220. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):3369.
221. Takahashi J. iPSC cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen Ther*. 2020;13:18-22.
222. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
223. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-27.

Literaturverzeichnis

224. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24(1):115-24.
225. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(5):369-78.
226. Kim S, Honmou O, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res*. 2006;1123(1):27-33.
227. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
228. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
229. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 19):4411-22.
230. Zhang Z, Wang X, Wang S. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with Parkinson's disease. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2008;44(5-6):169-77.
231. Datta I, Mishra S, Mohanty L, Pulikkot S, Joshi PG. Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011;13(8):918-32.
232. Aliaghaei A, Gardaneh M, Maghsoudi N, Salehinejad P, Gharib E. Dopaminergic Induction of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells by Conditioned Medium of Choroid Plexus Epithelial Cells Reduces Apomorphine-Induced Rotation in Parkinsonian Rats. *Arch Iran Med*. 2016;19(8):561-70.
233. Boroujeni ME, Gardaneh M. Umbilical cord: an unlimited source of cells differentiable towards dopaminergic neurons. *Neural Regen Res*. 2017;12(7):1186-92.
234. Delcroix GJ, Garbayo E, Sindji L, Thomas O, Vanpouille-Box C, Schiller PC, Montero-Menei CN. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemi-parkinsonian rats. *Biomaterials*. 2011;32(6):1560-73.
235. Bouchez G, Sensebe L, Voure'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, Guilloteau D, Charbord P, Besnard JC, Chalon S. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 2008;52(7):1332-42.
236. Ye M, Wang XJ, Zhang YH, Lu GQ, Liang L, Xu JY, Sheng-Di C. Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13(1):44-9.
237. Offen D, Barhum Y, Levy YS, Burshtein A, Panet H, Cherlow T, Melamed E. Intrastratial transplantation of mouse bone marrow-derived stem cells improves motor behavior in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2007(72):133-43.
238. Blandini F, Cova L, Armentero MT, Zennaro E, Levandis G, Bossolasco P, Calzarossa C, Mellone M, Giuseppe B, Delilieri GL, Polli E, Nappi G, Silani V. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant*. 2010;19(2):203-17.

Literaturverzeichnis

239. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol*. 2006;198(1):54-64.
240. Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(4):489-97.
241. Chen BY, Wang X, Chen LW, Luo ZJ. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. *Curr Drug Targets*. 2012;13(4):561-71.
242. Robinson AP, Foraker JE, Ylostalo J, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow enhance glial differentiation of rat neural stem cells: a role for transforming growth factor beta and Notch signaling. *Stem Cells Dev*. 2011;20(2):289-300.
243. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res*. 2007;32(2):353-62.
244. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171-6.
245. Shen Y, Huang J, Liu L, Xu X, Han C, Zhang G, Jiang H, Li J, Lin Z, Xiong N, Wang T. A Compendium of Preparation and Application of Stem Cells in Parkinson's Disease: Current Status and Future Prospects. *Front Aging Neurosci*. 2016;8:117.
246. Parish CL, Castelo-Branco G, Rawal N, Tonnesen J, Sorensen AT, Salto C, Kokaia M, Lindvall O, Arenas E. Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest*. 2008;118(1):149-60.
247. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells*. 2005;23(5):681-8.
248. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres. *Exp Cell Res*. 2004;294(1):9-17.
249. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Storch A, Sabolek M. Adult cerebrospinal fluid inhibits neurogenesis but facilitates gliogenesis from fetal rat neural stem cells. *J Neurosci Res*. 2009;87(14):3054-66.
250. Hermann A, Gerlach M, Schwarz J, Storch A. Neurorestoration in Parkinson's disease by cell replacement and endogenous regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(2):131-43.
251. Muotri AR, Gage FH. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*. 2006;441(7097):1087-93.
252. Milosevic J, Maisel M, Wegner F, Leuchtenberger J, Wenger RH, Gerlach M, Storch A, Schwarz J. Lack of hypoxia-inducible factor-1 alpha impairs midbrain neural precursor cells involving vascular endothelial growth factor signaling. *J Neurosci*. 2007;27(2):412-21.
253. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*. 2005;20(2):665-71.
254. Milosevic J, Schwarz SC, Krohn K, Poppe M, Storch A, Schwarz J. Low atmospheric oxygen avoids maturation, senescence and cell death of murine mesencephalic neural precursors. *J Neurochem*. 2005;92(4):718-29.
255. Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RD. In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res*. 2001;65(4):284-8.

