

Neurale Differenzierung adulter Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut und Identifizierung nach Implantation in das Rattenhirn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Susanne Greschat
aus Singen

Düsseldorf 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2005

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	5
1. EINLEITUNG	9
1.1 Frühe Neurogenese: Gastrulation und Neurulation	9
1.2 Definition und Abgrenzung der Stammzelle.....	12
1.3 Embryonale Stammzellen.....	14
1.4 Adulte Stammzellen.....	15
1.5 Der Zellzyklus: Regulation von Proliferation und Differenzierung	16
1.6 Proliferation von Stammzellen	19
1.7 Differenzierung von Stammzellen.....	20
1.8 Plastizität von Stammzellen.....	20
1.9 Migration von Stammzellen	22
1.10 Nabelschnurblut.....	23
1.10.1 Etablierte Verwendung des Nabelschnurbluts	23
1.10.2 Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC)	24
1.11 Therapiemöglichkeiten mit Stammzellen	25
1.11.1 Anforderungen an Zelltransplantate	25
1.12 Fragestellung und Zielsetzung.....	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Nomenklatur der USSC	27
2.2 Kultivierung der USSC.....	27
2.3 Beschichtung der Zellkulturplatten.....	28
2.4 Differenzierung der USSC in Zellkultur	28
2.4.1 Differenzierung mit XXL-Medium	28
2.4.2 DA-Medium und Tyrosinhydroxylase-Induktion.....	29
2.5 Immuncytochemische und immunhistochemische Färbungen	31
2.5.1 Prinzip der Färbungen.....	31
2.5.2 Puffer und Lösungen.....	32
2.5.3 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	33
2.5.4 Immuncytochemisches Färbeprotokoll.....	35
2.5.5 Immunhistochemische Färbeprotokolle.....	36
2.5.6 Auswertung der immuncytochemischen und histochemischen Färbungen..	38

2.6 BrdU-Inkorporation und Apoptose	38
2.7 Funktionalitätstest der USSC durch Patch-clamp	40
2.7.1 Grundlagen der Patch-clamp Technik.....	40
2.7.2 Durchführung der Patch-clamp Experimente	42
2.8 Molekularbiologische Analyse der USSC Differenzierung	43
2.8.1 RNA-Isolierung aus USSC	43
2.8.2 Reverse Transkription (RT-PCR)	43
2.8.3 Prinzip der quantitativen PCR mit Taqman®.....	44
2.8.4 Durchführung der quantitative PCR	44
2.9 Funktionalitätstest durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	45
2.9.1 HPLC-Vorversuche und Probengewinnung	46
2.9.2 HPLC-Analyse und Auswertung.....	48
2.10 Markierung der USSC mit PKH26	49
2.11 Versuchstiere.....	49
2.12 Tierexperimente.....	50
2.12.1 Immunsuppression.....	50
2.12.2 Prinzip der stereotaktischen Implantation	50
2.12.3 Implantation PKH26-markierter USSC	51
2.12.4 Implantation unmarkierter USSC	51
2.12.5 Perfusion.....	52
2.13 Markierung der USSC durch Lipofektion mit USPIO	52
2.13.1 Markierung der USSC und <i>in vitro</i> -Vorversuche	52
2.13.2 Implantation und Analyse USPIO markierter USSC <i>in vivo</i>	53
2.14 Aufarbeitung der Gehirne	54
2.15 Auswertung der Implantationsexperimente.....	54
2.15.1 Semiquantitative Bestimmung hTau-immunpositiver Zellen.....	54
2.15.2 Immunhistochemische Identifizierung der USSC im Rattenhirn	55
2.15.3 Bestimmung der Lokalisation und Verteilung der USSC <i>in vivo</i>	55
3. ERGEBNISSE	56
3.1 Proliferation und Zellzyklusausstieg der USSC	56
3.2 Zellreduktion durch XXL- Inkubation.....	59
3.3 Neurale Differenzierung der USSC durch XXL- Medium	59
3.3.1 Morphologische Veränderungen der USSC	59
3.3.2 Expression unterschiedlicher neuronaler Proteine	60
3.3.3 Expression glialer Proteine	64
3.3.4 Expression unterschiedlicher Transmitter-synthetisierender Enzyme	67
3.3.5 Immunocytochemischer Nachweis spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanäle	72
3.3.6 Kontrollversuch: XXL-Inkubation von humanen Fibroblasten.....	72

3.4 Nachweis der neuronalen Differenzierung der USSC durch quantitative PCR..	73
3.5 Effekte der Einzelkomponenten des XXL-Mediums auf Zellmenge und Differenzierung	74
3.6 Reversible Induktion des dopaminergen Phänotyps durch DA-Medium	75
3.7 Funktionalitätstest der USSC mit Hilfe der Patch-clamp Technik	83
3.8 Funktionalitätstest der USSC durch HPLC-Analyse	86
3.9 Etablierung der Nachweismethoden zur USSC-Identifizierung in vivo	89
3.9.1 Zellkulturexperimente mit PKH26-markierten USSC	89
3.9.2 <i>In vitro</i> -Experimente mit USPIO-markierten USSC	92
3.9.3 Spezifität des für die USSC-Identifizierung verwendeten Antikörpers.....	93
3.10 Identifizierung PKH26-markierter USSC nach Implantation.....	94
3.10.1 Verteilung PKH26-markierter Zellen.....	94
3.10.2 Immunhistochemische Untersuchung des Phänotyps PKH26-markierter Zellen	99
3.10.3 PKH26-Kontrollversuch und Autofluoreszenz	106
3.11 Identifizierung der USSC mit Hilfe der Kernspintomographie	108
3.12 Immunhistochemische Identifizierung unmarkierter USSC in vivo.....	109
3.12.1 Lokalisationen der USSC im Rattenhirn.....	109
3.12.2 Ausbreitung der USSC nach Implantation.....	112
3.13 Tumorinzidenz	113
4. DISKUSSION	116
4.1 Differenzierung der USSC in Zellkultur	116
4.1.1 Neuronale Differenzierung durch XXL-Medium.....	116
4.1.2 Gliale Differenzierung durch XXL-Medium	118
4.1.3 Co-Expression von Transmitterphänotypen durch XXL-Medium	118
4.2 Proliferation und Zelltod der USSC.....	119
4.3 Zusammensetzung des XXL-Mediums	120
4.4 Induktion des dopaminergen Phänotyps	121
4.5 Funktionalität differenzierter USSC	124
4.5.1 Spannungsabhängige Na ⁺ -Kanäle und Patch-clamp	124
4.5.2 Funktionalitätstest mit Hilfe der HPLC-Analytik.....	125
4.6. Implantationsort Gehirn: Immunreaktion und Autofluoreszenz	126
4.7 Identifizierung implantierter USSC in vivo.....	128
4.7.1 Identifizierung PKH26-markierter USSC	128
4.7.2 Identifizierung USPIO-markierter USSC mit Hilfe des MRT	129

4.7.3 Immunhistochemische Identifizierung unmarkierter USSC	130
4.8 Überleben und Verteilung implantierter USSC in vivo	131
4.9 Differenzierung der USSC in vivo	134
4.9.1 Neuronale Differenzierung der USSC <i>in vivo</i>	134
4.9.2 Gliale Differenzierung der USSC <i>in vivo</i>	135
4.10 Tumorinzidenz	136
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	138
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	141
7. DANKSAGUNG	149

Abkürzungen

[A]	Ampere
[T]	Tesla
[V]	Volt
3V	Dritter Ventrikel
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor, FGF-1
AG	Antigen
AK	Antikörper
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor, FGF-2
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Brom-Desoxyuridin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Cholin-Azetyltransferase
CC	Corpus callosum
CS	Deckgläschen, Coverslip
d	Tag, day
DA	Dopamin
DAB	3,3`- Diaminobenzidin
DAPI	4,6`- Diamidino - 2 - phenylindol
DAT	Dopamintransporter
db-cAMP	Dibutiryl - cAMP
DCX	Doublecortin
DDC	Dopa - Decarboxylase
DG	Gyrus dentatus, Struktur des Hippocampus
DHBA	Dihydroxybenzylamin
div	Tage in Zellkultur, days <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E 16	Embryonaltag 16
EB	Embryoid body, Embryoidkörperchen

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESZ	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	Fluorescent activating cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
GABA	γ - Aminobuttersäure
GAPDH	Glyzerinaldehyd-6-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
gp	Meerschwein, guinea pig
gt	Ziege, goat
GVHD	graft versus host disease
h	Stunde
HE	Hämalaun - Eosin
HLA	Human leucocyte antigen
hNuc	humaner Kern
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
hTau	humanes Tau-Protein
I	Strom
i.d.R.	in der Regel
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICM	Innere Zellmasse
kbp	Kilobasenpaare
KCB	Kourion Cord Blood
KCl	Kaliumchlorid
LV	Lateraler Ventrikel
M	Monat
MEA	Multielektroden-Array
Mio.	Millionen
MPI	Max-Planck-Institut
MRT	Magnetresonanztomographie

ms	Maus
MSC	Mesenchymale Stammzellen
Na	Natrium
NeuN	Neuronaler Kern
NF	Neurofilament
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Normales Ziegenserum
NHI	National Institute of Health
NT2-Zellen	humane Neuroteratokarzinom-Zellen, Zelllinie
ODC	Ornithin-decarboxylase
OP	Operation
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RA	<i>all-trans</i> -Retinsäure
rbt	Kaninchen, rabbit
RMS	Rostral Migratory Stream
RNAi	RNA interference
rpm	U/ min
RT	Raumtemperatur
s.c.	sub cutan
SHH	Sonic hedhog
Syn	Synaptophysin
TH	Tyrosinhydroxylase
TPA	Phorbol-12 - myristat -13 - acetat
TTX	Tetrodotoxin
TUNEL	Terminal Deoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labelling
Tx	Triton
U	Spannung
UCB	Nabelschnurblut, umbilical cord blood

ÜN	über Nacht
USPIO	Ultrasmall paramagnetic iron-oxide particles
USSC	Unrestricted somatic stem cells
Wo	Woche
XXL	Differenzierungsmedium
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Frühe Neurogenese: Gastrulation und Neurulation

Alles menschliche Leben entwickelt sich letztlich aus einer totipotenten Stammzelle - der befruchteten Eizelle. Die Tatsache, dass sich während der Embryogenese nach einer Teilung von polaren Zellen keine identischen Tochterzellen mehr bilden, sondern differenzierte Zellen, stellt ein wichtiges Prinzip der Embryogenese dar. In welche Richtung sich eine Zelle während der Embryogenese weiterentwickelt, wird hierbei von Organisatoren, Signalmolekülen sowie der Ausrichtung des Embryos im dreidimensionalen Raum bestimmt. Nach der Befruchtung der Eizelle entwickelt sich über das 2-, 4- und 8-Zell-Stadium und der Morula die frühe Blastozyste (Abb. 1.1). In diesem frühen Stadium der Embryogenese erfolgt zum ersten Mal eine Zellspezialisierung: Der äußere Zellkranz, die polarisierten Zellen der Morula, entwickelt sich zum Trophoblasten, während die weiter innen gelegenen apolaren Zellen sich zur „inner cell mass“ (ICM) entwickeln (Abb. 1.2). Während sich aus dem Trophoblasten die spätere Plazenta entwickelt, entstehen aus der ICM alle Gewebetypen des späteren Embryos. Bei dieser Entwicklung interagieren die beiden Gewebe miteinander. So sezerniert die ICM z.B. FGF-4 (fibroblast growth factor-4) um die Proliferation und Differenzierung der Trophectodermzellen zu regulieren. Nach Einnistung der Blastozyste in den Uterus entwickeln sich aus der ICM zwei Zellschichten. Zum Blastocoel (Bcl) hin, einem mit wässriger Flüssigkeit gefüllter Hohlraum um die ICM herum, entwickelt sich der Hypoblast. Unter dieser Zellschicht bildet sich der Epiblast, der eine Anhäufung undifferenzierter, pluripotenter Zellen darstellt.

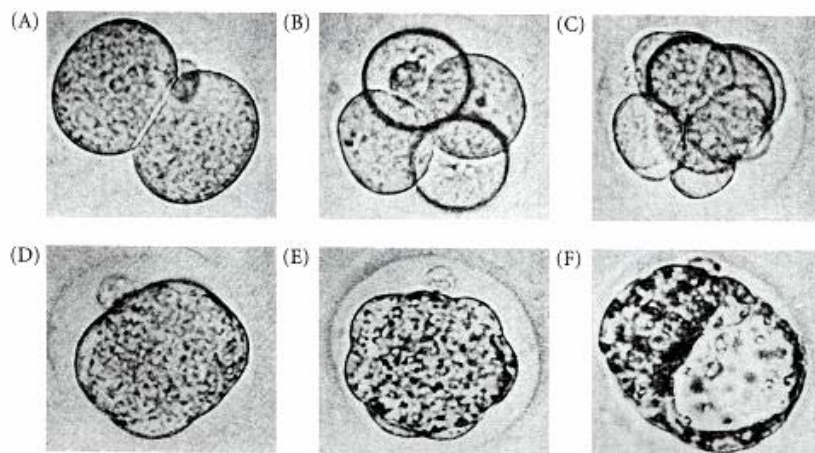


Abb. 1.1: Entwicklung der Blastozyste aus einer befruchteten Eizelle. Aus dem 2-Zell-Stadium (A) entsteht über das 4-Zell-Stadium (B), 8-Zell-Stadium (C) und das kompaktierte 8-Zell-Stadium (D) die Morula (E) und schließlich die Blastozyste (F) (Gilbert, 2000).

Bei der nun stattfindenden Gastrulation, der Entstehung der drei verschiedenen Keimblätter, wird die Blastozyste (Blastula) zur Gastrula, einer mehrschichtigen Struktur mit bilateraler Symmetrie (Abb. 1.3). Zellen des Epiblasten wandern durch eine schlitzförmige Blastoporenstruktur, die Primitivrinne, und die Nodalstruktur (Hensen's node) zwischen Epi- und Hypoblast ein. Der Hypoblast wird nun durch die einwandernden Zellen zurückgedrängt und entwickelt sich im Folgenden zu extraembryonalem Gewebe. Lateral einwandernde Epiblastzellen führen zur Bildung von Mesoderm und Endoderm, zwei der drei Keimblätter des Embryos. Aus dem Endoderm werden später der Darm und alle davon abgeleiteten Gewebe gebildet. Das Mesoderm differenziert sich letztlich zu Muskeln, Nieren, Herz und Blutgefäßen. Einwandernde Epiblastzellen führen anterior zur Bildung des Notochord (Chorda dorsalis), einer Struktur des dorsalen Mesoderms, welches das definierende Element der Chordaten darstellt und Vorläufer der Wirbelsäule ist. Der anteriore Teil des Epiblasten bildet schließlich das Ektoderm, aus dem neben der Epidermis, die die Oberfläche des Embryos bildet, das Nervensystem hervor geht. Es sind BMP4-Signale (Bone Morphogenetic Protein 4) zwischen benachbarten Ektodermzellen, die zur epidermalen Differenzierung der Zellen führen, während die Inhibition der BMP4-Signale die Ausbildung des anterioren neuralen Ektoderms bewirkt. Die Präsenz von FGF zusammen mit inhibierten oder reduzierten BMP4-Signalen führt zum posterioren neuralen Ektoderm. Retinsäure-Exposition unterstützt diese Posterisierung zusätzlich.

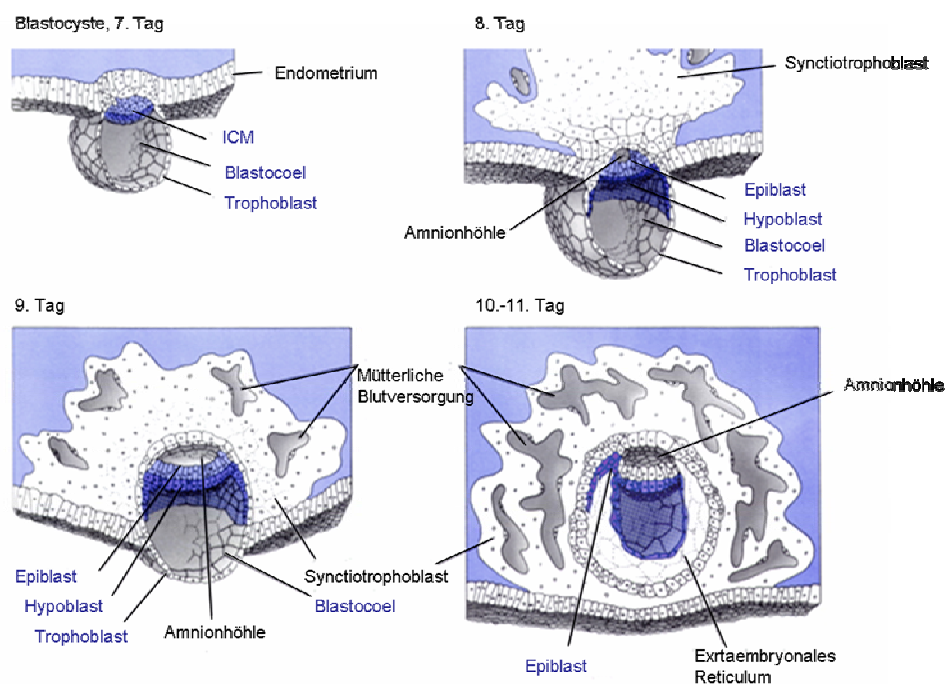


Abb. 1.2: Der humane Embryo vor der Gastrulation (modifiziert nach Gilbert, 2000).

