

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN
ELDE EDİLEN ASTROSİTLERİN
DEDİFERANSİYASYON KAPASİTESİNİN
İNCELENMESİ**

KEMAL UĞUR TÜFEKÇİ

TEMEL SİNİRBİLİMLER

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2011970074

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN
ELDE EDİLEN ASTROSİTLERİN
DEDİFERANSİYASYON KAPASİTESİNİN
İNCELENMESİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER

DOKTORA TEZİ

KEMAL UĞUR TÜFEKÇİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin Genç

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'nca (BİDEB) yürütülmekte olan 2214/A-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında 1059B141400079 destek numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2011970074

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Kemal Uğur Tüfekci '**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN ASTROSİTLERİN DEDİFERANSİYASYON KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ**' konulu Doktora tezini 10/07/2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Şermin Genç

DEÜ Sağlık Bil. Ens. Sinirbilimler AD.

ÜYE

Prof. Dr. Pınar Akan

DEÜ Sağlık Bil. Ens. Sinirbilimler AD.

ÜYE

Prof. Dr. Ş. Esra Erdal

DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biy. ve Genetik AD.

ÜYE

Prof. Dr. Ersin O. Koylu

Ege Ün. Tıp Fak. Fizyoloji AD.

ÜYE

Yard. Doç. Dr. Çiğdem Tosun

İYTE Fen Fak. Mol. Biy. ve Genetik Bölümü

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Semra Koçtürk

DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD.

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

Ege Ün. Müh. Fak. Biyomühendislik Böl.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Astrositler	5
2.2. Astrogliosis	5
2.3. Nöral Kök Hücreler	7
2.3.1. Embriyonik Gelişimde Nöral Kök Hücreler	7
2.3.2. Postnatal Dönemde Nöral Kök Hücreler	9
2.3.3. Yetişkin Nöral Kök Hücreler	10
2.4. Astrosit Farklılaşması	11
2.5. Astrosit Dediferansiyasyonu.....	12
2.6. Kök Hücreden Elde Edilen Astrositler	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	15
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	15
3.4. Çalışma Materyali	15
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	15
3.6. Veri Toplama Araçları.....	15
3.6.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü	15
3.6.2. Nöral Kök Hücre Üretimi.....	16

3.6.3. Nöral Kök Hücrelerin mAGES'e farklılaştırılması	17
3.6.4. mAGES Hücrelerinin Nöral kök hücreye dediferansiyasyonu.....	17
3.6.5. Kantitatif PCR.....	17
3.6.6. Immunfloresan Boyama ve EdU işaretlemesi.....	17
3.6.7. NF- κ B aktivasyonunun belirlenmesi	19
3.6.8. Griess Yöntemiyle Nitrit Konsatrasyonu Ölçülmesi	19
3.6.9. Resazurin indirgenmesi ile hücre miktarının belirlenmesi	20
3.6.10. Hücre proliferasyonunun izlenmesi (Cell Tracking).....	20
3.6.11. Canlı hücre Görüntüleme	21
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	21
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	22
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	22
3.10. Etik Kurul Onayı	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. mAGES Hücrelerinde Astrosit ve NKH Belirteç Proteinlerinin Ekspresyonu.....	23
4.2. mAGES Hücrelerinin İnflamatuvar Karakterizasyonu	24
4.3. mAGES Hücrelerinin Dediferansiyasyon Kapasitesi.....	26
4.4. Reaktif Astrositlerde mAGES Dediferansiyasyonu.....	31
4.5. STAT1 sinyalleşmesinin astrosit dediferansiyasyonundaki rolü	32
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
7. KAYNAKLAR	39
8. EKLER	50
8.1. Etik Kurul Onayı	50
8.2. Özgeçmiş	52
8.3. Tezden yapılan yayınlar.....	58

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kantitatif PCR'da kullanılan primer dizileri.....	18
Tablo 2: İmmunfloresan boyamalarda kullanılan antikolar	19



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hücre farklılaşmalarının şematik gösterimi	16
Şekil 2: CFSE işaretlemesi ile proliferasyon analizinin şematik gösterimi.....	20
Şekil 3: NKH ve mAGES hücrelerinde astrosit ve NKH belirteç mRNA düzeylerinin zamana bağlı değişimi.....	23
Şekil 4: NKH ve mAGES hücrelerinde astrosit ve NKH belirteç proteinlerinin immunfloresan boyama ile gösterimi	24
Şekil 5: mAGES Hücrelerinde inflamatuvar uyarılarla NFκB nükleer translokasyonu....	24
Şekil 6: NKH, mAGES ve Primer astrositlerde CCM ile uyarım sonucu pro-inflamatuvar belirteç mRNA'larının değişimi	25
Şekil 7: mAGES'da inflamatuvar uyarım sonucunda Nitrit (NO ₂ ⁻) salınımı	26
Şekil 8: FGF ile uyarım sonucu Astrosit ve NKH belirteçlerinin immunfloresan boyama ile gösterilmesi	27
Şekil 9: FGF2 ile dediferansiyasyonda hücre proliferasyonu ve astrosit-NKH belirteçlerinin zamana bağlı değişimi	28
Şekil 10: Canlı hücre görüntüleme yöntemiyle dediferansiyasyon sırasında proliferasyonun değişik zaman noktalarındaki görüntüleri.....	28
Şekil 11: CFSE ile işaretli mAGES hücrelerinin FGF ile değişik zamanlarda inkübasyonu sonucu elde edilen CSFE yoğunluk histogramları.....	29
Şekil 12: CFSE yoğunluğuna göre hesaplanan hücre bölünme sayıları.....	29
Şekil 13: Astrosit ve NKH belirteçlerinin mRNA düzeylerinin dediferansiyasyon sırasında zamana bağlı değişii	30
Şekil 14: Dediferansiyasyon sırasında NFκB nükleer translokasyon yanıtının değişimi ..	31
Şekil 15: İnflamatuvar uyarıların mAGES Dediferansiyasyonuna etkileri	32
Şekil 16: Ruxolitinib'in CCM ile baskılanan astrosit dediferansiyasyonuna etkisi.....	33
Şekil 17:Ruxolitinib'in IFN-γ ile baskılanan astrosit dediferansiyasyonuna etkisi	34

KISALTMALAR

Aldh1l1	Aldehid dehidrojenaz 1 ailesi, üye L1
Aqp4	Aquaporin 4
ASCL1	Achaete-Scute Ailesi BHLH Transkripsiyon faktörü 1
ATP	Adenozin trifosfat
Blbp	Beyin lipid bağlama proteini
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CBP	cAMP responsive element binding
CCM	Complete Cytokine Mix
CFSE	5-(ve 6)-Karboksifloresin diasetat suksinimidil ester
CNTF	Siliyer Nörotrofik faktör
Cox-2	Siklooksijenaz 2
BMP	Kemik morfojenik protein
DG	Dentat girus
EdU	5-Etil-2'-deoksiüridin
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EKH	Embriyonik kök hücre
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	FGF reseptörü
GABA	Gamma aminobütirik asit
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
Glt-1	Glial glutamat transporter-1
GS	Glutamin sentetaz
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	İnterferon-gama
IL-1 β	İnterlökin-1beta
IL-6	İnterlökin-6

iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK	Janus Tirozin Kinaz
LIF	Lösemi inhibitör faktör
mAGES	Fare EKH'den elde edilen astrosit hücreleri
MSS	Merkezi sinir sistemi
NEDA	N(l-naftil) etilen diamin dihidroklorür
NEH	Nöroepitelyal hücre
NF1A	Nükleer faktör-1A
Ngn	Nörojenin
NKH	Nöral Kök Hücre
NO	Nitrik oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
Olig2	Oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2
RGH	Radyal glial hücre
S100b	S100 kalsiyum bağlayıcı protein B
SCL	Stem cell leukaemia
SEZ	Subependimal zon
SGZ	Subgranüler zon
SHH	Sonic hedgehog
Sox9	Cinsiyet belirleme bölgesi Y-kutusu 9 (Sex determining region Y-box 9)
Srf	Serum response factor (Serum yanıt faktörü)
STAT	Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktive edici (Signal Transducer and Activator of Transcription)
SVZ	Subventriküler zon
Tbr1	T-Box Beyin 1
TLR2	Toll benzeri reseptör 2
TLR3	Toll benzeri reseptör 3
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, "Neuroscience" alanına her geçen gün daha da ilgili olmamı sağlayan, laboratuvar çalışmalarının tümünde yol gösterici olan ve her konuda kendisinden yardım isteyebildiğim danışmanım Prof. Dr. Şermin Genç'e,

Almanya'da Konstanz Üniversitesi'nde kaldığım süre boyunca danışmanlığımı yapan Prof. Marcel Leist'a,

Konstanz Üniversitesi'nde çalıştığım süre boyunca araştırmayı ve günlük yaşamı kolaylaştırsan, başta Dr. Suzanne Kleiderman, Dr. Luidmila Efremova, Simon Gutbier, Petra Chovancová, Alice Krebs ve Xenia Dolde olmak üzere Tüm "AG LEIST" üyelerine ve arkadaşlarım Hatice Yiğit, Oğuz Top ve Hande Aypek'e,

Çalışmada manevi olarak destek olan ekip arkadaşlarım Dr. Ufuk Vurgun, Erden Eren, Burak İbrahim Arıöz, Kamer Burak İşçi ve Bora Taştan'a,

Doğduğum günden bugüne sahip olduğum her şey için annem Remziye TÜFEKÇİ ve yakın zamanda aramızdan ayrılan babam Hasan Tahsin TÜFEKÇİ'ye,

Projeyi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN ASTROSİTLERİN DEDİFERANSİYASYON KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ

Kemal Uğur Tüfekci

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler AD.

ugurtufekci@gmail.com

ÖZET

Astrositlerin nöral kök hücreler üzerinden nöronlara dönüşmesi nörolojik hastalıklar ve beyin hasarlarının tedavisinde yeni bir yaklaşım olabilmektedir. Bu dönüşümü etkileyen faktörler tam olarak açıklanamamıştır ve bunların anlaşılması karmaşık hastalık modellerinde veya konvansiyonel hücre kültür sistemlerinde oldukça zordur. Bu mekanizmaların açıklaması için serumsuz ve kontrollü bir mikro-çevrede yaşayan saf ve homojen hücre popülasyonu olan Fare embriyonik kök hücrelerinden (EKH) elde edilen astrosit hücreleri (mAGES; **M**ouse **A**strocytes **G**enerated from **E**mbryonic **S**tem Cells) kullanılmıştır. Bu hücreler Fibroblast büyüme faktörü (FGF; Fibroblast growth factor) ile muamele edildiklerinde tekrar hücre döngüsüne girerek proliferasyon başlanmaktadır. FGF Reseptörünün tirozin kinaz sinyallemesiyle Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) ekspres eden mAGES hücreleri Nestin ekspres eden Nöral Kök Hücrelere (NKH) dönüşmektedir. Yaptığımız fenotipik ve fonksiyonel karakterizasyonlara göre mAGES dediferansiyasyonu sonucu elde edilen hücreler EKH'lerden mAGES elde edilirken elde edilen NKH'lerle aynı olduğu belirlenmiştir. İnflamatuar aracı moleküllerin, özellikle İnterferon-gama (IFN- γ), mAGES hücrelerinin NKH'ye dediferansiyasyonunu önemli ölçüde engellemiştir. Bu mekanizmanın STAT1 fosforilasyonuna bağımlı olarak gerçekleştiği gösterildi.

Bu çalışmada astrositlerin genetik manipülasyondan bağımsız olarak başka hücrelere dönüştüğü ortaya konuldu. Bu durum ilişkili sinyalleme aktivatörlerinin astrosit dediferansiyasyonunu nasıl baskıladığı veya tetiklediği ile astrositlerin bazı hastalıklarda

NKH'lere neden dönüşemediklerini açıklamaktadır. Bu faktörlerin rollerinin açığa kavuşturulması beyin hasarı ve nörodejenerasyonda rejenerasyonu sağlayacak ilaç hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Astrosit, Dediferansiyasyon, Fibroblast büyüme faktörü, Nöral kök hücreler



INVESTIGATION OF DEDIFFERENTIATION CAPACITY OF ASTROCYTES GENERATED FROM MURINE EMBRYONIC STEM CELLS

Kemal Uğur Tüfekci

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience

ugurtufekci@gmail.com

ABSTRACT

Conversion of astrocytic cells to neurons, through dedifferentiation to neural stem cells (NSC), can be an ideal approach to cure neurodegeneration and brain injuries. The signaling pathways regulating such a cell conversion are not fully elucidated, and it is quite challenging to determine in complex disease models or regular cell culture systems. In order to solve this problem, we established a serum-free, strictly controlled cellular model of pure and homogeneous "Mouse astrocytes generated from murine embryonic stem cells (mAGES)." mAGES cells proliferated by exposure to FGF and caused conversion of GFAP-expressing mAGES to nestin-expressing NSC. As a result of standard phenotyping, mAGES dedifferentiation gave rise to NSC which is similar to NSC lineage obtained directly by differentiation of ESC to neural cells. Inflammatory mediator molecules, especially interferon-gamma, affected mAGES de-differentiation and robustly debilitated the generation of NSCs from mAGES by STAT1 phosphorylation independent of nitric oxide generation. Thus, in this project, signaling mechanism, which affect conversion of astrocytes without genetic manipulation, were described. The complex interaction between related signaling molecules promoting/inhibiting astrocyte dedifferentiation may disclose the reason why astrocytes are not able to generate NSC in neurodegenerative diseases. Increased knowledge of such factors may provide innovative therapeutic opportunities to support such conversions as regeneration targets.

Keywords: Astrocyte, Dedifferentiation, Fibroblast growth factor, Neural stem cells

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Olgun astrositler sağlam beyinde normal olarak prolifer olmamakta [1, 2], ancak literatürde astrositlerin hücre döngüsüne yeniden girişini ve kök hücrelere dönüşmesini sağlayan bazı moleküller tanımlanmıştır [3]. Bunlar, nükleotidler [4, 5], Epidermal büyüme faktörü (EGF) [6, 7], FGF2 [8-10], ve sonic hedgehog (SHH) [11] gibi büyüme faktörleridir. Magdalena Götz ve ark. tarafından yapılmış öncü çalışmalar, SHH'nin bazı fare beyin hasarı modellerinde astrositleri dediferansiye ederek NKH'ye çevirdiğini göstermektedir [12].

Astrositlerin *in vivo* nöron oluşturmamasının nedeni, inflamasyon veya hastalık sırasında inhibitör faktörlerin salınması olabilmektedir [13]. Bu tür sinyaller, dediferansiyasyonu ve hücre döngüsüne yeniden girişı önleyebilir [14] veya notch sinyalleme aracılığıyla [15] astrositlerin nörojenezde doğru yönelimini destekleyebilir. Hastalık modellerinde destekleyici [16], dediferansiyasyonu ve nörojenik dönüşümü engelleyen birkaç faktör aynı anda endojen olarak salınabilir [12], ve bu durum astrositlerin dediferansiyasyonu ve nörojenezin farmakolojik tetiklenmesine olanak tanıyan hedeflerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır [17, 18].

Bu projede amacımız:

1. Kök hücrelerden elde edilen astrositlerin dediferansiyasyon kapasitesinin belirlenmesi,
2. Astrositik immün yanıtların bu dediferansiyasyona etkilerinin incelenmesi,
3. Dediferansiyasyonu düzenleyen mekanizmanın açığa çıkarılmasıdır.

Hipotez: FGF2 uygulaması astrosit dediferansiyasyonunu uyarırken immün uyarılar bu mekanizmayı baskılamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astrositler

Astrositler, nöronlar ve oligodendrositler gibi nöroektoderm kökenli merkezi sinir sisteminde (MSS) en yaygın bulunan glial hücrelerdir [19]. Astrositlerin sağlıklı MSS'de nöronlara mekanik destek dışında önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Astrositler kan damarlarını genişleten ve daraltan çeşitli aracı moleküller (nitrit oksit, prostaglandinler, arakinodik asit) salgılayarak kan akışını modüle eder. Astrosit uzantıları tüm önemli sinapsları sararak sinaptik transmisyonu, sıvı, iyon ve pH homeostazını sağlar. Ayrıca astrositlerin sinaptik aralıkta aktif moleküller olan Gamma aminobütirik asit (GABA), glutamat, pürinler, D-serin gibi nörotransmitterler salgılayarak sinaptik transmisyonda rol alır. MSS'de astrosit prosesleri bir taraftan kan damarları ile diğer taraftan ise nöronal perikarya, aksonlar ve sinapslar ile kontak halinde bulunur. Bu sayede nöronlar için gerekli olan glukoz ve diğer metabolitleri sağlayarak enerji ve metabolizmasında önemli bir görev üstlenmektedir. Kan beyin bariyerini serebral kapiller endotel hücreler, bazal lamina, perivasküler perisitler ve astrosit uçları oluşturmaktadır. Yetişkin farelerde yapılan çalışmalarda astrosit son ayakta bulunan kemik morfojenik protein (BMP) sinyallemesi ile serebral endotel hücrelerde kan beyin bariyeri özelliklerini regüle ettiği gösterilmiştir [1].

2.2. Astrogliosis

Bazı merkezi sinir sistemi hastalıklarının ortak patolojilerinde reaktif astrogliosise rastlanmaktadır [20]. Bu süreç MSS hasarlarına karşı astrositlerin moleküler, hücresel ve fonksiyonel değişiklikleri kapsamakta ve hastalığın şiddetine göre farklılık göstermektedir [21]. Hafif şiddetli travmalarda veya MSS lezyonlarından uzakta meydana gelen hafif ve orta şiddetli astrogliosiste astrosit proliferasyonu neredeyse hiç görülmemektedir. GFAP düzeylerinin artışı gözlenmekte ve bunun yanına Bakır-Çinko süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz ve metalloprotein enzimleri upregüle edilmektedir [22]. Orta şiddetli astrogliosiste indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve tümör nekrozis faktör(TNF)- α , - β , interlökinler ve interferonlar gibi trofik faktör ve sitokinler salınmaktadır [23]. Hafif ve

orta şiddetli astrogliosisde, eğer ki uyaran ortadan kalkmışsa astrositik yanıtların rezolüsyonu oluşmakta ve sağlıklı dokularda gözlenen astrositik davranışlarına geri dönüş olmaktadır [24]. Bu durumun aksine fokal lezyonların, enfeksiyonun veya nörodejenerasyonun yakınındaki astrogliosis artmış astrositik proliferasyonla karakterizedir. Reaktif astrositlerin proliferasyonunu sağlayan moleküler faktörlerin tam olarak karakterize edilememesine rağmen EGF, FGF, Endotelin 1, Adenozin trifosfat (ATP), lipopolisakkarit ve NO'nun rolleri tanımlanmıştır [20]. Artmış proliferasyonun sonucunda komşu astrositlerin uzantıları birbirine karışmakta ve glial skar oluşumuna sebep olmaktadır. Bu şekildeki bir skar oluşumu genellikle ciddi doku hasarı, nekroz, tümörler, kronik nörodejenerasyon, enfeksiyon veya inflamatuvar infiltrasyon oluşan yerlerin sınırlarında astrositlerin farklı tipteki hücrelerle etkileşimiyle olmaktadır [1, 24]. Bu şekilde oluşan yapısal değişiklikler uzun sürelidir ve uyarının rezolüsyonuyla ortadan kalkmamaktadır [24]. Ayrıca ilerlemiş glial skarlar yoğun inflamasyon durumlarında etraftaki sağlıklı dokuyu korumak üzere bariyer görevi görmektedir. Reaktif astrositler ayrıca eksitotoksik glutamat alımı, oksidatif strese karşı glutatyon üretimi, Amiloid- β peptid degradasyonu, ekstraselüler boşluk ve iyon dengesi düzenlemesi, kan beyin bariyeri onarımı ve MSS inflamasyonu düzenlemesi yaparak da MSS sinir sistemi hücrelerini ve dokusunu korur. Bütün bunlara rağmen, elde edilen yeni kanıtlara göre reaktif astrositlerin MSS fizyopatolojisine katkıda bulunduğu veya kaynağı olduğu öne sürülmektedir. Glial skar yapısındaki reaktif astrositler akson rejenerasyonunu engelleyen kollajen ve sülfat proteoglikanlarını sentezlemektedir [23]. Ayrıca genetik mutasyonlar sonucu astrosit fizyolojisinin değişmesi Alexander hastalığı veya Amyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklara sebep olmaktadır [20]. Reaktif astrositlerin bu zıt etkileri astrogliosisin hem yararlı hem de zararlı etkilere sebep olabileceğini ortaya koymaktadır [1, 24].

2.3. Nöral Kök Hücreler

2.3.1. Embriyonik Gelişimde Nöral Kök Hücreler

Omurgalıların MSS gelişimi sırasında ilk olarak nöroepitelyal hücreler (NEH) oluşmaktadır. Bu hücreler MSS'nin en çok prolifere olan hücreleridir [25] ve astrosit, oligodendrosit, nöron ve ependimal hücre gibi tüm hücre tiplerinin temelini oluşturmaktadır. MSS oluşumu sırasındaki en önemli özelliği farklı bölgelerde lokalize olan NEH'lerin farklı hücre nesillerine dönüşmeyi sağlayan kader belirleyici molekülleri salgılamasıdır. Örneğin, ventral spinal kordda ifade edilen transkripsiyon faktörleri oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2 (Olig2) ve Achaete-Scute Ailesi BHLH Transkripsiyon faktörü 1'in (Ascl1) erken dönemde motor nöron oluşumunu geç dönemde de oligodendrosit farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir [26, 27]. Fakat yapılan transplantasyon, genetik nesil haritalama ve motor nöronların genetik indüksiyonla öldürülmesi çalışmaları Olig2+ veya Ascl1+ motor nöron öncü hücrelerinin Olig2+ veya Ascl1+oligodendrosit öncü hücreleriyle aynı nesilden gelmediğini kanıtlamıştır [28, 29]. Bu yüzden, erken dönemdeki öncü hücreler olan NEH'ler bile ileri dönemde sadece spesifik nesil belirleyicilere sahip olduğundan *in vivo* koşullarda sadece tek bir hücre tipine farklılaşmaktadır [25].

In vitro koşullarda ise en azından NEH'lerin bazıları büyüme faktörleriyle uyarım sonucunda nöron-astrosit veya nöron-oligodendrosit gibi hem nöron hem de glial hücreleri oluşturabilmektedir [30]. NEH'ler nörosfer kültür koşullarına maruz bırakıldıklarında EGF ve SHH sinyal yolak aktivasyonu sonucunda gliojenik transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla astrosit, oligodendrosit ve nöronlara farklılaşabilmektedir [31, 32]. Sonuç olarak NEH'ler *in vivo* koşullarda tek nesle ve bazıları iki nesle farklılaşabilirken *in vitro* koşullarda multipotent olarak davranmaktadır.

NEH'lerin çoğu *in vivo* koşullarda sınırlı sayıdaki hücre bölünmesinde kendini yenilemekte ve neredeyse tüm beyin bölgelerinde radyal glial hücrelerle (RGH) yer değiştirmektedir [33] ve RGH çoğu beyin bölgesindeki nörojenezden sorumludur [34]. İstisnali olarak ise spinal kordda RGH'ler nörojenezin sonunda ve gliogenezin

başlangıcında ortaya çıkmaktadır [26, 35]. İlginç olarak da bazı NEH'ler *in vivo* koşullarda istirahat halinde olmasına rağmen BMP gibi spesifik sinyal yolları da bu hücreleri sessiz şekilde geçici arest halinde tutabilmektedir [36, 37]. Sonuç olarak erken dönemdeki nöral kök hücreler gelişmekte olan MSS'de *in vivo* koşullarda kısıtlı kendini yenileme ve tek veya kısıtlı nesil oluşturma potansiyeline sahiptir [31, 32].

RGH, NEH'lerden daha sonra astrositlerde sürekli eksprese edilen glutamat taşıyıcıları (GLAST, GLT-1, Glutamin sentaz, Aldh1L1), reaktif astrositlerde eksprese edilen vimentin, nestin, BLBP, DSD1-proteoglikan ve Tenascin-C ve yetişkin NKH'lerde eksprese edilen çeşitli gen ve proteini eksprese eder [38]. Her ikisi de bazal membranda ve CD133 (Prominin) eksprese edilen ventriküler apikal yüzeylerde aynı apiko-bazal polariteyi paylaşmaktadır [33, 39]. Yapılan *in vivo* ve primer kültür ile yapılan *in vitro* çalışmaların sonucunda RGH'lerin büyük bir kısmının çoğunlukla nöron olacak şekilde NEH'e benzer şekilde farklılaştığı kanıtlanmıştır [25]. NEH'e benzer şekilde RGH'lerde *in vivo* koşullarda üç farklı nesile farklılaşma gözlenmeyip sadece *in vitro* koşullarda büyüme faktörüyle uyarım sonucunda (örneğin, nörosfer kültür koşulları) multipotent davranışlara rastlanmaktadır. Kendilerini yenilemelerine istinaden, RGH ardışık olarak farklı nöron alttiplerini oluşturmak için asimetrik olarak bölünme geçirir [40, 41]. RGH'nin gelişim sırasında farklı nöron alttiplerini oluşturma potansiyeli oldukça sınırlıdır ve geç dönemdeki RGH'ler serebral korteksin derin katmanlarda erken dönemde oluşan nöronları oluşturamamaktadır [42]. Ayrıca RGH nörojenez sırasında en fazla 8 veya 9 kez bölünme geçirmekte gliogenez başlayacağı zaman beynin çoğu bölgesinde ortadan kaybolmaktadır. Bu ortadan kayboluş kendini tüketen simetrik nörojenik bölünmeler veya astrosit veya ependimal hücrelere dönüşme ile olmaktadır [43, 44]. Görüldüğü üzere RGH'ler, 1 kez bölünme geçiren veya simetrik olarak bölündüklerinde simetrik olarak tek bir nöron tipine dönüşen nöral öncü hücrelere (örneğin gelişmekte olan ön beyindeki bazal progenitörler) göre nesil ve bölünme olarak daha potent hücrelerdir [39, 45]. Bütün bunlara istinaden asimetrik bölünmeler ve farklı yavru hücre oluşturmalarına dayanarak, RGH ve NEH'ler nöronal progenitör hücrelerden açıkça farklı hücrelerdir *in vivo* koşullarda az sayıda

bölünebilmelerine karşın (rodentlerde; NEH için 2-4 bölünme, RGH için 6-8 bölünme) kendilerini yenileyebilme koşulunu sağlamaktadır [25]. Bununla birlikte nöronal progenitör hücreler NKH'lerin *in vitro* koşullardaki yeteneği olan nörosfer oluşumunu gerçekleştirememekte; multipotansi ve uzun süreli kendini yenileme özelliğinden yoksun kalmaktadır [38].

2.3.2. Postnatal Dönemde Nöral Kök Hücreler

Memelilerde doğumdan sonra beyin bölgelerinin nörojenezi sonlanırken gliojenez onun yerine geçmektedir ve daha baskın hale gelerek yoğunlaşmaktadır [27]. Bu dönemde gelecekte beyaz cevher olacak bölgede veya hemen altında proliferen olan hücreler yoğun bir bant oluşturacak ve subventriküler zonu (SVZ) oluşturacaktır. Postnatal dönemde SVZ'nin, retroviral tek hücre işaretlemesiyle yavru hücrelerde belirlemeyle çoğunlukla glial progenitör hücre içerdiği gösterilmiştir. İşaretlenmiş nesildeki hücreler hem dağınık haldeki oligodendrosit ve öncü hücrelerini ve astrositleri hem de tek tip glial hücre kümelerinden oluşmaktadır [38, 39]. Devamı niteliğindeki çalışmalarda ise Olig2 transkripsiyon faktörünün artmış düzeylerinin astrosit farklılaşmasını inhibe ettiği ve oligodendrosit farklılaşmasına yol açtığı ortaya konmuştur [46]. Ayrıca serebral korteks gri cevherinde astrosit gruplarına farklılaşan ve astrosit dağılımına sebep olan astrosit öncü hücreleri gibi tek hücre tipine farklılaşan öncü hücreler parankim boyunca dağılmışlardır [47, 48]. İlginçtir ki serebral kortekste postnatal dönemde nöronal öncü hücrelerin bulunmaz iken postnatal 3-11 gün arasında hipoksiye maruz kalınması durumunda T-Box Beyin 1 +(Tbr1+) dikenli piramidal nöronların mevcut GFAP+ hücrelerden oluştuğu gösterilmiştir [49]. Ek olarak *in vitro* ve *in vivo* düşük oksijene maruz kalınması postnatal serebral kortekssteki GFAP+ hücrelerden reaktif astrositlerin hasar yanıtına benzer şekilde multipotent ve kendini yenileyen hücreler oluşmasına yol açmıştır [49].