Literaturverzeichnis

256. Liste I, Garcia-Garcia E, Martinez-Serrano A. The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2004;24(48):10786-95.
257. Liste I, Garcia-Garcia E, Bueno C, Martinez-Serrano A. Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(11):1880-92.
258. Yang M, Donaldson AE, Marshall CE, Shen J, Iacovitti L. Studies on the differentiation of dopaminergic traits in human neural progenitor cells in vitro and in vivo. *Cell Transplant*. 2004;13(5):535-47.
259. Christophersen NS, Meijer X, Jorgensen JR, Englund U, Gronborg M, Seiger A, Brundin P, Wahlberg LU. Induction of dopaminergic neurons from growth factor expanded neural stem/progenitor cell cultures derived from human first trimester forebrain. *Brain Res Bull*. 2006;70(4-6):457-66.
260. Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H. Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci*. 2001;21(11):3895-903.
261. Park CH, Kang JS, Shin YH, Chang MY, Chung S, Koh HC, Zhu MH, Oh SB, Lee YS, Panagiotakos G, Tabar V, Studer L, Lee SH. Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons. *FASEB J*. 2006;20(14):2553-5.
262. Garcia-Parra P, Maroto M, Cavaliere F, Naldaiz-Gastesi N, Alava JI, Garcia AG, Lopez de Munain A, Izeta A. A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells. *BMC Neurosci*. 2013;14:48.
263. Tan KK, Tann JY, Sathe SR, Goh SH, Ma D, Goh EL, Yim EK. Enhanced differentiation of neural progenitor cells into neurons of the mesencephalic dopaminergic subtype on topographical patterns. *Biomaterials*. 2015;43:32-43.
264. Timmer M, Grosskreutz J, Schlesinger F, Krampfl K, Wesemann M, Just L, Bufler J, Grothe C. Dopaminergic properties and function after grafting of attached neural precursor cultures. *Neurobiol Dis*. 2006;21(3):587-606.
265. Redmond DE, Jr., Bjugstad KB, Teng YD, Ourednik V, Ourednik J, Wakeman DR, Parsons XH, Gonzalez R, Blanchard BC, Kim SU, Gu Z, Lipton SA, Markakis EA, Roth RH, Elsworth JD, Sladek JR, Jr., Sidman RL, Snyder EY. Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12175-80.
266. O'Keefe FE, Scott SA, Tyers P, O'Keefe GW, Dalley JW, Zufferey R, Caldwell MA. Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. *Brain*. 2008;131(Pt 3):630-41.
267. Wakeman DR, Redmond DE, Jr., Dodiya HB, Sladek JR, Jr., Leranath C, Teng YD, Samulski RJ, Snyder EY. Human neural stem cells survive long term in the midbrain of dopamine-depleted monkeys after GDNF overexpression and project neurites toward an appropriate target. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(6):692-701.
268. Harrower TP, Tyers P, Hooks Y, Barker RA. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2006;197(1):56-69.
269. Levesque M. F. NT, Rezak M. . Therapeutic microinjection of autologous adult human neural stem cells and differentiated neurons for Parkinson's Disease: five year post-operative outcome. . *Open Stem Cell J* 2009;1 20–29. 10.2174/1876893800901010020.
270. Jang SE, Qiu L, Chan LL, Tan EK, Zeng L. Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Front Neurosci*. 2020;14:558532.