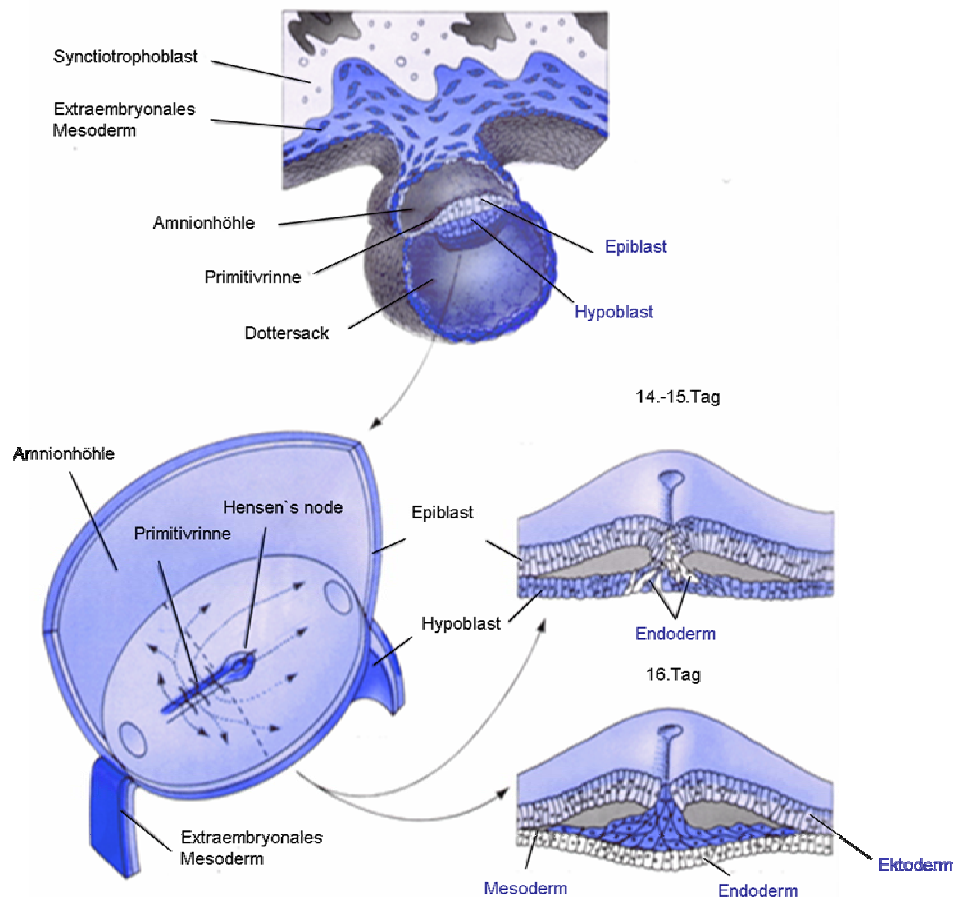


Abb. 1.3: Die Gastrulation des Embryos. Entwicklung der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm (modifiziert nach Gilbert, 2000).

An die Gastrulation schließt sich der Prozess der Neurulation an, der zur Bildung des Neuralrohrs führt. Durch Signale des Notochords und des angrenzenden Mesoderms wird zuerst die Neuralplatte aus dem Ektoderm gebildet. Ein wichtiges Signalmolekül bei der Neurulation ist Sonic hedgehog (SHH), das als Morphogen auf das benachbarte Gewebe wirkt. Zur Bildung des Neuralrohrs müssen folgende Schritte durchlaufen werden (Abb. 1.4): Zuerst erfolgt eine Veränderung der Zellpackung in der Neuralplatte, die durch distinkte Zell-Zell-Interaktionen vermittelt wird, so dass sich die Neuralplatte auffalten kann. An den beiden sich bildenden Neuralfalten schließt sich daraufhin das Neuralrohr zusammen und löst sich vom restlichen Gewebe ab. Nur die Neuralleistenzellen, die aus den Neuralfalten entstehen, stellen noch die Verbindung zur Epidermis her. Diese Zellpopulation migriert anschließend entlang des Neuralrohrs und bildet letztlich die Zellen des peripheren Nervensystems, während sich aus dem Neuralrohr die Zellen des zentralen Nervensystems entwickeln. Der Schluss des Neuralrohres beginnt am anterioren Ende des Embryos und wird in posteriorer Richtung fortgesetzt. Daher kann also in

Teilen des Embryos noch die Gastrulation und in anderen Teilen bereits die Neurulation stattfinden. Das entstandene Neuralrohr ist in drei primäre Gehirnvesikel segmentiert (Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon), die die Ausgangsstrukturen für alle adulten Gehirnregionen bilden (Gilbert, 2000; Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001)

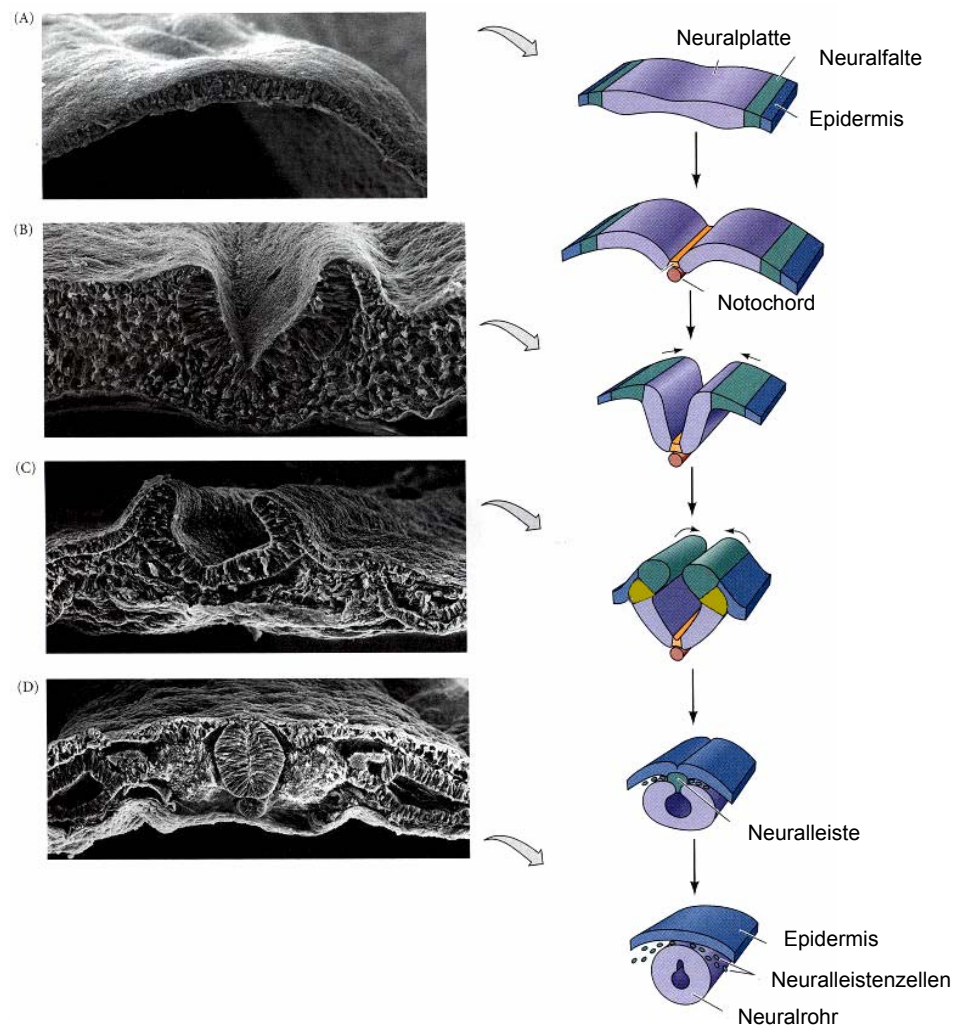


Abb. 1.4: Prozess der Neurulation.

Nach Entwicklung der Neuralplatte oberhalb des Notochords faltet sich diese auf, um sich schließlich an den Neuralfalten zum Neuralrohr zu schließen. Aus den Zellen des Neuralrohrs entwickeln sich später die Zellen des zentralen Nervensystems, aus den bei Schließung des Neuralrohres lateral migrierenden Neuralleistenzellen die Neurone des peripheren Nervensystems (Gilbert, 2000).

1.2 Definition und Abgrenzung der Stammzelle

Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen eines Embryos, Fötus oder Adulten, die sich durch zwei besondere Eigenschaften auszeichnen: Zum einen durch die Fähigkeit, sich in spezialisierte Zellen eines Gewebes oder Organs zu entwickeln und zum anderen dem Vermögen, sich nahezu unbegrenzt selbst zu erneuern.

Am geläufigsten ist mittlerweile die Einteilung der verschiedenen Stammzellen nach der Potentialitäts-Nomenklatur, d.h. in totipotente, pluripotente, multipotente oder unipotente Stammzellen. Die befruchtete Eizelle stellt ein Beispiel für eine totipotente Stammzelle dar. Diese ist jedoch nur *in vivo*, in den komplexen dreidimensionalen Bedingungen im Mutterleib, zur Ausbildung eines Embryos in der Lage. Pluripotente Stammzellen (z.B. embryonale Stammzellen) können sich unter bestimmten Bedingungen zu allen Zelltypen der drei Keimblätter entwickeln – niemals jedoch zu einem kompletten Embryo. Multipotente Stammzellen können sich nur noch zu einigen Zelltypen der drei Keimblätter spezialisieren. Ein Beispiel für multipotente Stammzellen stellen die neuronalen Stammzellen dar, die in bestimmten Arealen des adulten Gehirns entdeckt wurden. Sie wurden mittlerweile auch im Gehirn des Menschen identifiziert und sind bei Extraktion in Zellkultur beispielsweise zur Differenzierung in alle neuronalen Zelltypen in der Lage (Gage et al., 1998; Gage, 2000). Darüber hinaus hat sich die Einteilung der verschiedenen Stammzellarten in embryonale und adulte Stammzellen etabliert. Während embryonale Stammzellen aus embryonalem Gewebe stammen, sind adulte Stammzellen stets postnatalen Ursprungs und befinden sich in reifem Gewebe. Eine weitere, wesentlich unpräzisere Nomenklatur, teilt die verschiedenen Stammzellen nach ihrer Gewebszugehörigkeit bzw. dem Gewebe ein, das sie schließlich bilden. Hiernach unterteilt man embryonale Stammzellen, germinale (Geschlechtszellen bildende), hämatopoetischen (Blut bildende), somatische (Gewebe bildende), mesenchymale (aus dem Mesenchym stammende) oder epitheliale (Epithel bildende) Stammzellen.

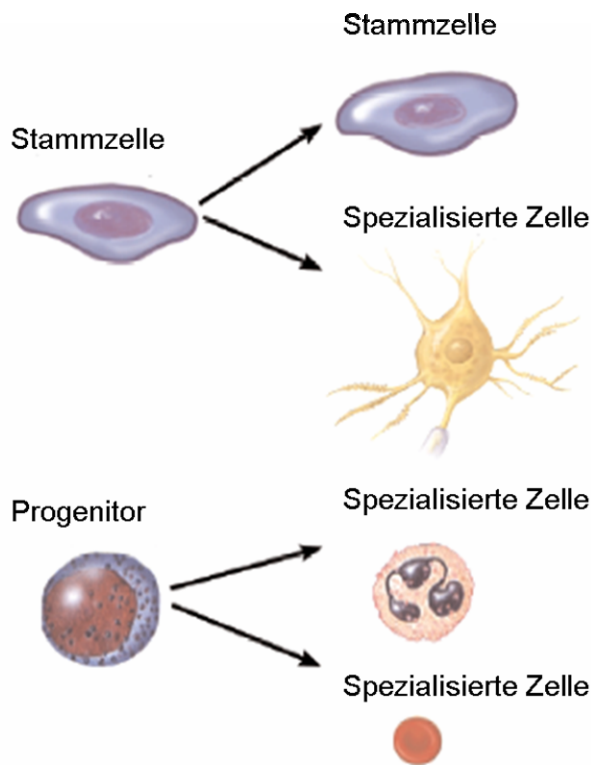


Abb. 1.5: Abgrenzung von Stammzellen gegenüber Progenitorzellen. Eine Stammzelle ist eine unreife Zelle, die sich selbst reproduzieren und in eine Vielzahl unterschiedlicher reiferer Zellen ausdifferenzieren kann. Bei der Teilung einer Stammzelle entsteht immer mindestens eine neue zusätzliche Stammzelle. Progenitorzellen, auch Vorläuferzellen genannt, können unspezialisiert sein oder bereits einige Charakteristika spezialisierter Zellen aufweisen. Teilt sich ein Progenitor, so entstehen stets zwei reife spezialisierte Zellen (Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001).

Von Stammzellen sind so genannte Progenitorzellen oder Vorläuferzellen abzugrenzen. Progenitorzellen kommen in fötalem sowie adultem Gewebe vor und stellen bereits teilweise spezialisierte Zellen dar. Sie werden auch als Übergangszellen einer Stammzelle zu einer vollständig spezialisierten, reifen Zelle eines Gewebes verstanden. Nach Zellteilung eines Progenitors entstehen reife Zellen oder erneut Progenitorzellen, wohingegen nach Teilung einer Stammzelle mindestens eine der Zellen wiederum eine Stammzelle wird, die in der Lage ist, sich selbst zu erneuern (Abb. 1.5). Progenitorzellen entwickeln sich zu verwandten Zelltypen, jedoch nicht zu einem großen Spektrum unterschiedlichster Zellen. Die Teilungsrate der Progenitorzellen ist abhängig von ihrem Reifegrad. Ein Unterscheidungsmerkmal zwischen einer reifen Zelle und einem Progenitor ist, dass letzterer im Allgemeinen als noch nicht funktionstüchtig gilt (Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001).

1.3 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESZ) zeichnen sich in Zellkultur durch unlimitierte Vermehrbarkeit aus. Sie werden als pluripotent bezeichnet, da sich aus ihnen in der Zellkultur Gewebe aller drei Keimblätter bilden können. ESZ werden beispielsweise aus der ICM einer frühen Blastozyste, vor deren Einnistung in den Uterus gewonnen. In einer speziellen Kultivierungstechnik, in so genannten „hängenden Tropfen“, bil-

den ESZ spontan Embryoidkörperchen (embryoid bodies, EBs) aus, die die Zelltypen aller drei Keimblätter beinhalten. Diese Technik wurde erstmals 1984 beschrieben (Wobus et al., 1984) und bildet heute die Grundlage der meisten Differenzierungsprotokolle für ESZ. Implantationen von ESZ der Maus lieferten bereits vielversprechende Daten, die auf großes Potential dieser Zellen hinsichtlich einer Zellersatztherapie schließen lassen. Allerdings scheinen ESZ, werden sie nicht zuvor selektioniert, nach Implantation in erheblichem Maße zur Tumorbildung zu führen (Andrews, 1998; Erdo et al., 2003). Darüber hinaus stellt die Forschung an und mit humanen embryonalen Stammzellen heute ein erhebliches ethisches Problem dar. Die Isolierung embryonaler Stammzellen ist in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz (EschG, 13.12.1990) verboten, da sowohl beim therapeutischen Klonen als auch bei der Gewinnung von Stammzellen aus nicht implantierten, „überzähligen“ Embryonen, wie sie im Rahmen von *in vitro*-Fertilisationen anfallen, die jeweiligen Embryonen getötet werden. Der Import humaner, embryonaler Stammzellen nach Deutschland ist durch das am 2. April 2002 verabschiedete Stammzellgesetz ebenfalls verboten. Jedoch kann unter strengen Auflagen ein Antrag auf Verwendung dieser Zellen für besondere Forschungszwecke gestellt werden (Stammzellgesetz, 28. Juni 2002, §4ff). Danach dürfen für genehmigte Experimente jedoch nur Stammzelllinien importiert und verwendet werden, die vor dem Stichtag 1. Januar 2002 in bestimmten Ländern „gewonnen“ wurden.