NG2 progenitör hücreler simetrik ve asimetric olarak bölünerek yetişkin beyinde oligodendrositler ve NG2-glia hücre ağının oluşmasını sağlar [50]. Bu hücreler *in vivo*

koşullarda tek nesil veya iki nesile köken olmaktadır ve mevcut fenotipini primer kültür koşullarında koruyabilmektedir [51]. EGF ve FGF varlığındaki nörosfer kültür koşullarında bu hücreler ve alttıpleri de multipotansi özelliği göstermektedir [50].

Özellikle postnatal dönemde dentat girus (DG) ve lateral ventrikülün lateral duvarında nörojenez devam etmektedir. Embriyonik gelişim sırasında lateral ventrikülün lateral duvarı gangliyonik kabartı olarak isimlendirilmekte ve bazal gangliyadaki projeksiyon nöronlarını ve telensefalonun tümündeki ve postnatal olfaktör bölge ara nöronları oluşturmaktadır [52]. Viral vektör veya genetik nesil izleme çalışmaları da postnatal SVZ'deki hücrelerin olfaktör bölgeye göç edip yerleştiğini kanıtlamıştır [38, 48]. Bu kökündeki hücreler GFAP+ hücrelerdir ve neonatal RGH'lerden köken almıştır [38].

2.3.3. Yetişkin Nöral Kök Hücreler

Erken postnatal dönemde dokunun olgunlaşma süreci VZ ve SVZ'nin küçülmesi ve lateral ventrikülün lateral duvarında Subependimal zonda (SEZ) ve hipokampal oluşumun DG kısmındaki ikincil nörojenik alan olan subgranüler zonda (SGZ) ependimal hücrelerin olgunlaşması ile tamamlanmaya başlar [30, 33, 38]. Her iki alan da olfaktör bölgedeki yeni nöron oluşumlarına ve DG'deki granüler hücre katmanına katkıda bulunur ve embriyonik nörojenezdeki karakteristiklerini korurlar [38].

Yetişkin NKH ependimal hücre tabakasının altında ve striatumun tabanında SEZ'de ince bir katman halinde bulunmakta *in vitro* koşullarda EGF veya FGF varlığında multipotansi özelliği göstermektedir [53, 54]. Bu hücreler en az 10-20 pasaj boyunca kendilerini yenileyebilmekte ve *in vitro* koşullarda nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaşabilmektedir. Bu hücrelerin klonal analizleri *in vitro* koşullarda sürekli-tek hücre canlı görüntüleme yapılabilmektedir [55, 56]. Bu yöntemle yapılan analizlerde SEZ'den elde edilen yetişkin NKH'ler büyüme faktörü eklemeksizin kültüre edildiğinde sadece nöronlara farklılaşmış ve glial hücrelere farklılaşmamıştır [56]. Ancak EGF veya FGF eklenmesi durumunda hücreler tekrar proliferere olmaya başlamış ve gliojenik potansiyel

kazanmıştır [56]. Sonuç olarak NKH'lerin çoğu *in vivo* koşullarda sadece nöronlara farklılaşabilirken *in vivo* koşullarda büyüme faktörleri de gliojenik süreçlerin aktive olmasını sağlamaktadır [55, 56].

2.4. Astrosit Farklılaşması

Nörojenik sürecin sonuna doğru gliojenik süreç aktive olur ve astrosit ve oligodendrosit farklılaşması başlar. Nörojenik fazda yüksek miktarda eksprese edilen Nörojenin (Ngn) gibi bHLH transkripsiyon faktörleri gliojenik CBP/p300/Smad transkripsiyonel kompleksini sekestere ederek ve Janus Tirozin Kinaz (JAK)/ Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktive edici (Signal Transducer and Activator of Transcription; STAT) yolağını baskılayarak gliogenez sürecini inhibe eder [57, 58]. Gelişim süreci devam ettikçe nöral öncü hücreler BMP, Lösemi inhibitor faktör (LIF)/Siliyer Nörotrofik faktör (CNTF) gibi gliojenik sitokinlerden gelen sinyallere yanıt vermeye başlar [59]. Bu durum astroglial genlerden GFAP ve S100 kalsiyum bağlayıcı protein B (S100 β) promotorlarındaki STAT3 bağlanma noktalarının demetilasyonu ile gerçekleşir [60-62]. Astroglial farklılaşmada da nöronal farklılaşmadaki alt tiplerin belirlenmesi sürecindeki değişik sinyalleme kaskatları astrositlerin alt tiplerine farklılaşmasına yol açmaktadır. Gliojenik sürecin başlatılmasında özelleşme süreci başlamadan Cinsiyet belirleme bölgesi Y-kutusu 9 (Sex determining region Y-box 9; Sox9), Olig2 ve Serum yanıt faktörü (serum response factor; Srf) gibi transkripsiyon faktörleri önemli roller oynamaktadır [63-65]. Sox9 spinal kord gri cevher astrositleri oluşumu için gerekli iken beyaz cevher astrositlerine fazla etkisi yoktur. Nükleer faktör-1A (NF1A) da spinal kord gliogenez sürecinin başlangıcını ve astrositik belirteç ekspresyonlarını (GFAP) düzenler [66, 67]. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalara göre Sox9, NF1A ekspresyonunu indükler ve ikisi birlikte astroglial gelişimde özellikle metabolizma ve migrasyonda rol alan genlerin bulunduğu kaskadı başlatır [68]. Ventral nöral tüpte de astrosit farklılaşması bHLH transkripsiyon faktörlerinden stem cell leukaemia (SCL) ile düzenlenmektedir [69]. Buna ek olarak, Pax6

nörogenezi düzenlemesine rağmen astrosit farklılaşmasına öncü hücre proliferasyonunu inhibe ederek katkıda bulunur [70].

2.5. Astrosit Dediferansiyasyonu

Astrositlerin beyin hasarı ve nörodejenerasyon durumundaki inflamatuvar aktivasyon mekanizmaları literatürde iyi tanımlanmış olmasına rağmen plastisite ve soya bağlılıklarını etkileyen faktörler açısından daha az bilinmektedir. Örneğin, astrositik NKH'den gelen nörojenez, yetişkin memeli beyninin bazı kısımlarında gösterilmiştir [71]. Bu bölgelerin dışında olgun astrositlerin fonksiyonel nöronlara dönüştürülmesi ektopik nörojenik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu gerektirir [18, 72-75]. Terapötik amaçlar için, astrositlerin genetik yeniden programlama gereksizsin nöronlara dönüştürülmesinin elverişli olacağı düşünülmektedir. İnflamasyon veya hastalık sırasında, astrosit aktivasyonu, örneğin, mikroglia [76-80], infiltrate lökositler [81] veya stresli nöronlar (ATP; reaktif oksijen türleri) [24] tarafından salınan sitokinler tarafından tetiklenir. Ortaya çıkan astrogliosis, nöron yenilenmesi üzerinde hem zararlı hem de faydalı etkilere sahip olabilir [1, 21]. Şiddetli astrogliosisin önemli özellikleri, olgun, çoğalmayan astrositlerin hücre döngüsüne yeniden girişi ve glial skar oluşumudur [1, 82, 83]. Örneğin, TNF ile transkripsiyon faktörü Nükleer Faktör Kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonu, astrositlerin bir dediferansiyasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [16, 84]. Bu astrositlerden bazıları normal olarak nestin gibi NKH'de bulunan belirteçleri yeniden eksprese etmektedir [24]. Astrositlerin nöron üretme kapasitesine sahip hücrelere dönüştürülme potansiyeli, gelecekteki nörorejeneratif terapiler için, eğer normalde neden *in vivo* olarak astrositik soyları içinde kaldıklarının bilinmesi durumunda kullanılabilir [38, 82].

Reaktif astrositleri *in vivo* olarak neslini Notch sinyalleme düzenlemekte ve RGH'lerin nörojenez veya gliojenez gideceğine karar vermektedir. Sürekli artmış Notch düzeyleri hücreleri RGH olarak tutmakta ve nörojenezle etkileşirken yükselen Noggin ve azalan Hes seviyeleri de Notch sinyallemesini inhibe ederek RGH ve NKH'lerin nörona farklılaşmasını sağlar [85]. Reaktif astrositlerin nörosfer kültür koşullarında NKH fenotipine geçişinde de Notch sinyalleme rol almaktadır [86].

Serebral korteksteki reaktif astrositlerin NKH özellikleri kazanımında SHH'nin sinayllemede önemli rolleri bulunmaktadır. SHH sinyal aracısı *smoothed*'in yetişkin astrositlerde delesyonu yapıldığında travmatik beyin hasarı sonrası reaktif astrosit proliferasyonunun ve nörosfer oluşumunun azaldığı gösterilmiştir [12]. SHH en yüksek olarak plazmada ve beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunmaktadır ve invaziv beyin hasarı sonrası beyin parankimine ulaşabilmektedir. Bu durum amiloidoz ve nöronal hücre ölümü gibi non-invaziv hasarlarda reaktif astrositlerin neden proliferere olmadığı açıklamaktadır [12].

Bu noktada skar oluşumunun azalmasına katkıda bulunan sinyal yollarının da incelenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda FGF sinyalleme ve delesyonu skar oluşumunu azaltan GFAP ve vimentin aklı gelmektedir [87]. Bu tip ara filament proteinleri membran proteinlerini hedefleyerek FGF reseptörü (FGFR) aracılı sinyalleme kolaylaştırabilmektedir [88]. Bu tür sinyaller NKH ve hatta reaktif astrositlerin nörojenez potansiyelini etkilemekte ve skar oluşumunu azaltmayla yakından bağlantılıdır.

İmmatür glial hücrelerin hasarlı dokuya transplante edilmeleri çoğunlukla faydalı etkilere sahip olmuştur [89] ve transplante edilmiş kök hücrelerden salınan faktörler skar oluşumunu ve nöronal ölümü önlemektedir. Ayrıca beyinde NKH gibi davranan reaktif astrositlerin hasarlı bölgeye transplantasyonu da benzer etkilere yol açmaktadır [38]. Ayrıca spinal korddaki ependimal hücreler travmatik hasarla aktive olmakta, GFAP+ hücrelere farklılaşmakta ve hasar bölgesine göç ederek nöroprotektif faktörler salgılamaktadır [90].

2.6. Kök Hücreden Elde Edilen Astrositler

Astrositlerin metabolik veya fonksiyonel çalışmalarında istirahat halindeki veya değişik aktivasyon senaryolarında bazı zorluklara rastlanmaktadır: i) *in vivo* çalışmalarda deneyin sonunda astrositler ve çevresindeki diğer hücre tiplerinin ayrılanamaması, ii) Akış sitometri ile ayrılanmış hücrelerle yapılan *ex vivo* çalışmalarda hücrelerin yaşatılamaması veya tanımlanamayan aktivasyon halleri ve iii) *in vitro* çalışmalardaki

hücrelerin karışık hücre tiplerini içermesi ve görece daha immatür hücrelerden oluşması [91]. Primer hücre kültüründe öncü hücreler, reaktif astrositler veya mikroglia gibi diğer hücre tipleri bulunabilmektedir. Bu yüzden, primer kültüre alternatif olarak proliferasyon olmayan ve aktive olmamış astrositlerin kök hücreden üretilmesi stratejisi önerilmektedir [92]. Bu yeni modelde pluripotent kök hücrelerden elde edilen NKH'lerin BMP4 ile inkübe edilmesiyle saf ve proliferasyon olmayan astrosit popülasyonu 24-48 saat içerisinde elde edilebilmektedir. Farklılaştırdığımız fare astrosit kök hücrelerinden elde edilen mAGES hücreleri GFAP, aquaporin 4 (AQP4) ve glial glutamat transporter-1 (GLT-1) ekspresyonunda, nöronal fonksiyonları desteklemekte ve immün yanıtlara katılmaktadır [92]. Bu protokol fare EKH ve hastalığa yatkın uyarılmış pluripotent kök hücre hatlarına uygulanabilmektedir ve primer kültürün aksine hücreler hücre döngüsünden çıkmakta nestin ekspresyonu neredeyse kaybolmaktadır. mAGES hücrelerinin transkriptom analizleri sonucunda da hücrelerin kortikal astrositlere benzerliği göze çarpmaktadır [92].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamızın Kasım 2014-Kasım 2015 tarihleri arasında Konstanz Üniversitesi'nde, ön çalışmaları yapılmıştır. Ocak 2017-Haziran 2017 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi'nde kendi laboratuvarımızda yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Hücre kültürü çalışmasıdır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda CGR8 fare embriyonik kök hücre hattı ve bu hücre hattından farklılaştırılan Nöral kök hücreler (NKH) ve mAGES hücreleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: GFAP, Nestin, S100B, BLBP, Sox2, Glut-1 ekspresyon düzeyleri, NF-κB nükleer translokasyonu

Bağımsız Değişken: Ruxolitinib, IL-1β, TNF-α ve IFN-γ dozları, FGF2 inkübasyon süresi

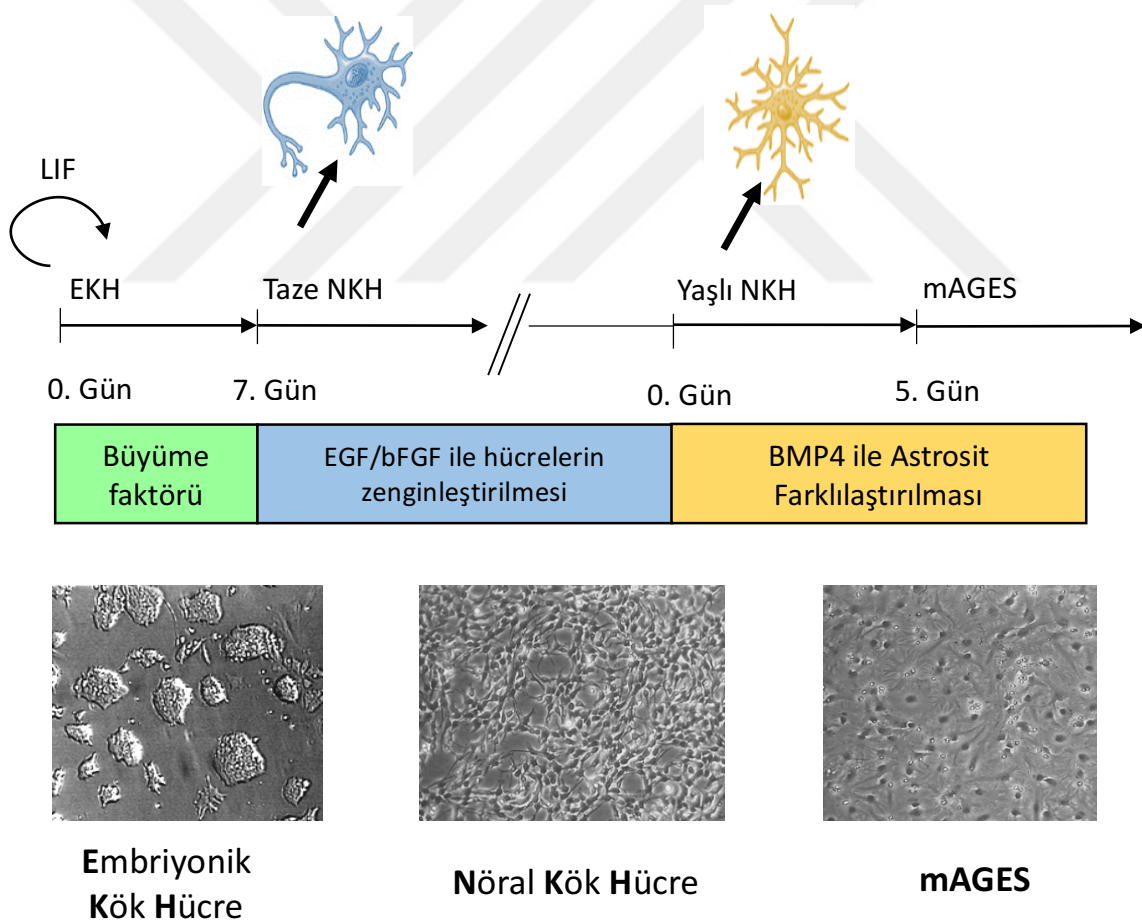
3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Çalışmada besleyici hücreye gereksinim duymayan CGR8 fare EKH hattı kullanılmıştır. Hücreler %0,1 Jelatin ile kaplanmış kültür kaplarında; %10 FBS, 2mM Glutamax, 2 mM Sodyum piruvat, 100 μM Non-esansiyel amino asit, 50 μM β-Merkaptoetanol, 100 U/ml Penisilin ve 100μg/ml Streptomisin ile desteklenen Glasgow's MEM ortamında 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında idame ettirilmiştir. Hücre kültür ortamına hergün taze olarak 10⁴U/ml Lösemi inhibitör faktör (Leukemia Inhibitory Factor; mLIF) + 3i (2 μM SU5402, 800 nM PD184352 and 3 μM CHIR99021) eklendi. Hücreler haftada 3 kez 1:10 oranında pasajlandı.

3.6.2. Nöral Kök Hücre Üretimi

CGR8 hücrelerinin NKH'ye farklılaşması için hücreler %0,1 Jelatin ile kaplanmış, 10 cm çapında kültür kaplarına 5.6×10^5 yoğunlukta N2B27 ortamında (1:1 DMEM / F12 ve Neurobasal, N2-takviyesi, B27-takviyesi, 2 mM Glutamax, 100 uM β -merkaptotanol, 7.5 μ g/ml insülin, 50 ug/ml Sığır Serum Albumini) ekildi ve 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Farklılaşmanın 7. gününde hücreler NKH ortamına [20 ng/ml Endotelial büyüme faktörü (Endothelial growth factor; EGF) ve 20 ng/ml Fibroblast Büyüme Faktörü 2 (Fibroblast growth factor 2; FGF2) ile desteklenmiş N2B27 ortamı] alınarak 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında idame ettirildi. Hücreler haftada 2 kez 1:30 oranında pasajlanmıştır.



Şekil 1: Hücre farklılaşmalarının şematik gösterimi

3.6.3. Nöral Kök Hücrelerin mAGES'e farklılaştırılması

mAGES hücreleri, Kleiderman ve ark.'ın protokolüne göre NKH'lerden farklılaştırılmıştır [92]. Hücreler 100 µg/mL poli-L-Ornitin ve 200 µg/mL laminin kaplanmış 96-kuyulu plaklara 2×10^4 hücre/kuyu yoğunlukta ekildi. NKH'ler, BMP4 ile desteklenmiş N2B27 ortamında 5 gün süreyle mAGES'a farklılaştırıldı.

3.6.4. mAGES Hücrelerinin Nöral kök hücreye dediferansiyasyonu

Beş günlük mAGES iki kez PBS ile yıkandı ve 20 ng/ml FGF2 ile takviye edilmiş N2B27 ortamına alındı ve ortam iki günde bir değiştirildi. Kontrol olarak hücreler, BMP4 ve FGF2 olmaksızın N2B27 ortamında kültüre edildi. Deneyler 1-10 gün aralığında yapılmıştır.

3.6.5. Kantitatif PCR

Total RNA izolasyonu RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) protokolüne göre yapıldı. RNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçülerek ve 1 µg RNA'dan iScript II Reverse Transcription Supermix (Biorad, Hercules, CA) kitiyle cDNA sentezi yapıldı. Kantitatif PCR, MyIQ cycler (BioRad, Hercules, CA) cihazında SsoFast EvaGreen qPCR Supermix kit (BioRad) kullanılarak üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. mRNA düzeylerindeki değişimler $\Delta\Delta C_T$ yöntemine göre analiz edildi ve housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı . Kullanılan genlerin primer dizileri Tablo 1'de listelenmiştir.

3.6.6. Immunfloresan Boyama ve EdU İşaretleme

İnkübasyonu biten hücreler %4 paraformaldehit ile fiske edildi. Fikse edilen hücrelere %0,1 Triton X-100 ile permeabilize edilip %10 FBS ile bloklandı. İlk olarak, bir timin analogu olan EdU (5-Etinil-2'-deoksiüridin) boyaması yapılarak hücrelerin bölünüp bölünmediği gösterilmiştir. EdU boyaması için Baseclick, BCK-EdU555, (Neuried, Germany) kiti kullanıldı ve üretici talimatları izlenerek boyaması yapıldı. Ardından hücreler ilgili proteine özgü primer antikorla (Tablo 2) ve ardından Alexa Fluor-488 veya Alexa Fluor-647 konjuge sekonder antikorlar ile işaretlenmiştir.

Tablo 1: Kantitatif PCR'da kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Forward Dizi (5'→3')	Reverse Dizi (5'→3')
Aldh1l1	CTCGGTTTGCTGATGGGACG	GCTTGAATCCTCCAAAAGGTGCGG
Aqp4	GCTCAGAAAACCCCTTACCTGTGG	TTCCATGAACCGTGGTGACTCC
Blbp	GGGTAAGACCCGAGTTCCTC	ATCACCCTTTGCCACCTTC
Cox-2	CCATTGAACCTGGACTGCAGAAGGC	CGGAACTAAGAGGAGCAGCAATGC
GAPDH	CAGGCAGCTCAGGTTGACTCTG	GGATGCAGGGATGATGTTC
Gfap	GCCCCGGCTCGAGGTCGAG	GTCTATACGCAGCCAGGTTGTTCTCT
GLAST	CTCTACGAGGCTTTGGCTGC	GAGGCGGTCCAGAAACCAGTC
Glt-1	GCAGCCATCTTCATAGCCCAAATG	CTCATTCTATCCAGCAGCCAGTCC
GS	GTGTGTGGAAGAGTTACCTGAGTGG	ATGTGCCTCAAGTTGGTCTCTGC
IFN-β	CTTCTCCACCACAGCCCTCTCC	CCACCCAGTGCTGGAATTG
IL-1β	TTTTTGTGTTTCATCTCGGAGCCTGTAG	GAGCACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACCATAGC	GGAGAGCATTGGAAATTGGGGTAGG
iNOS	TTGCCACGGACGAGACGGATAGG	GGGGTTGTTGCTGAACTTCCAGTC
Nestin	CTGGAAGGTGGGCAGCAACT	ATTAGGCAAGGGGGAAGAGAAGGTG
Olig2	GGCGGTGGCTTCAAGTCATC	TAGTTTCGCGCCAGCAGCAG
S100b	GGTTGCCCTCATTGATGTCTTCCAC	CTTCCTGCTCCTTGATTTCTCCAG
TLR2	CCTCCGTCTTGGAAATGTCACCAGG	GAGCCACGCCACATCATTC
TLR3	GCCCCCTTTGAACTCCTCTTC	AGATCCTCCAGCCCTCGATG
TNF-α	TAGCAAACCACCAAGTGGAGGAG	GCAGCCTTGTCCTTGAAGAGAA

Aldh1l1: Aldehid dehidrojenaz 1 ailesi, üye L1; Aqp4: Aquaporin 4; Blbp: Beyin lipid bağlama proteini; Cox-2: Siklooksijenaz 2; GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz; Glt-1: glial glutamat transporter-1; GS: Glutamin sentetaz; IFN-β: interferon-beta; IL-1β: interlökin-1 Beta; IL-6: interlökin-6; iNOS: İndüklenebilen nitrik oksit sentaz; Olig2: oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2; S100b: S100 kalsiyum bağlayıcı protein B; TLR2: Toll benzeri reseptör 2; TLR3: Toll benzeri reseptör 3; TNF-α: Tümör nekroz faktörü alfa

Tablo 2: İmmunfloresan boyamalarda kullanılan antikorlar

Antikor	Seyreltme oranı	Katalog no	Marka
Aqp4	1:500	Sc-20812	Santa Cruz Biotechnology
GFAP	1:1000	556330	BD Biosciences
Nestin	1:500	MAB353	Millipore
NF-κB p65	1:200	Sc-372	Santa Cruz Biotechnology
S100b	1:1000	52532	Sigma-Aldrich
Sox2	1:100	651902	Covance

3.6.7. NF-κB aktivasyonunun belirlenmesi

Hücreler IL-1β (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) ve IFN-γ (20 ng/ml) ve ayrıca bu 3 sitokin kombinasyonu (Complete Cytokine Mix; CCM) ile uyarıldı. 30 dk'lık uyarımın ardından hücreler %4 paraformaldehit ile fiske edildi. Fikse edilen hücreler %0,1 Triton X-100 ile permeabilize edilip %10 FBS ile blokladı. Ardından hücreler NF-κB p65 (Santa Cruz, ABD) antikoruyla ve ardından Alexa Fluor-555 işaretli sekonder antikor ile işaretlendi. Hücrelerin görüntüsü Cellomics ArrayScan sayesinde yüksek çözünürlüklü CCD kamera ile alındı ve Hoescht-33342 ile yapılan nükleer boyamayla karşılaştırılarak odaklama yapıldı. Yapılan incelemede NF-κB aktivasyonu "nükleer translokasyon" algoritmasına göre belirlendi [76].

3.6.8. Griess Yöntemiyle Nitrit Konsantrasyonu Ölçülmesi

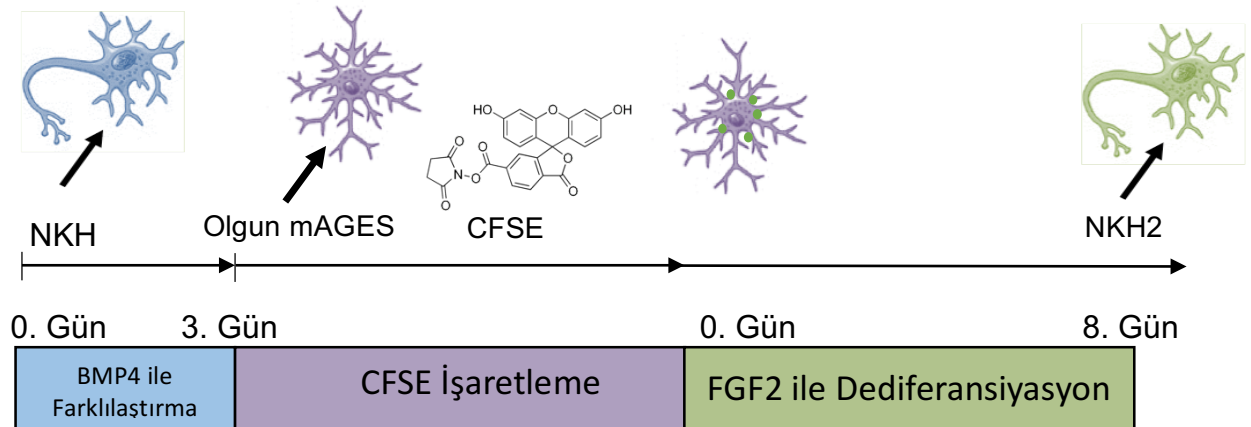
İnflamatuvar uyarım sonucu hücre kültür ortamına salınan NO miktarı Griess yöntemine göre belirlendi. 96-kuyulu plaklarda uyarım sonucunda hücre kültür ortamı toplandı ve analiz için kullanıldı. Örneklerde bulunan NO konsantrasyonunun belirlenmesi için Sodyum Nitrit'in (NaNO₂) değişik konsantrasyonlarıyla (0-10 µM) hazırlanan standart eğrisi kullanıldı. Örnekler ve standartlardan 100'er µl kuyucuklara eklendi ve üzerilerine 25 µl Sulfanilamid (6,25 mM)-HCL (3M) karışımı eklenerek 560nm dalga boyunda arkaplan absorbans değerleri ölçüldü. Ardından kuyulara 12,5 µl N(l-naftil) etilen diamin dihidroklorür (NEDA; 12,5 mM) eklenerek 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek konsantrasyonlar belirlendi.

