

Robert Enrico Feldmann
Dr. sc. hum.

Differenzielle Proteomanalyse neuronaler Stammzellen aus dem adulten Gehirn

Geboren am. 28.09.1970 in Ruit a.d.F.
Diplom der Fachrichtung Physik am 13.07.1997 an der Universität Mainz

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Kuschinsky

Seit wenigen Jahren ist bekannt, daß in bestimmten Arealen des *adulten* Säugerhirns auch bis ins hohe Alter hinein Populationen multipotenter neuronaler Stammzellen ansässig sind. Die Stammzellen sind dabei hauptsächlich in drei spontan neurogenen Zonen, im hippocampalen Gyrus dentatus, Bulbus olfaktorius und der subventrikulären Zone (SVZ) lokalisiert. Adulte neuronale Stammzellen haben folgende Eigenschaften: 1.) Sie besitzen die Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung durch Mitose, 2.) sie sind nicht terminal differenziert, 3.) sie sind Nestin immunpositiv und 4.) sie können unter dem Einfluß geeigneter Signale zu Gehirnzellen unterschiedlichen Phänotyps differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden adulte neuronale Stammzellen von Ratten in-vitro kultiviert und das cytosolische Proteom anhand von umfassenden Protein-Expressionsstudien mit Hilfe der Schlüsseltechnologien der Proteomik (2D-Gelelektrophorese und Peptide-Mass-Fingerprinting per Massenspektrometrie) funktionell analysiert. Die Arbeit hatte folgende Ziele: **(A)** Kartierung und Inventarisierung des Proteoms der Stammzellen des Hippocampus, **(B)** Durchführung eines differenziellen Protein-Screenings derselben Stammzellen nach einer durch Veränderung des Inkubationsmediums induzierten Differenzierung, und **(C)** Beginn eines differenziellen Screenings durch Vergleich des Proteoms der Stammzellen der SVZ mit denen des Bulbus olfaktorius, zur Vorbereitung weiterer Vergleichsstudien zwischen undifferenzierten Zellen der drei Ursprungsorte.

(A): Das erstellte cytosolische Proteominventar der *hippocampalen* Stammzellen umfaßt 2066 kartierte Proteinspots, von denen 266 Spots (13 %) identifiziert werden konnten, die 108 verschiedenen Proteinen entsprechen, sowie vier expressed sequence tags (EST) beinhalten. Die identifizierten Proteine haben bekannte Funktionen u.a. in den Bereichen Transkription, Signaltransduktion, Metabolismus, Proteinfaltung, Cytoskelett, Zellzyklus, Detoxifikation, Proteindegradierung und im Metabolismus von Neurotransmittern. Dieses Inventar wurde als initiale und erweiterbare Proteom-Referenzdatenbank per „open access“ publiziert, und steht damit im Hinblick auf zukünftige Ergänzungen zur allgemeinen Verfügung im Internet (Proteome Science 2003, 1:4 (12 June 2003), <http://www.proteomesci.com/home/>). **(B):** Die erfolgreiche experimentelle *Induktion einer Differenzierung* dieser Zellen ließ sich anhand der Entstehung von Neurofilament- bzw. β -III-

Tubulin-immunpositiven Neuronen und GFAP-immunpositiven Astrozyten nachweisen. Im differenziellen Vergleich der differenzierten mit der undifferenzierten Zellgruppe waren in den undifferenzierten Zellen u.a. Proteine des MAPK-Signalwegs höher exprimiert. Eine erhöhte Expression nach Differenzierung wurde bei Proteinen der Proteinbiosynthese und nachgeschalteter Prozesse der Proteinfaltung gefunden, welche mit einer Abnahme von Proteinen der Proteindegradierung einherging. Darüber hinaus wurde ein umfangreiches Rearrangement vor allem der Aktin-basierten Anteile des Cytoskeletts nach Differenzierung gefunden. Ein möglicher Zusammenhang dieses Differenzierungsprozesses mit dem Wnt-Signalweg wurde nach pharmakologisch induzierter Inhibition dieses Weges anhand eines Protein-Assays aufgezeigt. Die differenzielle Proteomanalyse ergab zudem Hinweise auf eine mögliche cholinerge, glutamaterge und GABAerge Phänotypisierung der terminalen Zellen während der Differenzierung. Des Weiteren zeigten die Daten in den neuronalen Stammzellen die differenzielle Expression des bisher nicht im Gehirn oder Nervengewebe beschriebenen Proteins SP22 auf, und belegten die intrazelluläre Existenz von Albumin und beider Ketten des Hämoglobins (α und β). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß die morphologischen Veränderungen, welche die neuronalen Stammzellen bei der Differenzierung aufweisen, mit spezifischen und umfangreichen Änderungen ihres molekularen Profils der Proteinexpression einhergehen. (C): Die Ergebnisse des differenziellen Screenings zum Vergleich der Stammzellen der SVZ mit denen des Bulbus olfaktorius zeigten in der SVZ eine erhöhte Aktivität bzw. Modulation des mitogenen Rezeptortyrosinkinase-Signalwegs, wohingegen in den bulbären Zellen eher G-Protein-vermittelte Wege der Signaltransduktion vorherrschten. Erstmals konnten wir auch das in den Stammzellen des Bulbus olfaktorius erhöht exprimierte und unseres Wissens nach bisher weder in Stammzellen noch im Gehirn beschriebene Outer dense fiber protein nachweisen, dessen Funktion im Gehirn noch unbekannt ist. Darüber hinaus zeigten die Daten eine differenzielle Regulation von Proteinen u.a. aus den Bereichen des Cytoskelettaufbaus, Vesikelverkehrs und der Zellzyklusregulation auf.

Die Befunde aus (A) weisen darauf hin, daß die hippocampalen Stammzellen cytosolische Proteine exprimieren, die funktionell zahlreichen zellbiologischen Prozessen zugeordnet sind. Die durch (B) erbrachten Nachweise a) einer Aktivierung des embryonalen Wnt-Signalwegs in adulten hippocampalen Stammzellen, sowie b) einer Herabregulation embryonaler Proteine beim Übergang der Zellen in den differenzierten Zustand, könnten zu einer neuen Betrachtungsweise und Einordnung von adulten Stammzellen des Gehirns führen: Da sie im adulten Gehirn auf molekularer Ebene ein embryonales Profil konserviert haben, wäre ihre korrekte Bezeichnung treffender neuronale Stammzellen des adulten Gehirns. Zuletzt weisen die von den Ergebnissen aus (C) deutlich aufgezeigten Unterschiede der Expression zwischen den Stammzellen der SVZ und des Bulbus olfaktorius auf eine regional-molekulare Heterogenität im Proteom dieser Zellen hin, welche durch zelluläre Aneuploidie

und chemokinetische und chemotaktische Vorgänge während der Migration von der SVZ zum Bulbus olfactorius induziert worden sein könnte.