1.4 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen weisen genauso wie alle Stammzellen zwei wichtige Charakteristika auf: Zum einen sind sie in der Lage, sich über einen langen Zeitraum hinweg selbst zu erneuern, zumindest über die Lebensdauer des sie enthaltenden Organismus hinweg, und zum anderen können sie sich zu reiferen Zellen spezialisieren. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind adulte Stammzellen stets postnatalen Ursprungs und befinden sich durchweg in reifem Gewebe, in so genannten Stammzellnischen in verschiedensten Organen des Körpers.

Die Existenz einer adulten, multipotenten Stammzelle wurde erstmals von Maximov 1906 postuliert. Sein Konzept der Hämatogenese, nach dem aus einer hämatopoetischen Stammzelle verschiedene Blutzellen gebildet werden, setzte sich im Laufe der Jahrzehnte durch. Bis heute wurden adulte Stammzellen in vielen verschiedenen Geweben identifiziert, darunter neben dem peripheren Blut auch z.B. im Gehirn, Knochenmark, Hautepithel, Rückenmark, Pankreas, Leber und in der Retina.

In der Literatur werden adulte Stammzellen wiederum grob in verschiedene Stammzellarten eingeteilt. Von den Stammzellen des Blutes, den hämatopoetischen Stammzellen, werden häufig die so genannten mesenchymalen Stammzellen abgegrenzt. Aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe, dessen Ursprung größtenteils im Mesoderm liegt, entwickeln sich neben dem Binde- und Stützgewebe und vielen anderen Geweben jedoch auch Blutzellen. Somit sind ontogenetisch auch hämatopoetische Stammzellen dem Mesenchym zuzuordnen und diese Art der Nomenklatur irreführend (Pschyrembel, 1998; Roche Lexikon Medizin, 2003). Die Bezeichnung der hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen ist jedoch in der Literatur gebräuchlich und beschreibt jeweils eine klar definierte Population mit distinkten Eigenschaften. Beide Stammzellarten wurden beispielsweise im Knochenmark entdeckt (Pittenger et al., 1999) und unterscheiden sich durch Eigenschaften wie die Ausstattung mit bestimmten Oberflächenmolekülen oder ihre Affinität zu Plastikoberflächen. Während hämatopoetische Stammzellen die Oberflächenmarker CD34 und CD45 exprimieren und nicht adhärent wachsen, zeichnen sich mesenchymale Stammzellen unter anderem durch das Fehlen von CD34 und CD45 sowie adhärentes Wachstum in Zellkulturflaschen und ihre meist spindelförmige Morphologie aus. Neben dem Knochenmark wurden mesenchymale Stammzellen auch im Nabelschnurblut (Bieback et al., 2004; Kögler et al., 2004) oder Fettgewebe (Park et al., 1999) gefunden. Bisher scheint jedoch unklar, ob adulte Stammzellen in ihren jeweiligen Geweben als eine Art „Überbleibsel“ der Embryogenese entstanden sind oder ob es sich hingegen um ein und dieselbe Ursprungs-Stammzelle handelt, die sich z.B. durch das Blutssystem im gesamten Organismus verteilt und schließlich in bestimmten Geweben angereichert hat (Minguell et al., 2001). Unklarheit herrscht neben einer eindeutigen Identifizierungsmöglichkeit für adulte Stammzellen auch über deren Funktion in den verschiedenen Geweben des Organismus. Neben einer ständigen Selbsterneuerung, um die Existenz der Stammzellnische zu erhalten, wird auch so genanntes „Homing“ propagiert. Hierbei sollen Stammzellen in der Lage sein, zu zerstörtem oder geschädigtem Gewebe zu migrieren und dieses zu ersetzen bzw. mit der Sezernierung bestimmter Faktoren positiv zu beeinflussen (Grove et al., 2004; Harris et al., 2004).

1.5 Der Zellzyklus: Regulation von Proliferation und Differenzierung

Der Zellzyklus einer Zelle besteht aus einzelnen, verschieden lang andauernden Phasen. Man unterscheidet die eigentliche Phase der Zellteilung, die Mitose, von der

Interphase, der zwischen zwei Mitosen liegenden Phase. Die Interphase wird wiederum in mindestens drei Abschnitte unterteilt (Abb. 1.6): Direkt im Anschluss an eine Mitose befindet sich die teilungsfähige Zelle in einer je nach Zellart unterschiedlich langen Wachstumsphase, der G_1 -Phase (G=gap, engl. Lücke). In dieser Phase bildet die Zelle zelleigene Proteine und bereitet so die S-Phase (Synthesephase) vor. Die darauf folgende S-Phase dient der Verdopplung der DNA, die eine wichtige Voraussetzung für die Mitose darstellt. An die S-Phase schließt sich nun die prämitotische G_2 -Phase an, die in jedem Fall zur Mitose der Zelle überleitet. Nach der Mitose kann eine Zelle auch bis zu einem bestimmten Punkt des Zellzyklus in die G_0 -Phase eintreten oder den Zyklus weiterhin durchlaufen. Die G_0 -Phase ist als eine lange Periode beschrieben, aus der Zellen nur auf bestimmten Reiz hin wieder in die G_1 -Phase einmünden. So kann der zeitliche Abstand von einer Mitose bis zur nächsten zwischen Stunden und Monaten variieren. Postmitotische Zellen, wie z.B. reife Neurone, haben die Fähigkeit zur Proliferation gänzlich verloren und den Zellzyklus verlassen. Die neurale Differenzierung einer Zelle ist somit eng mit ihrer Proliferation und dem Zellzyklus verknüpft. Zellen, die während der Entwicklung des Gehirns den Zellzyklus verlassen, entwickeln sich zu Neuronen bzw. Gliazellen. Am Ende der G_1 -Phase des Zellzyklus befindet sich ein Restriktionspunkt – wird dieser überschritten, durchläuft die Zelle den Zyklus. Um auszudifferenzieren, muss die Zelle den Zellzyklus an diesem Punkt verlassen und in die G_0 -Phase eintreten (Ohnuma und Harris, 2003).

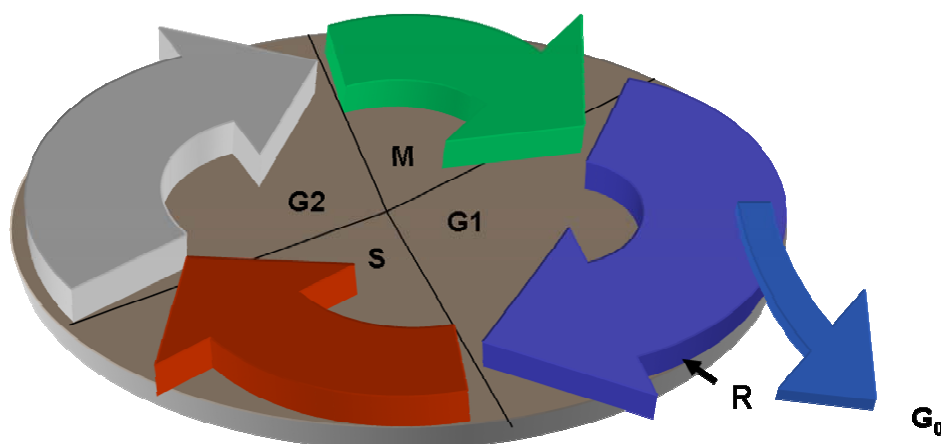


Abb. 1.6: Die Phasen des Zellzyklus.

M=Mitose, G_1 -Phase, S=Synthesephase, G_2 -Phase; G_0 -Phase. R= Restriktionspunkt markiert den Abschnitt im Zellzyklus, an dem Zellen entweder den Zyklus verlassen und ausdifferenzieren oder ihn weiter durchlaufen (mod. nach Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001).

Viele Substanzen, wie z.B. Cycline oder deren Inhibitoren, regulieren die G₁-Phase und somit den Zeitpunkt des Austritts bzw. die Differenzierung einer Zelle aus dem Zyklus (Ohnuma und Harris, 2003). Durch Überexpression eines cdk-Inhibitors konnte beispielsweise in der *Xenopus*-Retina gezeigt werden, dass proneurale Gene induziert werden können. Im Umkehrfall konnte durch Überexpression eines Cyclins wiederum die Herabregulation proneuraler Gene gezeigt werden (Ohnuma et al., 2002). Allerdings können nicht nur durch Komponenten der G₁-Phase, wie beispielsweise den Cyclinen, proneurale Gene beeinflusst werden, der Mechanismus funktioniert auch entgegengesetzt (Abb.1.7). So konnten durch Überexpression von NeuroD2 und Mash1 embryonale Karzinomzellen zu Neuronen ausdifferenziert werden (Farah et al., 2000). Darüber hinaus haben auch exogene Faktoren, wie beispielsweise Sonic hedgehog (SHH) Einfluss auf die G₁-Zellzyklus-Komponenten (Kenney et al., 2004) und können somit zur Differenzierung einer Zelle führen.

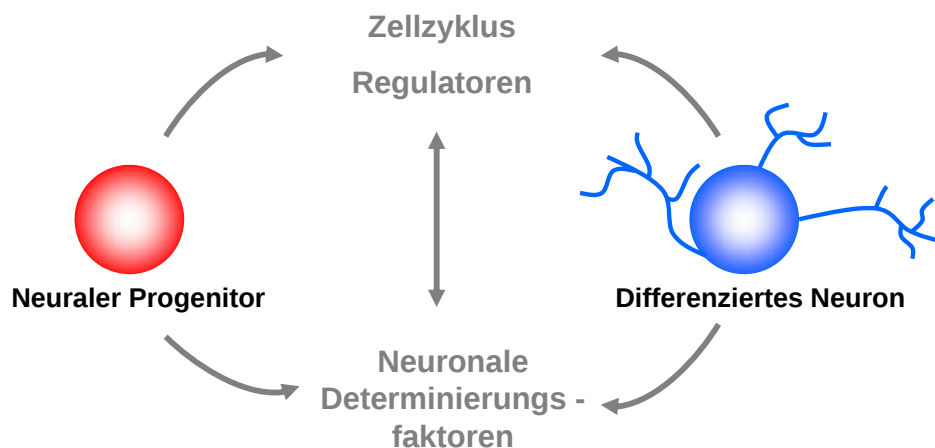


Abb. 1.7: Wechselwirkungen zwischen Zellzyklus und neuronaler Differenzierung. Vereinfachtes Schema, das die Interaktion zwischen Zellzyklusregulatoren (wie beispielsweise Cyclinen) und der Expression sowie Funktion von neuronalen Determinationsfaktoren (z.B. NeuroD) darstellt (Ohnuma und Harris, 2003).

Neben der Differenzierung ist auch der Stammzellcharakter einer Zelle mit dem Zellzyklus verknüpft. Es konnte beobachtet werden, dass sich die symmetrische Zellteilung von Stammzellen im Gegensatz zur Zellteilung von differenzierten Zellen sehr langsam vollzieht (Sommer und Rao, 2002). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung ist, dass die geringe Geschwindigkeit der Zellteilung der Stammzellen auf einen geringen Expressionslevel von Zellzyklus-Aktivatoren, wie den Cyclinen, zurückzuführen ist und die Zellen so im Proliferationsstatus verbleiben können (Ohnuma et al., 2002). Zellen, die einerseits einen reifen Phänotyp aufweisen, aber

andererseits Stammzeleigenschaften besitzen, müssen daher in der Lage sein, nach Verlassen des Zellzyklus wieder in diesen einzutreten. Müller-Glia-Zellen der Retina stellen beispielsweise eine solche Zellpopulation dar. Für diese Zellen konnte gezeigt werden, dass sie im ausdifferenzierten, adulten Zustand große Mengen an Zellzyklus-Inhibitoren wie z.B. p27Kip1 exprimieren, bei Verletzung der Retina kommt es jedoch zu einer massiven Herabregulation der Inhibitoren, so dass diese Zellen erneut in die S-Phase des Zellzyklus eintreten können (Reh und Levine, 1998).

1.6 Proliferation von Stammzellen

Eine Schlüsseleigenschaft der Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Stammzellen existieren in biologischen Nischen, wie beispielsweise die neuronalen Stammzellen in der Subventrikularzone (SVZ) oder dem Gyrus dentatus des Säugergehirns (Gage, 2000). Dies bedeutet, dass sie i. d. R. von ausdifferenzierten, sich nicht mehr teilenden Zellen umgeben sind. Es stellt sich also die Frage, wie Stammzellen die Differenzierungssignale, die offensichtlich auf die sie umgebenden Zellen einwirken, umgehen können. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass RNAi eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Stammzeleigenschaften spielt (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004). Erst kürzlich konnte durch genetische Modifikationen von Keimbahn-Stammzellen in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass drc-1 (dicer-1)-defiziente Mäuse, denen somit die zur Synthese von miRNA essentielle doppelsträngige RNase-III fehlt, eine verlängerte Passagezeit von der G₁- zur S-Phase aufweisen. Daraus folgt, dass RNAi für Stammzellen notwendig ist um den Restriktionspunkt in der G₁-Phase zu passieren und somit weiterhin im Zellzyklus zu verbleiben und zu proliferieren (Hatfield et al., 2005).

Eine weitere Möglichkeit, um die Proliferation von Stammzellen zu erhalten bzw. zu regulieren, stellen Transkriptionsfaktoren dar. Prominentes Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor Oct-4, der beispielsweise als wichtiger Faktor undifferenzierter, proliferierender, embryonaler Stammzellen der Maus identifiziert werden konnte. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Oct-4 in der Oocyte einer Maus, im 4-Zell-Stadium und in der ICM der Blastula exprimiert wird, nicht aber in differenziertem Gewebe nach der Gastrulation (Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001). Weitere Daten belegen, dass der Grad der Oct-4-Expression, also nicht nur sein Vorhandensein oder seine Abwesenheit, die Differenzierung embryonaler Maus-Stammzellen beeinflusst und somit festlegt, ob diese weiter proliferieren oder nicht (Niwa et al., 2000).

1.7 Differenzierung von Stammzellen

Als Differenzierung einer Zelle wird ganz allgemein der Prozess bezeichnet, bei dem sich eine unspezialisierte Zelle, wie eine Stammzelle, zu einer spezialisierten Körperzelle entwickelt. Während des Differenzierungsprozesses werden bestimmte Gene aktiviert oder inaktiviert, was dazu führt, dass die differenzierte Zelle spezifische Strukturen und Funktionen eines bestimmten Zelltyps aufweist. Inaktivierung von Genen kann durch Zellzyklusregulatoren erfolgen. Die Differenzierung einer Zelle wird neben genetischen auch durch exogene Signale reguliert. Für beide Möglichkeiten wurden bereits im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation Beispiele genannt. Exogene Faktoren wie z.B. SHH vermitteln ihre Wirkung, indem sie an Rezeptormoleküle der Zellmembran binden und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Die inzwischen in der Zellkultur eingesetzten Protokolle zur Differenzierung von Stammzellen sind vielfältig, dennoch lassen sich Grundprinzipien erkennen: Inspiriert durch die Embryogenese sollen Stammzellen in Kultur unterschiedlichsten Faktoren und Gradienten ausgesetzt werden, um eine gerichtete Differenzierung der vorliegenden Zellen zu erreichen. Dafür werden beispielsweise Moleküle verwendet, deren Potential bereits aus der Embryogenese bekannt ist (SHH, RA, FGF u.a.). Eine andere Möglichkeit stellt die Manipulation des Zellzyklus zur Auslösung der Differenzierung dar. Sie kann beispielsweise durch Überexpression von Cyclinen bzw. Herabregulation von Zellzyklus-Inhibitoren erreicht werden. Ein anderer Vorstoß ist, die Stammzellen in Kontakt mit bereits ausdifferenziertem Gewebe bzw. dessen Medienüberstand zu bringen, so dass unbekannte sezernierte Faktoren des Gewebes bzw. Überstandes letztlich zur Differenzierung der Stammzellen führen.

1.8 Plastizität von Stammzellen

Als Plastizität wird das Potential einer adulten Stammzelle bezeichnet, sich in spezialisierte Zelltypen aus anderen Geweben zu differenzieren. Der Begriff der Transdifferenzierung beschreibt hierbei die direkte Differenzierung einer Zelle ohne genetische Reprogrammierung in verschiedene Zelltypen anderer Keimblätter (Abb. 1.8 A). Im Gegensatz dazu wird die genetische Reprogrammierung ebenfalls als Mechanismus diskutiert. Hier erfolgt zuerst eine Entdifferenzierung der adulten Stammzelle und anschließende Transformation in eine unreifere Zelle, so dass letztlich aus dieser Zelle die Differenzierung in eine reife Zelle eines anderen Gewebes erfolgen kann (Abb. 1.8 B) (Blau et al., 2001). In Mischkulturen von

Progenitoren und Stammzellen besteht das Risiko, die Reifung eines Progenitors fälschlicherweise für die Differenzierung einer Stammzelle zu halten und so die Plastizität dieser Stammzelle falsch zu bewerten (Abb. 1.8 C). Eine Veränderung von Zellmarkern (Oberflächenantigene, Isoenzyme, chromosomale Marker) wird auch beobachtet, wenn Stammzellen mit reifen, ausdifferenzierten Zellen fusionieren, ohne dass eine Differenzierung stattgefunden hat. Bei diesem Phänomen scheinen Stammzellen sowohl in Zellkultur als auch in Tierexperimenten mit ausdifferenzierten Zellen zu verschmelzen und daher sowohl Marker der Stammzelle als auch der reifen Zelle zu exprimieren (Abb. 1.8 D). Dieses Phänomen wurde vor allem für hämatopoetische bzw. Knochenmarks-Stammzellen beschrieben (Alvarez-Dolado et al., 2003).