Literaturverzeichnis

271. Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ, Zaehres H, Wu G, Frank S, Moritz S, Greber B, Yang JH, Lee HT, Schwamborn JC, Storch A, Scholer HR. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):465-72.
272. Han YC, Lim Y, Duffield MD, Li H, Liu J, Abdul Manaph NP, Yang M, Keating DJ, Zhou XF. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Neural Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4304916.
273. Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2527-32.
274. Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, Walker D, Zhang WR, Kreitzer AC, Huang Y. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):100-9.
275. Choi DH, Kim JH, Kim SM, Kang K, Han DW, Lee J. Therapeutic Potential of Induced Neural Stem Cells for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).
276. Westerlund U, Svensson M, Moe MC, Varghese M, Gustavsson B, Wallstedt L, Berg-Johnsen J, Langmoen IA. Endoscopically harvested stem cells: a putative method in future autotransplantation. *Neurosurgery*. 2005;57(4):779-84; discussion -84.
277. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264(5162):1145-8.
278. Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol*. 1999;46(6):867-77.
279. Meissner KK, Kirkham DL, Doering LC. Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson's. *Brain Res*. 2005;1057(1-2):105-12.
280. Richardson RM, Broaddus WC, Holloway KL, Fillmore HL. Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Res*. 2005;1032(1-2):11-22.
281. Seidenfaden R, Desoeuvre A, Bosio A, Virard I, Cremer H. Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol Cell Neurosci*. 2006;32(1-2):187-98.
282. Chen K, Hughes SM, Connor B. Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant*. 2007;16(8):799-810.
283. Zhang RL, Zhang L, Zhang ZG, Morris D, Jiang Q, Wang L, Zhang LJ, Chopp M. Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neuroscience*. 2003;116(2):373-82.
284. Kriks S, Studer L. Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons. *Adv Exp Med Biol*. 2009;651:101-11.
285. Boyer LF, Campbell B, Larkin S, Mu Y, Gage FH. Dopaminergic differentiation of human pluripotent cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2012;Chapter 1:Unit1H 6.
286. Deleidi M, Cooper O, Hargus G, Levy A, Isacson O. Oct4-induced reprogramming is required for adult brain neural stem cell differentiation into midbrain dopaminergic neurons. *PLoS One*. 2011;6(5):e19926.
287. Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 2001;19(4):271-8.
288. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrlich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009;136(3):411-9.

Literaturverzeichnis

289. Shim JW, Park CH, Bae YC, Bae JY, Chung S, Chang MY, Koh HC, Lee HS, Hwang SJ, Lee KH, Lee YS, Choi CY, Lee SH. Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr1 overexpression. *Stem Cells*. 2007;25(5):1252-62.
290. Popken GJ, Dechert-Zeger M, Ye P, D'Ercole AJ. Brain development. *Adv Exp Med Biol*. 2005;567:187-220.
291. Zhang J, Moats-Staats BM, Ye P, D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor system genes during the early postnatal neurogenesis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*. 2007;85(8):1618-27.
292. Baron-Van Evercooren A, Olichon-Berthe C, Kowalski A, Visciano G, Van Obberghen E. Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci Res*. 1991;28(2):244-53.
293. Le Roith D, Parrizas M, Blakesley VA. The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging process. *Endocrine*. 1997;7(1):103-5.
294. Moosavi M, Maghsoudi N, Zahedi-Asl S, Naghdi N, Yousefpour M, Trounce IA. The role of PI3/Akt pathway in the protective effect of insulin against corticosterone cell death induction in hippocampal cell culture. *Neuroendocrinology*. 2008;88(4):293-8.
295. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39684-95.
296. Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, de Pablo F, Zardoya R. Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Mol Biol Evol*. 2008;25(6):1043-53.
297. Kim JG, Kang MJ, Yoon YK, Kim HP, Park J, Song SH, Han SW, Park JW, Kang GH, Kang KW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Yi EC, Kim TY. Heterodimerization of glycosylated insulin-like growth factor-1 receptors and insulin receptors in cancer cells sensitive to anti-IGF1R antibody. *PLoS One*. 2012;7(3):e33322.
298. Chiu SL, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev*. 2010;5:7.
299. Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harvey RP, Bartlett PF. Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(6):2199-203.
300. Kalluri HS, Vemuganti R, Dempsey RJ. Mechanism of insulin-like growth factor I-mediated proliferation of adult neural progenitor cells: role of Akt. *Eur J Neurosci*. 2007;25(4):1041-8.
301. Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Tachibana K, Sakurada K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett*. 2010;470(2):115-20.
302. McGinley LM, Sims E, Lunn JS, Kashlan ON, Chen KS, Bruno ES, Pacut CM, Hazel T, Johe K, Sakowski SA, Feldman EL. Human Cortical Neural Stem Cells Expressing Insulin-Like Growth Factor-I: A Novel Cellular Therapy for Alzheimer's Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):379-91.
303. Lunn JS, Sakowski SA, McGinley LM, Pacut C, Hazel TG, Johe K, Feldman EL. Autocrine production of IGF-I increases stem cell-mediated neuroprotection. *Stem Cells*. 2015;33(5):1480-9.
304. van Golen CM, Castle VP, Feldman EL. IGF-I receptor activation and BCL-2 overexpression prevent early apoptotic events in human neuroblastoma. *Cell Death Differ*. 2000;7(7):654-65.