3.6.9. Resazurin indirgenmesi ile hücre miktarının belirlenmesi

Hücre miktarının belirlenmesi amacıyla Resazurin indirgenmesi yöntemi kullanıldı. Resazurin normalde floresan olmayan bir madde iken hücre içindeki dehidrojenaz enzimleri tarafından yıkılarak floresan ışımaya verebilen Rezorufin'e dönüştürülmektedir. Bu bağlamda inkübasyonu biten hücreler üzerine son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde resazurin eklendi. Hücre kültür kabı 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve 530 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalgaboylarında floresan yoğunlukları ölçüldü. Sonuçlar kontrole oranlanarak hesaplandı.

3.6.10. Hücre proliferasyonunun izlenmesi (Cell Tracking)

Prolifere olmayan mAGES hücrelerinin tekrar proliferasyon kapasitesinin kuantitatif olarak göstermek için CFSE (5-(ve 6)-Karboksifloresin diasetat suksinimidil ester) işaretlemesi yapıldı. Diferansiyel mAGES hücreleri PBS içindeki 10 µM CFSE ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretlendi ve bağlanmayan CFSE ortam ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından hücreler 1-10 gün arasında FGF ile inkübe edildi ve deney sonunda hücreler Hoechst H-33342 ile boyanarak yüksek çözümlü hücre analiz sisteminde (High Content Screening, CellInsight CX5, Thermo Scientific, Schwerte, Almanya) analiz edildi. Hücre başına elde edilen total CFSE miktarındaki azalmalara göre hücrelerin kaç kez bölündüğü hesaplandı.



Şekil 2: CFSE işaretlemesi ile proliferasyon analizinin şematik gösterimi

3.6.11. Canlı hücre Görüntüleme

mAGES hücrelerinin dediferansiyasyonu canlı hücre görüntüleme sistemiyle (Zeiss cell observer) 37°C'de ve %5 CO₂ içeren koşullarda izlendi. Bu amaçla hücreler FGF2 muamelesinin 3. gününde mikroskopa yerleştirildi ve kültür kabında sabit alanlar belirlendi. Bu alanlar 20X büyütmede her 15dk'da 8 gün boyunca AxioCamHRm kamera sistemiyle görüntülendi. Hücrelerin kültür ortamındaki hareketleri ve proliferatif davranışları video halinde kaydedildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın takvimi şu şekildedir:

	Temmuz- Aralık 2014	Ocak- Haziran 2015	Temmuz- Aralık 2015	Ocak- Haziran 2016	Temmuz- Aralık 2016	Ocak- Haziran 2017
CGR8 Hücrelerinin farklılaştırılması						
NKH farklılaştırılması						
mAGES Karakterizasyonu						
mAGES Dediferansiyasyonu						
Canlı Hücre Görüntüleme						
Literatür Okuma						
Tez yazımı						

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veri analizleri Graphpad Prism'in 7.01 versiyonu ile yapıldı. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Mann Withney U testi kullanılarak gerçekleştirildi. p değeri 0,05 ten küçük olan analizler istatistiksel anlamlı olarak ifade edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın tek sınırlılığı sadece kök hücreden elde edilen astrositlerde gerçekleştirilmiş olmasıdır. Daha geçerli ve kapsamlı bir çalışma olması için primer astrosit üzerinde de deneylerin yapılması gerekmektedir. Ancak primer kültürdeki saflık problem veya astrositlerin izolasyon sırasında aktive olmaları sorun yaratmaktadır (Bkz. Kısım 2.6). Bu ve yukarıda sayılan benzer sebepler çalışmanın sınırlılığı olmaktan çıkmaktadır. Ayrıca kullanılan *in vitro* model hayvan kullanımına alternatif olacak bir modeldir. Kök hücreden üretilen hücrenin fareden elde edilen primer astrosit hattına denk olması daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [92].

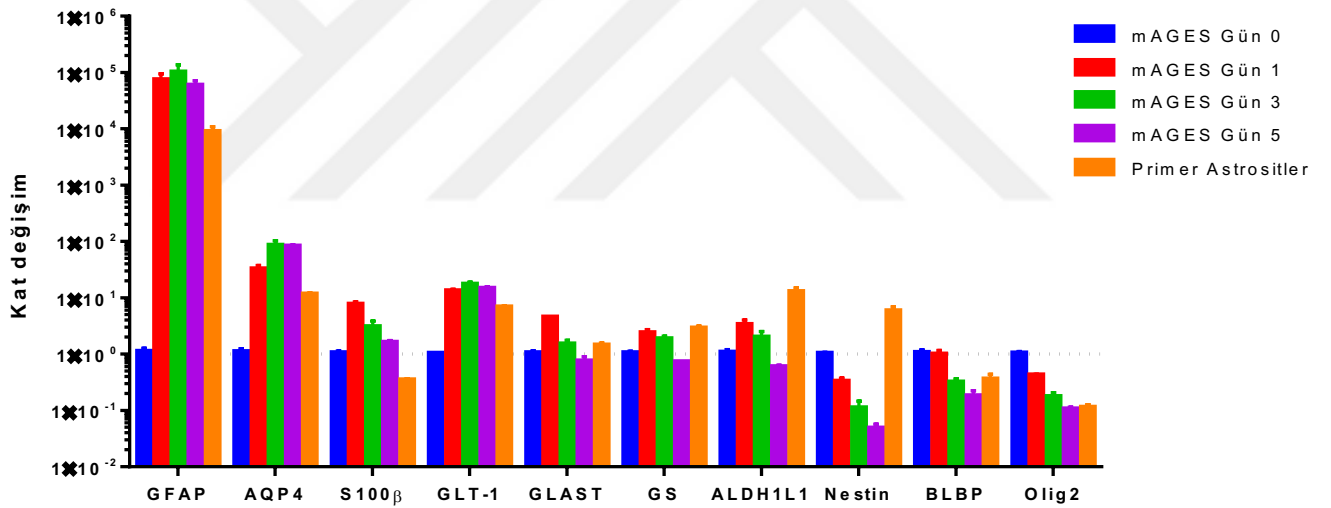
3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma DEÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu tarafından 3055-GOA protokol ve 2016/32-09 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

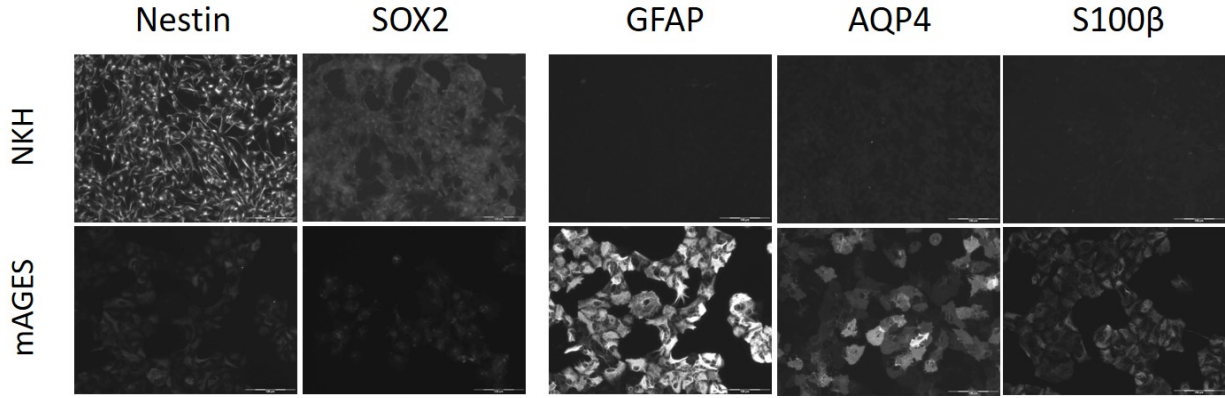
4.1. mAGES Hücrelerinde Astrosit ve NKH Belirteç Proteinlerinin Ekspresyonu

NKH'den mAGES farklılaştırılması sırasında NKH ve astrosit belirteçlerinin mRNA ve protein düzeyleri değişik zaman noktalarında incelendi. mRNA analizi için 0, 1, 3 ve 5. günlerde RNA izolasyonu için örnekler toplandı ve pozitif kontrol olarak primer astrosit RNA'sı kullanıldı. Astrosit belirteci olarak GFAP, AQP4, S100 β , GLT-1, GLAST, GS ve ALDH1L1 ile NKH belirteci olarak Nestin, BLBP ve Olig2 mRNA'ları incelendi. mAGES hücreleri farklılaşmasında NKH belirteçlerinin mRNA düzeyleri azalırken astrosit belirteç düzeyleri artmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: NKH ve mAGES hücrelerinde astrosit ve NKH belirteç mRNA düzeylerinin zamana bağlı değişimi

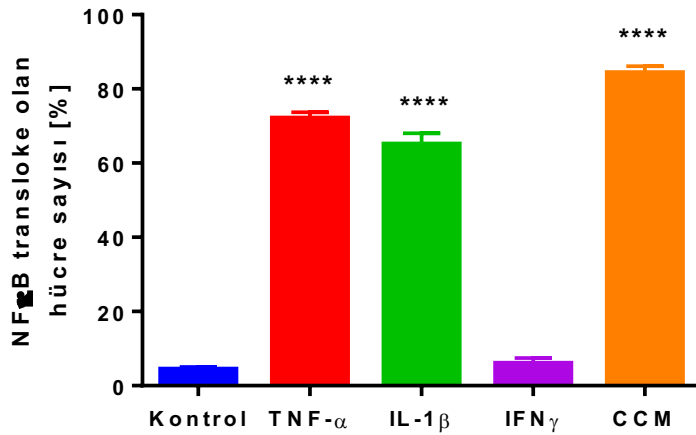
NKH ve Astrosit belirteçlerinin protein düzeyinde incelemek için hücreler farklılaşmanın 5. gününde fikse edildi ve Astrosit belirteci olarak GFAP, AQP4 ve S100 β ile NKH belirteci olarak Nestin ve SOX2 proteinleri boyandı. mAGES hücreleri farklılaşmasında NKH belirteçlerinin protein düzeyleri azalırken astrosit belirteç düzeyleri artmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4: NKH ve mAGES hücrelerinde astrosit ve NKH belirteç proteinlerinin immunfloresan boyama ile gösterimi

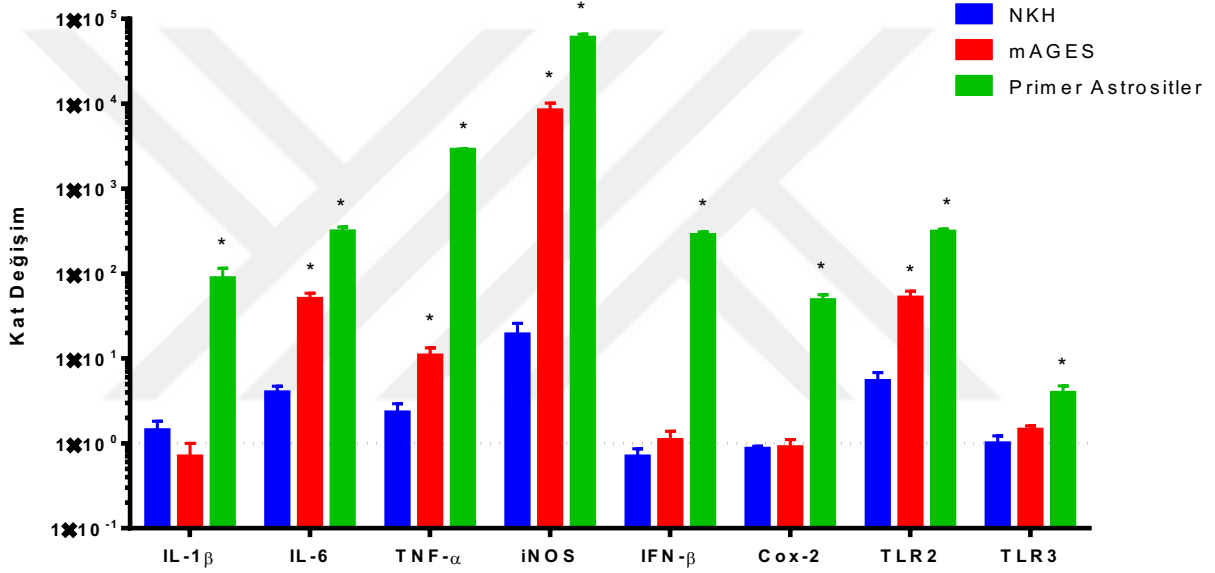
4.2. mAGES Hücrelerinin İnflamatuvar Karakterizasyonu

mAGES Hücrelerinin fonksiyonel karakterizasyonu için NF κ B nükleer translokasyonu, proinflamatuvar mRNA düzeyleri ve nitrit sekresyonları incelendi. NF κ B nükleer translokasyonu için hücreler IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ ve ayrıca bu 3 sitokin kombinasyonu (Complete Cytokine Mix; CCM) ile uyarıldı. NF κ B translokasyonu olan hücrelerin oranı toplam hücre sayısına oranlanarak hesaplandı. Uyarım sonucunda mAGES hücrelerinin yaklaşık %80'inde NF κ B translokasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 5).



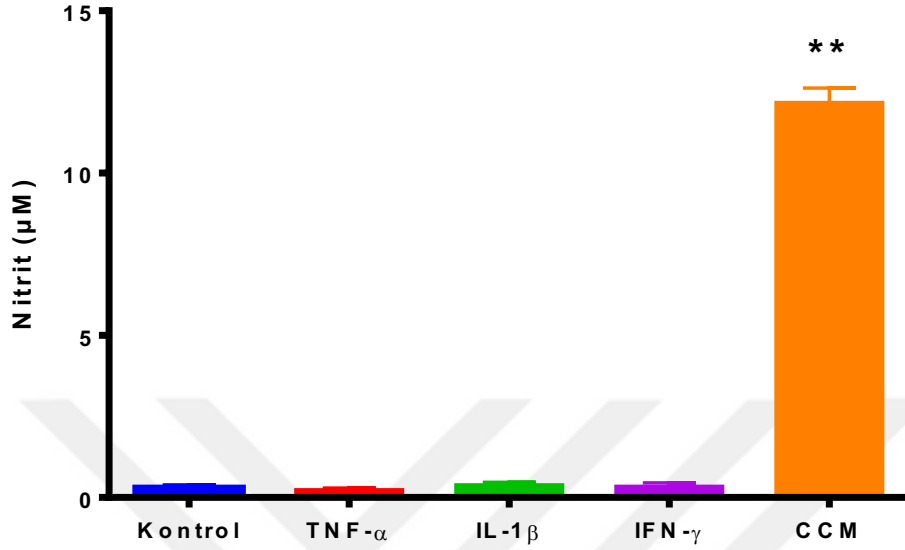
Şekil 5: mAGES Hücrelerinde inflamatuvar uyarımlarla NF κ B nükleer translokasyonu

mAGES hücrelerinde proinflamatuvar mRNA'ların düzeylerinin belirlenmesi için farklılaştırılmış hücreler 4 saat boyunca CCM ile uyarıldı ve RNA izolasyonu yapılarak IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, Interferon-beta (IFN- β), Cox-2, TLR2 ve TLR3 mRNA'ları amplifiye edildi. Uyarım sonucunda mAGES hücrelerinin primer astrositlere benzer bir patternde pro-inflamatuvar yanıt verdiği belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6: NKH, mAGES ve Primer astrositlerde CCM ile uyarım sonucu pro-inflamatuvar belirteç mRNA'larının değişimi

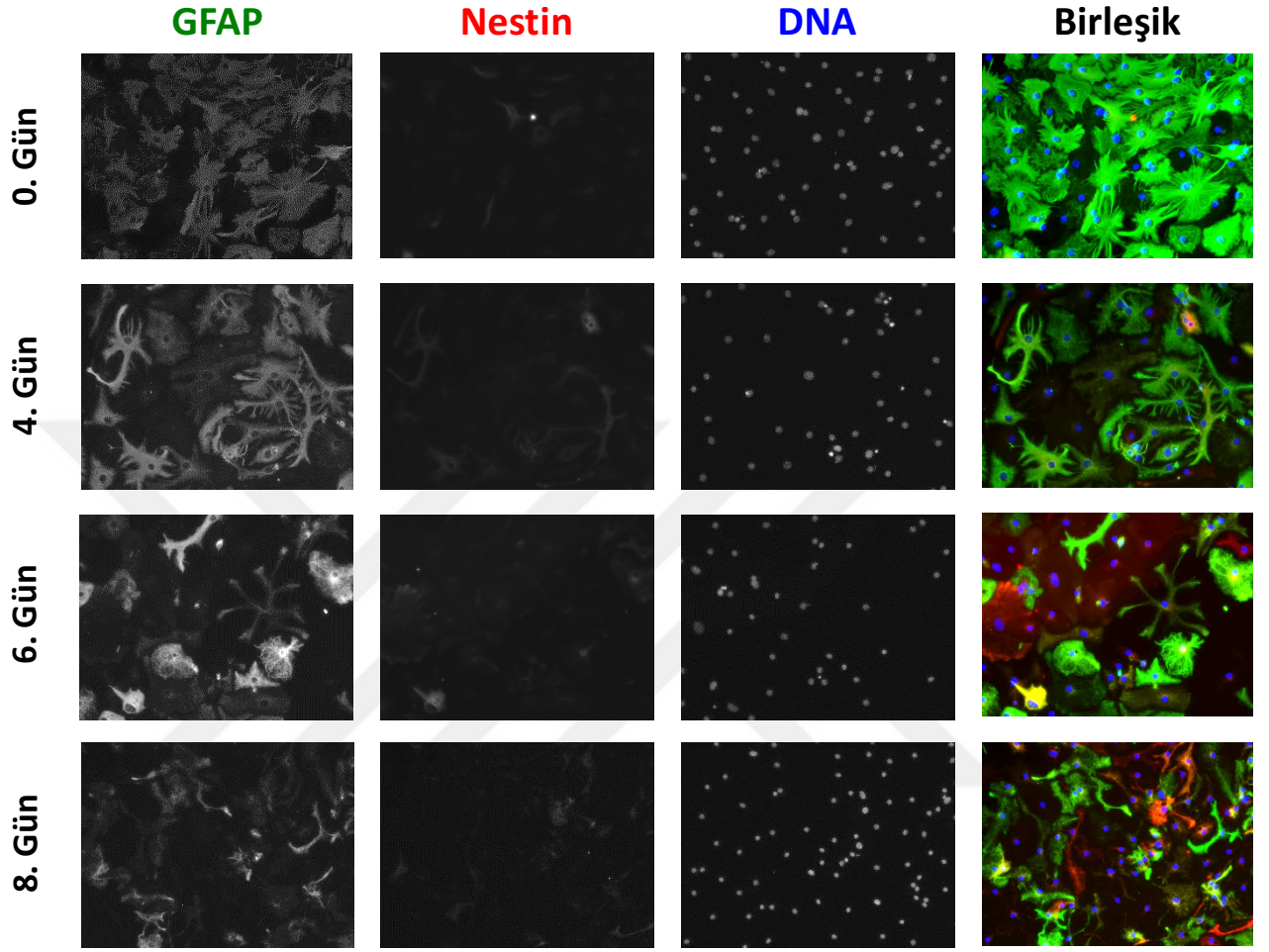
İnflamatuvar yanıtların değerlendirilmesi amacıyla inflamatuvar uyarım sonucu hücre kültür ortamına salınan Nitrit (NO $_2^-$) konsantrasyonu Griess yöntemiyle ölçüldü. Farklılaştırılan mAGES hücreleri IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ ve ayrıca bu 3 sitokin kombinasyonu (CCM) ile 72 saat inkübe edildi ve hücre kültür ortamı toplanarak NO $_2^-$ belirlendi. Ölçüm sonucuna göre hücrelerin sadece CCM ile uyarım sonucunda NO $_2^-$ salgıladıkları belirlendi (Şekil 7).



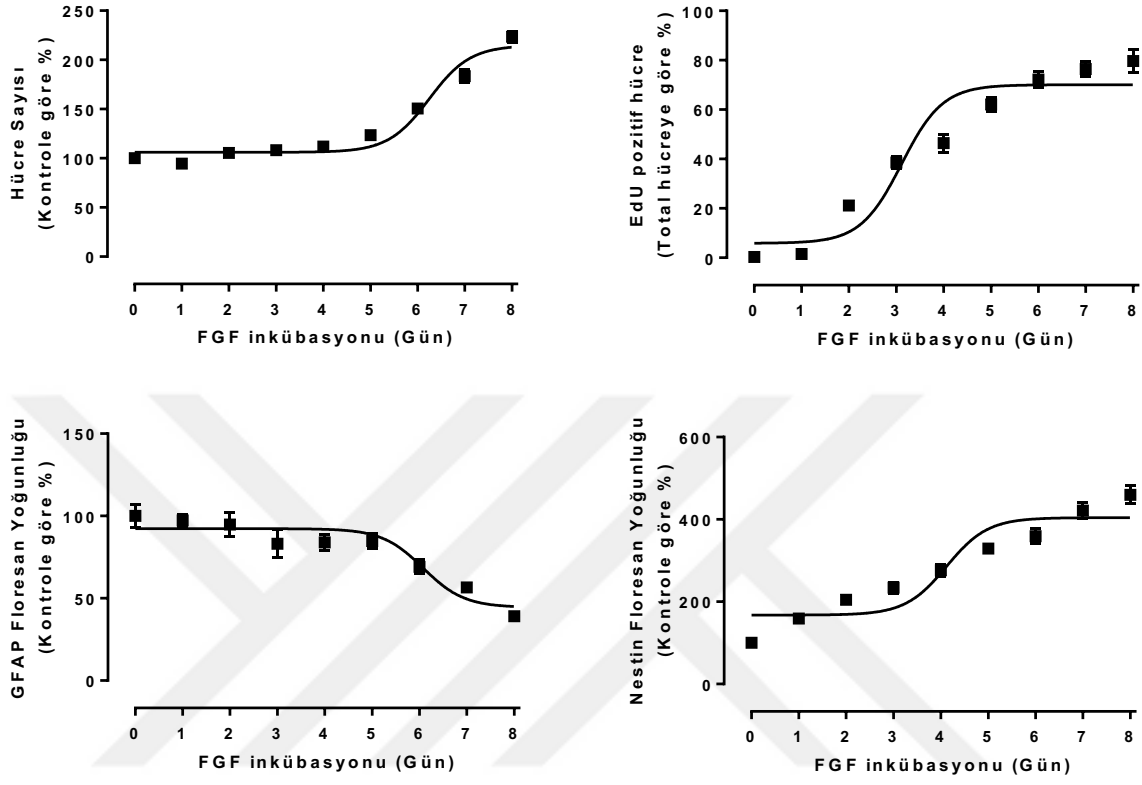
Şekil 7: mAGES'da inflamatuvar uyarım sonucunda Nitrit (NO_2^-) salınımı

4.3. mAGES Hücrelerinin Dediferansiyasyon Kapasitesi

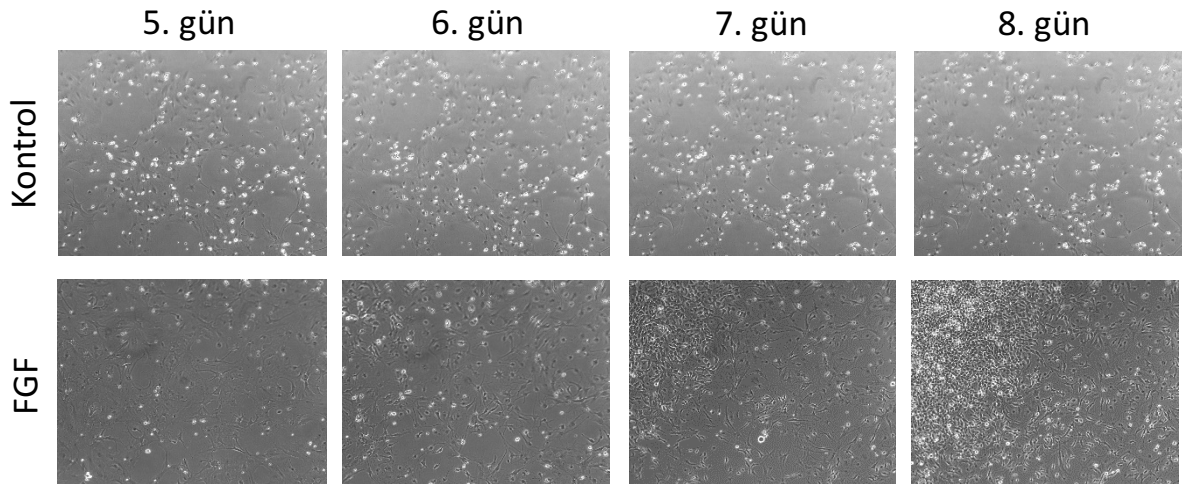
mAGES hücrelerinin dediferansiyasyon kapasitesini incelemek üzere hücreler 20 ng/ml FGF ile 8 güne kadar inkübe edildi. Bu süre boyunca hücrelerdeki GFAP ve Nestin düzeyleri immunfloresan boyama yöntemiyle incelendi. Elde ettiğimiz görüntülere göre GFAP protein düzeyleri zamanla azalırken Nestin ile boyanan hücre sayısı artmaktadır (Şekil 8 ve 9). Ayrıca normalde hücre döngüsünden çıkan bu hücreler tek hücre döngüsüne girerek proliferere olmaya başlamışlardır (Şekil 9). Canlı hücre görüntüleme deneylerimizde de FGF ile uyarılan hücrelerde proliferasyonun meydana geldiği, ancak normal koşullarda hücrelerin bölünmediği gösterilmiştir (Şekil 10).



Şekil 8: FGF ile uyarım sonucu Astrosit ve NKH belirteçlerinin immunfloresan boyama ile gösterilmesi

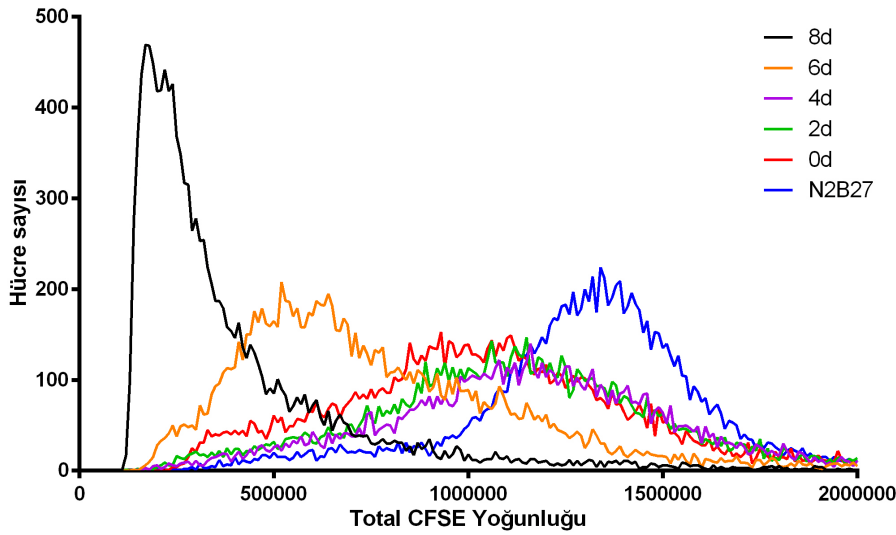


Şekil 9: FGF2 ile dediferansiyasyonda hücre proliferasyonu ve astrosit-NKH belirteçlerinin zamana bağlı değişimi

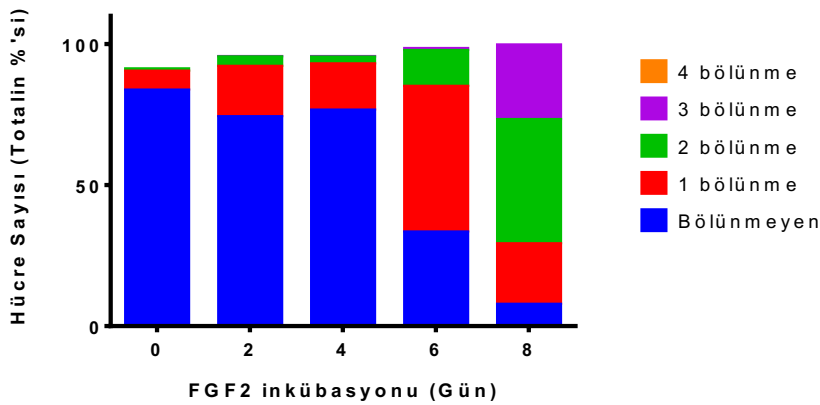


Şekil 10: Canlı hücre görüntüleme yöntemiyle dediferansiyasyon sırasında proliferasyonun değişik zaman noktalarındaki görüntüleri

mAGES dediferansiyasyonunda proliferen olan hücrelerin kökenini belirlemek amacıyla ve hücrelerin kaç kez bölünerek proliferen olduğunu göstermek amacıyla CFSE ile işaretlenen hücreler değişik sürelerde FGF ile inkübe edildi ve inkübasyon sonunda hücrelerdeki toplam CFSE yoğunluğu ölçüldü. CFSE yoğunluğundaki azalma hücrelerin mitoz bölünme geçirdiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuca göre 8. güne doğru CFSE yoğunluğu iyice azalmış (Şekil 11) ve hücrelerin 1'den fazla kez bölünme geçirerek proliferen olduğu saptanmıştır (Şekil 12).