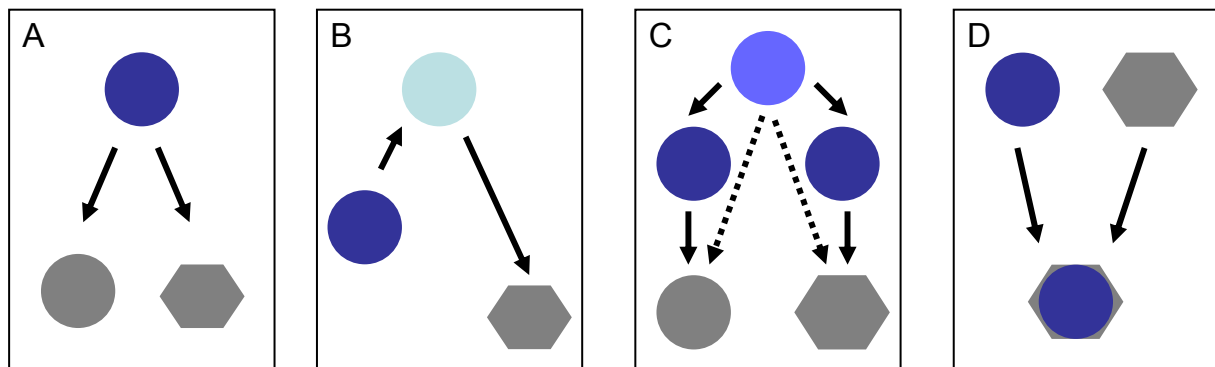


Abb. 1.8: Schema verschiedener Differenzierungsmöglichkeiten und der Fusion von Stammzellen. (A) zeigt eine Transdifferenzierung, wobei eine Stammzelle (blau) unmittelbar in eine reifere Zelle, z.B. einen Progenitor (grau) oder in eine ausdifferenzierte reife Zelle (grau, eckig) übergeht. Schema einer Differenzierung durch eine genetische Reprogrammierung (B), wobei eine Stammzelle (blau) über den Umweg einer unreiferen, potenteren Stammzelle (hellblau), zu einer reifen Zelle ausdifferenziert. (C) zeigt die Mischung aus einer potenten Stammzelle (hellblau), einer weniger potenten Stammzelle (blau), eines Progenitors (grau, rund) und einer ausdifferenzierten Zelle (grau, eckig). Bei dieser heterogenen Population kann fälschlicherweise die Transdifferenzierung der potenten Stammzelle (hellblau) zur ausdifferenzierten, reifen Zelle angenommen werden (grau), wobei tatsächlich aber Vorläuferzellen bzw. unipotente Stammzellen (blau) ausdifferenzierte Zellen (grau) bilden. (D) zeigt die vereinfachte Darstellung einer Fusion. Hierbei verschmelzen Stammzelle und ausdifferenzierte Zelle, so dass der Eindruck der Transdifferenzierung entsteht (mod. nach Neuss und Jahnen-Dechent, 2004).

Bis heute ist unklar, wie viele beobachtete Differenzierungen adulter Stammzellen in den letzten Jahren wirklich auf Plastizität zurückzuführen sind und nicht etwa Fusionen darstellten (Alvarez-Dolado et al., 2003; Harris et al., 2004; Nygren et al., 2004; Ogle et al., 2004; Terada et al., 2002; Wurmser et al., 2004; Wurmser und Gage, 2002; Ying et al., 2002). Aufgrund dessen, ist es vor allem bei *in vivo*-Experimenten umso wichtiger, diesen Sachverhalt im Falle einer beobachteten Transdifferenzierung von adulten Stammzellen durch adäquate Methoden zu bestätigen. Eine Mög-

lichkeit hierfür wäre beispielsweise die Bestimmung des Chromosomensatzes einer potentiell transdifferenzierten Zelle.

1.9 Migration von Stammzellen

Generell lassen sich die Matrix-gesteuerte (haptotaktische), ungerichtete (chemokinetische) und gerichtete (chemotaktische) Migration unterscheiden. Bei der haptotaktischen Migration bildet der Untergrund eine Art Leitschiene, an der sich migrierende Zellen orientieren. Eine chemokinetische Migration findet immer dann statt, wenn kein ausreichendes chemotaktisches Signal vorhanden ist, oder ein beliebig starkes Signal kein Konzentrationsgefälle aufweist. Ist eine Zelle migratorisch aktiv, und ist eine der beiden Bedingungen für die ungerichtete Migration erfüllt, beginnt die Zelle sich zufällig zu bewegen und nimmt in immer gleichen Zeitintervallen eine Richtungsänderung vor (Tranquillo, 1991). Existiert jedoch ein Konzentrationsgradient einer chemotaktischen Substanz, so findet eine chemotaktische Migration statt. Die Richtung der Migration ist von der Art des chemotaktischen Signals abhängig. Die aktive Fortbewegung einer Zelle setzt stets die Adhäsion auf einer Oberfläche voraus. Die Migration selbst lässt sich in drei Abschnitte gliedern: Im ersten Teil muss die polarisierte Zelle ihren Zellkörper in Migrationsrichtung strecken und neue Adhäsionsplaques bilden. Anschließend muss das Zytoskelett samt Zellkern in Migrationsrichtung bewegt werden, und letztlich müssen Adhäsionsplaques am hinteren Ende der Zelle wieder gelöst werden, um eine Vorwärtsbewegung zu ermöglichen. Ein intaktes Zytoskelett und eine nicht zu starke Adhäsion auf der Oberfläche sind daher für die Migration essentiell (Ahmed und Brown, 1999).

Die Migration von Stammzellen kann sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im Erwachsenenalter in bestimmten Hirnregionen beobachtet werden. Während der Embryonalentwicklung migrieren beispielsweise Neuralleistenzellen, die aus dorsalen Regionen des Neuralrohres stammen, entlang spezifischer Wege und differenzieren letztlich zu Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems, was den Stammzellcharakter dieser Zellen unterstreicht. Neurale Stammzellen befinden sich auch im Erwachsenenalter noch in Regionen des Hippocampus/Gyrus dentatus und ventrikulären sowie subventrikulären Regionen des Gehirns. Aus Experimenten mit Nagern ist bekannt, dass Stammzellen der Subventrikulär-Zone entlang des RMS (rostral migratory stream) zum Bulbus olfactorius wandern und nach ihrer Migration dort ausdifferenzieren (Menezes et al., 2002). Darüber hinaus bestehen weitere Beispiele für die Migration von Stammzellen in Zellkultur sowie im Gewebeverbund.

Nach Implantation von Stammzellen, z.B. in das Gehirn eines Versuchstieres, wurde sowohl Migration dieser Zellen, als auch in manchen Fällen das Verbleiben der Zellen am Implantationsort beobachtet (Englund et al., 2002; Fricker et al., 1999; Jain et al., 2003; Wennersten et al., 2004). Generell scheint für das migratorische Potential von Stammzellen neben den spezifischen Zelleigenschaften entscheidend zu sein, ob das Implantationsorgan bereits durch eine zusätzliche Läsion verletzt wurde oder noch intakt vorliegt.

1.10 Nabelschnurblut

Nabelschnurblut entstammt dem fötalen Kreislauf und enthält verschiedenste Zelltypen. Neben Erythrozyten, Leukozyten und hämatopoetischen Stammzellen sind auch in geringerem Maße somatische (Gewebe bildende) Stammzellen sowie andere Stammzellen und Progenitoren im Nabelschnurblut enthalten (Bieback et al., 2004; Kögler et al., 2004; Ohnuma und Harris, 2003). Nabelschnur-Stammzellen exprimieren wesentliche Transplantationsantigene noch nicht und können daher auch in nicht vollständig histokompatible Empfänger transplantiert werden, ohne Abstoßungsreaktionen hervorzurufen (Lewis, 2002; Ohnuma und Harris, 2003; Staba et al., 2004).

1.10.1 Etablierte Verwendung des Nabelschnurbluts

Stammzell-Transplantationen stellen bei vielen hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Leukämie, nach myeloablativer Chemo- und Radiotherapie eine etablierte Behandlungsform dar. Die Quelle der hämatopoetischen Stammzellen stellt hierfür häufig das Knochenmark dar. In vielen Fällen können jedoch nicht die eigenen Zellen des Patienten verwendet werden, sondern es muss eine allogene Transplantation durchgeführt werden. Trotz Knochenmarks-Transplantationen verwandter, histokompatibler Spender kann die Morbidität der Patienten jedoch 40-50% betragen. Die Transplantat-vermittelte Morbidität resultiert hierbei beispielsweise auch aus der Abstoßungsreaktion, der so genannten „graft versus host“-Reaktion (GVH).

Seit einiger Zeit wird Nabelschnurblut (UCB) als alternative Quelle von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) anstelle von Knochenmark für allogene Stammzell-Transplantationen genutzt. Im Jahre 1988 führten Gluckmann und Mitarbeiter die erste erfolgreiche UCB-Transfusion bei einem 6-jährigen Jungen durch. Inzwischen wurden weltweit bereits mehr als 3.500 Transplantationen mit Nabelschnurblut-Stammzellen durchgeführt, überwiegend als Fremdspende, die Tendenz ist weiter steigend (Grewal et al., 2004; Wagner und Verfaillie, 2004; Wagner et al., 2004). Vor-

teile der Stammzellspende aus UCB sind die schnelle Verfügbarkeit der Zellen aus UCB-Bänken, sowie das seltenere Auftreten der GVH-Reaktion. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass eine Nabelschnurrestblutspende nur eine begrenzte Zellzahl enthält. Da für eine erfolgreiche Transplantation jedoch eine bestimmte Zelldosis pro Kilogramm Körpergewicht benötigt wird, bedeutet dies, dass mit Nabelschnurrestblut momentan hauptsächlich Patienten mit geringerem Körpergewicht, wie Kinder und Jugendliche, therapiert werden können.

1.10.2 Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC)

Neben den hämatopoetischen Stammzellen sind im Nabelschnurblut auch somatische Stammzellen, wie z.B. MSCs, enthalten. Nabelschnurstammzellen sind ontogenetisch primitiver als die klassischen adulten Stammzellen des Knochenmarks und ähneln in ihren Proliferations- und Differenzierungseigenschaften eher den embryonalen Stammzellen. USSC (unrestricted somatic stem cells) stellen wohl definierte, pluripotente somatische Stammzellen dar, die zwischen den embryonalen und adulten Stammzellen einzuordnen sind (Kögler et al., 2004). Die USSC weisen einerseits Merkmale auf wie sie auch bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu beobachten sind, wie z.B. adhärentes Wachstum in Plastikzellkulturflaschen und die spindelförmige Morphologie der Zellen. Außerdem exprimieren USSC die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34 und CD45 nicht. Die USSC scheinen ein über das Potential der MSC hinausgehendes Differenzierungspotential zu haben, da sie neben Knochen, Knorpel, und Fettgewebe auch in Cardiomyozyten, Hepatozyten und, wie die vorliegende Arbeit zeigt, in Neurone differenziert werden können (Kögler et al., 2004). Darüber hinaus beträgt die mittlere Telomerlänge der USSC 8,93 kbp, und ist somit länger als die der MSCs, die lediglich 7,27 kbp beträgt und erneut aufzeigt, dass es sich bei den USSC nicht um MSCs handelt. Da die Telomerlänge einer Zelle Aufschluss über deren „Jugendlichkeit“ gibt, wird auch in dieser Hinsicht das größere Potential der USSC deutlich und grenzt sie somit von den adulten Stammzellen wie beispielsweise den MSCs ab (Kögler et al., 2004). Das genaue FACS-Expressionsmuster der USSC-Oberflächenmoleküle wurde bei Kögler et al. (2004) veröffentlicht.

Es existieren verschiedenste Protokolle, um Stammzellen oder auch die Gesamtpopulation an Zellen aus Nabelschnurblut zu isolieren. Im Folgenden soll die Gewinnung der USSC kurz umrissen werden, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Bei der Gewinnung der USSC aus dem Nabelschnurrestblut wird zuerst die

Population der mononukleären Zellen per Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnen und kultiviert. Anschließend werden die USSC-Kolonien aus der Population der kultivierten mononukleären Zellen anhand ihrer Adhärenz sowie Morphologie selektiert und in bestimmten Medien weiter vermehrt. Die Charakterisierung der USSC erfolgte mittels FACS-Analyse, um die Homogenität der USSC-Population zu gewährleisten (Kögler et al., 2004).

1.11 Therapiemöglichkeiten mit Stammzellen

Es existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten einer Stammzelltherapie: Entweder werden die Zellen dort implantiert, wo ein Gewebedefekt vorliegt, oder sie werden systemisch appliziert, wobei dann davon ausgegangen wird, dass die Stammzellen selbstständig in das beschädigte Gebiet einwandern. Es ist generell möglich, undifferenzierte, differenzierte oder transfizierte Stammzellen zu applizieren. Darüber hinaus können Zellen als Zellsuspension oder mit einem dreidimensionalen Konstrukt auf Trägermaterialien, so genannten Scaffolds (engl. = Gerüst), in einen Organismus eingebracht werden.

1.11.1 Anforderungen an Zelltransplantate

Zellen, die bei Implantationen in Regionen des menschlichen Körpers injiziert oder in anderer Weise eingebracht werden sollen, müssen viele Anforderungen erfüllen. Stammzellen, die zur Zellersatztherapie verwendet werden, gelten als Arzneimittel, weshalb sie dem Arzneimittelgesetz (AMG) unterliegen. Wie bei jedem anderen Arzneimittel auch stellt sich daher neben der Frage nach der Wirksamkeit vor allem die Frage nach der Unbedenklichkeit des Therapeutikums Zelle. Zuerst muss daher die Frage nach dem Tumorpotential sowie der allgemeinen Toxizität der zu implantierenden Zellen gestellt werden. Adulte Stammzellen scheinen bezüglich der Tumorbildung ein geringeres Risikopotential aufzuweisen als embryonale Stammzellen. Das Risiko vor-selektierter embryonaler Stammzellen, z.B. neuronaler Progenitoren, wird geringer eingeschätzt als das unselektierter Zellen. Darüber hinaus muss gewährleistet sein, dass die verwendeten Zellen nur mit klar definierten, unbedenklichen Substanzen vor der Implantation in Kontakt waren. Dies gilt z.B. für Serumbehandlungen. Generell gelten für die Herstellung der Zellen, die für Zellersatztherapien verwendet werden und deshalb für die Therapie als Medikament zugelassen werden müssen, die gleichen GMP-Richtlinien (Good Manufacturing Practice) wie für die Produktion jedes anderen Arzneimittels auch.

Implantierte Zellen sollten nach Platzierung im Zielgebiet die Fähigkeit aufweisen, in ihrer neuen Umgebung zu überleben und sich funktionell zu integrieren. Es scheint umstritten, ob die tatsächliche Ausdifferenzierung der implantierten Zellen zu denen des Zielgewebes das Ziel einer solchen Implantation ist. Vielmehr wird diskutiert, ob Faktoren, die von den implantierten Zellen im beschädigten Gebiet sezerniert werden, für positive Effekte, wie z.B. die Verbesserung der Herzleistung nach einem Infarkt, verantwortlich sind. Zellen, die systemisch appliziert werden sollen, müssen sich über ihre Überlebensfähigkeit hinaus durch migratorisches Potential auszeichnen und in der Lage sein, ihren Wirkungsort zu erreichen.