Literaturverzeichnis

305. Mairet-Coello G, Tury A, DiCicco-Bloom E. Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J Neurosci.* 2009;29(3):775-88.
306. Bondy C, Werner H, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience.* 1992;46(4):909-23.
307. Bondy CA, Lee WH. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:33-43.
308. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev.* 2005;26(7):916-43.
309. Yuan H, Chen R, Wu L, Chen Q, Hu A, Zhang T, Wang Z, Zhu X. The Regulatory Mechanism of Neurogenesis by IGF-1 in Adult Mice. *Mol Neurobiol.* 2014.
310. Glasper ER, Llorens-Martin MV, Leuner B, Gould E, Trejo JL. Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus.* 2010;20(6):706-12.
311. Ye P, Umayahara Y, Ritter D, Bunting T, Auman H, Rotwein P, D'Ercole AJ. Regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in brain of transgenic mice expressing an IGF-I-luciferase fusion gene. *Endocrinology.* 1997;138(12):5466-75.
312. Bartlett WP, Li XS, Williams M. Expression of IGF-1 mRNA in the murine subventricular zone during postnatal development. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;12(4):285-91.
313. Bartlett WP, Li XS, Williams M, Benkovic S. Localization of insulin-like growth factor-1 mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol.* 1991;147(1):239-50.
314. Bondy CA, Cheng CM. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):25-31.
315. Nishijima T, Piriz J, Dufлот S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nunez A, Torres-Aleman I. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron.* 2010;67(5):834-46.
316. D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides.* 2002;36(2-3):209-20.
317. Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology.* 1990;127(3):1033-40.
318. Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron.* 1993;10(4):729-40.
319. Mathews LS, Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD. Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology.* 1988;123(1):433-7.
320. Gutierrez-Ospina G, Saum L, Calikoglu AS, Diaz-Cintra S, Barrios FA, D'Ercole AJ. Increased neural activity in transgenic mice with brain IGF-I overexpression: a [3H]2DG study. *Neuroreport.* 1997;8(13):2907-11.
321. Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology.* 1996;137(12):5484-92.