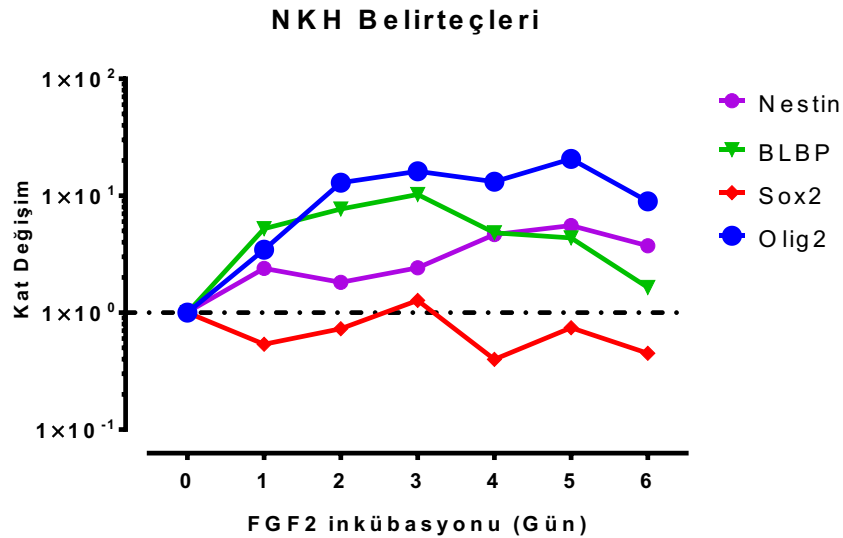
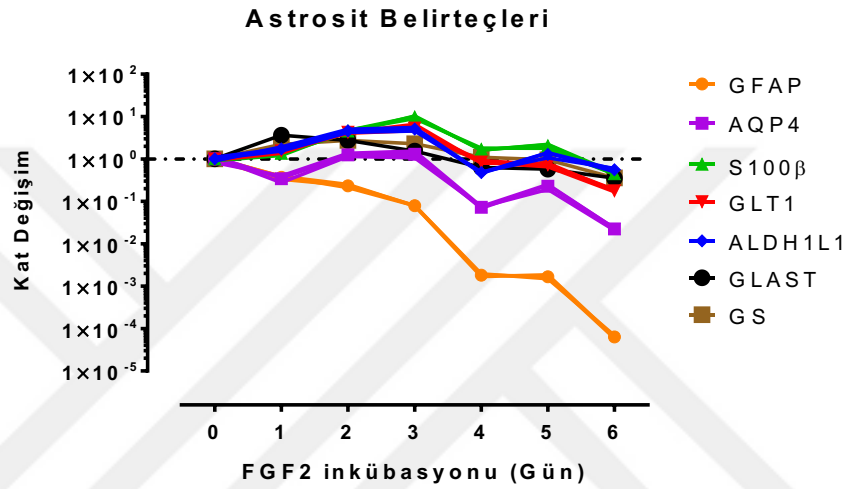


Şekil 11: CFSE ile işaretli mAGES hücrelerinin FGF ile değişik zamanlarda inkübasyonu sonucu elde edilen CFSE yoğunluk histogramları



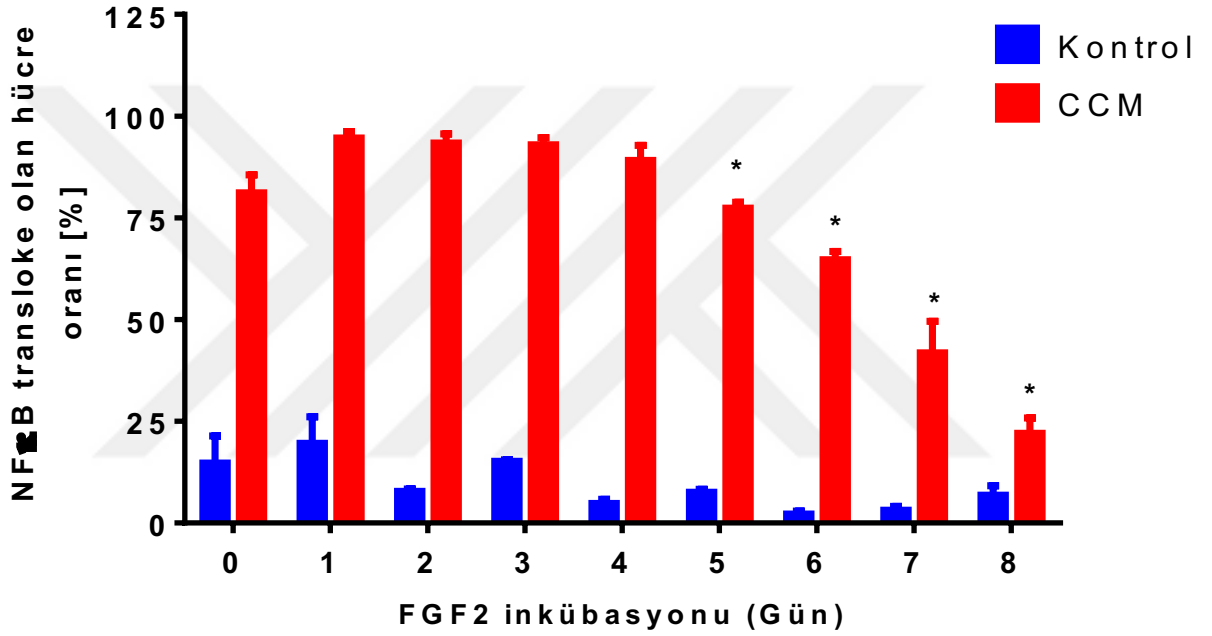
Şekil 12: CFSE yoğunluğuna göre hesaplanan hücre bölünme sayıları

Tüm bunlarla birlikte astrosit belirteçlerinden GFAP, AQP4, S100 β , GLT1, ALDH1L1, GLAST ve GS ile NKH belirteçlerinden Nestin, BLBP, Sox2 ve Olig2'nin mRNA düzeyleri qPCR ile incelendi. FGF ile inkübe edilen hücrelerde zamana bağlı olarak astrosit belirteçleri azalırken NKH belirteçlerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13: Astrosit ve NKH belirteçlerinin mRNA düzeylerinin dediferansiyasyon sırasında zamana bağlı değişii

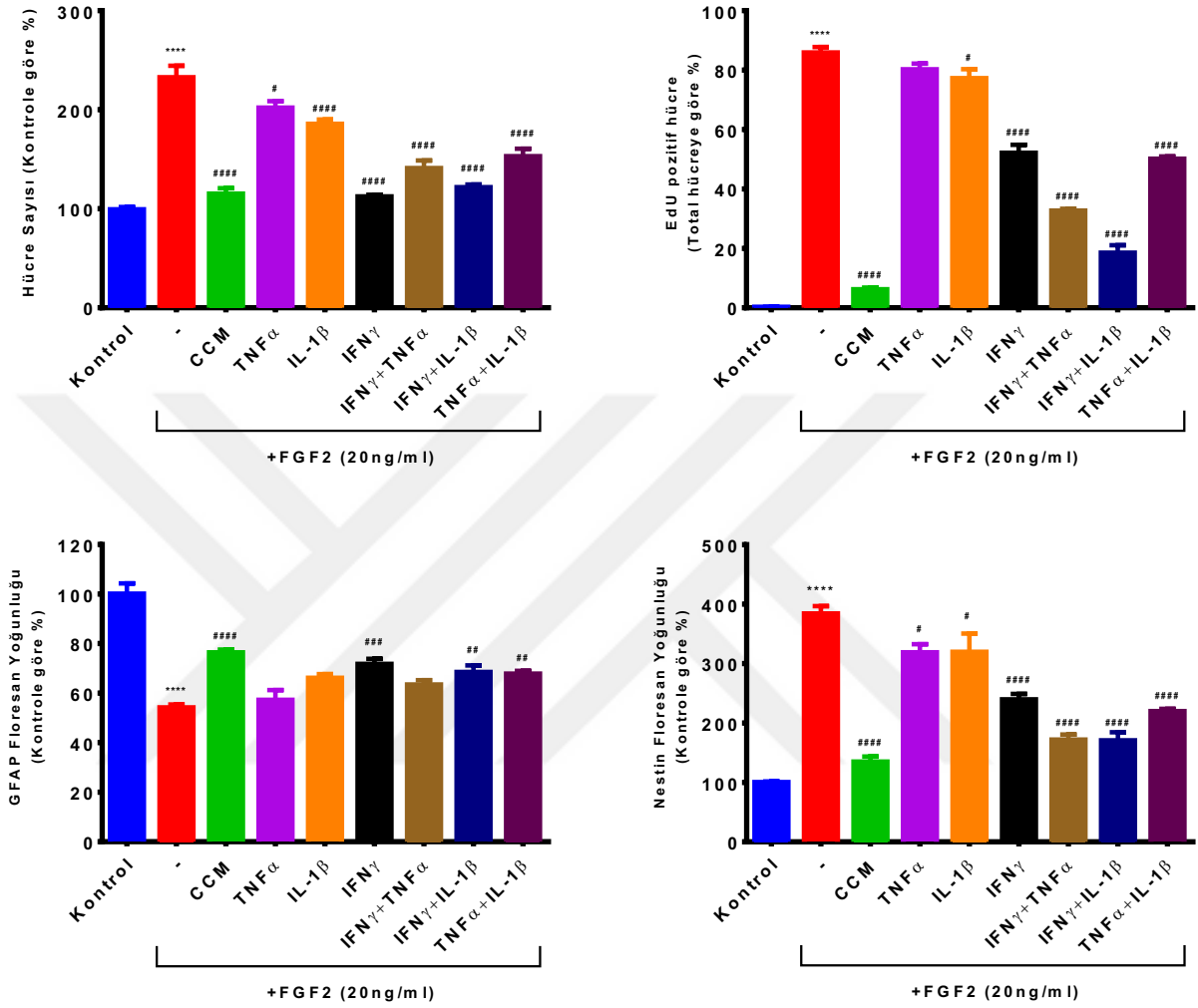
mAGES dediferansiyasyonu sırasında hücrelerin inflamatuvar özellikleri azalmaktadır. Bu durumu NFκB translokasyonunun ölçülmesi ile belirledik. 8 güne kadar FGF ile dediferansiye olan mAGES hücreleri CCM ile 30 dk boyunca uyarılarak NFκB translokasyon protokolü uygulandı. Elde ettiğimiz sonuca göre dediferansiyasyonun 5. gününden itibaren NFκB translokasyon yanıtları azalmaktadır (Şekil 14).



Şekil 14: Dediferansiyasyon sırasında NFκB nükleer translokasyon yanıtının değişimi

4.4. Reaktif Astrositlerde mAGES Dediferansiyasyonu

mAGES hücrelerinin inflamatuvar uyarılar ve bunların değişik kombinasyonlarıyla dediferansiyasyonun nasıl etkilendiği resazurin indirgenmesi, EdU, GFAP ve Nestin boyamalarıyla incelendi. Sitokinlerin tek uygulanmaları dediferansiyasyonu az miktarda baskılarken kombinasyonlarının additif etki gösterdiği belirlendi (Şekil 15). Ayrıca CCM ile uyarım ve IFN-γ uyarımı aynı oranlarda baskılamıştır. Bu bulguya göre baskılayıcı etkide temel rolü olan sitokinin IFN-γ olduğunu düşünerek sinyal mekanizması araştırıldı.

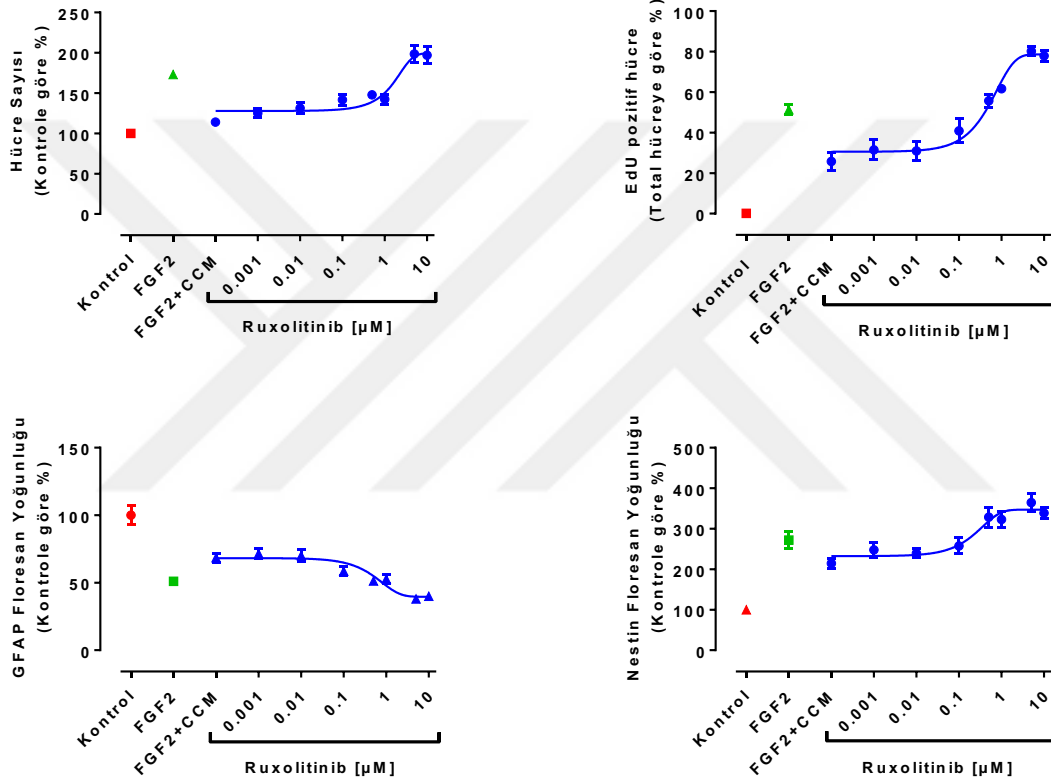


Şekil 15: İnflamatuar uyarıların mAGES Dediferansiyasyonuna etkileri

4.5. STAT1 sinyallemesinin astrosit dediferansiyasyonundaki rolü

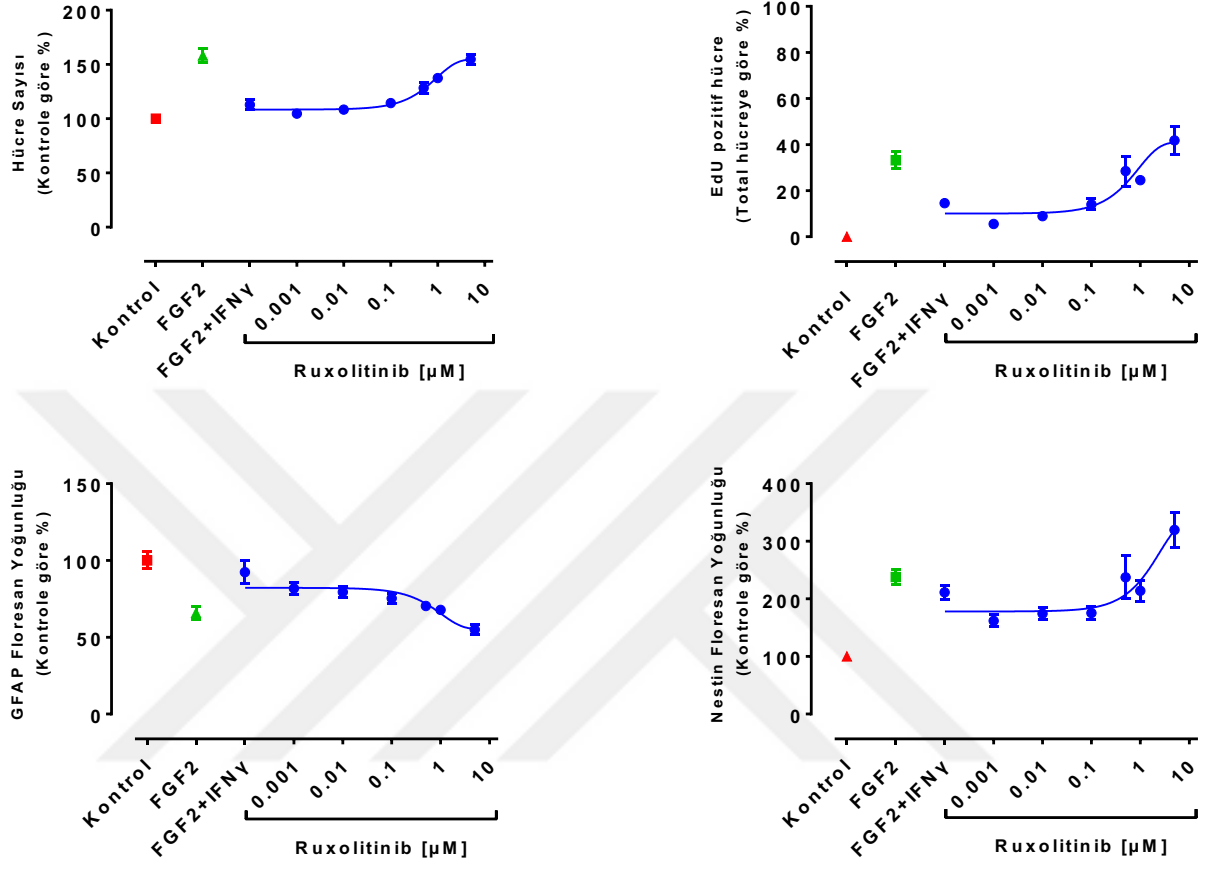
Astrosit dediferansiyasyonunda inhibitör etkinin IFN- γ kaynaklı olduğu düşünüldüğünden etki mekanizmasının STAT1 aracılığıyla olup olmadığını belirlemek için JAK1/2 inhibitör molekülü olan Ruxolitinib (1 nM-10 μ M) ile interferon sinyal yolağını baskıladık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre CCM uyarımı sonucu 8 gün boyunca FGF2 ile indüklenen proliferasyon ve Nestin ekspresyonu azalmış, azalan GFAP ekspresyonu ise

artmıştır. Ancak Ruxolitinib kullandığımızda hücreler tekrar proliferasyon olmuş, Nestin ekspresyonu artmış ve GFAP ekspresyonu azalmıştır (Şekil 16).



Şekil 16: Ruxolitinib'in CCM ile baskılanan astrosit dediferansiyasyonuna etkisi

Ayrıca, IFN- γ uyarımı sonucu 8 gün boyunca FGF2 ile indüklenen proliferasyon ve Nestin ekspresyonu azalmış, FGF2 muamelesi ile azalan GFAP ekspresyonu ise artmıştır. Ancak Ruxolitinib eklediğimizde hücreler tekrar proliferasyon olmuş, Nestin ekspresyonu artmış ve GFAP ekspresyonu azalmıştır (Şekil 17).



Şekil 17:Ruxolitinib'in IFN- γ ile baskılanan astrosit dediferansiyasyonuna etkisi

5. TARTIŞMA

Post-mitotik astrositler yalnızca belirli durumlarda yeniden hücre döngüsüne girerek proliferere olmaktadır [12, 24]. Ancak astrositlerin dediferansiyasyonu ve nörona yeniden farklılaşması genetik olarak yeniden programlanmayı veya *in vitro* modellemesi çok zor olan patolojik koşulları gerektirmektedir. *In vitro* nörosfer modeli çalışmalarında nörojenik hücrelerin ortaya çıkışının lezyon bölgesindeki astrositlerin direk dönüşümünden ziyade kök hücrelerin lezyon bölgesine göç etmesi sonucu olabileceği ortaya konmuştur [12, 17, 93-95]. Bizim çalışmamız ise astrosit dediferansiyasyonunun farzedilen mekanizması ve özelliklerinin tanımlanmasında karşılaşılan zorlukları ortadan kaldırmaktadır. Bu yüzden moleküler biyolojik ve gen mühendisliği yaklaşımlarını kullanmadan olgun astrositlerde hücre döngüsüne yeniden girişini kanıtlayabileceğimiz farklı bir deneysel yaklaşım kullanıldı. mAGES astrosit kültürlerindeki yüksek orandaki homojenite; hücre tipi, fonksiyonu ve plastisitesindeki değişiklikleri uzun zaman diliminde kantitasyona minimal düzeydeki karışıklık ile olanak sağlamaktadır. mAGES hücrelerinden FGF2'ye maruz bırakılarak dediferansiye edilen nörojenik NKH benzeri NKH2 hücreleri kendilerini yenileme, fenotip, proliferasyon özellikleri ve bipotent farklılaşma kapasitesine sahiptir. Özellikle mAGES hücre kültüründe pasajlama işlemi gerekmez sadece ortam değiştirilerek nöronlara farklılaştırılabilmektedir [92]. Bu şekildeki bir dönüşümde transdiferansiyasyon olmadan iki basamaklı bir farklılaşma olmaktadır: i) mAGES hücreleri NKH2'ye dediferansiye olmakta (8 gün, FGF2 ile) ve ii) NKH2 hücreleri nörona farklılaştırılmaktadır (14 gün).

Primer hücre veya diğer karmaşık hücre kültür sistemlerinde dediferansiyasyonun en temel sorunu mevcut kök hücre popülasyonunun dışlanamamasıdır. mAGES hücrelerinin tamamen karakterize edilmiş olmalarına rağmen [92], astrositlerinin tümünün NKH2'ye farklılaşmasının doğrudan kanıtlanabilmesi oldukça önem taşımaktadır. CFSE seyrelmesiyle hücre bölünmesi analizi ve canlı hücre görüntüleme yöntemleri direkt olarak hücre bölünmelerini ölçerek yaklaşık %90 oranında hücrenin deney yapılan zaman aralığında yeniden hücre döngüsüne girdiğini gösterdi. Bu denli yüksek bir oran NKH2

oluşumunda düşük bir oranda mAGES hücre grubunun dışlanabilirliğini ve uygun koşullar sağlandığında yüksek verimle astrositlerin dediferansiye olduğunu göstermektedir. Literatürle kıyasladığımızda ise Sirko ve ark. tarafından 2013 yılında yayınlanan çalışmada kesici-delici alet yaralanması modelinde fare beyinlerinden izole edilen astrositlerin yalnızca %22,5'i nörosfer oluşturabilmiştir [12].

Bazı çalışmalarda ise astrositlerde proliferasyonun uyarılması için EGF'nin gerekli olduğu belirtilmiştir [6, 7]. Ancak mAGES hücrelerinde fonksiyonel EGF reseptörü bulunmasına rağmen bizim çalışmamızda sadece FGF2 uygulaması dediferansiyasyonu indüklemiştir. Ayrıca primer astrositlerle yapılan çalışmalarda FGF2 inkübasyonu ile hücrelerin tekrar hücre döngüsüne girerek proliferere olduğu gösterilmiştir [8-10]. Çalışmalar arasındaki bu şekildeki uyumsuzluklar hücrelerin olgunluk düzeyine göre farklı sinyalleme sistemlerinin aktive olmasından kaynaklanabilmektedir. Bu bağlamda EGF'nin daha az farklılaşmış hücrelerde, primer astrosit kültüründeki bazı alt popülasyonlarda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular FGF2'nin sinir sistemi gelişimi [96] ve akut MSS hasarlarındaki rolleriyle [13] uyumludur. FGF2 kök hücrelerde NKH proliferasyonunu uyarmakta ve travmatik hasar veya iskemi sonrası rejenerasyonu iletmektedir [13, 97, 98]. Akut nörotravma vakalarında artmış olan FGF2 bu durumlarda görülen astrosit proliferasyonu ile koreledir ancak Parkinson hastalığı gibi kronik nörodejeneratif hastalıklarda FGF2 düzeylerinin düşük olması [99] dolayısıyla astrositler proliferere olamamaktadır [12].

mAGES kullanımına alternatif olarak tam olarak farklılaşmış saf astrosit popülasyonu elde etmek için uygulanacak yöntem akım sitometrik hücre dizilemedir (örn. Aqp4/GLT-1 pozitif hücreler). Fakat bu işlem serum maruziyeti (beyin hücreleri için fizyolojik olmayan bir durum) ve astrositlerin tripsin muamesiyle kültür kabından kaldırılmasını içermektedir. Bu işlemler astrositleri aktive etmekte ve hücre karakteristiklerini değiştirmektedir [1, 21, 100]. Çalışmamızın bulguları yukarıda saydığımız dış etkenlerin

örneği olarak patolojik olarak etkili maddelerin dediferansiyasyonu baskılayıcı etkisini göstermiş ve bunlardan IFN γ 'nın rolünü başarıyla saptayarak istenmeyen etkilerini doğrulamıştır. IFN γ ve CCM, STAT1 yolağını aktive ederek dediferansiyasyonu baskılamakta ve JAK/STAT yolağı inhibitörü Ruxolitinib ise bu etkiyi baskılayarak FGF ile indüklenmiş proliferasyonu devam ettirmektedir. Ancak STAT1 ve FGF2 sinyallemleri arasındaki moleküler bağlantıların ortaya çıkarılması gerekmektedir. Astrosit dediferansiyasyonu; yalnızca *in vivo* infiltre olan hücreler [81, 101] veya mikroglia [102, 103] tarafından üretilen sitokin IFN γ tarafından değil, mikroglia tarafından yüksek miktarda salgılanan pro-inflamatuar moleküllerden TNF ve IL-1 [76-80] tarafından da inhibe edilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda astrositlerin, yeni nöronlara farklılaşma kapasitesine sahip NKH'lere dönüşmesi sırasında immün yanıtın süreci nasıl etkilediği ve bu etkiyi hangi yolak üzerinden gösterdiği ortaya çıkarıldı. Çalışmamızda geliştirdiğimiz sistem, bulgularımız ışığında yeni hedeflerin tanımlanmasına ve MSS patolojilerinde astrositlerin nöronlara dönüştürülmesi için yeni ilaç adaylarının taranmasını kolaylaştıracak ve daha sonra *in vivo* etkinlik denemelerine ön bilgi sağlayacaktır.