1.12 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Frage untersucht werden, ob USSC neuronal differenziert werden können und somit potentielle Kandidaten für eine Zellersatztherapie im Zentralnervensystem darstellen könnten. Hierzu musste zunächst die neuronale Differenzierbarkeit der USSC in Zellkultur gezeigt und mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesen werden. Neben dem neuronalen Differenzierungspotential der USSC wurde darüber hinaus die Entwicklung verschiedener Neurotransmitter-Subtypen nach Inkubation in einem speziellen Differenzierungsmedium (XXL-Medium) immunocytochemisch untersucht. Des Weiteren sollte ein Nachweis der Funktionalität differenzierter USSC erbracht und die Anreicherung einer Transmitter-spezifischen Subpopulation der USSC durch Variationen der Differenzierungsbedingungen untersucht werden. Den Anteil dopaminerg differenzierter USSC zu vermehren, erschien hier aufgrund der Verknüpfbarkeit zu bisher nicht heilbaren neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson als besonders erstrebenswert. Neben der Frage der neuronalen Differenzierbarkeit der USSC sollte auch das *in vivo*-Verhalten der Zellen nach Implantation in das Gehirn eines Versuchstieres analysiert werden. Hierbei wurden drei verschiedene Methoden zur Identifizierung *in vivo* getestet und anhand dieser Methoden die Überlebensfähigkeit und Verteilung der USSC analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Nomenklatur der USSC

Die hinter den Akronymen KCB (für Kourion cord blood) und SA (für Sandra Sensken, Mitarbeiterin des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, ITZ) angegebenen Zahlen geben jeweils die Charge des Nabelschnurblutes an, aus der die USSC gewonnen wurden. Bei KCB 55/15 handelt es sich z.B. um die fünfzehnte Passage einer Zellkulturflasche USSC, die ursprünglich von der Nabelschnurrestblut-Charge 55 stammten. Da jedoch die ursprünglich selektionierten, adhärennten Kolonien der mononukleären Zellen in mehreren Zellkulturflaschen kultiviert wurden, existieren solche Passagennummern mehrmals. Sie geben daher also nur an, wie oft die vorliegenden USSC im Vorfeld passagiert wurden und von welchem Nabelschnurrestblut sie ursprünglich stammten. Für die vorliegende Arbeit wurden die Zellchargen KCB 55, KCB 295, KCB 13, SA 20, SA 33 und SA 5 verwendet.

2.2 Kultivierung der USSC

Die Kultivierung der USSC erfolgte in unbeschichteten T75-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc) als adhärennt wachsende Zellschicht. Proliferationsmedium war hierbei DMEM Glutamax® (Fa. Gibco) unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (50.000 IE, Fa. Gibco) und 30% FCS (Fa. Cambrex). FCS wurde ausschließlich hitzeinaktiviert verwendet (56° C, 30 min). Zum Passagieren der USSC wurden pro konfluenter T75-Zellkulturflasche 5 ml Trypsin/EDTA (Fa. Gibco) im Wasserbad erwärmt und nach vorherigem Spülen der adhärennten Zellen mit PBS (Fa. PAA Laboratories) auf die USSC gegeben. Durch unterstützendes Schwenken wurde der Zellrasen abgelöst und die Suspension nach 3 min in 40 ml kühles DMEM/10% FCS Gemisch überführt. Durch die Verwendung eines speziellen Filters (Fa. BD) wurden größere Agglomerate bereits vereinzelt. Durch anschließendes Abzentrifugieren bei 1800 U/min für 10 min wurden die USSC pelletiert, nach Absaugen des Mediumüberstandes mit 1 ml DMEM trituriert und mit Hilfe einer Thoma Zählkammer und Methylenblau (Fa. Sigma) gezählt. Zur Expansion der USSC wurden diese im Verhältnis 1:3 gesplittet. KCB Zellen wurden in einer Dichte von 1-1,5 Mio. Zellen, SA maximal in einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro T-75-Kulturflasche ausgesät. KCB USSC wurden nach 7d ± 1d erneut umgesetzt, SA USSC wurden bei 80% Konfluenz der T75-Kulturflaschen gesplittet, wobei diese Zelldichte in der Regel nach etwa drei Tagen erreicht wurde. Die Aussaatdichte der USSC auf Zellkulturplatten betrug etwa 10.000 Zellen /cm².

2.3 Beschichtung der Zellkulturplatten

Zur Durchführung von Differenzierungsexperimenten in 6-well Zellkulturplatten wurden diese mit 0,5-1 mg/ml PDL (Fa. Sigma) beschichtet, anschließend mit PBS gewaschen und daraufhin mit 13 µg/ml Laminin (Fa. Tebu, Offenbach) beschichtet. Beide Substanzen wurden jeweils über Nacht bei 4° C inkubiert. Zu einer gleichmäßigeren Beschichtung der einzelnen Kulturkammern führte die Verwendung eines Schüttlers, auf dem die Zellkulturplatten über Nacht verblieben. Vor der Zellaussaat wurden die beschichteten Kulturplatten erneut mit PBS gewaschen.

Zur Differenzierung und anschließenden immunocytochemischen Analyse der USSC wurden Ø 13 mm Glasdeckgläschen (CS) in einer 24-well Zellkulturplatte mit ebenfalls 0,5-1 mg/ml PDL und 13 µg/ml Laminin beschichtet. Nach der PDL-Beschichtung, die wiederum bei 4° C über Nacht erfolgte, wurden die CS nach einem PBS-Waschschritt in eine neue 24-well Platte überführt und dort anschließend mit Laminin beschichtet. Nach erneutem Waschen der CS wurden die USSC ausgesät.

2.4 Differenzierung der USSC in Zellkultur

2.4.1 Differenzierung mit XXL-Medium

Zur Herstellung des Differenzierungsmediums XXL (Müller und Rosenbaum, 2001) wurden die in Tab. 2.1 aufgelisteten Substanzen steril zum Grundmedium zugegeben. FCS wurde vor Gebrauch bei 56° C für 30 min hitzeinaktiviert zusätzlich steril filtriert. Das Differenzierungsmedium XXL wurde lichtgeschützt alle zwei Tage gewechselt.

Tab. 2.1: Zusammensetzung des XXL-Mediums

Substanz	Endkonzentration	Firma
FCS	15%	Cambrex
IBMX	500 µM	Sigma
db-cAMP	1000 µM	Sigma
NGFβ	50 ng/ml	Tebu
bFGF	20 ng/ml	Tebu
RA	10 µM	Sigma

Die auf beschichteten CS in 24-well- oder in 6-well-Zellkulturplatten ausgesäten USSC wurden bereits im subkonfluentem Stadium mit XXL-Medium inkubiert. Die

Zelldifferenzierung wurde mit Hilfe immuncytochemischer Färbungen verifiziert und anschließend quantifiziert. Die Versuchsdauer betrug bis zu vier Wochen. Als Kontrollversuch wurden humane Hautfibroblasten ebenfalls auf beschichtete CS in 24-well Zellkulturplatten ausgesät und mit XXL-Medium inkubiert.

2.4.2 DA-Medium und Tyrosinhydroxylase-Induktion

Zur Erhöhung des Anteils Tyrosinhydroxylase (TH)-immunpositiver USSC wurden zuvor XXL-differenzierte USSC zusätzlich mit DA-Medium (Stull und Iacovitti, 2001) inkubiert (Tab. 2.3). Da Vorversuche für längere Inkubationszeiten als 24 h zu drastischem Zellsterben führten, wurde die Inkubationsdauer des DA-Mediums auf maximal 24 h begrenzt. Als Grundmedium des Induktionsmediums wurde das chemisch definierte, serumfreie N2-Medium (Tab. 2.2) verwendet:

Tab. 2.2: Zusammensetzung des N2-Mediums (500ml)

Substanz	Konzentration	Firma
DMEM (023)	750 ml	Gibco
Glutamin	2 mM	Sigma
Ham's F12	250 ml	Gibco
Insulin	5 µg/ml	Sigma
Natriumselenit	30 nM	Sigma
Progesteron	20 nM	Sigma
Putrescin	100 µM	Sigma
Transferrin	100 µg/ml	Sigma

Dem N2-Medium wurden die aufgelisteten Komponenten in den angeführten Konzentrationen steril zugesetzt. Um Autokatalyse des Dopamins zu verhindern, wurden die Versuche lichtgeschützt durchgeführt.

Tab. 2.3: Zusammensetzung des DA-Mediums

Substanz	Endkonzentration	Firma
TPA	200 nM	Sigma
aFGF	100 ng/ml	Tebu
IBMX	0,25 mM	Sigma
Forskolin	50 μ M	Sigma
Dopamin HCl	20 μ M	Sigma

Um den Effekt des DA-Mediums auf die TH-Expression der USSC zu quantifizieren, wurden drei unabhängige Experimente (TH1, 2, 3) mit KCB 55-Zellen unterschiedlicher Passagen und XXL-Vorinkubationszeiten durchgeführt. Nach Inkubation der USSC in XXL-Medium (1) wurden bei allen Experimenten korrespondierende Zellen für 4 h (2) oder 24 h (3) mit DA-Medium inkubiert. Die Hälfte der für 4 h mit DA-Medium inkubierten Zellen wurde nach 4 h nochmals für 20 h mit DMEM/30% FCS versetzt (4) (Abb. 2.1).

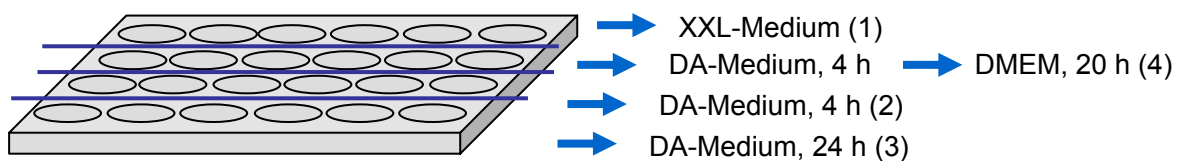


Abb. 2.1: Kultivierungsbedingungen 1-4 zur Analyse der TH-Induktion durch DA-Medium.

Die Zellen der Bedingungen 1 und 2 wurden gemeinsam fixiert, sowie nach weiteren 20 h die der Bedingungen 3 und 4. Die Zellen aller Bedingungen wurden in einer Doppelfärbung mit jeweils gegen TH- und GABA-gerichteten Antikörper (AK) gefärbt. Der Anteil TH-immunpositiver Zellen, der der veränderten Kerne, der Zellen mit abgerundetem Soma (GABA-Färbung), sowie die Gesamtzahl aller Zellen wurde pro zufällig gewählter mikroskopischer Felder mit Hilfe der Lucia Software (Fa. Nikon) computerunterstützt bestimmt. Bei jedem Versuch wurden pro Bedingung vier CS mit jeweils 20 mikroskopischen Gesichtsfeldern analysiert. Um den Einfluss des als zelltoxisch bekannten Dopamins auf die TH-Induktion zu analysieren, wurden darüber hinaus zwei Experimente mit drei bzw. vier CS pro Bedingung durchgeführt, bei denen die USSC neben 4 h in DA-Medium auch für 4 h in A-Medium (ohne Dopamin)

inkubiert wurden. Wiederum wurden 20 zufällig ausgewählte mikroskopische Gesichtsfelder ausgewertet und die Gesamtzahl aller Zellen pro Bedingung bestimmt. Der Fehlerbalken gibt in allen Diagrammen den jeweiligen Standardfehler an. Als signifikant wurde $p < 0,05$, als hochsignifikant $p < 0,01$ und als extrem hochsignifikant $p < 0,001$ gewertet.

2.5 Immuncytochemische und immunhistochemische Färbungen

2.5.1 Prinzip der Färbungen

Zur Bestimmung der Markerexpression der USSC mittels immuncytochemischer Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses in XXL-Medium bzw. DA-Medium und ihres Proliferationsverhaltens, wurden Markierungen durch die indirekte Immunfluoreszenz-Methode durchgeführt (Abb. 2.2).

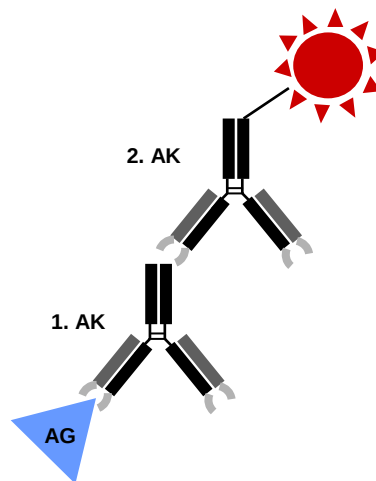


Abb. 2.2: Indirekte Immunfluoreszenzmethode mit fluoreszierendem Sekundär-AK.

Hierbei wird das AG mit dem Primär-AK inkubiert, so dass ein AG-AK-Komplex entsteht. An diesen bindet in der zweiten Phase der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundär-AK. Durch Detektion des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundär-AK kann so die Position des AG in oder auf der Zelle lokalisiert werden (AK=Antikörper, AG=Antigen).

Zur Identifizierung der USSC *in vivo* mittels immunhistochemischer Färbungen wurden zusätzlich zu der indirekten Immunfluoreszenz die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (Abb. 2.3 A) sowie eine Kombination aus biotinyliertem Antikörper und indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb. 2.3 B).

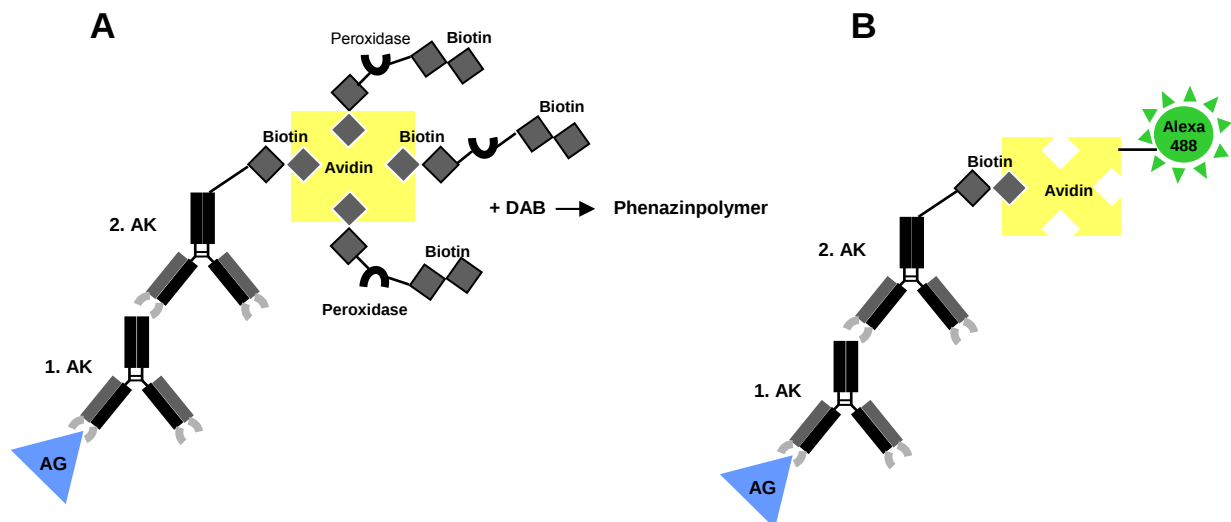


Abb. 2.3: Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode und Signalverstärkung durch Kombination aus biotinyliertem AK und Fluorochrom. Das AG wird mit dem Primär-AK inkubiert, so dass ein AG-AK-Komplex entsteht. An diesen bindet in der zweiten Phase der biotinylierte Sekundär-AK. Bei der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Technik bindet das Biotin des Sekundär-AK an den ABC. Die ebenfalls an den ABC gebundene Peroxidase oxidiert das zugesetzte DAB, wenn H_2O_2 zur Verfügung steht zu einem braunen Phenazinpolymer, wodurch das AG lokalisiert werden kann (A). Zur Signalverstärkung kann ein Avidin-gekoppeltes Fluorochrom (hier Alexa 488) verwendet werden. Dieses bindet an den biotinylierten Sekundär-AK und verstärkt so dessen ursprüngliches Signal (B).

2.5.2 Puffer und Lösungen

Als Waschpuffer für die immunocytochemischen Färbungen und zum Lösen bzw. Verdünnen der unten aufgeführten Substanzen wurde PBS (Fa. PAA Laboratories) verwendet. Alle für die Immunocytochemie verwendeten Substanzen sind im Folgenden aufgelistet:

- PFA-Stocklösung (8%): 8 g PFA in 0,1 M Phosphat-Puffer lösen, 56° C, pH 7
- PFA/ Glutaraldehyd (GA): 1 ml 4% PFA+ 12 µl GA (Fa. Merck)
- Triton (Tx) - Lösung (10%): 10 ml Triton-X 100 (Fa. Merck) ad 100 ml PBS
- NGS/ Triton (Tx) zum Blocken/Permeabilisieren:
 - 10% NGS/ 0,03% Tx: 1 ml NGS (Fa. Sigma) ad 10 ml PBS + 30 µl 10%Tx
- DAPI-Lösung: DAPI (Fa. Roche) 1:10 in PBS
- Citifluor, Eindeckelmedium für Fluoreszenzfärbungen (Fa. Citifluor)

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet. PBS wurde aufgrund des hohen Verbrauches selbst hergestellt.