Literaturverzeichnis

322. Mason JL, Ye P, Suzuki K, D'Ercole AJ, Matsushima GK. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci*. 2000;20(15):5703-8.
323. Ye P, Carson J, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I influences the initiation of myelination: studies of the anterior commissure of transgenic mice. *Neurosci Lett*. 1995;201(3):235-8.
324. Popken GJ, Hodge RD, Ye P, Zhang J, Ng W, O'Kusky JR, D'Ercole AJ. In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004;19(8):2056-68.
325. Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci*. 2001;21(5):1481-9.
326. Dentremont KD, Ye P, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. Increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression during early postnatal development differentially increases neuron number and growth in medullary nuclei of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999;114(1):135-41.
327. O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. Increased expression of insulin-like growth factor I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus. *J Comp Neurol*. 2003;464(3):382-91.
328. Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996;95(1):44-54.
329. Zhang J, Popken GJ, Ye P, D'Ercole AJ. Down-regulation of 14-3-3 eta gene expression by IGF-I in mouse cerebellum during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;143(2):199-206.
330. Sun LY, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I stimulates histone H3 and H4 acetylation in the brain in vivo. *Endocrinology*. 2006;147(11):5480-90.
331. Ye P, Popken GJ, Kemper A, McCarthy K, Popko B, D'Ercole AJ. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-I promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression. *J Neurosci Res*. 2004;78(4):472-84.
332. Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. Increased expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) during embryonic development produces neocortical overgrowth with differentially greater effects on specific cytoarchitectonic areas and cortical layers. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;154(2):227-37.
333. Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(4):233-41.
334. Carlson SW, Madathil SK, Sama DM, Gao X, Chen J, Saatman KE. Conditional overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances hippocampal neurogenesis and restores immature neuron dendritic processes after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(8):734-46.
335. Ye P, Li L, Richards RG, DiAugustine RP, D'Ercole AJ. Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci*. 2002;22(14):6041-51.
336. Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F. *Igf1* gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron*. 1995;14(4):717-30.
337. Cheng CM, Mervis RF, Niu SL, Salem N, Jr., Witters LA, Tseng V, Reinhardt R, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J Neurosci Res*. 2003;73(1):1-9.
338. Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG, Varela-Nieto I. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal *Igf-1*-deficient mice. *J Neurosci*. 2001;21(19):7630-41.

Literaturverzeichnis

339. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993;75(1):59-72.
340. Holzenberger M, Hamard G, Zaoui R, Leneuve P, Ducos B, Beccavin C, Perin L, Le Bouc Y. Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Endocrinology*. 2001;142(10):4469-78.
341. Liu W, D'Ercole JA, Ye P. Blunting type 1 insulin-like growth factor receptor expression exacerbates neuronal apoptosis following hypoxic/ischemic injury. *BMC Neurosci*. 2011;12:64.
342. Liu W, Ye P, O'Kusky JR, D'Ercole AJ. Type 1 insulin-like growth factor receptor signaling is essential for the development of the hippocampal formation and dentate gyrus. *J Neurosci Res*. 2009;87(13):2821-32.
343. Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Perin L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J, Le Bouc Y, Holzenberger M. Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol*. 2008;6(10):e254.
344. Zeger M, Popken G, Zhang J, Xuan S, Lu QR, Schwab MH, Nave KA, Rowitch D, D'Ercole AJ, Ye P. Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*. 2007;55(4):400-11.
345. Divall SA, Williams TR, Carver SE, Koch L, Bruning JC, Kahn CR, Wondisford F, Radovick S, Wolfe A. Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2900-9.
346. Holzenberger M, Leneuve P, Hamard G, Ducos B, Perin L, Binoux M, Le Bouc Y. A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology*. 2000;141(7):2557-66.
347. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1363-7.
348. Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG. An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1---qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet*. 1991;38(1):74-9.
349. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA, van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, de Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2855-64.
350. Walenkamp MJ, Losekoot M, Wit JM. Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. *Endocr Dev*. 2013;24:128-37.
351. van Duyvenvoorde HA, van Setten PA, Walenkamp MJ, van Doorn J, Koenig J, Gauguin L, Oostdijk W, Ruivenkamp CA, Losekoot M, Wade JD, De Meyts P, Karperien M, Noordam C, Wit JM. Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):E363-7.
352. Burkhardt S, Gesing J, Kapellen TM, Kovacs P, Kratzsch J, Schlicke M, Stobbe H, Tonjes A, Klammt J, Pfaffle R. Novel heterozygous IGF1R mutation in two brothers with developing impaired glucose tolerance. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(1-2):217-25.
353. Witsch J, Szafranski P, Chen CA, Immken L, Simpson Patel G, Hixson P, Cheung SW, Stankiewicz P, Schaaf CP. Intragenic deletions of the IGF1 receptor gene in five individuals with psychiatric phenotypes and developmental delay. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(11):1304-7.
354. Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, Kratzsch J, Korner A, Odeh R, Kiess W, Pfaffle R. Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-