Ayrıca dediferansiyasyonun IFN γ ile inhibe edilmesi mekanizmasının Ruxolitinib ile geri dönüşümünde FGF2 yolağı ile JAK/STAT yolağı arasındaki moleküler etkileşimlerin açığa çıkarılması yeni ilaç hedeflerini ortaya çıkaracaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Sofroniew, M.V. ve Vinters, H.V., *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. 119(1): p. 7-35.
2. Horner, P.J.; Power, A.E.; Kempermann, G.; Kuhn, H.G.; Palmer, T.D.; Winkler, J.; ve ark., *Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord*. J Neurosci, 2000. 20(6): p. 2218-28.
3. Zhang, L.; Yin, J.C.; Yeh, H.; Ma, N.X.; Lee, G.; Chen, X.A.; ve ark., *Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons*. Cell Stem Cell, 2015. 17(6): p. 735-47.
4. Rathbone, M.P.; Middlemiss, P.J.; Kim, J.K.; Gysbers, J.W.; DeForge, S.P.; Smith, R.W.; ve ark., *Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells*. Neurosci Res, 1992. 13(1): p. 1-17.
5. Franke, H.; Krugel, U. ve Illes, P., *P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo*. Glia, 1999. 28(3): p. 190-200.
6. Nakatsuji, Y. ve Miller, R.H., *Density dependent modulation of cell cycle protein expression in astrocytes*. J Neurosci Res, 2001. 66(3): p. 487-96.
7. Mayer, S.I.; Rossler, O.G.; Endo, T.; Charnay, P. ve Thiel, G., *Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 18): p. 3340-50.
8. Neary, J.T.; Kang, Y. ve Shi, Y.F., *Cell cycle regulation of astrocytes by extracellular nucleotides and fibroblast growth factor-2*. Purinergic Signal, 2005. 1(4): p. 329-36.
9. Hou, Y.J.; Yu, A.C.; Garcia, J.M.; Aotaki-Keen, A.; Lee, Y.L.; Eng, L.F.; ve ark., *Astrogliosis in culture. IV. Effects of basic fibroblast growth factor*. J Neurosci Res, 1995. 40(3): p. 359-70.
10. Eclancher, F.; Kehrl, P.; Labourdette, G. ve Sensenbrenner, M., *Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain*. Brain Res, 1996. 737(1-2): p. 201-14.

11. Pitter, K.L.; Tamagno, I.; Feng, X.; Ghosal, K.; Amankulor, N.; Holland, E.C.; ve ark., *The SHH/Gli pathway is reactivated in reactive glia and drives proliferation in response to neurodegeneration-induced lesions*. *Glia*, 2014. 62(10): p. 1595-607.
12. Sirko, S.; Behrendt, G.; Johansson, P.A.; Tripathi, P.; Costa, M.; Bek, S.; ve ark., *Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]*. *Cell Stem Cell*, 2013. 12(4): p. 426-39.
13. Robel, S.; Berninger, B. ve Gotz, M., *The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis*. *Nat Rev Neurosci*, 2011. 12(2): p. 88-104.
14. Mira, H.; Andreu, Z.; Suh, H.; Lie, D.C.; Jessberger, S.; Consiglio, A.; ve ark., *Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus*. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(1): p. 78-89.
15. Magnusson, J.P.; Goritz, C.; Tatarishvili, J.; Dias, D.O.; Smith, E.M.; Lindvall, O.; ve ark., *A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse*. *Science*, 2014. 346(6206): p. 237-41.
16. Gabel, S.; Koncina, E.; Dorban, G.; Heurtaux, T.; Birck, C.; Glaab, E.; ve ark., *Inflammation Promotes a Conversion of Astrocytes into Neural Progenitor Cells via NF-kappaB Activation*. *Mol Neurobiol*, 2015.
17. Lindvall, O. ve Kokaia, Z., *Stem cell research in stroke: how far from the clinic?* *Stroke*, 2011. 42(8): p. 2369-75.
18. Berninger, B., *Making neurons from mature glia: a far-fetched dream?* *Neuropharmacology*, 2010. 58(6): p. 894-902.
19. Cekanaviciute, E. ve Buckwalter, M.S., *Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases*. *Neurotherapeutics*, 2016. 13(4): p. 685-701.
20. Dossi, E.; Vasile, F. ve Rouach, N., *Human astrocytes in the diseased brain*. *Brain Res Bull*, 2017.
21. Anderson, M.A.; Ao, Y. ve Sofroniew, M.V., *Heterogeneity of reactive astrocytes*. *Neurosci Lett*, 2014. 565: p. 23-9.

22. Wilhelmsson, U.; Bushong, E.A.; Price, D.L.; Smarr, B.L.; Phung, V.; Terada, M.; ve ark., *Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(46): p. 17513-8.
23. Chen, Y. ve Swanson, R.A., *Astrocytes and brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(2): p. 137-49.
24. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. 32(12): p. 638-47.
25. Gao, P.; Postiglione, M.P.; Krieger, T.G.; Hernandez, L.; Wang, C.; Han, Z.; ve ark., *Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex*. Cell, 2014. 159(4): p. 775-88.
26. Guerout, N.; Li, X. ve Barnabe-Heider, F., *Cell fate control in the developing central nervous system*. Exp Cell Res, 2014. 321(1): p. 77-83.
27. Takebayashi, H. ve Ikenaka, K., *Oligodendrocyte generation during mouse development*. Glia, 2015. 63(8): p. 1350-6.
28. Mukoyama, Y.S.; Deneen, B.; Lukaszewicz, A.; Novitsch, B.G.; Wichterle, H.; Jessell, T.M.; ve ark., *Olig2+ neuroepithelial motoneuron progenitors are not multipotent stem cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(5): p. 1551-6.
29. Battiste, J.; Helms, A.W.; Kim, E.J.; Savage, T.K.; Lagace, D.C.; Mandyam, C.D.; ve ark., *Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord*. Development, 2007. 134(2): p. 285-93.
30. Malatesta, P. ve Gotz, M., *Radial glia - from boring cables to stem cell stars*. Development, 2013. 140(3): p. 483-6.
31. Gabay, L.; Lowell, S.; Rubin, L.L. ve Anderson, D.J., *Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro*. Neuron, 2003. 40(3): p. 485-99.

32. Hack, M.A.; Sugimori, M.; Lundberg, C.; Nakafuku, M. ve Gotz, M., *Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6*. Mol Cell Neurosci, 2004. 25(4): p. 664-78.
33. Gotz, M. ve Huttner, W.B., *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(10): p. 777-88.
34. De Juan Romero, C. ve Borrell, V., *Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex*. Glia, 2015. 63(8): p. 1303-19.
35. McDermott, K.W.; Barry, D.S. ve McMahon, S.S., *Role of radial glia in cytogenesis, patterning and boundary formation in the developing spinal cord*. J Anat, 2005. 207(3): p. 241-50.
36. Furutachi, S.; Miya, H.; Watanabe, T.; Kawai, H.; Yamasaki, N.; Harada, Y.; ve ark., *Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells*. Nat Neurosci, 2015. 18(5): p. 657-65.
37. Martynoga, B.; Mateo, J.L.; Zhou, B.; Andersen, J.; Achimastou, A.; Urban, N.; ve ark., *Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence*. Genes Dev, 2013. 27(16): p. 1769-86.
38. Gotz, M.; Sirko, S.; Beckers, J. ve Irmeler, M., *Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis*. Glia, 2015. 63(8): p. 1452-68.
39. Taverna, E.; Gotz, M. ve Huttner, W.B., *The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. 30: p. 465-502.
40. Lodato, S.; Shetty, A.S. ve Arlotta, P., *Cerebral cortex assembly: generating and reprogramming projection neuron diversity*. Trends Neurosci, 2015. 38(2): p. 117-25.
41. Greig, L.C.; Woodworth, M.B.; Galazo, M.J.; Padmanabhan, H. ve Macklis, J.D., *Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity*. Nat Rev Neurosci, 2013. 14(11): p. 755-69.

42. Leone, D.P.; Srinivasan, K.; Chen, B.; Alcamo, E. ve McConnell, S.K., *The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex*. *Curr Opin Neurobiol*, 2008. 18(1): p. 28-35.
43. Jacquet, B.V.; Salinas-Mondragon, R.; Liang, H.; Therit, B.; Buie, J.D.; Dykstra, M.; ve ark., *FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain*. *Development*, 2009. 136(23): p. 4021-31.
44. Noctor, S.C.; Martinez-Cerdeno, V.; Ivic, L. ve Kriegstein, A.R., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. *Nat Neurosci*, 2004. 7(2): p. 136-44.
45. Borrell, V. ve Gotz, M., *Role of radial glial cells in cerebral cortex folding*. *Curr Opin Neurobiol*, 2014. 27: p. 39-46.
46. Marshall, C.A.; Novitsch, B.G. ve Goldman, J.E., *Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells*. *J Neurosci*, 2005. 25(32): p. 7289-98.
47. Garcia-Marques, J. ve Lopez-Mascaraque, L., *Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity*. *Cereb Cortex*, 2013. 23(6): p. 1463-72.
48. Zerlin, M.; Milosevic, A. ve Goldman, J.E., *Glial progenitors of the neonatal subventricular zone differentiate asynchronously, leading to spatial dispersion of glial clones and to the persistence of immature glia in the adult mammalian CNS*. *Dev Biol*, 2004. 270(1): p. 200-13.
49. Bi, B.; Salmaso, N.; Komitova, M.; Simonini, M.V.; Silbereis, J.; Cheng, E.; ve ark., *Cortical glial fibrillary acidic protein-positive cells generate neurons after perinatal hypoxic injury*. *J Neurosci*, 2011. 31(25): p. 9205-21.
50. Dimou, L. ve Gallo, V., *NG2-glia and their functions in the central nervous system*. *Glia*, 2015. 63(8): p. 1429-51.

51. Zhu, X.; Hill, R.A.; Dietrich, D.; Komitova, M.; Suzuki, R. ve Nishiyama, A., *Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells*. *Development*, 2011. 138(4): p. 745-53.
52. Sultan, K.T.; Brown, K.N. ve Shi, S.H., *Production and organization of neocortical interneurons*. *Front Cell Neurosci*, 2013. 7: p. 221.
53. Gage, F.H.; Kempermann, G.; Palmer, T.D.; Peterson, D.A. ve Ray, J., *Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus*. *J Neurobiol*, 1998. 36(2): p. 249-66.
54. Gage, F.H.; Ray, J. ve Fisher, L.J., *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS*. *Annu Rev Neurosci*, 1995. 18: p. 159-92.
55. Ortega, F.; Berninger, B. ve Costa, M.R., *Primary culture and live imaging of adult neural stem cells and their progeny*. *Methods Mol Biol*, 2013. 1052: p. 1-11.
56. Costa, M.R.; Ortega, F.; Brill, M.S.; Beckervordersandforth, R.; Petrone, C.; Schroeder, T.; ve ark., *Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro*. *Development*, 2011. 138(6): p. 1057-68.
57. He, F.; Ge, W.; Martinowich, K.; Becker-Catania, S.; Coskun, V.; Zhu, W.; ve ark., *A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis*. *Nat Neurosci*, 2005. 8(5): p. 616-25.
58. Sun, Y.; Nadal-Vicens, M.; Misono, S.; Lin, M.Z.; Zubiaga, A.; Hua, X.; ve ark., *Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms*. *Cell*, 2001. 104(3): p. 365-76.
59. Guillemot, F., *Cell fate specification in the mammalian telencephalon*. *Prog Neurobiol*, 2007. 83(1): p. 37-52.
60. Fan, G.; Martinowich, K.; Chin, M.H.; He, F.; Fouse, S.D.; Hutnick, L.; ve ark., *DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling*. *Development*, 2005. 132(15): p. 3345-56.
61. Namihira, M.; Nakashima, K. ve Taga, T., *Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter*. *FEBS Lett*, 2004. 572(1-3): p. 184-8.

62. Takizawa, T.; Nakashima, K.; Namihira, M.; Ochiai, W.; Uemura, A.; Yanagisawa, M.; ve ark., *DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain*. *Dev Cell*, 2001. 1(6): p. 749-58.
63. Stolt, C.C.; Lommes, P.; Sock, E.; Chaboissier, M.C.; Schedl, A. ve Wegner, M., *The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord*. *Genes Dev*, 2003. 17(13): p. 1677-89.
64. Cai, J.; Chen, Y.; Cai, W.H.; Hurlock, E.C.; Wu, H.; Kernie, S.G.; ve ark., *A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development*. *Development*, 2007. 134(10): p. 1887-99.
65. Lu, P.P. ve Ramanan, N., *A critical cell-intrinsic role for serum response factor in glial specification in the CNS*. *J Neurosci*, 2012. 32(23): p. 8012-23.
66. Deneen, B.; Ho, R.; Lukaszewicz, A.; Hochstim, C.J.; Gronostajski, R.M. ve Anderson, D.J., *The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord*. *Neuron*, 2006. 52(6): p. 953-68.
67. Cebolla, B. ve Vallejo, M., *Nuclear factor-I regulates glial fibrillary acidic protein gene expression in astrocytes differentiated from cortical precursor cells*. *J Neurochem*, 2006. 97(4): p. 1057-70.
68. Kang, P.; Lee, H.K.; Glasgow, S.M.; Finley, M.; Donti, T.; Gaber, Z.B.; ve ark., *Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis*. *Neuron*, 2012. 74(1): p. 79-94.
69. Muroyama, Y.; Fujiwara, Y.; Orkin, S.H. ve Rowitch, D.H., *Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube*. *Nature*, 2005. 438(7066): p. 360-3.
70. Sakurai, K. ve Osumi, N., *The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes*. *J Neurosci*, 2008. 28(18): p. 4604-12.
71. Ihrie, R.A. ve Alvarez-Buylla, A., *Cells in the astroglial lineage are neural stem cells*. *Cell Tissue Res*, 2008. 331(1): p. 179-91.

72. Chouchane, M. ve Costa, M.R., *Cell therapy for stroke: use of local astrocytes*. Front Cell Neurosci, 2012. 6: p. 49.
73. Corti, S.; Nizzardo, M.; Simone, C.; Falcone, M.; Donadoni, C.; Salani, S.; ve ark., *Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons*. Exp Cell Res, 2012. 318(13): p. 1528-41.
74. Su, Z.; Niu, W.; Liu, M.L.; Zou, Y. ve Zhang, C.L., *In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord*. Nat Commun, 2014. 5: p. 3338.
75. Torper, O.; Pfisterer, U.; Wolf, D.A.; Pereira, M.; Lau, S.; Jakobsson, J.; ve ark., *Generation of induced neurons via direct conversion in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(17): p. 7038-43.
76. Henn, A.; Kirner, S. ve Leist, M., *TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes*. J Immunol, 2011. 186(5): p. 3237-47.
77. Hanisch, U.K. ve Kettenmann, H., *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): p. 1387-94.
78. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. 19(8): p. 312-8.
79. Falsig, J.; Latta, M. ve Leist, M., *Defined inflammatory states in astrocyte cultures: correlation with susceptibility towards CD95-driven apoptosis*. J Neurochem, 2004. 88(1): p. 181-93.
80. Falsig, J.; Porzgen, P.; Lund, S.; Schratzenholz, A. ve Leist, M., *The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function*. J Neurochem, 2006. 96(3): p. 893-907.
81. Lees, J.R.; Golumbek, P.T.; Sim, J.; Dorsey, D. ve Russell, J.H., *Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis*. J Exp Med, 2008. 205(11): p. 2633-42.
82. Buffo, A.; Rite, I.; Tripathi, P.; Lepier, A.; Colak, D.; Horn, A.P.; ve ark., *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(9): p. 3581-6.

83. Anderson, M.A.; Burda, J.E.; Ren, Y.; Ao, Y.; O'Shea, T.M.; Kawaguchi, R.; ve ark., *Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration*. *Nature*, 2016. 532(7598): p. 195-200.
84. Michelucci, A.; Bithell, A.; Burney, M.J.; Johnston, C.E.; Wong, K.Y.; Teng, S.W.; ve ark., *The Neurogenic Potential of Astrocytes Is Regulated by Inflammatory Signals*. *Mol Neurobiol*, 2016. 53(6): p. 3724-39.
85. Imayoshi, I. ve Kageyama, R., *Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors*. *Trends Neurosci*, 2014. 37(10): p. 531-8.
86. Ninkovic, J. ve Gotz, M., *A time and place for understanding neural stem cell specification*. *Dev Cell*, 2014. 30(2): p. 114-5.
87. Pekny, M. ve Pekna, M., *Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits*. *Physiol Rev*, 2014. 94(4): p. 1077-98.
88. Kang, W.; Balordi, F.; Su, N.; Chen, L.; Fishell, G. ve Hebert, J.M., *Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(29): p. E2987-95.
89. Shear, D.A.; Tate, M.C.; Archer, D.R.; Hoffman, S.W.; Hulce, V.D.; Laplaca, M.C.; ve ark., *Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury*. *Brain Res*, 2004. 1026(1): p. 11-22.
90. Gregoire, C.A.; Goldenstein, B.L.; Floriddia, E.M.; Barnabe-Heider, F. ve Fernandes, K.J., *Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury*. *Glia*, 2015. 63(8): p. 1469-82.
91. Chandrasekaran, A.; Avci, H.X.; Leist, M.; Kobolak, J. ve Dinnyes, A., *Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research*. *Front Cell Neurosci*, 2016. 10: p. 215.
92. Kleiderman, S.; Sa, J.V.; Teixeira, A.P.; Brito, C.; Gutbier, S.; Evje, L.G.; ve ark., *Functional and phenotypic differences of pure populations of stem cell-derived astrocytes and neuronal precursor cells*. *Glia*, 2016. 64(5): p. 695-715.

93. Faiz, M.; Sachewsky, N.; Gascon, S.; Bang, K.W.; Morshead, C.M. ve Nagy, A., *Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke*. *Cell Stem Cell*, 2015. 17(5): p. 624-34.
94. Arvidsson, A.; Collin, T.; Kirik, D.; Kokaia, Z. ve Lindvall, O., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. *Nat Med*, 2002. 8(9): p. 963-70.
95. Yamashita, T.; Ninomiya, M.; Hernandez Acosta, P.; Garcia-Verdugo, J.M.; Sunabori, T.; Sakaguchi, M.; ve ark., *Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum*. *J Neurosci*, 2006. 26(24): p. 6627-36.
96. Guillemot, F. ve Zimmer, C., *From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development*. *Neuron*, 2011. 71(4): p. 574-88.
97. Goldshmit, Y.; Frisca, F.; Pinto, A.R.; Pebay, A.; Tang, J.K.; Siegel, A.L.; ve ark., *Fgf2 improves functional recovery-decreasing gliosis and increasing radial glia and neural progenitor cells after spinal cord injury*. *Brain Behav*, 2014. 4(2): p. 187-200.
98. Salmaso, N.; Kim, J.; Saenz, J.M.; Davis-Cooper, S.; Schwartz, M.L. ve Vaccarino, F.M., *Long-lasting therapeutic actions of fibroblast growth factor 2 in a model of brain injury associated with very premature birth*. *Int J Dev Neurosci*, 2015. 47(Pt A): p. 89.
99. Claus, P.; Werner, S.; Timmer, M. ve Grothe, C., *Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease*. *Neurosci Lett*, 2004. 360(3): p. 117-20.
100. Zamanian, J.L.; Xu, L.; Foo, L.C.; Nouri, N.; Zhou, L.; Giffard, R.G.; ve ark., *Genomic analysis of reactive astrogliosis*. *J Neurosci*, 2012. 32(18): p. 6391-410.
101. Liesz, A.; Suri-Payer, E.; Veltkamp, C.; Doerr, H.; Sommer, C.; Rivest, S.; ve ark., *Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke*. *Nat Med*, 2009. 15(2): p. 192-9.
102. Kawanokuchi, J.; Mizuno, T.; Takeuchi, H.; Kato, H.; Wang, J.; Mitsuma, N.; ve ark., *Production of interferon-gamma by microglia*. *Mult Scler*, 2006. 12(5): p. 558-64.

103. Chien, C.H.; Lee, M.J.; Liou, H.C.; Liou, H.H. ve Fu, W.M., *Microglia-Derived Cytokines/Chemokines Are Involved in the Enhancement of LPS-Induced Loss of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in DJ-1 Knockout Mice*. PLoS One, 2016. 11(3): p. e0151569.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3055-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Elde Edilen Astroitlerin Dediferansiyasyon Kapasitesinin İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Şermin GENÇ
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/32-09	Tarih:22.12.2016
	Prof.Dr.Şermin GENÇ'in sorumlusu olduğu "Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Elde Edilen Astrositlerin Dediferansiyasyon Kapasitesinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seviñ ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi KEMAL UĞUR TÜFEKÇİ

TC Kimlik No / Pasaport No:	15637590466
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler ABD.İnciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4126552
e-posta :	ugur.tufekci@deu.edu.tr / ugurtufekci@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Doktora	Devam ediyor
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Yüksek Lisans	2011
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	FEN FAKÜLTESİ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	2010-
Universität Konstanz	Almanya	Konstanz	Biyoloji Bölümü Leist Lab.	Araştırma Görevlisi	2014-2015

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji Ve Genetik , Nörobiyoloji , Genetik Bozuklukların Moleküler Biyolojisi
Nörodejenerasyon, Nöroimmünoloji, Nörobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Alzheimer ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkır Geliştirilmesi	TÜBİTAK	242120	15.08.2012-15.08.2015	Bursiyer	Uluslararası
Aktive Protein C'Nin Mikroglial Tümör Nekrozis Faktör Alfa-Related Apoptosis Inducing Ligand (Trail) Ekspresyonu Üzerine Etkisi	TÜBİTAK	25000	15.10.2011-15.07.2012	Bursiyer	Ulusal
Mikroglial Aktivasyonda mikroRNA'ların Rolü	TÜBİTAK	69000	15.04.2010-15.10.2011	Bursiyer	Ulusal
Resveratrolün mikroglial hücrelerdeki ATP ile indüklenmiş inflamazom aktivasyonuna etkilerinin incelenmesi	DEÜ-BAP	88490	2014-2016	Araştırmacı	Ulusal
Melatoninin mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonuna etkisi	DEÜ-BAP	94851	2015-2016	Araştırmacı	Ulusal
Eritropoetin'in Nöronal Sistin Glutamat Transport Sistemi Üzerine Etkisinde Eritropoetin Reseptör Sinyallemesinin ve Nrf2 Transkripsiyon Faktörü Aktivasyonunun Rolü	DEÜ-BAP	89560	2012-2014	Araştırmacı	Ulusal
Fitokimyasalların mikroglial hücrelerde aktivasyonla indüklenen hücre ölümüne etkisi	DEÜ-BAP	28390	2013-2014	Araştırmacı	Ulusal
Subakut Sklerozan Panensefalitli Hastalarda Mikrona-155, Mikrona-146 Ve Mikrona-181 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	DEÜ-BAP	19455	2012-2014	Araştırmacı	Ulusal
Lityumun nöronal yaşlanma üzerine miRNA aracılı etkileri	DEÜ-BAP	99237	2017-Devam Ediyor	Araştırmacı	Ulusal

İnfanıl Kolik ile Migren ve Biyoriitm düzensizliklerinin ilişkisinin değeriendirilmesi	DEÜ-BAP	92000	2017-Devam Ediyor	Araştırmacı	Ulusal
--	---------	-------	-------------------	-------------	--------

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			3
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			0
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			363
H-Endeksi			7
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	-	-
	Doktora	-	-
	Uzmanlık	-	-
Diğeri (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	Faaliyetler	Society for Neuroscience Üyeliđi,Hücre Ölümü Araştırmaları Derneđi Üyeliđi,Beyin Araştırmaları Derneđi Üyeliđi	

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Yayın Teşvik	Dokuz Eylül Üniversitesi	2016
Yayın Teşvik	Dokuz Eylül Üniversitesi	2012
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans 1.liđi	Dokuz Eylül Üniversitesi	2011
9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi Poster Ödülü (3.lük)	Yeditepe Üniversitesi	2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Kleiderman, Susanne; Gutbier, Simon; Tufekci, Kemal Ugur; Ortega, Felipe; Sa, Joao V.; Teixeira, Ana P.; Brito, Catarina; Glaab, Enrico; Berninger, Benedikt; Alves, Paula M.; Leist, Marcel, Conversion of Nonproliferating Astrocytes into Neurogenic Neural Stem Cells: Control by FGF2 and Interferon-gamma, 2016, STEM CELLS

Yiş, Uluç; Tufekçi, Kemal Uğur; Genç, Şermin; Çarman, Kürşat Bora; Bayram, Erhan; Topçu, Yasemin; Hız Kurul, Semra; OP86–2425: Expression patterns of micro-RNAs 146a, 181a, and 155 in subacute sclerosing panencephalitis, 2015, European Journal of Paediatric Neurology 19, S27

Tufekci, K. U.; Eren, E.; Ates, H.; Genc, S., Endothelial protein C receptor expression in microglia is regulated by Sp1, 2015, GLIA

Eren, E.; Tufekci, K. U.; Isci, K. B.; Genc, S., Sulforaphane exerts protective effects in microglial cells by switching polarization phenotypes, 2015, GLIA

Polat, I.; Ayanoglu, M.; Tufekci, U.; Genc, S.; Yis, U.; Kurul, S. Hiz, EXPRESSION PATTERNS OF MICRORNAS-146A,-34A,-132,-134 AND-184 IN PEDIATRIC EPILEPSY PATIENTS, 2015, EPILEPSIA

Alural, Begum; Duran, Gizem Ayna; Tufekci, Kemal Ugur; Allmer, Jens; Onkal, Zeynep; Tunalı, Dogan; Genc, Kursad; Genc, Sermin, EPO mediates neurotrophic, neuroprotective, anti-oxidant and anti-apoptotic effects via downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y neuron-like cells, 2014, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY

Yiş, Uluç; Tufekçi, Kemal Uğur; Genç, Şermin; Çarman, Kürşat Bora; Bayram, Erhan; Topçu, Yasemin; Hız Kurul, Semra, Expression Patterns of Micro-RNAs 146a, 181a, and 155 in Subacute Sclerosing Panencephalitis, 2014, JOURNAL OF CHILD NEUROLOGY

Vurgun, Ufuk; Sahin, Ozlem; Tufekci, Kemal Ugur; Keskinoglu, Pembe; Yener, Gorsev; Genc, Kemal Kursad; Genc, Sermin, ASSOCIATION OF PERIPHERAL VISFATIN LEVELS AND VISFATIN G-948T GENE POLYMORPHISM WITH ALZHEIMER'S DISEASE IN A TURKISH POPULATION, 2013, TURKISH JOURNAL OF GERIATRICS-TURK GERIATRI DERGISI

Tufekci, Kemal Ugur; Meuwissen, Ralph; Genc, Sermin; Genc, Kursad, Inflammation in Parkinson's Disease, 2012, INFLAMMATION IN NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

Tufekci, Kemal Ugur; Genc, Sermin; Genc, Kursad, The Endotoxin-Induced Neuroinflammation Model of Parkinson's Disease, 2011, PARKINSONS DISEASE

Tufekci, Kemal Ugur; Bayin, Ezgi Civi; Genc, Sermin; Genc, Kursad, The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease, 2011, PARKINSONS DISEASE

Tufekci, Kemal Ugur; Genc, Kursad, Neurovascular Protection by Erythropoietin: From the Bedside Back to the Bench, 2010, STROKE

Tufekci KU, Meuwissen R, Genc S, Genc K. Inflammation in Parkinson's disease. Adv Protein Chem Struct Biol. 2012;88:69-132.

Tufekci KU, Genc K. Neurovascular Protection by Erythropoietin: From the Bedside Back to the Bench. Stroke. 2010 Jul;41(7):e462. Epub 2010 May 13.