- 5-fache Stocklösung PBS: 6,9 g NaH_2PO_4 , 43,5 g NaCl ad 1000 ml Aqua ad injectabilia (Fa. Braun), pH-Wert 7,4

- H₂O₂, Fa. Sigma (tiefgekühlt), verdünnt in Aqua dest
- 5% NGS (Fa. Sigma), verdünnt in PBS
- Hämalaun (Fa. Sigma)
- 1% Eosin-Lösung in Aqua dest. (Fa. Sigma)
- Rotihistol, Toluol-Ersatz (Fa. Merck)
- DAPI-Lösung: DAPI (Fa. Roche) 1:10 in PBS
- Citifluor, Eindeckelmedium für Fluoreszenzfärbungen (Fa. Citifluor)
- Entellan, Eindeckelmedium für nicht-fluoreszente Färbungen (Fa. Merck)

2.5.3 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Alle in Tab. 2.4 aufgeführten Primärantikörper zur immuncytochemischen Analyse der USSC wurden mit PBS verdünnt und vor Gebrauch 1 min bei 1600 rpm abzentrifugiert.

Tab. 2.4: Verwendete Primärantikörper zur immuncytochemischen Analyse der USSC

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Hersteller
CAT ms IgG	Cholin-Acetyltransferase	1:500	Chemicon
bTub ms IgG	β-III-Tubulin	1:200	Chemicon
DCX gp IgG	Doublecortin	1:200	Chemicon
DDC ms IgG	Dopa-Decarboxylase	1:500	Chemicon
GABA rbt IgG	γ-Aminobuttersäure	1:1000	Sigma
GFAP ms IgG	Gliales, fibrilläres, saures Protein	1:300	Chemicon
Na ⁺ ms IgG	Spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanal, Segment III/VI	1:50	Sigma
NeuN ms IgG1	Neuronaler Kern	1:500	Chemicon
NF-cocktail rbt IgG	Neurofilament (H,M und L-Kette)	1:1000	Biotrend
Nuc ms IgG	Humaner Kern	1:200	Chemicon
Syn ms IgG	Synaptophysin	1:100	Sigma
TH2 clone ms, IgG1	Tyrosinhydroxylase	1:100	Sigma
Vim ms IgG	Vimentin	1:300	Chemicon

Die für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 2.5 aufgelistet. Wie auch schon für die immunocytochemischen Färbungen wurden alle Antikörper in PBS verdünnt und vor Gebrauch bei 1600 rpm für 1 min abzentrifugiert.

Tab. 2.5: Verwendete Primärantikörper zur immunhistochemischen Analyse

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Hersteller
ED-1 ms IgG1	ED1, aktivierte Makrophagen bzw. Mikroglia	1:500	Serotec
hTau rbt IgG (MAB 1512)	Humanes Tau-Protein	1:100	Chemicon
Nuc ms IgG1	Humanes Kernprotein	1:200	Chemicon
GFAP ms IgG	Gliales fibrilläres saures Protein	1:300	Chemicon
NeuN ms IgG1	Neuronaler Kern	1:500	Chemicon

Alle verwendeten Sekundärantikörper wurden mit PBS verdünnt und vor Gebrauch ebenfalls 1 min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Sekundär-Antikörper wurden stets lichtgeschützt inkubiert. In Tab. 2.6 sind alle Sekundärantikörper aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tab. 2.6: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-ms IgG, FITC-gekoppelt	1:100	Chemicon
Anti-rbt IgG, Rhodamin X-gekoppelt	1:1000	Molecular Probes
Anti-ms IgG, Alexa 488-gekoppelt	1:1000	Molecular Probes
Anti-gp IgG, Alexa 488-gekoppelt	1:1000	Molecular Probes
Anti-rbt IgG, biotinyliert	1:200	Vector
Anti-ms IgG, biotinyliert	1:200	Vector
Streptavidin-gekoppeltes Alexa 488	1:500	Molecular Probes

2.5.4 Immuncytochemisches Färbeprotokoll

Zur immuncytochemischen Färbung wurden die mit USSC bewachsenen CS aus den 24-well Zellkulturplatten genommen und in eine feuchte Kammer gelegt bzw. die Färbung in den jeweiligen Kulturkammern einer 6-well Zellkulturplatte durchgeführt. Für Färbungen in den 6-well Platten musste das Volumen der einzelnen Lösungen von 100 µl auf etwa 250 µl erhöht werden. Um Verdunstung der Antikörper, z.B. bei Inkubationen über Nacht zu vermeiden, wurden die entsprechenden Kulturkammern mit Parafilm bedeckt und auf diese Weise der feuchten Kammern vergleichbare Bedingungen geschaffen. Die Färbungen der verschiedenen Antigene erfolgten nach unten aufgeführtem Schema:

1. Fixierung der Zellen (4% PFA oder 4% PFA/ GA, s. unten)
2. 3 x Waschen mit PBS
3. Blocken/ Permeabilisieren der Zellmembranen mit NGS/ Tx für > 30 min, RT
4. Inkubation des 1. Antikörpers bei 4° C, ÜN
5. 3 x Waschen mit PBS
6. Inkubation des 2. Antikörpers bei 4° C, ÜN
7. 3 x Waschen mit PBS
8. Zellkernfärbung mit DAPI, 1 min
9. 3 x Waschen mit PBS
10. Eindeckeln mit Citifluor

Die Fixierung der Zellen erfolgte für die GABA- und TH-Färbung mit einer Mischung aus 4% PFA und 0,3% Glutaraldehyd für 5 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde für 20 min mit Ethanolamin (Fa. Sigma) inkubiert. Zum Nachweis der restlichen Antigene wurden die Zellen für 10-15 min mit 4% PFA fixiert. Schritt 3 wurde routinemäßig mit 10% NGS und 0,03% Tx für mindestens 30 min durchgeführt, für den Nachweis des humanen Kerns mit Hilfe des Anti-Nuc Antikörpers wurde jedoch 10% NGS unter Zusatz von 0,5% Tx verwendet und sowohl dem Erst- als auch Zweitantikörper 5% NGS und 0,5% Tx zugesetzt.

2.5.5 Immunhistochemische Färbeprotokolle

2.5.5.1 Fluoreszenzfärbungen

Die Protokolle zur ED1- und GFAP-Färbung wurden von der Immunocytochemie übernommen. Zur Färbung von NeuN wurden die entsprechenden Schnitte im Gegensatz zum Standardprotokoll mit Aceton bei -20° C fixiert. Alle übrigen Schritte wurden identisch durchgeführt. Als beste Methode zur Nuc-Färbung erwies sich die Kombination aus biotinyliertem Sekundär-AK und Streptavidin-gekoppeltem Alexa 488, um eine Verstärkung des Signals zu erhalten. Des Weiteren wurden sowohl 1. als auch 2. AK unter Zusatz von 5% NGS und 0,5% Tx inkubiert, um ein besseres Penetrieren der AK in den Kern zu gewährleisten. Die immunhistochemische Färbung wurde an Hirnschnittpräparaten von PFA-fixierten Versuchstieren durchgeführt, was somit eine zusätzliche PFA-Fixierung überflüssig machte. Das Protokoll der Nuc-Färbung im Einzelnen:

1. Lufttrocknen der Schnitte, ca. 15 min, RT
2. Rehydrieren mit PBS
3. Blocken und Permeabilisieren mit 10% NGS und 0,5% Tx, 15 min, RT
4. Inkubation des 1. AK in 5% NGS und 0,5% Tx über Nacht bei 4° C
5. 3 x Waschen mit PBS
6. Inkubation des biotinylierten 2. AK in 5% NGS und 0,5% Tx für 2 h, RT
7. 3 x Waschen mit PBS
8. Inkubation des Streptavidin-Alexa 488 für 2 h, RT
9. 3 x Waschen mit PBS
10. Zellkernfärbung mit DAPI, 1 min
11. 3 x Waschen mit PBS
12. Eindeckeln mit Citifluor

2.5.5.2 hTau-Färbungen mit DAB-Markierung

Die Färbung des humanen Tau-Proteins wurde mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex Methode und DAB-Markierung durchgeführt. Das Protokoll im Einzelnen:

1. Lufttrocknen der Schnitte, ca. 15 min, RT
2. Rehydrieren mit PBS
3. 10 min 4% PFA

4. Waschen mit Aqua dest.
5. je 2 min 50%, 100%, 50% Aceton, RT
6. 2 x Waschen mit Aqua dest.
7. 2 x Waschen mit PBS
8. Blocken endogener Peroxidasen 0,3% H₂O₂, 30 min, RT
9. Waschen mit PBS
10. Blocken mit NGS für 30 min, RT
11. hTau (1:100), 4° C, ÜN
12. 3 x Waschen mit PBS
13. Biotinylierter Anti-ms-Antikörper (1:200), 1 h, RT
14. 3 x Waschen mit PBS
15. ABC-Lösung, 30 min, RT
16. 3 x Waschen mit PBS
17. DAB Entwicklung (0,2 mg/ml DAB-Lösung, 1 ml+ 4 µl 1% H₂O₂), 10 min
18. 2 x Waschen mit Aqua dest.
19. Entwässern mit aufsteigender EtOH-Reihe
20. 2 x 2 min Rotihistol
21. Eindeckeln mit Entellan

2.5.5.3 Hämalaun-Eosin-Färbungen

Um eventuell auftretende Tumorbildung zu beurteilen, wurden einige Hirne stichprobenartig nach unterschiedlichen Überlebenszeiten der Tiere (von zwei Tagen bis zu einem Monat Überlebenszeit) mit Hilfe von Hämalaun-Eosin (HE)-Färbungen untersucht. Anschließend wurden die Hirnschnittpräparate am Mikroskop auf Unregelmäßigkeiten des Gewebes hin untersucht. Die HE-Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Lufttrocknen der Schnitte
2. Rehydrieren mit PBS
3. Hämalaun-Lösung, 3 min
4. 15 min Spülen mit Leitungswasser
5. Differenzieren mit HCl/ EtOH (200 ml 70% EtOH mit 1 ml 37% HCl), 10-15 min
6. Eosin-Lösung, 5 min
7. 3 x Waschen Aqua dest.
8. Entwässern mit aufsteigender EtOH-Reihe

9. 2 x 2 min Rotihistol

10. Eindeckeln mit Entellan

2.5.6 Auswertung der immuncytochemischen und histochemischen Färbungen

Die Quantifizierung der immuncytochemischen Färbungen erfolgte mit dem Nikon Eclipse TE 200 Fluoreszenzmikroskop. Zufällig ausgewählte Gesichtsfelder der einzelnen CS wurden zuerst fotografiert und anschließend mit Hilfe der Lucia Software computerunterstützt ausgewertet. Hierbei wurde mit Hilfe der DAPI-Färbung die Gesamtzellzahl bestimmt und mit der Anzahl der positiven Zellen für die jeweilige Antikörperfärbung ins Verhältnis gesetzt. Die Anzahl immunpositiver Kerne (DAPI, BrdU, Nuc) konnte nach entsprechender Programmierung mit Hilfe der Lucia Software vom Computer bestimmt werden. Wurde die Expression eines Antikörpers oder Parameter wie die Morphologie der Somata der Zellen bestimmt, so erfolgte die Auswertung in der 20-fachen Vergrößerung. In der Regel wurden pro CS 15-20 zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgewertet und 2-4 CS pro Bedingung analysiert. Beim BrdU-Assay und der Bestimmungen der Überlebensrate der USSC wurde in der 10-fachen Vergrößerung ausgewertet. Als Diagramm wurden jeweils die Mittelwerte der Zellzahlen bzw. die Prozentsätze immunpositiver Zellen der einzelnen Gesichtsfelder mehrerer analysierter CS aufgetragen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt, die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an. Als signifikant (*) wurde $p < 0,05$, als hochsignifikant (**) $p < 0,01$ und als extrem hochsignifikant (***) $p < 0,001$ gewertet. Neben dem Fluoreszenzmikroskop wurde zur Auswertung der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen (GFAP, NeuN und ED1) das konfokale Laserscannmikroskop (BioRad MRC 1024, Krypton-Argon Laser, Nikon Diaphot 200 Mikroskop) verwendet. Auf diese Weise konnten die Färbungen auf Co-Expression mit dem USSC-Markierungsfarbstoff PKH26 untersucht werden und so eine mögliche Differenzierung bzw. Phagozytose der implantierten USSC festgestellt werden. Die Analyse der Nuc-immunpositiven USSC in Hirnschnittpräparaten erfolgte am Axio-plan2 Mikroskop der Firma Zeiss.

2.6 BrdU-Inkorporation und Apoptose

Zur Bestimmung des Anteils proliferierender USSC unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen wurde der Prozentsatz BrdU-einlagernder Zellen bestimmt. Dazu wurde dem entsprechenden Kulturmedium jeweils 23 h vor der Fixierung der Zellen 10 μ M BrdU zugesetzt. BrdU wird bei dieser Methode der Proliferations-

bestimmung als Thymidin-Analogon kompetitiv in alle Zellen eingebaut, die sich während der BrdU-Expositionszeit in der S-Phase befinden (Abb. 2.4). Anschließend kann das in die genomische DNA der Zellen eingebaute BrdU mit Hilfe immunocytochemischer Färbungen detektiert und so die Anzahl der sich teilenden Zellen bestimmt werden.

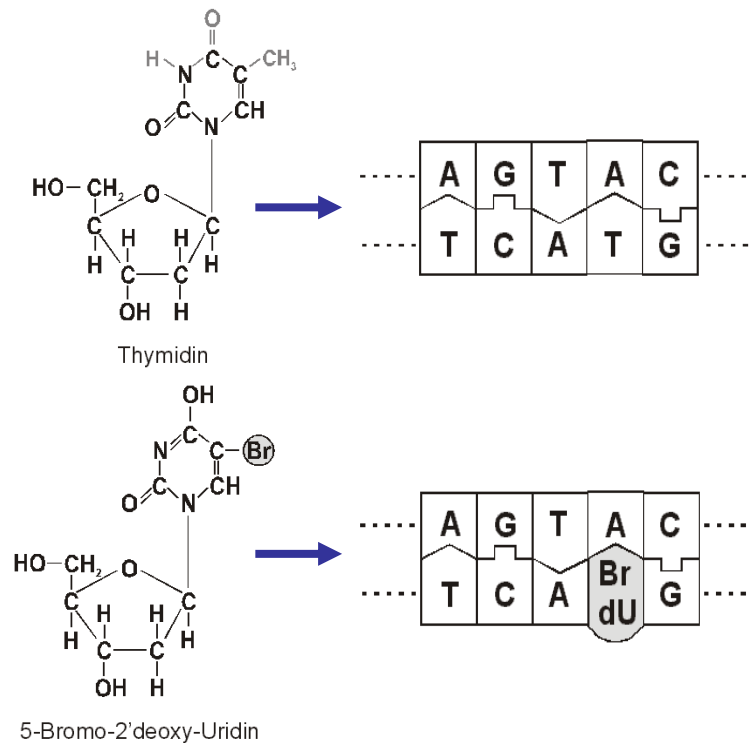


Abb. 2.4: Einbau des BrdU als Thymidin-Analogon in proliferierende Zellen.

Die Strukturformeln des Thymidins und des synthetischen BrdU weisen große Strukturähnlichkeiten auf, so dass BrdU bei Zusatz in das Kulturmedium in Zellen, die sich zur Expositionszeit in der S-Phase befinden, anstelle des Thymidins eingebaut werden kann. BrdU wird anschließend immunocytochemisch detektiert.

In dieser Arbeit wurden die BrdU-einbauenden USSC mit Hilfe eines BrdU-Kits (Fa. Roche, BrdU Labelling Detection Kit I), der nach Herstellerangaben verwendet wurde, gefärbt und identifiziert. Der Anteil BrdU-inkorporierender Zellen pro Färbezeitpunkt sowie die Gesamtzellzahl wurden in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bestimmt und der Prozentsatz inkorporierender Zellen pro Bedingung als Diagramm aufgetragen. Für die im Ergebnisteil dargestellten Resultate wurden die Datensätze dreier unabhängiger Experimente mit den Zellchargen KCB 55/13 und SA 5/8 aufgetragen. Obwohl die BrdU-Inkorporation eine weit verbreitete und häufig angewandte Methode zur Proliferationsdetektion darstellt, wird die Spezifität dieser Methode immer wieder in Frage gestellt. So besteht die Möglichkeit, dass BrdU anstatt während der Proliferation einer Zelle während der DNA-Degradation in der letzten Phase der Apoptose eingebaut und anschließend detektiert wird (Cooper-Kuhn und Kuhn,

2002). Um sicherzustellen, dass es sich bei den BrdU-einbauenden USSC um proliferierende und nicht um apoptotische Zellen handelt, wurden von parallelen SA 5/13 Kulturen nach vier Tagen XXL-Differenzierung und 23 h BrdU-Inkubation zum einen der Anteil BrdU einlagernder Zellen und zum anderen der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Für dieses Kontrollexperiment wurde eine XXL-Differenzierungsdauer gewählt, bei der zum einen noch mit Proliferation und somit BrdU-Einlagerung der USSC zu rechnen ist, und zum anderen aufgrund der stattfindenden Reduktion der Zellzahl während der ersten Woche XXL-Inkubation bereits apoptotischer Zelluntergang möglich ist. Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe eines TUNEL-Kits (In situ cell death detection Kit, TMR red, Fa. Roche) nachgewiesen. Die Detektion der Apoptose beruht bei dieser Methode auf der Markierung von Strangbrüchen genomischer DNA, die mit Hilfe einer markierten terminalen Transferase, die an die freien 3-OH-Enden der Nukleinsäuren bindet, sichtbar gemacht werden. Der verwendete TUNEL-Kit detektiert apoptotische Zellen noch bevor morphologische Veränderungen stattfinden oder die DNA-Bruchstücke im Zytoplasma der Zellen sichtbar werden und stellt somit eine sehr frühe Detektionsmethode der Apoptose dar.