Literaturverzeichnis

- like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1137-42.
355. Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Kruijs T, Kratzsch J, Schmidt G, Schlicke M, Muller E, van de Leur HS, Kiess W, Pfaffle R. A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2316-24.
356. Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ. Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor I. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990;52(1-2):253-7.
357. Russell JW, Windebank AJ, Schenone A, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Neurobiol.* 1998;36(4):455-67.
358. Vicario-Abejon C, Yusta-Boyo MJ, Fernandez-Moreno C, de Pablo F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci.* 2003;23(3):895-906.
359. Lin X, Bulleit RF. Insulin-like growth factor I (IGF-I) is a critical trophic factor for developing cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;99(2):234-42.
360. Nitta A, Zheng WH, Quirion R. Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death induced by corticosterone through activation of the PI3k/Akt pathway. *J Neurosci Res.* 2004;76(1):98-103.
361. Engele J. Changing responsiveness of developing midbrain dopaminergic neurons for extracellular growth factors. *J Neurosci Res.* 1998;51(4):508-16.
362. Kummer JL, Zawada WM, Freed CR, Chernauek SD, Heidenreich KA. Insulin-like growth factor binding proteins in fetal rat mesencephalic cultures: regulation by fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1996;137(8):3551-6.
363. Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Sonntag WE, Riddle DR. Adult-onset deficiency in growth hormone and insulin-like growth factor-I decreases survival of dentate granule neurons: insights into the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci Res.* 2006;83(2):199-210.
364. Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 2004;164(1):111-22.
365. Kalluri HS, Dempsey RJ. IGFBP-3 inhibits the proliferation of neural progenitor cells. *Neurochem Res.* 2011;36(3):406-11.
366. Choi KC, Yoo DS, Cho KS, Huh PW, Kim DS, Park CK. Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells. *J Korean Neurosurg Soc.* 2008;44(6):375-81.
367. Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res.* 2000;59(3):332-41.
368. Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K. Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci.* 2005;25(11):2838-52.
369. Delcourt N, Thouvenot E, Chanrion B, Galeotti N, Jouin P, Bockaert J, Marin P. PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J.* 2007;26(6):1542-51.
370. Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res.* 1990;27(4 Pt 1):317-26.
371. Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A. Co-ordinated and cellular specific induction of the

Literaturverzeichnis

- components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;59(2):119-34.
372. Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtjarn M, Leverin AL, Wang X, Blomgren K, Isgaard J, Hagberg H. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *Eur J Neurosci.* 2005;21(6):1489-502.
373. Costain WJ, Rasquinha I, Sandhu JK, Rippstein P, Zurakowski B, Slinn J, MacManus JP, Stanimirovic DB. Cerebral ischemia causes dysregulation of synaptic adhesion in mouse synaptosomes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(1):99-110.
374. Lee WH, Wang GM, Seaman LB, Vannucci SJ. Coordinate IGF-I and IGFBP5 gene expression in perinatal rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(2):227-36.
375. Lee WH, Clemens JA, Bondy CA. Insulin-like growth factors in the response to cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci.* 1992;3(1):36-43.
376. Mastroiacovo F, Busceti CL, Biagioni F, Moyanova SG, Meisler MH, Battaglia G, Caricasole A, Bruno V, Nicoletti F. Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(2):264-76.
377. Clawson TF, Vannucci SJ, Wang GM, Seaman LB, Yang XL, Lee WH. Hypoxia-ischemia-induced apoptotic cell death correlates with IGF-I mRNA decrease in neonatal rat brain. *Biol Signals Recept.* 1999;8(4-5):281-93.
378. O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL. IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia.* 2002;39(1):85-97.
379. Cao Y, Gunn AJ, Bennet L, Wu D, George S, Gluckman PD, Shao XM, Guan J. Insulin-like growth factor (IGF)-1 suppresses oligodendrocyte caspase-3 activation and increases glial proliferation after ischemia in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(6):739-47.
380. Guan J, Miller OT, Waugh KM, McCarthy DC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor-1 improves somatosensory function and reduces the extent of cortical infarction and ongoing neuronal loss after hypoxia-ischemia in rats. *Neuroscience.* 2001;105(2):299-306.
381. Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG, Mitchell HJ, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res.* 2005;1063(1):15-26.
382. Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Tureyen K, Vemuganti R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem.* 2003;87(3):586-97.
383. Zhong J, Zhao L, Du Y, Wei G, Yao WG, Lee WH. Delayed IGF-1 treatment reduced long-term hypoxia-ischemia-induced brain damage and improved behavior recovery of immature rats. *Neurol Res.* 2009;31(5):483-9.
384. Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* 2009;217(2):361-70.
385. Hatton J, Rapp RP, Kudsk KA, Brown RO, Luer MS, Bukar JG, Chen SA, McClain CJ, Gesundheit N, Dempsey RJ, Young B. Intravenous insulin-like growth factor-I (IGF-I) in moderate-to-severe head injury: a Phase II safety and efficacy trial. *Neurosurg Focus.* 1997;2(5):ECP1; discussion p following ECP.
386. Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, Bartus RT. Safety and tolerability of intraputaminally delivered CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 2008;7(5):400-8.