Kemal Ugur Tufekci, Kursad Genc. Lack of extra-erythropoietic activity of erythropoietin: Unexpected results, new perspectives. Blood E-letter (<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/eletters/blood-2009-10-248666v1>), 1/4/2010

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Alural, Begum; Ayyildiz, Zeynep Ozge; Tufekci, Kemal Ugur; Genc, Sermin; Genc, Kursad. Erythropoietin Promotes Glioblastoma via miR-451 Suppression, 2017, Vitamins and Hormones

Tufekci, Kemal Uğur; Meuwissen, Ralph Leo Johan; Öner, Meryem Gülfem; Genç, Şermin, The Role of MicroRNAs in Human Diseases, 2013, Methods in molecular biology

Tufekci, Kemal Uğur; Meuwissen, Ralph Leo Johan; Genç, Şermin, The Role of MicroRNAs in Biological Processes, 2013, Methods in molecular biology

Tufekci, Kemal Uğur; Öner, Meryem Gülfem; Genç, Şermin; Genç, Kürşad, MicroRNAs and Multiple Sclerosis, 2010, Autoimmune Diseases

Tufekci KU, Civi Bayin E, Genc S, Genc K. The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Parkinsons Dis. 2011 Feb 22;2011:314082.

Tufekci KU, Genc S, Genc K. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. Parkinsons Dis. 2011 Jan 18;2011:487450.

Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. Autoimmune Dis. 2010 Nov 11;2011:807426.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Kamer Burak İşci, Begüm Alural, Kemal Uğur Tufekci, Şermin Genç, Sülforafan Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu Baskılar, 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara.

Erden Eren, Erdoğan Pekcan Erkan, Kemal Uğur Tufekci, Gülşah Gökçe, Anıl Tanburoğlu, Nurhak Demir, Görsev Yener, ŞErmin Genç. Serum miR-16 levels show negative correlation with Amyloid-Beta1-42 levels in Alzheimer's disease patients. 3. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, 10-12 Eylül 2014, İzmir.

Tufekçi, Kemal Uğur; Erkan, Erdoğan PEkcan; Yiş, Uluç; Çarman, Kürşat Bora; Bayram, Erhan; Topçu, Yasemin; Hız Kurul, Semra; Genç, Şermin. Immunoregulatory and Inflammatory microRNA expression signatures are altered in subacute sclerosing panencephalitis. 3. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, 10-12 Eylül 2014, İzmir.

Ufuk Vurgun, Özlem Şahin, Kemal Uğur Tüfekci, Görsev G. Yener, Kemal Kürşad Genç, Şermin Genç. Alzheimer Hastalığına yatkınlıkta Visfatin -948 G-T polimorfizminin etkisi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-12 Nisan, İstanbul.

Kemal Uğur Tüfekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç. Mikroglial aktivasyonda endotoksin uyarımıyla ekspresyonu değişen mikroRNA'ların belirlenmesi ve fonksiyonel analizi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-12 Nisan, İstanbul.

Kemal Uğur Tüfekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç. Mikroglial hücrelerin endotoksine karşı mikroRNA yanıtı. Turk Norol Derg 201016(Ek 1):158-159

Kemal Uğur Tüfekci, Şermin Genç Aktive protein C'nin Nuclear factor E-2 related factor-2 nükleer translokasyonuna ve ekspresyonuna etkisi. Turk Norol Derg 201016(Ek 1):157-158

Diğer yayınlar

Uğur Tüfekci, Kürşad Genç. Merkezi Sinir Sisteminin Otoimmün hastalıklarında mikroRNA. MikroRNA ve Sinirsistemi, 2011, TUBA

Düzenleme Tarihi :15/06/2017

8.3. Tezden yapılan yayınlar

Kleiderman S, Gutbier S, Tufekci KU, Ortega F, Sá JV, Teixeira AP, Brito C, Glaab E, Berninger B, Alves PM, Leist M. Conversion of Nonproliferating Astrocytes into Neurogenic Neural Stem Cells: Control by FGF2 and Interferon- γ . *Stem Cells*. 2016 Dec;34(12):2861-2874. doi: 10.1002/stem.2483.



Conversion of Nonproliferating Astrocytes into Neurogenic Neural Stem Cells: Control by FGF2 and Interferon- γ

SUSANNE KLEIDERMAN,^a SIMON GUTBIER,^a KEMAL UGUR TUFEKCI,^{a,b} FELIPE ORTEGA,^{c,d} JOÃO V. SA,^{e,f} ANA P. TEIXEIRA,^{e,f} CATARINA BRITO,^{e,f} ENRICO GLAAB,^g BENEDIKT BERNINGER,^c PAULA M. ALVES,^{e,f} MARCEL LEIST^a

Key Words. Astrocytes • Neural stem cells • De-differentiation • Neurogenesis • FGF2 • Interferon

ABSTRACT

Conversion of astrocytes to neurons, via de-differentiation to neural stem cells (NSC), may be a new approach to treat neurodegenerative diseases and brain injuries. The signaling factors affecting such a cell conversion are poorly understood, and they are hard to identify in complex disease models or conventional cell cultures. To address this question, we developed a serum-free, strictly controlled culture system of pure and homogeneous “astrocytes generated from murine embryonic stem cells (ESC).” These stem cell derived astrocytes (mAGES), as well as standard primary astrocytes resumed proliferation upon addition of FGF. The signaling of FGF receptor tyrosine kinase converted GFAP-positive mAGES to nestin-positive NSC. ERK phosphorylation was necessary, but not sufficient, for cell cycle re-entry, as EGF triggered no de-differentiation. The NSC obtained by de-differentiation of mAGES were similar to those obtained directly by differentiation of ESC, as evidenced by standard phenotyping, and also by transcriptome mapping, metabolic profiling, and by differentiation to neurons or astrocytes. The de-differentiation was negatively affected by inflammatory mediators, and in particular, interferon- γ strongly impaired the formation of NSC from mAGES by a pathway involving phosphorylation of STAT1, but not the generation of nitric oxide. Thus, two antagonistic signaling pathways were identified here that affect fate conversion of astrocytes independent of genetic manipulation. The complex interplay of the respective signaling molecules that promote/inhibit astrocyte de-differentiation may explain why astrocytes do not readily form neural stem cells in most diseases. Increased knowledge of such factors may provide therapeutic opportunities to favor such conversions. *STEM CELLS* 2016;34:2861–2874

SIGNIFICANCE STATEMENT

Making use of completely growth arrested, mature stem cell-derived murine astrocytes (mAGES), we demonstrate here the reprogramming of such cells into neural stem cells by FGF2, and attenuation of this process by inflammatory cytokines. The findings shed light on the factors and signaling mechanisms involved in astrocyte plasticity, with respect to regenerative processes in the brain that depend on astrocyte derived neural stem cells.

INTRODUCTION

Astrocytes are well-recognized for their inflammatory activation upon injury, but less is known on factors that affect their plasticity and lineage commitment. For example, neurogenesis from astrocytic neural stem cells has been demonstrated in certain niches of the adult mammalian brain [1–4]. Outside these niches, conversion of mature astrocytes into functional neurons requires expression of ectopic neurogenic transcription factors [5–13]. For therapeutic purposes, conversion of astrocytes to neurons without genetic reprogramming would be favorable.

During inflammation or disease, astrocyte activation is promoted by cytokines released from, for example, microglia [14–18], infiltrating leukocytes [19], or stressed neurons (ATP; reactive oxygen species) [20, 21]. The resultant “astrogliosis” may have both detrimental and beneficial effects on neuron regeneration [22, 23]. Important features of severe astrogliosis are the re-entry of mature, nonproliferating astrocytes into the cell cycle, and the formation of glial scars [23–27]. For instance, activation of the transcription factor NF- κ B by TNF has been shown to be associated with a de-differentiation of astrocytes [28, 29]. Some of these astrocytes re-express markers normally

^aDepartment of Biology, The Doerenkamp-Zbinden Chair of in-vitro Toxicology and Biomedicine/Alternatives to Animal Experimentation, University of Konstanz, Konstanz, Germany; ^bDepartment of Neuroscience, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University, Inciralti, Izmir, Turkey; ^cInstitute/Department of Physiological Chemistry, Research Group Adult Neurogenesis and Cellular Reprogramming, Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; ^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Biochemistry and Molecular Biology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University, Avenue Puerta de Hierro, Institute of Neurochemistry (IUIIN), Spain and Health Research Institute of the Hospital Clinico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain; ^eIBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal; ^fInstituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Oeiras, Portugal; ^gLuxembourg Centre for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, Belvaux, Luxembourg

Correspondence: Prof. Dr. Marcel Leist, University of Konstanz, Box M657 D-78457 Konstanz, Germany. Tel.: +49 7531 885037; Fax: +49-7531-885037 (885039); e-mail: marcel.leist@uni-konstanz.de

Received April 26, 2016; accepted for publication July 29, 2016; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* September 7, 2016.

© AlphaMed Press
1066-5099/2016/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2483>

found in neural stem cells, such as nestin [20, 30, 31]. The potential of astrocytes to be transformed into cells capable of generating neurons may be used for future neuroregenerative therapies, if more becomes known why they normally stay within their astrocytic lineage in vivo [24, 32, 33].

Mature astrocytes do not normally proliferate in the intact brain [23, 34], but several molecules that induce cell cycle re-entry and reversion to stem cells have been described [35]. These comprise nucleotides [36, 37], and growth factors such as EGF [38, 39], FGF2 [40–42], or sonic hedgehog (SHH) [43]. Pioneering work by Magdalena Götz and colleagues found that SHH also de-differentiated astrocytes in certain mouse injury models. Astrocytes exposed to this factor and isolated even from uninjured brains could be converted into self-renewing and neurogenic neural stem cells in vitro, although neurogenesis could not be demonstrated in vivo [44].

The reason for the failure of astrocytes to form neurons in vivo might be the release of inhibitory factors during inflammation or disease [45]. Such signals could either prevent de-differentiation and cell cycle re-entry [46], or they may favor astrocyte lineage commitment over neurogenesis (e.g., bone morphogenetic proteins (BMPs) [47, 48], or notch signaling [49]). Several factors that promote [28] and inhibit de-differentiation and neurogenic conversion may be released simultaneously in disease models [44, 45], and this makes it hard to identify targets that would allow pharmacological triggering of endogenous de-differentiation and neurogenesis from astrocytes [10, 50].

An alternative approach to in vivo disease models are well-controlled cell cultures. We have recently established an in vitro system of pure and post-mitotic “murine astrocytes generated from embryonic stem cells” (mAGES) [51]. These cells show transcriptomic, metabolic, and functional (glutamate uptake, glutamine release, response to cytokines) properties similar to primary astrocytes. As they can be maintained in medium without serum, their inflammatory activation state is very low, and the culture system allows the addition or removal of single factors under strictly controlled conditions. We tested several factors for their capacity to de-differentiate mAGES to NSC and found that the addition of FGF2 induced cell cycle re-entry and a full conversion of astrocytes into neurogenic NSC. This system was used to explore underlying signaling pathways. Moreover, we used the system to identify inflammatory factors that inhibit neurogenic conversion of astrocytes. IFN- γ (IFN γ) and the JAK-STAT pathway triggered by this cytokine were identified as important counter-regulators of de-differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Full details are given in Supporting Information

Differentiation/Preparation of Neural Stem Cells, mAGES, and Primary Astrocytes

NSC and mAGES were differentiated from murine embryonic stem cells (mESC) and maintained as described earlier [51]. In brief, NSC were maintained in N2B27-medium [1:1 DMEM/F12 and Neurobasal-medium, N2-supplement, B27-supplement, 2 mM Glutamax, 100 μ M β -mercaptoethanol, 7.5 μ g/ml insulin, 50 μ g/ml BSA] supplemented with 20 ng/

ml EGF and FGF2. NSC were re-plated in N2B27-medium supplemented with 20 ng/ml bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and differentiated into mAGES for 5 days. If mAGES were cultured for longer periods, medium containing 10 ng/ml BMP4 was changed every other day. Preparation of primary astrocytes [14, 17] is described in Supporting Information.

De-Differentiation of mAGES to NSC2

Five days-old mAGES were washed twice with PBS, and N2B27-medium supplemented with 20 ng/ml FGF2 was added. Medium was changed every other day. Experiments were performed on day 1–10. As control, cells were cultured in N2B27-medium without BMP4 and FGF2. To further maintain mAGES-derived NSC2, cells were re-plated at a density of 10,000 cells per cm^2 in N2B27-medium supplemented with 20 ng/ml FGF2 (\pm EGF) on gelatin-coated dishes. Medium was changed every other day, and cells were passaged twice a week equal to original NSC.

Differentiation of NSC/NSC2 into Neurons

NSC2 were seeded at a density of 30,000 cells per cm^2 in N2B27-medium supplemented with 10 ng/ml FGF2 on poly-L-ornithine-hydrobromide/laminin coated plates. On day 2, FGF2 concentration was reduced to 5 ng/ml. On day 4, N2B27-medium without FGF2 was added. Medium was changed every other day. Experiments were performed on day 14–21.

Quantitative RT-PCR, Immunocytochemistry, and EdU Labeling

Quantitative PCR (qPCR) and immunocytochemistry have been performed as described before [51]. Primers and antibodies are listed in Supporting Information. To detect DNA synthesis, cells were incubated for 48 hours with 10 μ M of the thymidine analog 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Baseclick, BCK-EdU555, Neuried, Germany), then fixed, permeabilized, and stained according to the manufacturer's instruction. Antigen-positive cells (1,000 cells/condition) were counted by the automated screening microscope CellInsight CX5 (Thermo Scientific, Schwerte, Germany) using the predefined algorithm “target activation.”

Measurement of Viability/Proliferation

Resazurin reduction and release of lactate dehydrogenase (LDH) were measured according to standard protocols [52].

Live Imaging and Single Cell Tracking

De-differentiation of mAGES was followed by time-lapse video microscopy on a Zeiss cell observer at 37°C. Phase contrast images were taken every 15 minutes from day 3–10 using a 20x phase contrast objective and an AxioCamHRm camera. In addition, mAGES were transfected for single cell tracking with a retroviral vector encoding DsRed, as described earlier [53]. Pictures of the red channel were taken every 0.5 hour with a 10x objective. Single cell tracking and the generation of consecutive lineage trees was performed using Timm's Tracking Tool as described earlier [54, 55].

CFSE Labeling and Measurement of Label Dilution in Adherent Culture

Adherent cultures of mAGES were incubated with 10 μ M CFSE (in PBS) for 15 minutes, and washed thereafter. De-

differentiation was initiated by addition of 20 ng/ml FGF2. At the end of the incubation, cells were stained with H-33342, and total CFSE intensity per cell was measured in live cells by an automated screening microscope (CellInsight CX5, Thermo Scientific, Schwerte, Germany). As control, CFSE-labeled astrocytes were maintained in medium without growth factors. To define the classes of non-dividing and dividing cells, a threshold has been set, which comprises 95% of the cells in control cultures. To normalize the data with regard to the starting population (day 0), cells were grouped into cells that have divided once, twice, or three times. Label-dilution factors per cell were used to back-calculate numbers of divisions, assuming a serial log₂ intensity reduction per cell division.

Statistical Analysis

Experimental data are based on three “biological replicates” (different cell lots/differentiations); each of these data points being the means of several “technical replicates” (repeated measures/wells within one experiment), unless otherwise stated. Data are presented as means ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA with GraphPad Prism, followed by Dunnett’s post hoc test, unless otherwise indicated.

RESULTS

Cell Cycle Re-Entry of Mature Astrocytes under Defined Conditions

To investigate cell cycle re-entry of murine astrocytes, cells were exposed to the growth factors EGF and FGF2, and incorporation of the thymidine analog EdU was measured to detect DNA synthesis/proliferation. Standard primary astrocytes [14, 17], normally maintained in medium containing 10% serum, were cultured in N2B27-medium without serum to exclude effects of other growth factors. In such cultures, some basic proliferation was observed, and this was increased by exposure to EGF for 8 days (about 10% of cells). FGF2 induced proliferation of a significantly larger fraction of cells (Fig. 1A, 1B), and EGF attenuated the response to FGF2. Affected astrocytes under these conditions divided once or twice within 10 days, and then exited the cell cycle again. Observations beyond that time frame were not pursued, due to the difficulty to maintain our primary cultures without serum and endothelium-derived factors [56] for more than two weeks (data not shown).

As second experimental system, homogeneous cultures of murine astrocytes generated from embryonic stem cells (mAGES) [51] were used. In such cells, no basic proliferation was observed at all, and added EGF had no effect. However, most of the cells started to proliferate when exposed to FGF2 (Fig. 1C, 1D), and EGF did not blunt this effect. Cell cycle re-entry was sustainable, as mAGES exposed to FGF2 for 8 days could be replated and further expanded in N2B27-medium containing FGF2 (Supporting Information Fig. 1). Thus, mAGES as well as primary astrocytes re-enter the cell cycle in response to FGF2, although the time course and re-entry efficiency differed between both cell types.

Conversion of mAGES to Neural Stem Cells by FGF2

Phenotypic changes associated with cell cycle re-entry were investigated by immunocytochemistry. Standard primary

astrocyte cultures, as also observed by others [57–59], always contained some nestin-positive cells (neural stem cell marker), and some glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocyte marker)-nestin double-positive immature astrocytes. Upon FGF2 exposure, nestin-staining increased, while GFAP expression decreased. This switch from a genuine astrocytic phenotype to a more immature precursor cell type was also observed in mAGES (Fig. 1B, 1D; Supporting Information Fig. 2A, 2B). In the latter cultures, star-shaped astrocytes with fine radial processes adopted hypertrophic processes (typically seen in reactive astrocytes) within the first few days of FGF2 exposure. At day 6, they adopted a bipolar morphology with two elongated processes, and finally the typical morphology of neural stem cells (NSC) was observed (Supporting Information Fig. 3). Thus, astrocytes exposed to FGF2 did not only re-enter the cell cycle, but also generated neural stem-like cells (NSC2), which could be maintained (by FGF2 or by FGF2 *plus* EGF) in a self-renewing state for ≥14 passages (Fig. 1E, Supporting Information Fig. 1).

A quantification of this conversion showed that EdU incorporation and downregulation of GFAP started from day 5 to 6. Upregulation of nestin expression started directly after FGF2 exposure, and increased continuously (Fig. 2A, 2B).

The mAGES cultures were selected for further studies on cell cycle re-entry as they are more homogeneous, show no basic proliferation and no need for serum. To ascertain that all cells in these cultures were fully differentiated astrocytes, mAGES were cultured for one month in BMP4-containing medium, under conditions in which transiently-silenced precursor cells are unlikely to survive [60]. The subsequent withdrawal of BMP4 and exposure to FGF2 resulted in a conversion into NSC2 with the same time course and efficiency as with 5-days old mAGES (Fig. 2C). Removal of BMP4 did not induce a de-differentiation within 8 days as shown by a lack of EdU incorporation. Moreover, we repeated the process with mAGES derived from three single cell clones of NSC, and with iPS-derived mAGES. In all cultures nestin and EdU incorporation were upregulated by FGF2, while GFAP-expression was downregulated (Fig. 2D). Thus, conversion of mAGES to NSC2 required FGF2 and was generalizable for various NSC.

Need for FGF2 Signaling, but not EGF, for mAGES De-Differentiation

For investigation of the signaling events involved in the conversion of mAGES into NSC2, phosphorylation of key proteins was quantified in the absence or presence of pathway-specific kinase inhibitors (Fig. 3A). An increased phosphorylation of ERK (pERK) and AKT (pAKT) was observed in response to FGF2 (Fig. 3B); levels of phosphorylated p38, JNK, or c-jun did not change (Supporting Information Fig. 4A). SU5402 (inhibitor of the FGF receptor (FGFR1) tyrosine kinase) inhibited the FGF2-induced phosphorylation of ERK and AKT (Fig. 3B, 3C) at non-cytotoxic concentrations (Supporting Information Fig. 4B). This was paralleled by an inhibition of the de-differentiation of mAGES in the presence of FGF2, as seen from reduced proliferation, inhibited EdU incorporation, and reduced expression of nestin (Fig. 3D, 3E). Thus, FGF receptor kinase activity was necessary for the conversion of mAGES to NSC2.

While Ly294002 (inhibitor of AKT phosphorylation) did not affect the response of mAGES exposed to FGF2 (data not shown), the MEK1/2 inhibitor U0126 (prevention of pERK

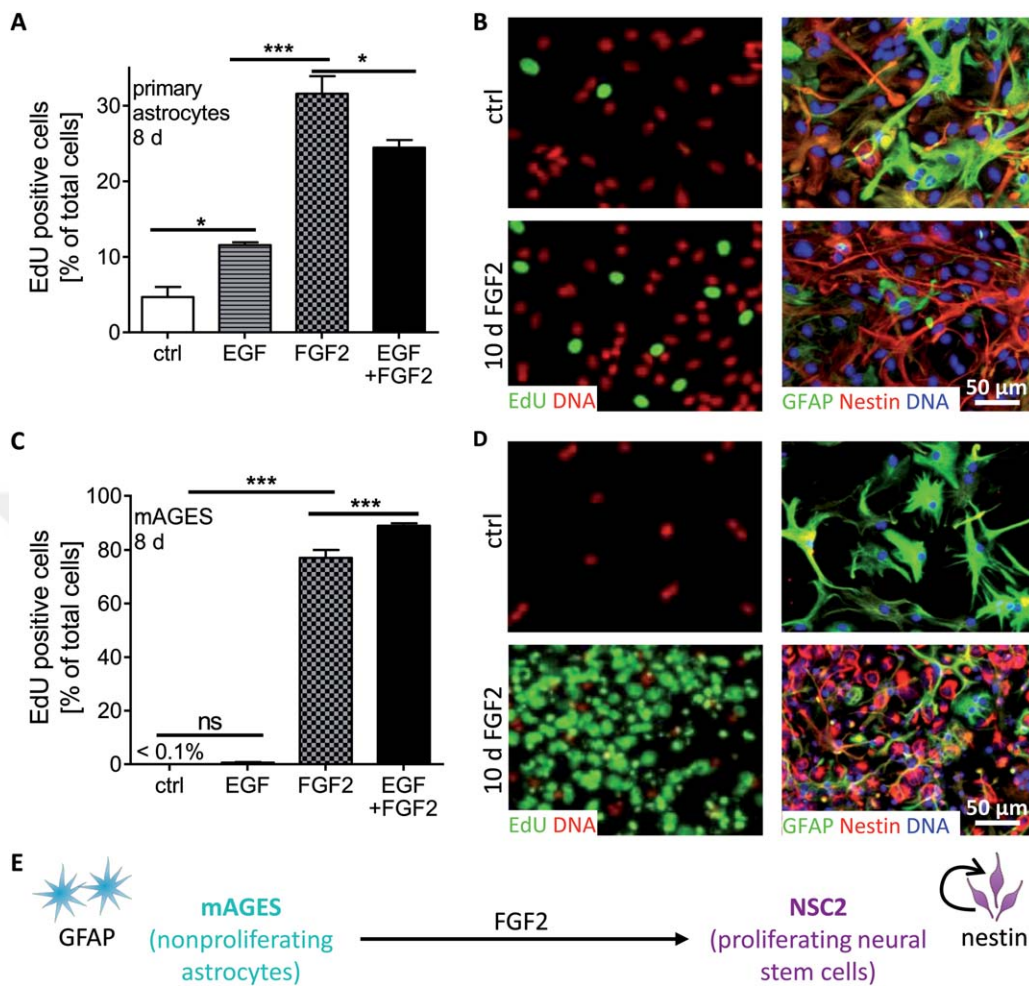


Figure 1. Cell cycle re-entry of mature astrocytes under controlled conditions. **(A):** Primary murine astrocytes were exposed to 20 ng/ml FGF2 or 20 ng/ml EGF or combinations thereof for 8 days. The nucleoside analog EdU (10 μ M) was added during the last 48 hours. EdU incorporation into the DNA was visualized by immunocytochemistry, and the number of EdU-positive nuclei was counted by an automated screening microscope (1000 nuclei/condition). Data are means \pm SEM for three cell preparations. ***, $p < .0001$; *, $p < .01$ (Tukey's post-test). **(B):** Representative images are shown for cells treated as in **(A)**. Left: EdU incorporation was visualized by immunocytochemistry (green), and nuclei were stained with H-33342 (red). Right: GFAP (green) and nestin (red) were visualized by immunocytochemistry, and nuclei were stained with H-33342 (blue). **(C):** Three different lots of mAGES were treated and analyzed as in **(A)**. In control cultures (N2B27, serum-free medium without additional factors), less than one cell per condition was found to be EdU-positive (< 0.1%). Data for cells exposed to growth factors are as indicated (given as means \pm SEM). ***, $p < .0001$; ns, not significant (Tukey's post-test). **(D):** The mAGES were immunostained as in **(B)**; a scale bar and color keys are displayed on the images. **(E):** Summary of the experimental procedure and findings of **A-D**: FGF2 drives the transformation of GFAP-positive, nonproliferating astrocytes (here exemplified by the pure and defined population of mAGES) to proliferating nestin-positive neural stem cells (here called NSC2). Abbreviations: EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; GFAP, glial fibrillary acidic protein; mAGES, murine astrocytes generated from embryonic stem cells; NSC2, neural stem-like cells.

formation) (Supporting Information Fig. 5A) inhibited the FGF2-induced proliferation of mAGES (Supporting Information Fig. 5B). U0126 also inhibited DNA synthesis in mAGES exposed to FGF2 (Supporting Information Fig. 5C) at non-cytotoxic concentrations (Supporting Information Fig. 5D), while FGF2-induced upregulation of nestin was not affected (Supporting Information Fig. 5C). This suggests that FGF receptor-induced phosphorylation of ERK, but not AKT, drives cell cycle re-entry, but not necessarily acquisition of other stem cell properties (nestin regulation).

Since other studies described rather an involvement of EGF than FGF2 in the de-differentiation of astrocytes, we investigated a putative role of endogenously produced EGF [38, 39]. The EGF receptor kinase inhibitor gefitinib inhibited EGF-induced phosphorylation of ERK and AKT at non-cytotoxic concentration of 0.1 μ M (Fig. 3F, Supporting Information Fig. 6A), while

phosphorylation of ERK and AKT induced by FGF2 was not affected (Fig. 3F, Supporting Information Fig. 6D). To test if any indirect EGF receptor activation is necessary for the de-differentiation of mAGES, cells were coexposed to FGF2 *plus* gefitinib (1 μ M). The EGF receptor inhibitor had no effect on EdU incorporation, nestin expression (Fig. 3G), or proliferation (Supporting Information Fig. 6B, 6C). Thus, EGF is neither sufficient (Fig. 1C) nor necessary for the conversion of mAGES into NSC2.