2.7 Funktionalitätstest der USSC durch Patch-clamp

2.7.1 Grundlagen der Patch-clamp Technik

An der Plasmamembran einer Zelle grenzen zwei Lösungen mit unterschiedlicher Ionenzusammensetzung aneinander. Die Extrazellulärlösung enthält vor allem Na^+ - und Cl^- -Ionen und nur wenige K^+ -Ionen. In der Intrazellulärlösung befinden sich hauptsächlich K^+ -Ionen und große anorganische Anionen. Ist eine Membran für eine Ionenart permeabel, diffundieren diese Ionen entsprechend ihres Konzentrationsgradienten von einem Kompartiment in das andere. Durch die Verschiebung elektrischer Ladung entsteht zwischen den beiden Lösungen eine Potentialdifferenz. Das sich aufbauende elektrische Feld verhindert schließlich eine weitere Diffusion von Ionen, und es werden keine Nettoladungen mehr verschoben. Die Potentialdifferenz zwischen den beiden Lösungen im Gleichgewicht ist das Umkehr- oder Gleichgewichtspotential E für das Ion X , das mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet und so zur Identifizierung der fließenden Ionen verwendet werden kann:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

- E: Umkehrpotential des Ions X
 R: allgemeine Gaskonstante $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
 T: Temperatur in Grad Kelvin
 Z: Betrag der Ladung des Ions X
 F: Faradaykonstante $96485 \text{ As} \cdot \text{mol}^{-1}$
 $[X]_n$: Konzentration des Ions X in der Lösung n
 Der Index i steht für intrazellulär (inside) und o für extrazellulär (outside).

In der Elektrophysiologie werden Membranpotentiale und Ionenströme mit Hilfe von Elektroden in Intrazellulär- und Extrazellulärlösungen gemessen. Zur Messung des Membranpotentials einer Zelle wird in der so genannten Stromklemme (current clamp) der Strom durch die Zellmembran auf Null geklemmt und die Spannungsdifferenz zwischen der Intra- und Extrazellulärlösung gemessen. In der Spannungsklemme (voltage clamp) kann das Membranpotential geklemmt werden und die dabei fließenden Ionenströme gemessen werden. Die verwendeten Ableitungskonfigurationen der Patch-clamp Technik sind in Abb. 2.5 dargestellt (Hamill et al., 1981):

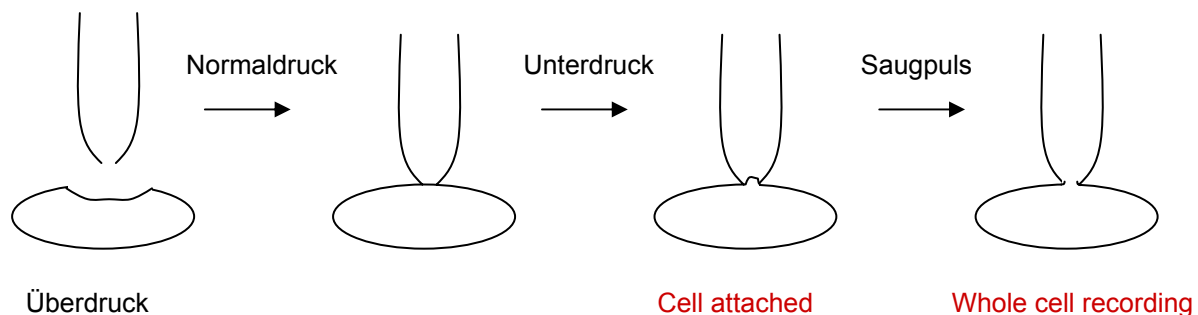


Abb. 2.5: Ableitungskonfigurationen der Patch-clamp Technik.

Unter mikroskopischer Kontrolle wird die Pipette mit Hilfe eines Mikromanipulators nahe an die Zelloberfläche herangeführt. Durch den an die Pipette angelegten Überdruck wird die Zellmembran dabei leicht eingedrückt. Wird der Druck weggenommen, schmiegt sich die Zellmembran erst an die Pipettenöffnung an und wird anschließend durch leichten Unterdruck angesaugt. In der dann erreichten „Cell attached“-Konfiguration können einzelne Ionenströme der im angesaugten Membranstück enthaltenen Ionenkanäle abgeleitet werden. Wird nun z.B. durch einen Saugpuls die Zelle geöffnet, kann die gesamte Zelle in der Ganzzellaufzeichnung gemessen werden („Whole cell recording“).

Zur Durchführung einer Patch-clamp Messung wird eine Patch-Pipette mit einer definierten Intrazellulärlösung gefüllt und mit Hilfe einer Kolbenspitze Überdruck angelegt, um beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung Verschmutzung der Pipettenöffnung zu verhindern. Die intrazelluläre Elektrode befindet sich in der Patch-Pipette,

die extrazelluläre Elektrode in der Badlösung. Taucht nun die Pipette in die Extrazellulärlösung ein, so entsteht durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen in der intra- und extrazellulären Lösung eine Spannungsdifferenz. Mit Hilfe des Patch-clamp Vorverstärkers, einem hochempfindlichen Strom-Spannungswandler, können letztlich in der Spannungsklemme Stromsignale und in der Stromklemme Spannungssignale der abgeleiteten Zellen gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Zellen in der „whole-cell“- Konfiguration abgeleitet. Um eine gute Ableitung der Zellen zu erreichen, mussten alle Zellen zuerst in die „cell-attached“- Konfiguration gebracht werden, die sich durch einen besonders hohen Widerstand zwischen Pipettenspitze und Zellmembran, den so genannten „Gigaseal“ (2-50 G Ω), auszeichnet. Anschließend wurden die Zellen durch einen kurzen Saugpuls geöffnet und die resultierenden Ströme während distinkter Spannungspulse gemessen.

2.7.2 Durchführung der Patch-clamp Experimente

Mit Hilfe der Patch-clamp Technik (Neher und Sakmann, 1976) sollte elektrophysiologisch das Vorhandensein bzw. die Funktion spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle auf undifferenzierten sowie auf XXL-differenzierten USSC analysiert werden. Gemessene Na⁺-Ströme sollten durch Applikation von 1 μ M Tetrodotoxin-Lösung (TTX) zur spezifischen Blockade der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle verifiziert werden. Die Patch-clamp Messungen wurden im Labor der Zentralen Forschung Physik der Bayer AG (Bayer Technologie Services) in Leverkusen unter Anleitung von Frau Dr. Kathrin Schnizler durchgeführt.

Die verwendete Badlösung (4 mM K⁺) setzte sich wie folgt zusammen: 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde nach dem Ansetzen mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Pipetten- oder Intrazellulärlösung enthielt 140 mM K⁺-Aspartat, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM CaCl₂ und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde nach dem Ansetzen der Lösung mit KOH auf pH 7,2 eingestellt.

Die verwendeten Patch-Pipetten wurden an einem Vertikal-Puller (L/M-3P-A, Fa. Sutter) aus Borsilicatglas-Kapillaren (Fa. Hilgenberg) gezogen ($\varnothing$ 1,6 mm) und anschließend über der Flamme poliert. Die verwendeten Patch-Pipetten wiesen Widerstände von etwa 5 M Ω auf, nachdem sie mit Intrazellulärlösung befüllt und in die Patch-Apparatur gesteckt bzw. in die Badlösung getaucht worden waren. Alle Messungen wurden mit einem EPC-9 Patch-clamp Verstärker (Fa. HEKA) durchgeführt. Datenaquirierung und Analyse wurden mit der Pulse+Pulsefit Software (Fa. HEKA)

durchgeführt. Bei den in der Spannungsklemme abgeleiteten Zellen betrug das Haltepotential -80 mV. Als Spannungspuls wurde ausgehend vom Haltepotential das Membranpotential von -80 mV für je 400 ms von -120 mV auf +60 mV in 20 mV-Schritten erhöht.

2.8 Molekularbiologische Analyse der USSC Differenzierung

2.8.1 RNA-Isolierung aus USSC

Die neuronale Differenzierung der USSC in XXL- und XXL+DA-Medium wurde neben der immunocytochemischen Analyse auch mit Hilfe der quantitativen RT-PCR analysiert. Hierzu wurden USSC auf beschichteten 6-well Zellkulturplatten unter verschiedenen Bedingungen (DMEM/30% FCS, XXL, XXL+DA) kultiviert. Zur Gewinnung des jeweiligen Zelllysates wurden die USSC mit je 350 µl RLT-Puffer (Fa. Qiagen) unter Zusatz von β -Mercaptoethanol (1:100) lysiert und bei -20° C gelagert. Aus den gesammelten Zelllysaten wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben die total-RNA isoliert.

2.8.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die gewonnene Zell-RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (Fa. GibcoBRL) verwendet. Das Pipettierschema und PCR-Protokoll im Einzelnen:

15,0 µl	total RNA	10min	20° C
6,0 µl	5X Puffer	60min	42° C
3,0 µl	DTT	5min	95° C
1,5 µl	dT19V	Lagerung:	-20° C
0,6 µl	dNTPs		
0,8 µl	RNAsin		
1,5 µl	Superscript II		
1,7 µl	Lichrosolv® (RNA freies H ₂ O)		

Die generierte cDNA wurde anschließend auf 100 µl mit Lichrosolv® verdünnt. Jeweils 5 µl der cDNA-Verdünnung wurden für die nachfolgend beschriebenen qPCRs verwendet.

2.8.3 Prinzip der quantitativen PCR mit Taqman®

Zur Durchführung der quantitativen RT-PCR mit Hilfe des Taqman® Assays (Fa. Applied Biosystems) werden 3 Primer benötigt, die an die cDNA binden (Abb. 2.6). Neben dem sense- und antisense Primer zu Amplifizierung der cDNA wird ein sondenmarkierter Primer verwendet („Sonde“), der an das gesuchte Gen auf den cDNA-Strängen bindet. An die Sonde ist ein Fluoreszenzfarbstoff („R“) und ein Quencher („Q“) gebunden, so dass anfangs keine Fluoreszenz gemessen werden kann. Erreicht die Polymerase die Sonde, so werden Quencher und Fluoreszenzfarbstoff voneinander gespalten, und ein Fluoreszenzsignal wird detektierbar, welches mit zunehmender Zyklenzahl ansteigt und einen Plateauwert erreicht. Ist die gesuchte Gensequenz vorhanden, resultiert ein typischer sigmoider Verlauf der Fluoreszenzkurve.

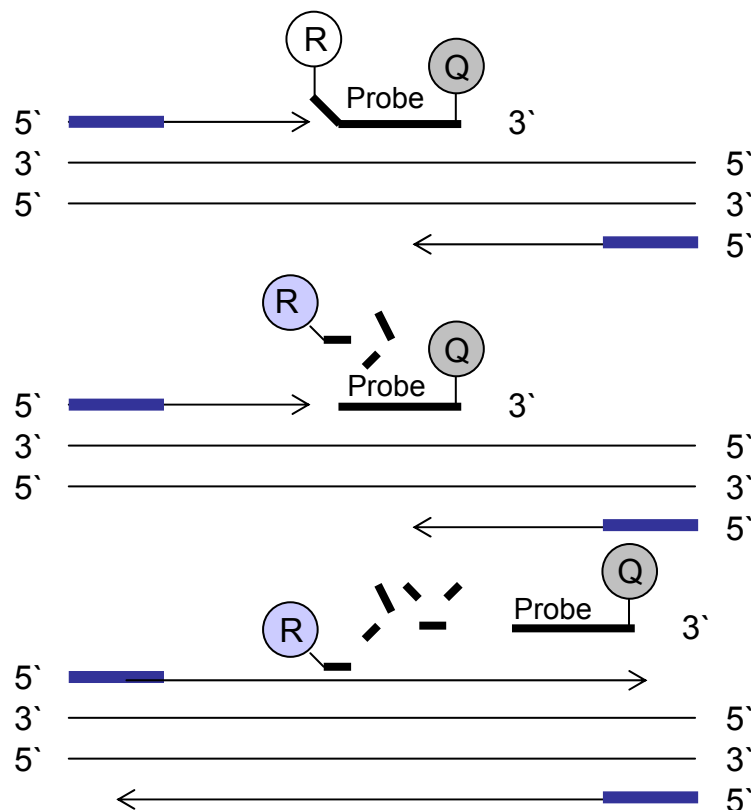


Abb. 2.6: Prinzip der quantitativen PCR mit Hilfe eines Taqman-Assays® (modifiziert nach Fa. Applied Biosystems).

2.8.4 Durchführung der quantitative PCR

Die Detektion der quantitativen PCR erfolgte mit dem GeneAmp ABI 7000 (Fa. Applied Biosystems). Von jeder cDNA-Probe wurden 5 µl eingesetzt und in einer Doppelbestimmung gemessen. Mit Hilfe der ebenfalls gemessenen humanen Referenzgene Glyzerinaldehyd-6-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Ornithin-

decarboxylase (ODC) und 18S (ribosomale RNA) wurde der relative Expressionslevel der analysierten Gene NF-M und Syn berechnet und für die einzelnen Versuchsbedingungen DMEM/30% FCS, XXL und XXL+DA aufgetragen.

Darüber hinaus wurde Gesamt-cDNA des menschlichen Gehirns (fötal und adult) als Positivkontrolle verwendet. In Tab. 2.7 sind die verwendeten Taqman® Assays (Fa. Applied Biosystems) sowie die gemessenen cDNA Proben aufgelistet:

Tab.2.7: Auflistung der verwendeten Taqman® -Assays

Gen	Erläuterung	Gen-ID	Taqman Assay®
NF-M	Mittlere Kette der Neurofilament-Tripelhelix	NM_005382	Hs00193572_m1
Syn	Synaptophysin, Protein synaptischer Vesikel	NM_003179	Hs00300531_m1
TH	Tyrosinhydroxylase, Enzym dopaminergischer Zellen	NM_000360	Hs00165941_m1
DAT	Dopamintransporter, adulter dopaminergischer Marker	NM_001044	Hs00168988_m1

Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben (Fa. Applied Biosystems). Für das als repräsentativ ausgewählte Ergebnis der Proben 9, 10 und 11 (Bedingungen der jeweiligen Zellen s. Ergebnisteil) wurde jeder Messwert gegen jeden Referenzgen-Messwert verrechnet, so dass in den dargestellten Diagrammen (Abb. 3.22 + Abb. 3.31) in jeden Datenpunkt vier Werte eingingen. Als Fehlerbalken wurde der Standardfehler angegeben, die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests überprüft, wobei $p < 0,01$ als hochsignifikant (**) und $p < 0,001$ als extrem hochsignifikant (***) gewertet wurde.

2.9 Funktionalitätstest durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Um festzustellen, ob Dopamin von den USSC in das Medium ausgeschüttet wird, was Rückschlüsse auf die Synthesefähigkeit der Zellen und somit deren Funktionalität zulässt, wurden Medienüberstände der Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, mittels der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) analysiert. Die HPLC-Analytik wird der Methode der Flüssigkeitschromatographien zugeordnet. Das Prinzip der Stofftrennung beruht hierbei ganz allgemein auf Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch- oder Größenausschlussvorgängen. Die HPLC ist ein Säulenchromatographie-Verfahren, bei dem die mobile Phase eine Flüssigkeit darstellt, und die stationäre Phase sich in einer Trennsäule befindet. Als

stationäre Phase verwendet man feinkörnige Kunststoffe oder Flüssigkeiten, die an einen inerten Träger gebunden und gegebenenfalls chemisch modifiziert sind. Bei der HPLC-Analyse wird die mobile Phase im Gegensatz zur Niederdruck- oder Mitteldruckchromatographie mit Hilfe einer Hochdruckpumpe (bis ca. 400 bar) durch die Säule gepresst. Die applizierten Substanzen weisen bei der Analyse unterschiedliche Affinitäten zur mobilen und stationären Phase auf, was sich durch den Grad der Wechselwirkungen und somit in den unterschiedlichen Retentionszeiten der Substanzen widerspiegelt, die letztlich zur Identifizierung der Substanzen führen. Hinter der Trennsäule der HPLC-Anlage befindet sich im Allgemeinen der Detektor, der auf das jeweilige Substanzgemisch anzupassen ist. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde ein elektrochemischer Detektor verwendet (Ehlers, 1996).