Literaturverzeichnis

387. Marks WJ, Jr., Baumann TL, Bartus RT. Long-Term Safety of Patients with Parkinson's Disease Receiving rAAV2-Neurturin (CERE-120) Gene Transfer. *Hum Gene Ther.* 2016;27(7):522-7.
388. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003;9(5):589-95.
389. Slevin JT, Gash DM, Smith CD, Gerhardt GA, Kryscio R, Chebrolu H, Walton A, Wagner R, Young AB. Unilateral intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal. *J Neurosurg.* 2007;106(4):614-20.
390. Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, Bakay R, Watts R, Guthrie B, Jankovic J, Simpson R, Tagliati M, Alterman R, Stern M, Baltuch G, Starr PA, Larson PS, Ostrem JL, Nutt J, Kieburtz K, Kordower JH, Olanow CW. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 2010;9(12):1164-72.
391. Barker RA. Continuing trials of GDNF in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(4):285-6.
392. Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2006;59(3):459-66.
393. Taylor H, Barua N, Bienemann A, Wyatt M, Castrique E, Foster R, Luz M, Fibiger C, Mohr E, Gill S. Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum. *PLoS One.* 2013;8(3):e56186.
394. Aly AE, Waszczak BL. Intranasal gene delivery for treating Parkinson's disease: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(12):1923-41.
395. Migliore MM, Ortiz R, Dye S, Campbell RB, Amiji MM, Waszczak BL. Neurotrophic and neuroprotective efficacy of intranasal GDNF in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2014;274:11-23.
396. Fan CH, Ting CY, Lin CY, Chan HL, Chang YC, Chen YY, Liu HL, Yeh CK. Noninvasive, Targeted, and Non-Viral Ultrasound-Mediated GDNF-Plasmid Delivery for Treatment of Parkinson's Disease. *Sci Rep.* 2016;6:19579.
397. Lu-Nguyen NB, Broadstock M, Yanez-Munoz RJ. Efficient Expression of Igf-1 from Lentiviral Vectors Protects In Vitro but Does Not Mediate Behavioral Recovery of a Parkinsonian Lesion in Rats. *Hum Gene Ther.* 2015;26(11):719-33.
398. Costales J, Kolevzon A. The therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in central nervous system disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016.
399. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
400. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2002;115(1):97-105.
401. Mandyam CD, Harburg GC, Eisch AJ. Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience.* 2007;146(1):108-22.
402. DiCicco-Bloom E, Black IB. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(11):4066-70.