Characterization of NSC2 as Multipotent Neural Stem Cells

After having found that NSC2 are able to self-renew (>14 passages), we investigated their developmental potency with respect to neurogenesis and gliogenesis: when NSC2 were

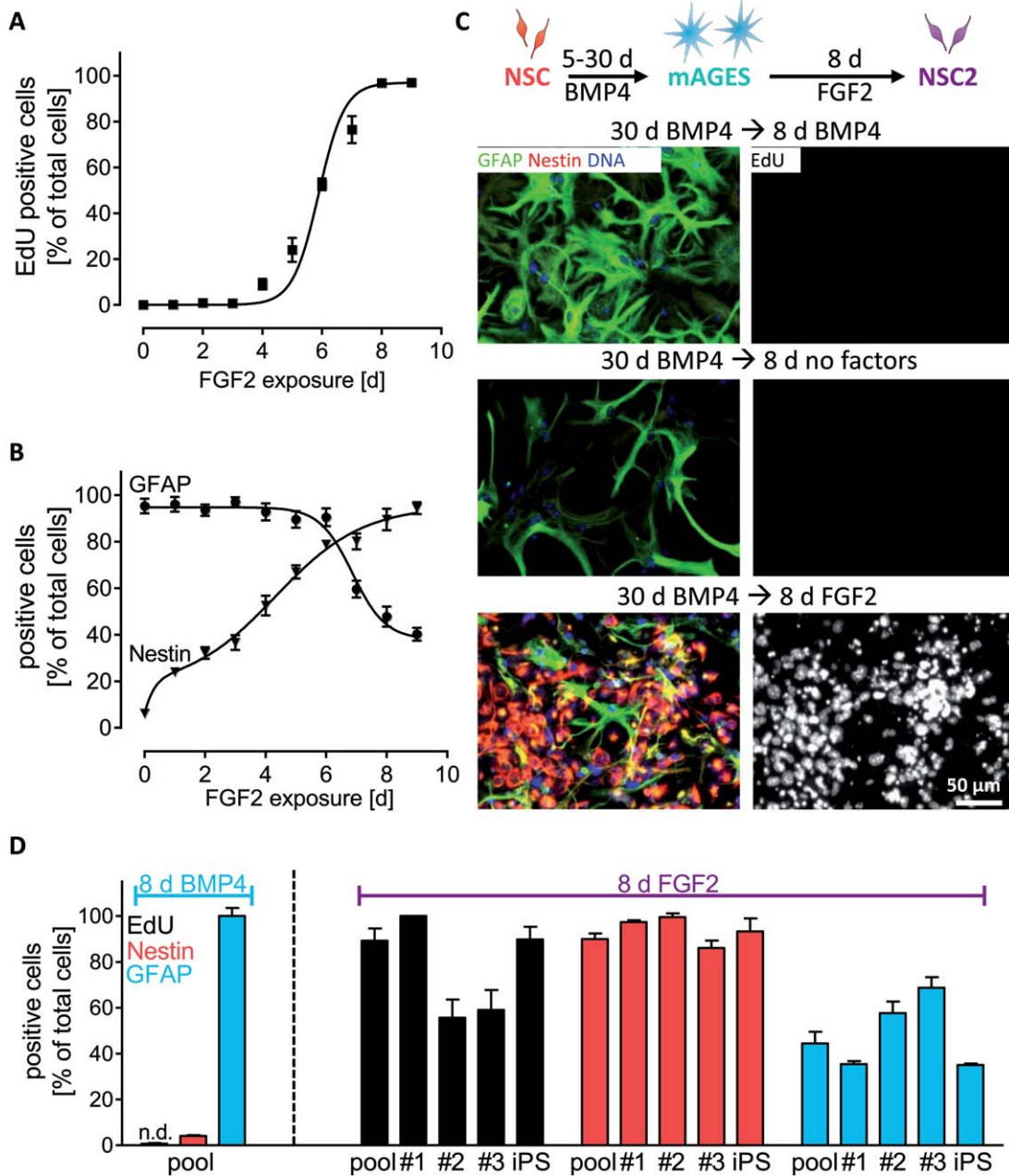


Figure 2. Conversion of mAGES to neural stem cells by FGF2. **(A):** Cultures of mAGES were exposed to 20 ng/ml FGF2 for 1-9 days, before they were fixed. EdU was added 48 hours prior to termination of the experiment. The percentage of EdU-positive nuclei was determined. **(B):** GFAP and nestin were visualized by immunocytochemistry in cells treated as in (A). The percentage of positive cells is displayed. **(C):** As shown in the schematic, NSC were differentiated to mAGES by exposure to BMP4, before they were exposed to FGF2 (0 or 20 ng/ml) for 8 days. EdU was added to the medium for the last 48 hours. GFAP and nestin were visualized by immunocytochemistry. Nuclei were stained with H-33342. FGF2 induced a conversion of fully mature mAGES into NSC2. Note that exposure of NSC to BMP4 for 5 days leads to homogeneous cultures of nonproliferating mAGES; long-term differentiation was chosen to render unlikely the presence of remaining NSC. **(D):** Embryonic stem cell-derived NSC (pool), three single cells clones of these NSC (#1-3), and induced pluripotent stem cell (iPS)-derived NSC were differentiated to mAGES (the left side of the diagram shows a typical phenotypic outcome for pool cells). Such mAGES were exposed to FGF2 for 8 days, and incubated with EdU for the last 48 hours. GFAP, nestin, and EdU-incorporation were visualized by immunocytochemistry, and the percentage of positive cells was determined by an automated screening microscope (means ± SEM). Abbreviations: EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; GFAP, glial fibrillary acidic protein; mAGES, murine astrocytes generated from embryonic stem cells; NSC, neural stem cells; NSC2, neural stem-like cells; n.d., not detectable.

exposed to BMP4, they adopted the typical star-shaped morphology of astrocytes within 3 days, and expressed GFAP and aquaporin 4 (Aqp4) to a similar extent as mAGES (Fig. 4A, 4B). The resultant astrocyte population was therefore termed

“mAGES2.” To investigate the neurogenic potential of NSC2, they were re-plated on poly-ornithine/laminin, and FGF2 was gradually withdrawn from the medium to allow spontaneous differentiation. After 14 days, the culture consisted of 60%

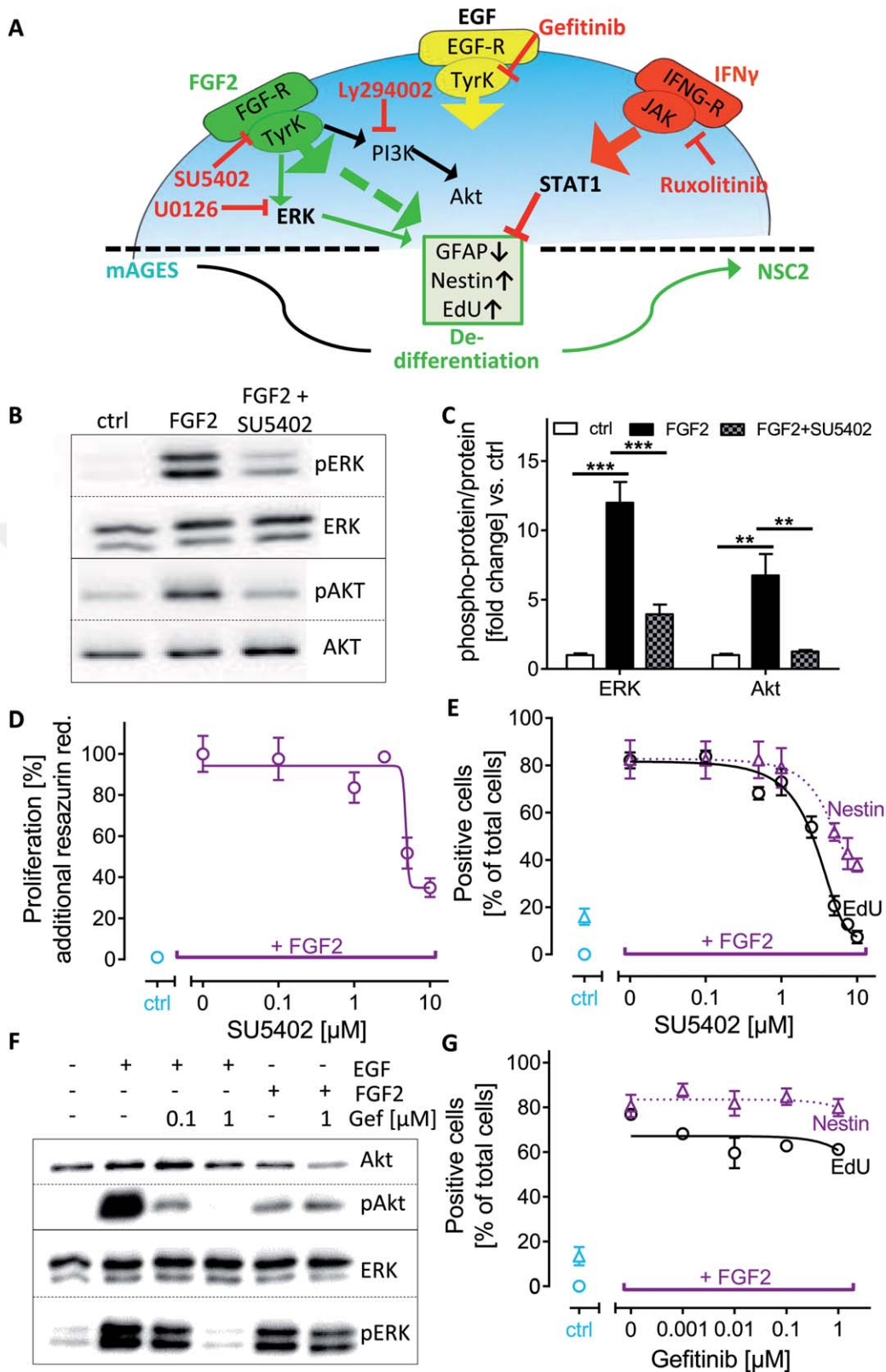


Figure 3. Need for FGF2 signaling, but not EGF, for mAGES de-differentiation. **(A):** Overview of inhibitor targets and signaling pathways affecting de-differentiation from mAGES to NSC2. **(B):** Cultures of mAGES were preincubated for 30 minutes with SU5402 (10 μ M), and exposed to FGF2 (20 ng/ml) for 20 minutes. Cell lysates were analyzed by Western blot for AKT and ERK, and their phosphorylated forms (pAKT, pERK). **(C):** Densitometric quantification of the ratio between phosphorylated and un-phosphorylated proteins from three experiments as in (B). **(D):** To measure proliferation, mAGES were exposed for 8 days to 0 (ctrl) or 20 ng/ml FGF2 plus increasing concentrations of SU5402, and resazurin reduction was used as surrogate measure of cell number. The data indicate the percentage of increased resazurin fluorescence signal (proportional to cell number) relative to ctrl conditions. **(E):** Nestin protein and EdU incorporation were visualized in mAGES treated as in (D), and incubated with EdU for the last 48 hours. Positive cells were counted by an automated screening microscope. **(F):** The mAGES were preincubated for 30 minutes with Gef, and exposed to 20 ng/ml EGF or FGF2 for 20 minutes, before AKT, ERK, and their phosphorylated forms were determined by Western blot. **(G):** The mAGES were exposed for 8 days to 0 (ctrl) or 20 ng/ml FGF2 plus increasing concentrations of gefitinib; EdU was added for the last 48 hours. EdU incorporation and nestin protein were visualized by immunocytochemistry. Positive cells were counted by an automated screening microscope. Data are means \pm SEM. Abbreviations: EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; Gef, gefitinib; GFAP, glial fibrillary acidic protein; mAGES, murine astrocytes generated from embryonic stem cells; NSC2, neural stem-like cells.

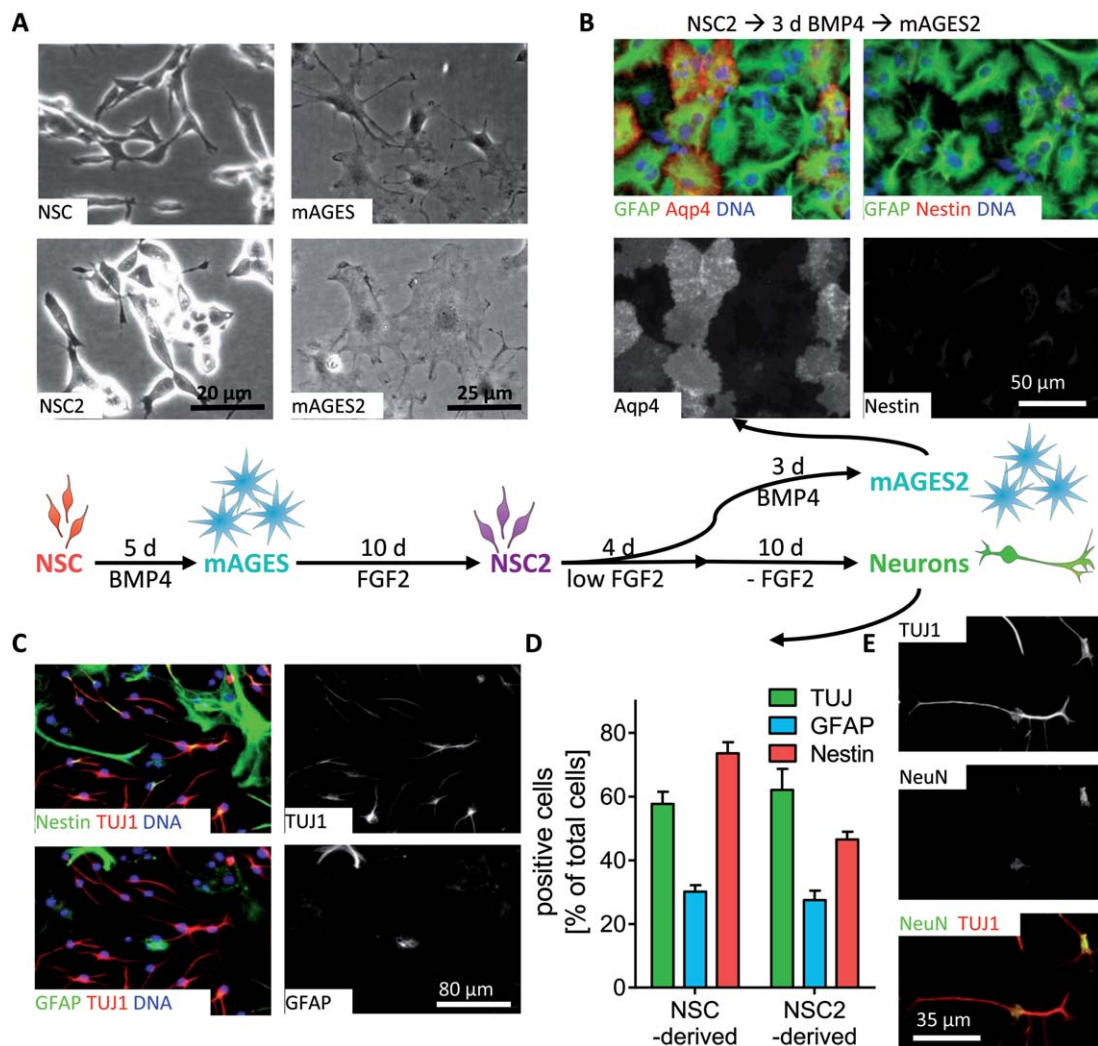


Figure 4. Characterization of NSC2 as multipotent neural stem cells. NSC2, that is, neural stem-like cells obtained from mAGES, were differentiated into either astrocytes (mAGES2) with BMP4 for 3 days (A, B) or into neurons (C, D, E). (A): Phase contrast images show typical neural stem cell morphology of NSC and NSC2 and astrocytic morphology of mAGES and mAGES2. (B): Representative immunofluorescence images of mAGES2, generated from NSC2 by exposure to BMP4 (for 3 days): GFAP (green), and either Aqp4 or nestin are shown (red). Nuclei were stained with H-33342 (blue). (C): NSC2 were differentiated into neurons by a stepwise reduction and subsequent withdrawal of FGF2 for 14 days. After fixation, TUJ1 (red) and either GFAP or nestin (green) were visualized by immunocytochemistry. Nuclei were stained with H-33342 (blue). (D): Either NSC or NSC2 were differentiated into neurons and stained as in (C). Then, the percentage of antigen-positive cells was counted by an automated screening microscope in three different experiments (data are means \pm SEM). (E): Phenotyping of neurons generated from NSC2 by coimmunostaining for β III-tubulin (TUJ1, red) and NeuN (green). Black/white images show individual fluorescent channels for clarity; the colored composite image combines both channels. Abbreviations: Aqp4, aquaporin 4; EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IFN γ , interferon- γ ; mAGES, murine astrocytes generated from embryonic stem cells; NSC, neural stem cells; NSC2, neural stem-like cells; TUJ1, β III-tubulin.

β III-tubulin-positive (TUJ1) neurons, and about 30% GFAP-positive astrocytes (Fig. 4C, 4D). Nestin expression was found to decrease to 20% after an additional week's culture (not shown). Conversely, most TUJ1-positive cells expressed the post-mitotic neuronal marker NeuN in the nucleus (Fig. 4E). In summary, NSC2 were found to be multipotent stem cells, giving rise to astrocytes and neurons with the same differentiation efficiency as the original NSC population.

Comparison of NSC2 with NSC Concerning Gene Expression and Function

To further characterize the phenotype of NSC2, several cell type marker genes were selected, and their expression levels

were compared with those found in mAGES and NSC (Fig. 5A). All astrocyte markers were lower in NSC/NSC2 than in mAGES. The glutamate transporter *Glt-1* (*SLC1A2*) and the calcium-binding protein *S100B* were even lower expressed in NSC2 than in NSC. Neural stem cell markers (*Nestin*, *Blbp*, *Olig2*) were upregulated in NSC2 (and NSC) compared with mAGES. Thus, qPCR analysis confirmed the similarity of NSC2 with NSC.

Next, expression of over 34,000 genes (covered by 45,000 probesets) was measured in mESC, NSC, mAGES, and NSC2 by microarray hybridization. Principal component analysis of global gene expression showed clustering of NSC2 and NSC samples as opposed to distinct groupings for the mESC and

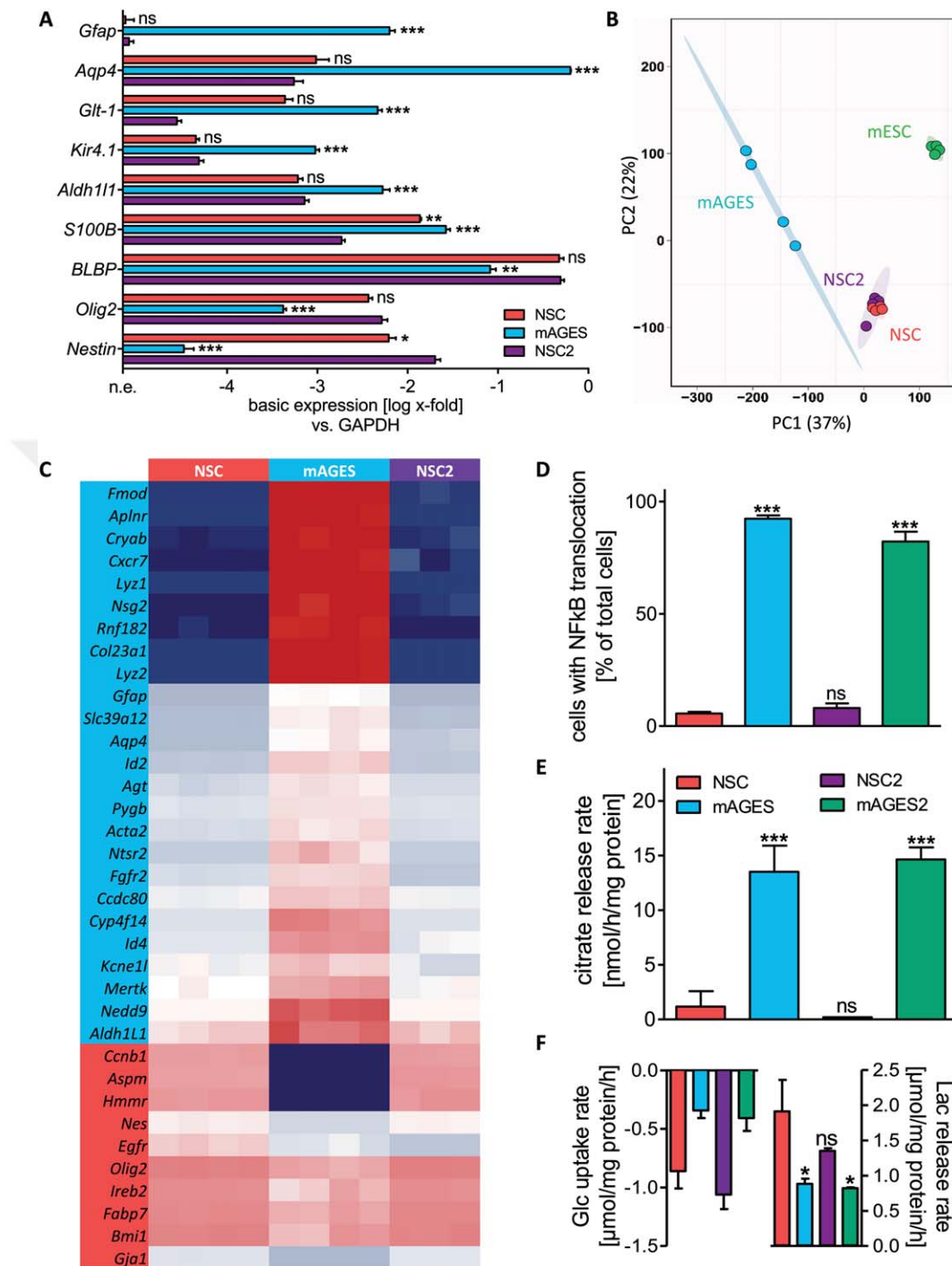


Figure 5. Comparison of primary (NSC) and secondary (NSC2) neural stem cells for gene expression, metabolism and inflammatory competence. **(A):** Expression levels (mRNA, measured by qPCR) in NSC, NSC2, and mAGES of astrocyte markers (*Gfap*, *Aqp4* (aquaporin), *Glt-1* (Slc1A2, glutamate transporter), *Kir4.1* (inwardly-rectifying potassium channel), *Aldh111*, *S100b*), or NSC markers (*nestin*, *Olig2*, *Bbbp*). ***, $p < .0001$; **, $p < .001$; *, $p < .01$; ns, not significant (vs. NSC2). **(B):** Transcriptome data (microarray) obtained for murine embryonic stem cells (mESC), NSC, mAGES, and NSC2. The 2D principal component analysis plot shows 4 biological replicates of each cell type and the 95% confidence interval as shaded ellipses. **(C):** Heatmap of gene expression values for known astrocyte (blue) and NSC (red) marker genes (listed vertically) [51]. Z-scores of normalized expression data plotted for four NSC, four mAGES, and three NSC2 samples (listed horizontally). Blue colors represent low, red colors high expression, with z-scores ranging from 1.4 to -1.4 . Full gene names and corresponding expression values are listed in Supporting Information Fig. 7. **(D):** Cells were exposed to a cytokine mix (=10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL1 β , 20 ng/ml IFN γ) for 30 minutes, and immunostained for the transcription factor NF κ B. Cytosol/nucleus ratio of NF κ B was measured by an automated screening microscope to identify cells with NF κ B nuclear translocation. **(E):** Citrate was measured in the supernatant after 3 and 24 hours to calculate citrate release (normalized to total protein content). **(F):** Glucose/lactate concentrations were measured in the supernatant after 3 and 24 hours. Uptake/release rates (normalized to total protein content) were calculated. Data are means \pm SEM from two biological replicates. Abbreviations: mAGES, murine astrocytes generated from embryonic stem cells; mESC, murine embryonic stem cells; NSC, neural stem cells; NSC2, neural stem-like cells.

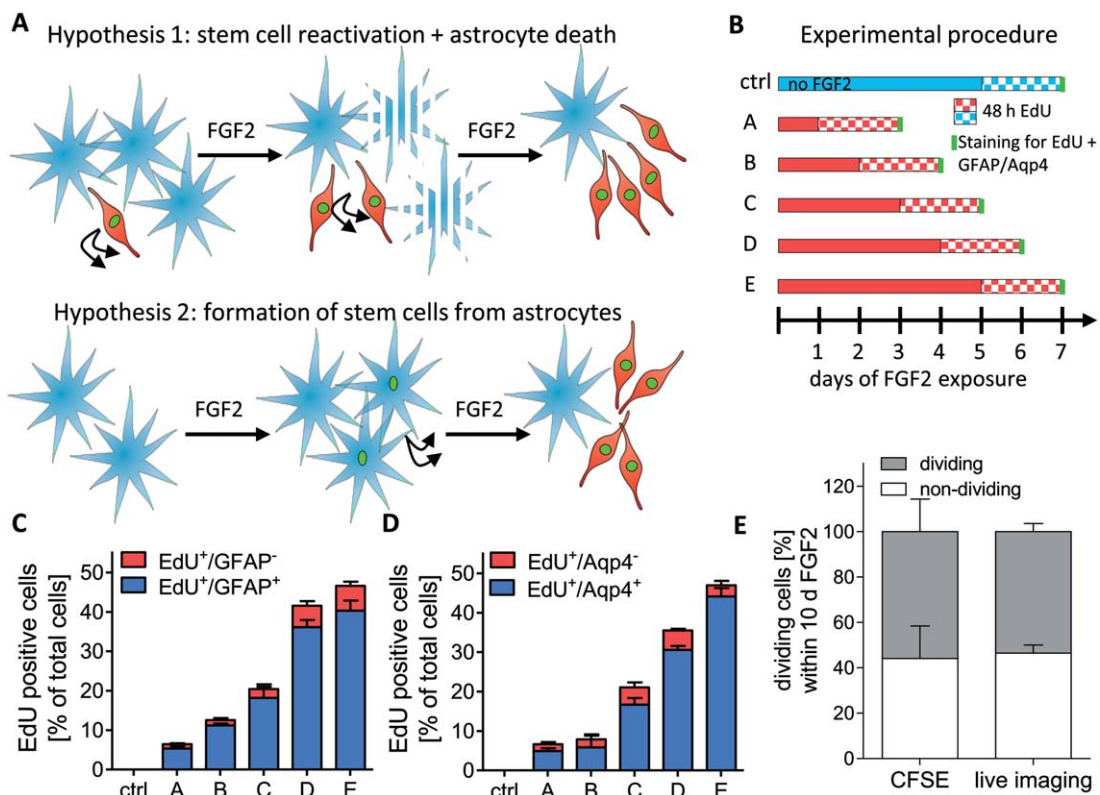


Figure 6. Evidence for generation of NSC2 from differentiated astrocytes. **(A):** Two working hypotheses on the origin of NSC2 have been formulated for further testing. Hypothesis-1: putative nestin-positive quiescent stem cells (red) within the mAGES population (<1%) are stimulated by FGF2 to proliferate (green nuclei), while original mAGES (blue) die. Hypothesis-2: FGF2 induces cell cycle re-entry of a large subpopulation of mAGES (green nuclei); these convert to GFAP⁺/nestin⁺-positive cells, and later to nestin⁺/GFAP⁻ NSC. **(B):** Experimental design to investigate the phenotype of transition cells: mAGES were exposed to FGF2 (0 (blue)/20 ng/ml (red)) for up to 7 days; EdU was added for the last 48 hours before immunostaining. **(C):** Cells were treated as in (B). EdU⁺/GFAP⁺, and EdU⁺/GFAP⁻ cells were counted by high-content imaging. **(D):** The experiment described in (C) was performed with Aqp4-staining instead of GFAP. **(E):** The mAGES were exposed to FGF2 (20 ng/ml) for 10 days, and the percentage cells (from original population) that divided at least once during this period was scored. To identify dividing cells, two different methods were used. Left: mAGES were stained with CFSE before the experiment; quantification of CFSE-fluorescence per cell after the experiment was used to identify cells that had divided 0, 1, 2, 3 or several times, based on label dilution. Right: live-cell continuous time-lapse imaging (tracking of 84 DsRed-transfected single cells was used (details in Supporting Information Figs. 10, 11)). All data are means \pm SEM of three (left) or two (right) biological replicates. Abbreviations: Aqp4, aquaporin 4; CFSE, carboxyfluorescein; EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

mAGES samples, and thus demonstrated the close similarity of NSC2 and NSC (Fig. 5B). This was further confirmed by analysis of significantly differentially expressed genes (DEG): no DEG was found for the NSC/NSC2 comparison.

For a targeted comparison, genes identified previously to distinguish astrocytes from neural stem cells [51] were selected. A heatmap of their normalized expression values, extracted from the microarray data, confirmed the similarity of NSC2 and NSC, and their pronounced differences to mAGES (Fig. 5C).

The high proportion of astrocyte genes in the above comparisons may obscure minor differences between the NSC populations. Therefore, we used a recently-identified set of *in vivo* NSC-specific genes [32] to compare NSC2 with NSC and mAGES. More than 70% of these marker genes showed higher expression in NSC2/NSC than in mAGES (Supporting Information Fig. 8), demonstrating conformity of NSC2 and NSC. The remaining 30% showed high variability in mAGES samples, and were here not suitable to clearly distinguish NSC from mAGES.