Literaturverzeichnis

403. Brunn J, Wiroth V, Kowalski M, Runge U, Sabolek M. Valproic acid in normal therapeutic concentration has no neuroprotective or differentiation influencing effects on long term expanded murine neural stem cells. *Epilepsy Res.* 2014;108(4):623-33.
404. Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, Schroeder H, Hermann A, Kirsch M, Storch A, Sabolek M. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC Neurosci.* 2010;11:48.
405. Arenas E. Engineering a dopaminergic phenotype in stem/precursor cells: role of Nurr1, glia-derived signals, and Wnts. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1049:51-66.
406. Arenas E. Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease. *J Mol Cell Biol.* 2014;6(1):42-53.
407. Kim C, Park S. IGF-1 protects SH-SY5Y cells against MPP(+)-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway. *Endocr Connect.* 2018;7(3):443-55.
408. Roberts CT, Jr., Leroith D. Molecular aspects of insulin-like growth factors, their binding proteins and receptors. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1988;2(4):1069-85.
409. LeRoith D, Werner H, Faria TN, Kato H, Adamo M, Roberts CT, Jr. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:22-32.
410. Frade JM, Marti E, Bovolenta P, Rodriguez-Pena MA, Perez-Garcia D, Rohrer H, Edgar D, Rodriguez-Tebar A. Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Development.* 1996;122(8):2497-506.
411. Aberg ND, Johansson UE, Aberg MA, Hellstrom NA, Lind J, Bull C, Isgaard J, Anderson MF, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of insulin-like growth factor-I increases the number of newborn oligodendrocytes in the cerebral cortex of adult hypophysectomized rats. *Endocrinology.* 2007;148(8):3765-72.
412. Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000;20(8):2896-903.
413. O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci.* 2000;20(22):8435-42.
414. O'Kusky J, Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33(3):230-51.
415. Shi B, Ding J, Liu Y, Zhuang X, Chen X, Fu C. ERK1/2 pathway-mediated differentiation of IGF-1-transfected spinal cord-derived neural stem cells into oligodendrocytes. *PLoS One.* 2014;9(8):e106038.
416. Ayadi AE, Zigmond MJ, Smith AD. IGF-1 protects dopamine neurons against oxidative stress: association with changes in phosphokinases. *Exp Brain Res.* 2016;234(7):1863-73.
417. Wilkins A, Chandran S, Compston A. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia.* 2001;36(1):48-57.
418. Zhu M, Feng Y, Dangelmajer S, Guerrero-Cazares H, Chaichana KL, Smith CL, Levchenko A, Lei T, Quinones-Hinojosa A. Human cerebrospinal fluid regulates proliferation and migration of stem cells through insulin-like growth factor-1. *Stem Cells Dev.* 2015;24(2):160-71.

Erklärung über Gemeinschaftsarbeit

Es wird darauf hingewiesen, dass die ELISA-Experimente zwischen 2009 und 2010 in Gemeinschaftsarbeit durchgeführt und ausgewertet wurden. Dies geschah im Rahmen der Arbeitsgruppe für Bewegungsstörungen der Klinik für Neurologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald. Federführend beteiligt war Frau Dr. Judith Brunn (geb. Buddensiek).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät oder wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Weinstadt, den 02.11.2021

Publikation

Effects of IGF-1 on differentiation and expansion of long term expanded fetal murine neural stem cells (DPG-Kongress 2011)

J. Buddensiek, T. Ehle, A. Hermann, A. Storch, M. Sabolek (Greifswald, Dresden, Schwendi)

Abstract/Basal Ganglia 1 (2011) 13-45

Danksagung

Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich herzlichst allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während des Entstehungsprozesses unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und damaligen Laborleiter Herrn Priv. Doz. Dr. med. Michael Sabolek für die Fragestellung zur vorliegenden Arbeit, seine Geduld und die stetige Ermutigung während der letzten Jahre, die Arbeit weiter voranzutreiben.

Außerdem danke ich meinem Doktorvater Prof. em. Dr. med. Dr. h.c. Christof Kessler und seiner Nachfolgerin Frau Univ.-Prof. Dr. med. Agnes Flöel, Direktorin der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Greifswald, für die wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der zurückliegenden Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Bewegungsstörungen, allen voran Frau Dr. Judith Brunn (geb. Buddensiek) für die stets konstruktive Kritik, sowie bei Sigrid Peters und Stephanie Hübner, die mich während der Laborarbeit mit Rat und Tat unterstützten.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, deren persönliche und seelische Unterstützung von unschätzbarem Wert für den Erfolg der Arbeit waren.