After this detailed phenotyping, functional comparisons were performed on the basis of features already known to differ between NSC and mAGES [51]. First, inflammation-

related signaling was explored. Cells were exposed to an inflammatory cytokine mix (TNF α , IL1 β , and IFN γ) for 30 minutes, and NF κ B translocation was measured. NSC2/NSC showed no response at all, while more than 90% of the cells in mAGES/mAGES2 cultures showed NF κ B translocation into the nucleus (Fig. 5D). Thus, NSC2 are clearly not reactive astrocytes. A comparison of the metabolism showed that mAGES2/mAGES released citrate, and exhibited similar glucose consumption and lactate release rates (Fig. 5E, 5F). In contrast, NSC/NSC2 did not release citrate and showed higher metabolic rates compared with mAGES/mAGES2. These data confirm a complete conversion from an astrocytic to a neural stem cell identity, when mAGES are de-differentiated to NSC2.

Evidence for Direct NSC2 Generation from Differentiated Astrocytes

Although the mAGES population comprises >99% astrocytes (GFAP-positive) [51], it cannot be entirely excluded that NSC2 arise from a minor subpopulation of nondifferentiated cells that is re-activated by FGF2. Therefore, two competing hypotheses may explain the generation of NSC2 (Fig. 6A): the

first assumes that some cells within the mAGES population did not differentiate into mature astrocytes upon exposure to BMP4, but rather stayed in a dormant stem cell state. They may start to proliferate upon exposure to FGF2, and overgrow the mAGES. The second hypothesis assumes that a large proportion of mAGES re-enters the cell cycle, and convert into NSC2.

For hypothesis-1 to be true, the original mAGES would need to die upon exposure to FGF2, in order to make space for the expanding NSC, and to explain the observed loss of GFAP-positive cells. Therefore, we carefully examined signs of cell death, and we also measured release of LDH into the medium as integral measure of putatively ongoing cell death. No indication of cell death was observed (Supporting Information Fig. 10A). Hypothesis-1 would be strengthened, if quiescent stem cells could be identified. However, we did not identify any CD133⁺ cells, and the mAGES cultures were homogeneously Ki67⁻, p27⁺, within the range of our detection limits [51].

Hypothesis-2 would be supported, if intermediate cell stages would be identified that combine properties of astrocytes and proliferating cells; for example, GFAP- and/or Aqp4-positive astrocytes should be observed to re-enter the cell cycle and incorporate EdU into DNA upon exposure to FGF2. For this purpose, cells double-positive for EdU and an astrocyte marker were identified at different time points during the 8-day de-differentiation process (Fig. 6B). At all timepoints, most of the proliferating (EdU-positive) cells coexpressed GFAP and/or Aqp4 (Fig. 6C, 6D). After day 7, the proportion of GFAP and EdU double-positive cells decreased, consistent with the downregulation of GFAP after prolonged FGF2 exposure. These data indicate that mature, GFAP- and Aqp4-positive astrocytes re-entered the cell cycle in response to FGF2.

Three imaging approaches were used to gain further insight: first, we used an established method of fluorescent label (CFSE) dilution [61] (adapted to adherent culture) to calculate the percentage of dividing cells. A histogram of total CFSE intensity in 20,000 cells showed that label intensity decreased in 72% of the cells in FGF2-exposed cultures (to indicate at least one division), compared to control cells not exposed to FGF2. Taking into account the quantification of label dilution steps (2x, 4x, 8x) in cells, and calculating back the respectively increased cell numbers at the time point of analysis, we found that >50% of the mAGES originally present at day 0 had divided at least once (Fig. 6E, Supporting Information Fig. 10B).

Second, to confirm the CFSE-labeling data, and to directly follow mAGES division, live cell time lapse imaging was performed. The mAGES were transfected with DsRed to track single cells (using Timm's Tracking Tool, which has been developed to track freshly isolated neural stem cells in vitro [54, 55]) (Supporting Information Fig. 11B, 11D, Supporting Information Video 1). Lineage trees were produced for 84 cells, of which 42 (50%) divided during 10 days of FGF2 exposure. Many of the cells divided once (19%), while another large subpopulation (19%) divided ≥ 3 times (Supporting Information Fig. 10C). Most of the cells (60%) started their first cell division on days 6-8 of FGF2 exposure (Supporting Information Fig. 10D), which is consistent with EdU incorporation starting to increase at day 5.

As third imaging approach, we followed the cells by phase contrast time-lapse microscopy in low density cultures, to

make sure that the entire population could be captured. This independent set of experiments also showed that around 50% of the mAGES (flat cells with a star-shaped morphology) divided (Supporting Information Fig. 11A, 11C, Supporting Information Video 2). After two to three divisions, cells changed their appearance and adopted a morphology similar to that of NSC (Supporting Information video 2, Supporting Information Fig. 3). No cell division was observed in control cultures maintained in medium containing no factors (Supporting Information Video 3). Thus, a large body of evidence supports hypothesis-2.

Blocking the Generation of NSC2 from mAGES by IFN γ Signaling

To investigate how de-differentiation of astrocytes may be affected by mediators present in a pathological environment, mAGES were exposed to inflammatory cytokines (TNF α , IL1 β , IFN γ) during de-differentiation with FGF2. For a first overview, resazurin reduction was measured to assess cell proliferation in response to FGF2. TNF α or IL1 β alone did not reduce proliferation, but a combination of both cytokines was effective. IFN γ , alone or in combination with other cytokines, also attenuated the proliferation of mAGES (Fig. 7A). These data were confirmed, when EdU incorporation was measured: the complete cytokine mix (CCM) or various combinations of the three cytokines reduced DNA synthesis to a large extent (Fig. 7B). IFN α or IFN β did not show any effect on the FGF2-induced de-differentiation of mAGES (not shown). Thus, the IFN γ receptor specifically affected astrocyte de-differentiation, in addition to its effect described directly on quiescent NSC [62]. Notably, the downregulation of GFAP and the upregulation of nestin during de-differentiation were affected by the same cytokine combinations as for proliferation/DNA synthesis, but the overall effect size was smaller (Supporting Information Fig. 12).

As IFN γ alone was sufficient to inhibit the de-differentiation of mAGES, its mechanism of action was further explored. No effect of nitric oxide (NO) due to induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) after cytokine exposure could be observed, as tested by several iNOS inhibitors (L-NNA, AMT, 7-NINA) or NO-donors in mAGES during exposure to FGF2 (data not shown). Ruxolitinib (Rux), an inhibitor of JAK1/2 (Fig. 3A), was used to test the role of the JAK/STAT pathway. In mAGES exposed to FGF2 *plus* IFN γ or CCM, cotreatment with ruxolitinib prevented the attenuation of proliferation, and of EdU incorporation, which is otherwise triggered by IFN γ or CCM (Fig. 7C, 7D, Supporting Information Fig. 13A, 13B). Western blot analysis revealed that the same concentration of Rux, which showed strong effects on cell fate (1 μ M), also completely blocked phosphorylation of STAT1 after short-term exposure to IFN γ or CCM (Fig. 7E, 7F), or after prolonged exposure (Supporting Information Fig. 13C). We also found that neither IFN γ nor ruxolitinib affected upstream FGF2 signaling (phosphorylation of ERK) (Supporting Information Fig. 13D). From this, we conclude that the JAK/STAT pathway, triggered by IFN γ , attenuates astrocyte de-differentiation downstream of FGF2 receptor surface expression and proximal signaling (Fig. 3A).

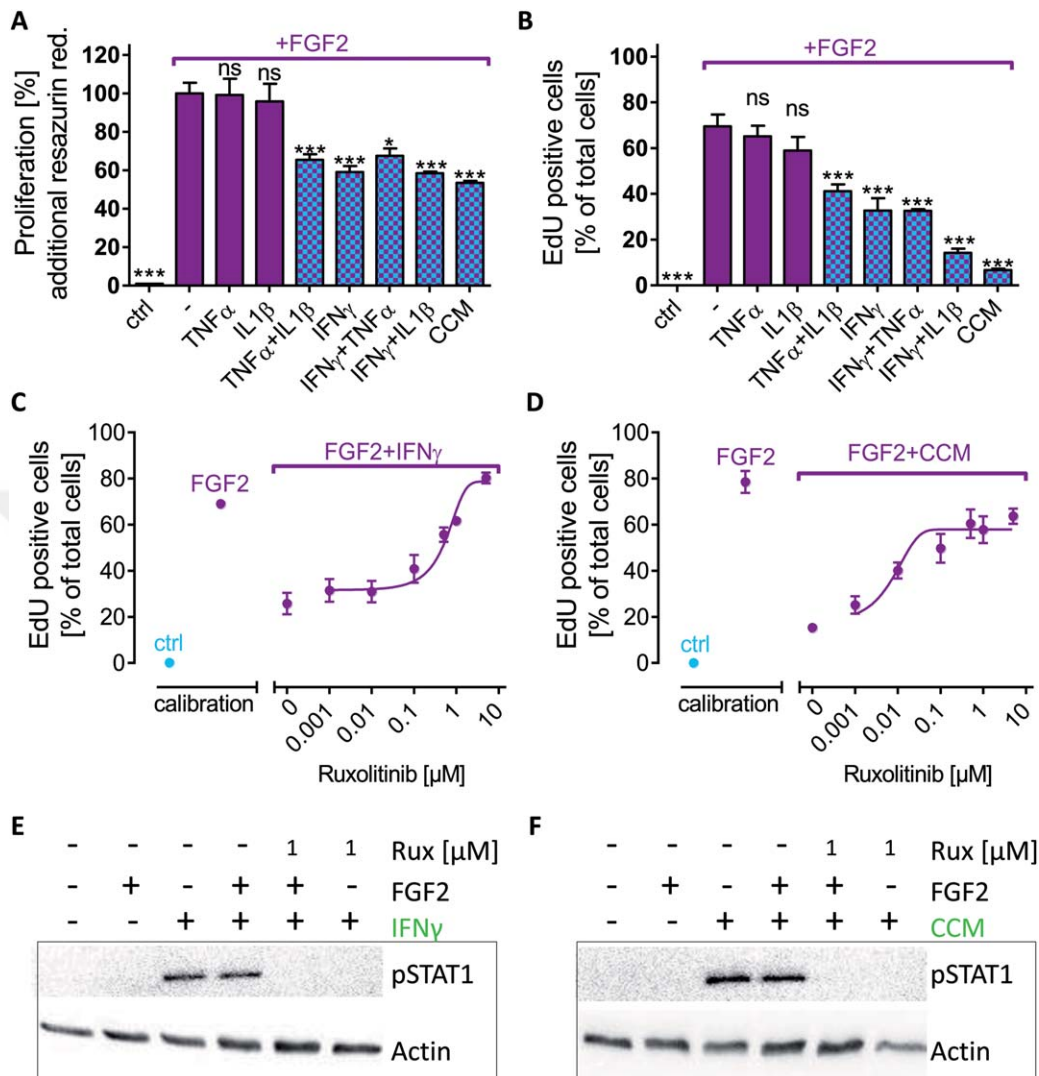


Figure 7. Block of the generation of NSC2 from mAGES by IFN γ signaling. **(A):** The mAGES were exposed to 20 ng/ml FGF2 for 8 days, and resazurin reduction was used as surrogate measure of cell number. Data indicate the percentage of increased resazurin fluorescence signal (proportional to cell number) relative to ctrl conditions (no FGF2). FGF2-exposed cells were cotreated with various combinations of inflammatory cytokines (10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL1 β , 20 ng/ml IFN γ) or complete cytokine mix (CCM). Data are means \pm SEM; ***, $p < .0001$; *, $p < .01$; ns, not significant (vs. FGF2). **(B):** The experiment was performed as in (A), with EdU added during the last 48 hours, and staining of nuclei with H-33342. Percentage of EdU-positive cells was quantified. **(C):** The mAGES were exposed to 20 ng/ml FGF2 for 8 days. FGF2-exposed cells were cotreated with 20 ng/ml IFN γ and various concentrations of ruxolitinib (Rux). EdU was quantified as in (B). **(D):** The experiment was performed as in (C), with CCM instead of IFN γ . **(E):** The mAGES were preincubated for 30 minutes with ruxolitinib (1 μ M), and exposed to FGF2 (20 ng/ml) and/or IFN γ (20 ng/ml) for 20 minutes. Phospho-STAT1 (pSTAT1) was analyzed by Western blot (actin as loading control). The experiment was repeated once with similar result. **(F):** The experiment was performed as in (E), with CCM instead of IFN γ . The experiment was repeated once with similar result. Abbreviations: CCM, complete cytokine mix; EdU, 5-Ethynyl-2-deoxyuridine; IFN γ , interferon- γ ; pSTAT1, Phospho-STAT1.

DISCUSSION

It is widely accepted that postmitotic astrocytes may re-enter the cell cycle under certain conditions [20, 44]. However, de-differentiation of genuine astrocytes into neural stem cells and their conversion into neurons usually requires genetic reprogramming or pathological situations, like trauma, excitotoxicity, or stroke [50, 62–69]. It has been suggested that migration of cells from the stem cell niches to the lesion site also contributes [70] to the in vivo emergence of neurogenic cells (identified by in vitro neurosphere assays [44, 67]). Most

likely, various mechanisms contribute to the astrocyte activation/de-differentiation observed in vivo, and they are paralleled by large heterogeneity within the astrocyte population and the NSC [22, 62, 68, 71, 72]. We chose here a simplified experimental approach that allowed direct and quantitative studies of cell cycle re-entry of mature astrocytes, not manipulated by molecular biology approaches. The high homogeneity of the mAGES astrocyte cultures used here allowed quantifications of cell type, function, and plasticity over long time spans and with little background noise. This facilitated the identification of an FGF2 receptor pathway (involving

tyrosine kinase activation and ERK phosphorylation) as a signal for cells to resume proliferation. The neurogenic NSC2 derived from mAGES astrocytes upon FGF2 exposure resembled NSC concerning self-renewal, phenotype, metabolism, proliferation behavior, and bi-potent differentiation capacity. Thus, the type of neurogenic cells generated here does not resemble reactive astrocytes (that may divide once or twice in the brain, and retain many astrocytic markers), but rather exemplifies full reversion to an NSC-like state. Notably, cultures of mAGES could be converted into neurons without any re-plating steps, and only by change of medium conditions within about three weeks (not shown). However, this conversion of astrocytes to neurons in a cell culture dish is not to be confused with trans-differentiation [73]; in our system, mAGES first de-differentiated into NSC2 (10 days; +FGF2), and afterwards generated neurons (14 days; -FGF2).

A central issue of all de-differentiation studies with primary cells or other complex cell cultures is the exclusion of a major role of an already present stem cell population, or of a transgene affecting the cell cycle [29]. Although mAGES have been carefully characterized and phenotyped for the absence of cells with quiescent NSC markers [51], it was important to provide direct evidence that a majority of astrocytes in the cultures transformed into NSC2. Co-staining of EdU and Aqp4 suggested that indeed mature astrocytes re-entered the cell cycle. CFSE-label dilution and live imaging of mAGES cultures, as a direct measure of cell division, further confirmed the cell cycle re-entry of about 50% of the cells (within the experimental time span observed). This high percentage (a) excludes the proliferation of only a minor subpopulation within mAGES cultures as major cause of NSC2 formation, and (b) corroborates a high efficiency of astrocyte de-differentiation under optimal conditions. For comparison, 22.5% of the astrocytes isolated from murine brains after stab-wound injury were able to form neurospheres [44].

In some studies, EGF has been shown to induce proliferation in astrocytes [38, 39]. This was not confirmed here, although mAGES expressed functional EGF receptors (Fig. 3A). Even an indirect contribution was excluded, as de-differentiation of mAGES was possible in the presence of non-cytotoxic, but effective concentrations of the EGF receptor inhibitor gefitinib. In view of these findings, it may be worth investigating in models that have been assumed to be EGF-dependent [38], whether production of endogenous FGF2 after exposure to EGF [39] would provide the pivotal signal for proliferation of cells. In fact, primary astrocytes have been observed to re-enter the cell cycle in response to FGF2 [40–42]. Discrepancies between studies may be due to different signaling systems being employed, depending on the maturity status of cells: EGF may have a more important role for less differentiated cells, and such cells are found as a subpopulation in primary astrocyte cultures.

The findings of our study are consistent with the broad role of FGF2 in neurodevelopment [74] and acute CNS injuries [45]. The cytokine stimulates proliferation of NSC in stem cell niches [45, 75–77], and it improves regeneration after traumatic injury or ischemia [78, 79]. The high levels of FGF2 found in acute neurotrauma correlate with a proliferation of astrocytes in such conditions, while low or absent regulation in chronic neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease [80], correlate with a failure of astrocytes to

proliferate [44]. The importance of FGF2 (in contrast to EGF) on NSC maintenance and astrocyte differentiation inhibition is in good agreement with earlier findings on rat [81]. However, terminally-differentiated astrocytes generated by exposure of rat NSC to BMP4 did not de-differentiate upon exposure to FGF2, and thus behaved differently from mAGES.

To obtain a pure population of fully differentiated astrocytes, an alternative to mAGES is the use of primary cultures in combination with FACS sorting or panning for genuine astrocyte markers [56, 82]. In our hands, the required manipulations and culture conditions led to a slight inflammation-like activation of (untreated) astrocytes, and such conditions largely change their properties [22, 23, 83]. The findings presented here, confirm the pronounced effects that external inflammatory factors may have: for instance, the model system established here allowed for the identification of IFN γ as one of the pathologically-relevant inflammatory factors likely to attenuate the de-differentiation of astrocytes in many disease models. IFN γ (and complete cytokine mix) inhibited the de-differentiation of mAGES by a phosphorylation of STAT1, while inhibition of the JAK/STAT pathway by ruxolitinib restored FGF2-induced proliferation. The exact interference between STAT1 phosphorylation and FGF2 signaling needs further examination (Fig. 3A). The astrocyte de-differentiation was not only attenuated by IFN γ , a cytokine produced in vivo from infiltrating cells [19, 84] and from microglia [85, 86], but also by the very common combination of microglia-derived [14–18] inflammatory factors TNF *plus* IL-1. In our study, IL-1 or TNF alone did not attenuate de-differentiation. This may be due to an intrinsic property of such NF- κ B-inducing cytokines to rather support de-differentiation of astrocytes [28, 87].

CONCLUSION

In summary, we have presented here evidence for defined signaling pathways that antagonistically control the conversion of astrocytes to NSC, that is, cells capable of forming new neurons. The experimental system developed on the basis of these findings may be used to identify targets, and possibly to screen for new drug candidates that foster the conversion of astrocytes to neurons in CNS pathologies, and that could then be tested in vivo for their efficacy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DFG-funded graduate schools RTG 1331 and KoRS-CB, the Doerenkamp-Zbinden foundation, and the BMBF. Stay of K.U.T. at Konstanz University was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK), 2214/A International Research Fellowship Program. JVS is the recipient of a Ph.D. fellowship (PD/BD/52474/2014) from FCT Portugal. EG acknowledges support by grants from the Luxembourgish Fonds Nationale de la Recherche (through the National Centre of Excellence in Research (NCER) on Parkinson's disease, I1R-BIC-PFN-15NCER, and Grant C13/BM/5782168). FO acknowledges support by research grants MEC (BFU2014-53654-P), BRADE-CM (S2013/ICE-2958) and the Ramon y Cajal Program of the Spanish Ministry of Economy and competitiveness (MEC) (RYC-2013-13290). Bioinformatics analyses presented in this paper were carried out in part using the HPC facilities of the University of

Luxembourg (see <http://hpc.uni.lu>). We thank Margit Henry and Prof. Agapios Sachinidis for their technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.K.: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing; S.G., K.U.T., F.O., J.V.S., A.T., C.B., and E.G.: Collection and/or

assembly of data, Data analysis and interpretation; B.B., P.M.A., and M.L.: Conception and design, Final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Doetsch F, Caille I, Lim DA et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97:703–716.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS et al. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:7153–7160.
- Steindler DA, Laywell ED. Astrocytes as stem cells: Nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* 2003;43:62–69.
- Ihrig RA, Alvarez-Buylla A. Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* 2008;331:179–191.
- Berninger B, Costa MR, Koch U et al. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 2007;27:8654–8664.
- Heinrich C, Blum R, Gascon S et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 2010;8:e1000373.
- Chouchane M, Costa MR. Cell therapy for stroke: Use of local astrocytes. *Front Cell Neurosci* 2012;6:49.
- Addis RC, Hsu FC, Wright RL et al. Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector. *PLoS One* 2011;6:e28719.
- Corti S, Nizzardo M, Simone C et al. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* 2012;318:1528–1541.
- Berninger B. Making neurons from mature glia: A far-fetched dream? *Neuropharmacology* 2010;58:894–902.
- Su Z, Niu W, Liu ML et al. In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat Commun* 2014;5:3338.
- Guo Z, Zhang L, Wu Z et al. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 2014;14:188–202.
- Torper O, Pfisterer U, Wolf DA et al. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:7038–7043.
- Henn A, Kirner S, Leist M. TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes. *J Immunol* 2011;186:3237–3247.
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathological brain. *Nat Neurosci* 2007;10:1387–1394.
- Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312–318.
- Falsig J, Latta M, Leist M. Defined inflammatory states in astrocyte cultures: Correlation with susceptibility towards CD95-driven apoptosis. *J Neurochem* 2004;88:181–193.
- Falsig J, Porzgen P, Lund S et al. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 2006;96:893–907.
- Lees JR, Golumbek PT, Sim J et al. Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *J Exp Med* 2008;205:2633–2642.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009;32:638–647.
- Sofroniew MV. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 2014;20:160–172.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 2014;565:23–29.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010;119:7–35.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3581–3586.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999;23:297–308.
- Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 2008;28:2394–2408.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 2016;532:195–200.
- Gabel S, Koncina E, Dorban G et al. Inflammation promotes a conversion of astrocytes into neural progenitor cells via NF- κ B activation. *Mol Neurobiol* 2015;53:5041–5055.
- Michelucci A, Bithell A, Burney MJ et al. The neurogenic potential of astrocytes is regulated by inflammatory signals. *Mol Neurobiol* 2016;53:3724–3739.
- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005;50:427–434.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54:15–36.
- Gotz M, Sirko S, Beckers J et al. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* 2015;63:1452–1468.
- Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 2010;7:470–482.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2000;20:2218–2228.
- Zhang L, Yin JC, Yeh H et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015;17:735–747.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Kim JK et al. Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. *Neurosci Res* 1992;13:1–17.
- Franke H, Krugel U, Illes P. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 1999;28:190–200.
- Nakatsuji Y, Miller RH. Density dependent modulation of cell cycle protein expression in astrocytes. *J Neurosci Res* 2001;66:487–496.
- Mayer SI, Rossler OG, Endo T et al. Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires EGR transcription factors. *J Cell Sci* 2009;122:3340–3350.
- Neary JT, Kang Y, Shi YF. Cell cycle regulation of astrocytes by extracellular nucleotides and fibroblast growth factor-2. *Purinergic Signal* 2005;1:329–336.
- Hou YJ, Yu AC, Garcia JM et al. Astrogliosis in culture. IV. Effects of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 1995;40:359–370.
- Eclancher F, Kehrli P, Labourdette G et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. *Brain Res* 1996;737:201–214.
- Pitter KL, Tamagno I, Feng X et al. The SHH/Gli pathway is reactivated in reactive glia and drives proliferation in response to neurodegeneration-induced lesions. *Glia* 2014;62:1595–1607.
- Sirko S, Behrendt G, Johansson PA et al. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* 2013;12:426–439.
- Robel S, Berninger B, Gotz M. The stem cell potential of glia: Lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 2011;12:88–104.
- Mira H, Andreu Z, Suh H et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2010;7:78–89.

- 47 Hampton DW, Asher RA, Kondo T et al. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *Eur J Neurosci* 2007;26:3024–3035.
- 48 Xiao Q, Du Y, Wu W et al. Bone morphogenetic proteins mediate cellular response and, together with Noggin, regulate astrocyte differentiation after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2010;221:353–366.
- 49 Magnusson JP, Goritz C, Tatarishvili J et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 2014;346:237–241.
- 50 Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell research in stroke: How far from the clinic? *Stroke* 2011;42:2369–2375.
- 51 Kleiderman S, Sa JV, Teixeira AP et al. Functional and phenotypic differences of pure populations of stem cell-derived astrocytes and neuronal precursor cells. *Glia* 2016;64:695–715.
- 52 Zimmer B, Schildknecht S, Kuegler PB et al. Sensitivity of dopaminergic neuron differentiation from stem cells to chronic low-dose methylmercury exposure. *Toxicol Sci* 2011;121:357–367.
- 53 Ortega F, Costa MR, Simon-Ebert T et al. Using an adherent cell culture of the mouse subependymal zone to study the behavior of adult neural stem cells on a single-cell level. *Nat Protoc* 2011;6:1847–1859.
- 54 Rieger MA, Schroeder T. Analyzing cell fate control by cytokines through continuous single cell biochemistry. *J Cell Biochem* 2009;108:343–352.
- 55 Costa MR, Ortega F, Brill MS et al. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 2011;138:1057–1068.
- 56 Foo LC, Allen NJ, Bushong EA et al. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* 2011;71:799–811.
- 57 Hansson E. Primary astroglial cultures. A biochemical and functional evaluation. *Neurochem Res* 1986;11:759–767.
- 58 Stahlberg A, Andersson D, Aurelius J et al. Defining cell populations with single-cell gene expression profiling: Correlations and identification of astrocyte subpopulations. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e24.
- 59 Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I et al. Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res* 2006;83:1515–1524.
- 60 Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* 1999;19:7077–7088.
- 61 Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp* 2010;(44):2259.
- 62 Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A et al. Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury. *Cell Stem Cell* 2015;17:329–340.
- 63 Arvidsson A, Collin T, Kirik D et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963–970.
- 64 Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006;26:6627–6636.
- 65 Ohira K, Furuta T, Hioki H et al. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci* 2010;13:173–179.
- 66 Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429–441.
- 67 Faiz M, Sachewsky N, Gascon S et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke. *Cell Stem Cell* 2015;17:624–634.
- 68 Bardehle S, Kruger M, Buggenthin F et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci* 2013;16:580–586.
- 69 Nato G, Caramello A, Trova S et al. Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Development* 2015;142:840–845.
- 70 Peron S, Berninger B. Imported stem cells strike against stroke. *Cell Stem Cell* 2015;17:501–502.
- 71 Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: An underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 2010;20:588–594.
- 72 Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 2012;814:23–45.
- 73 Gascon S, Murenu E, Masserdotti G et al. Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell* 2016;18:396–409.
- 74 Guillemot F, Zimmer C. From cradle to grave: The multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron* 2011;71:574–588.
- 75 Wagner JP, Black IB, DiCicco-Bloom E. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1999;19:6006–6016.
- 76 Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997;17:5820–5829.
- 77 Frinchi M, Bonomo A, Trovato-Salinaro A et al. Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2008;447:20–25.
- 78 Salmasso N, Kim J, Saenz JM et al. Long-lasting therapeutic actions of fibroblast growth factor 2 in a model of brain injury associated with very premature birth. *Int J Dev Neurosci* 2015;47:89.
- 79 Goldshmit Y, Frisca F, Pinto AR et al. Fgf2 improves functional recovery-decreasing gliosis and increasing radial glia and neural progenitor cells after spinal cord injury. *Brain Behav* 2014;4:187–200.
- 80 Claus P, Werner S, Timmer M et al. Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2004;360:117–120.
- 81 Sun Y, Hu J, Zhou L et al. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells. *J Cell Sci* 2011;124:1867–1877.
- 82 Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron* 2016;89:37–53.
- 83 Zamanian JL, Xu L, Foo LC et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 2012;32:6391–6410.
- 84 Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009;15:192–199.
- 85 Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H et al. Production of interferon- γ by microglia. *Mult Scler* 2006;12:558–564.
- 86 Chien CH, Lee MJ, Liou HC et al. Microglia-derived cytokines/chemokines are involved in the enhancement of LPS-induced loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in DJ-1 knockout mice. *PLoS One* 2016;11:e0151569.
- 87 Michelucci A, Bithell A, Burney MJ et al. The neurogenic potential of astrocytes is regulated by inflammatory signals. *Mol Neurobiol* 2016;53:3724–3739.



See www.StemCells.com for supporting information available online.