2.9.1 HPLC-Vorversuche und Probengewinnung

Um die Konzentration potentiell ausgeschütteten Dopamins im Medienüberstand zu erhöhen, wurden die USSC auf 6-well Zellkulturplatten kultiviert und differenziert. So konnte eine möglichst große Zellmenge mit einem Minimum an Kulturmedium (1 ml pro well) versetzt werden. Zur Durchführung der HPLC-Versuche wurden ca. 80.000 USSC auf zuvor beschichteten 6-well Zellkulturplatten (Fa. Nunc) ausgesät. Als Vorversuch wurde die Differenzierungsfähigkeit der USSC durch XXL-Inkubation auf beschichteten Plastikwells (im Gegensatz zu Glas-CS, die in den 24-well-Platten verwendet wurden) mittels immunocytochemischer TH-Färbung getestet.

Um die Fähigkeit der USSC zur Dopaminsynthese und Dopaminausschüttung zu untersuchen, wurden die Überstände unterschiedlich inkubierter USSC vor und nach KCl-Depolarisierung mit Hilfe der HPLC-Analyse untersucht. In Vorversuchen wurde die Stabilisierung der Proben mit Natriumbisulfit und o-Phosphorsäure sowie die Stabilisierung mit EDTA ausgetestet (Studer et al., 1998; Zeng et al., 2004). Hierbei erwies sich die EDTA-Stabilisierung als geeigneter, da in parallel durchgeführten Versuchen nach erstgenannten Methoden in einigen Fällen kein Dopamin zu messen war, wohl aber mit EDTA-Stabilisierung.

Die Probengewinnung zur HPLC-Analyse erfolgte nach unten aufgezeichnetem Schema (Abb. 2.7): Platten undifferenzierter und XXL-differenzierter USSC, sowie humane Hautfibroblasten als Kontrollzellen, wurden auf 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Jeweils drei Wells einer Kulturplatte wurden über Nacht (15-16 h) mit DA-Medium inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die unterschiedlichen Medien abge-

saugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei 37° C mit DMEM inkubiert, um den Basislevel der Dopaminausschüttung zu bestimmen. Danach wurden die DMEM-Überstände der jeweils zu einer Bedingung gehörenden Zellen gemischt und mit 0,1 mM EDTA stabilisiert. Anschließend wurden alle Zellen, um eine Depolarisierung herbeizuführen, mit 56 mM KCl in DMEM wiederum für 20 min bei 37° C inkubiert, gemischt und mit 0,1 mM EDTA stabilisiert.

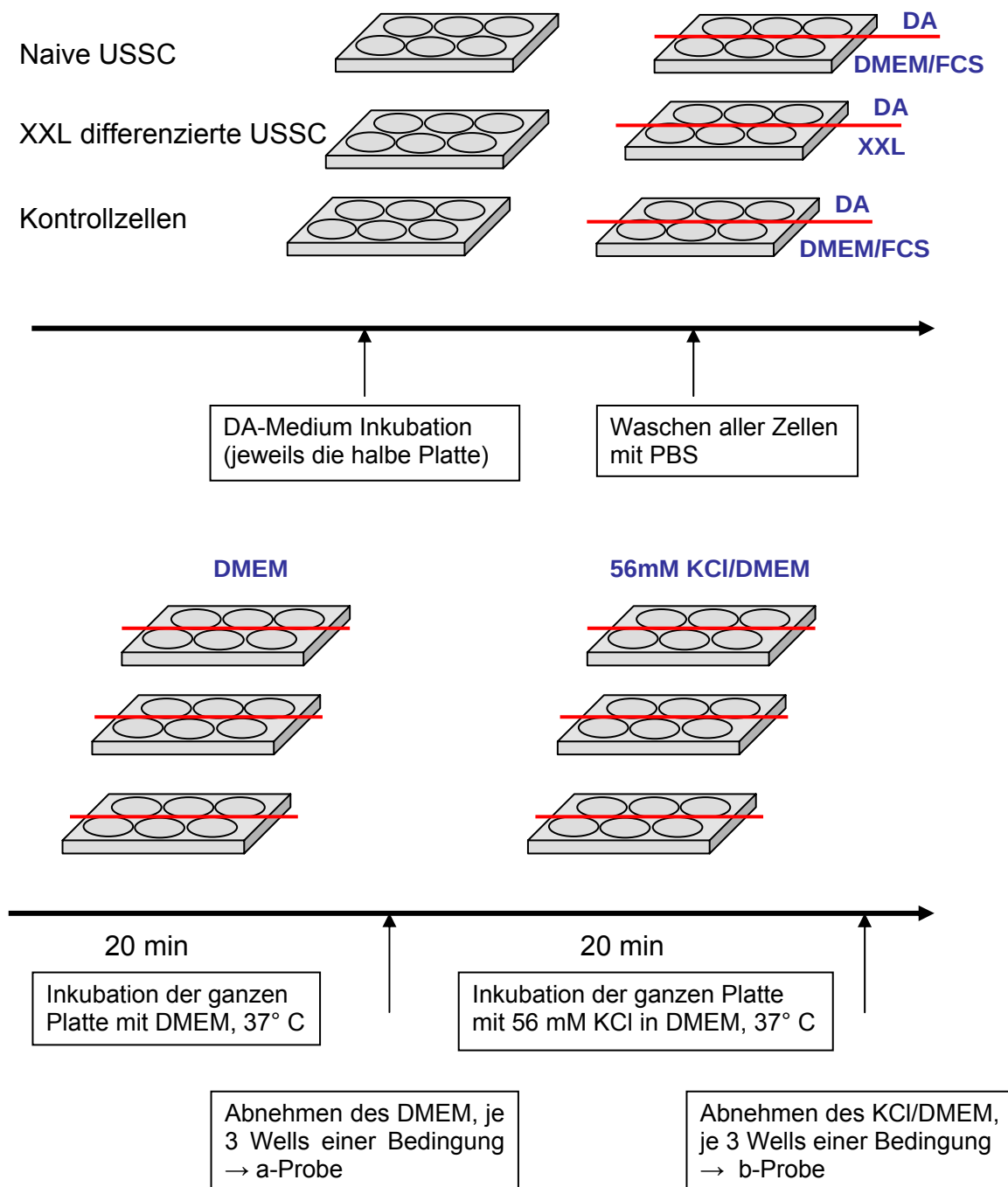


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Probengewinnung für die HPLC-Analyse.

Durch DA-Inkubation der Kontrollzellen konnte das vollständige Abwaschen des im DA-Medium bereits enthaltenen Dopamins kontrolliert werden konnte. So wurde sichergestellt, dass bereits in reinem DMEM detektiertes Dopamin spontan von den USSC freigesetzt wurde (Ribeiro et al., 2002; Waters und Smith, 2000). Alle Zellen wurden nach der Probengewinnung erneut mit DMEM versetzt und in den Brutschrank zurückgestellt. Alle HPLC-Proben wurden auf Eis und lichtgeschützt gelagert und umgehend zur Analyse zum Institut für Physiologische Psychologie transportiert.

2.9.2 HPLC-Analyse und Auswertung

Die HPLC-Analyse der Proben wurde im Institut für Physiologische Psychologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf von Frau Dr. M. A. de Souza Silva durchgeführt. Zur Auftrennung der Proben wurde eine 125 mm lange Nucleosil C-18 RP Säule verwendet, die Partikelgröße betrug 5 µm (Fa. Macharey und Nagel). Die mobile Phase bestand aus 0,15 M Perchlorsäure, 0,12 M NaOH, 0,67 mM EDTA, 0,86 mM Natriumoctylsulfat, 3,5% Acetonitril und 1,8% Tetrahydrofuran (pH=3). Die Arbeitselektrode wurde auf 0,7 V gegenüber der Ag/AgCl-Referenzelektrode eingestellt. Dihydroxybenzylamin (DHBA) wurde als interner Standard verwendet. Von jeder Probe wurden 45 µl mit 5 µl DHBA versetzt und anschließend automatisch appliziert (Fa. CMA, CMA/200 Autosampler). Mit Hilfe des Internen Standards wurden die in den Proben enthaltenen Mengen an Dopamin bzw. DOPAC berechnet. Darüber hinaus diente der DHBA-Zusatz zur Kontrolle des Injektionsvolumens. So konnten Fehler des Autosamplers in der Berechnung berücksichtigt werden und eventuell stattfindende Abbauprozesse der Probe durch den dann ebenfalls auftretenden Abbau des internen Standards, bemerkt werden. Vor Analyse der Medienüberstände wurden Standardlösungen von Dopamin und seiner Metabolite (z.B. DOPAC) analysiert (250 pg/ 50 µl in 0,05 M HClO₄). Durch vorheriges Messen der Standardlösung konnten später die in den Proben enthaltenen Substanzen anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert werden. Die Nachweisgrenze der HPLC-Anlage lag bei 1 pg Dopamin.

Um den unterschiedlichen Zelldichten der Wells unter den einzelnen Bedingungen und Zelltypen Rechnung zu tragen, wurde nach 2-3 h der Bio-Rad DC Proteinassay® (Fa. Bio-Rad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Bestimmungsmethode beruht auf einer Quantifizierung der kolorimetrischen Reaktion des Proteins mit Fohllins-Reagenz. Neben den Proben wurden BSA-Proteinstandards (Konzentrationen: 0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,5 mg/ml; 2,0 mg/ml) ver-

messen, so dass die Proteinmenge jeder HPLC-Probe bestimmt und der Dopamingehalt der Proben auf [mg] Protein normiert werden konnte.

2.10 Markierung der USSC mit PKH26

Um die USSC in Zellkultur mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26 (Fa. Sigma) zu markieren, wurden 1 ml Verdünnungslösung und 4 µl PKH26-Farbstoff gemischt. Anschließend wurden die bereits abtrypsinisierten USSC in Verdünnungslösung aufgenommen (2 Mio. Zellen in 1 ml) und in die vorbereitete Farblösung gegeben. Zellen und Farblösung wurden per Hand gemischt. Anschließend wurde 1 ml FCS hinzugegeben, erneut gemischt und eine Minute später 5 ml DMEM/10% FCS zugegeben. Danach wurden die markierten Zellen abzentrifugiert und mit DMEM/10% FCS gewaschen.

Um zu testen, ob das Differenzierungsverhalten der Zellen durch die PKH26-Markierung im Vergleich zu unmarkierten Zellen verändert wurde, wurden die PKH26-markierten USSC mit XXL-Medium differenziert und die Expression des neuronalen Markers Neurofilament (NF) mittels Immunocytochemie analysiert. Um die Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes in den USSC zu untersuchen, wurden PKH26-markierte USSC zusammen mit Rattenastrozyten als Co-Kultur ausgesät. Anhand einer GFAP-Färbung dieser Co-Kultur wurde die Co-Expression des roten PKH26 und des grünen FITC-Antikörpers, mit dessen Hilfe die GFAP-Färbung sichtbar gemacht wurde, nach einer Woche und einem Monat untersucht.

Zur Durchführung der *in vivo*-Experimente wurden die USSC in Zellkultur zwei Tage vor Implantation mit PKH26 markiert. Vor Implantation wurde die Markierung der USSC mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Fa. Nikon, Eclipse 2000TE) kontrolliert.

2.11 Versuchstiere

Für die Implantationsexperimente wurden adulte, männliche Wistar-Ratten verwendet. Das Körpergewicht der Tiere betrug 200-250 g bei Beginn der Immunsuppression. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet (21° C, 50% ± 5% Luftfeuchtigkeit) und unter denselben Bedingungen konventionell aufgezogen. Sie wurden in Standardkäfigen in Gruppen gehalten, sofern nicht wegen besonderer Umstände (z.B. unmittelbar vor und nach der OP) Einzelhaltung erforderlich war. Pelletiertes Trockenfutter und keimfreies Wasser (pH 2) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

2.12 Tierexperimente

2.12.1 Immunsuppression

Um eine Abstoßung des Implantats zu verhindern, wurden alle Ratten mit Ciclosporin A (Sandimmune®, Sandoz Pharmaceutica, 15 mg/kg s.c.) immunsupprimiert. Einen Tag vor der Implantation wurde mit einer Bolus-Injektion begonnen und insgesamt über 10 Tage hinweg mit einer Erhaltungsdosis immunsupprimiert. Der Gesundheitszustand der Versuchstiere wurde regelmäßig anhand des Körpergewichts kontrolliert.

2.12.2 Prinzip der stereotaktischen Implantation

Soweit nicht anderes erwähnt, wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Implantationsexperimente von Frau Dr. Claudia Rosenbaum durchgeführt. Unmittelbar vor der Implantation wurden die Tiere mit Rompun (Bayer AG, Leverkusen, 5 mg/kg) und Ketavet (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, 100 mg/kg) anästhesiert. Die narkotisierten Versuchstiere wurden am Schädel geschoren und anschließend im Stereotaxiegerät (Small animal adaptor, Fa. David Kopf Instruments) an drei Punkten fixiert: Durch zwei in den Meatus akustikus externus eingeführte Ohrstecker und durch einen Bügel, in den der Oberkiefer hinter den vorderen Schneidezähnen eingehängt wurde. Mit Hilfe dieser Methode konnte durch Einstellung entsprechender Koordinaten präzise in eine bestimmte anatomische Struktur implantiert werden. Die Schädeldecke der so arretierten Tiere wurde anschließend freipräpariert und die Lage des Schädels im Stereotaxiegerät (Nullpunkteinstellung) am Tier durch Bestimmung der Differenz zwischen Schädeldach und der Linea interauralis überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Sollwert: 10mm). Die Koordinaten der einzelnen Implantationsregionen wurden mit Hilfe des stereotaktischen Atlas (Paxinos und Watson, 1998) ermittelt (Tab 2.8).

Tabelle 2.8: Koordinaten der stereotaktischen Implantationen

Implantationsort	A/P Bregma	lateral rechts	ventral
Cortex	- 0,3 mm	- 4,0 mm	- 2,5 mm
Hippocampus	- 3,5 mm	- 3,4 mm	- 3,2 mm
Substantia nigra	- 5,0 mm	- 2,4 mm	- 7,7 mm
Basalganglien	- 1,5 mm	- 3,4 mm	- 6,5 mm

Die jeweiligen Koordinaten wurden am Stereotaxiegerät eingestellt, die Schädeldecke markiert und anschließend mit einem Zahnarztbohrer (Fa. Fine Science Tools, Ø 1,4 mm) an der markierten Stelle punktförmig geöffnet. Die Implantation erfolgte mit Hilfe einer an der Apparatur fixierten 25 µl-Hamilton-Spritze mit 22-gauge Kanüle. Dünnere Kanülen konnten aufgrund von Vorversuchen, bei denen die USSC diese Kanülen nicht passieren konnten, nicht verwendet werden. Ein Mikroliter der Zellsuspension (75.000 USSC/µl) wurde in vier Portionen à 0,25 µl stereotaktisch ins Rattenhirn implantiert. Nach erfolgter Implantation verblieb die Implantationsnadel ca. 10 min im Gehirn des Tieres, um einen Reflux der Zellsuspension zu vermeiden. Überschüssige USSC wurden anschließend auf beschichtete CS in 24-well Zellkulturplatten ausplattiert, um die Viabilität der USSC mindestens bis zum Zeitpunkt der Implantation zu kontrollieren.

2.12.3 Implantation PKH26-markierter USSC

Tiere, die mit PKH26-markierten USSC implantiert wurden, wurden nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde die Schädeldecke mit einer Knochenzange eröffnet, die Gehirne entnommen und umgehend in -40° C bis -50° C kaltem Isopentan (Fa. Merck) schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Hirne bei -80° C gelagert. Als Kontrollversuche wurden zwei Tiere mit PKH26-markierten, jedoch durch mehrmaliges Einfrieren abgetöteten USSC implantiert. Durch Ausplattieren der überschüssigen Zellen auf beschichteten CS in 24-well Zellkulturplatten wurde anschließend überprüft, dass keine USSC die Behandlung überlebt hatten. Die entsprechenden Gehirne wurden ebenfalls nach einer Woche bzw. nach einem Monat wie oben beschrieben entnommen und anschließend analysiert.

2.12.4 Implantation unmarkierter USSC

Zur Bestimmung der Verteilung bzw. Migration der USSC nach Implantation der unmarkierten USSC wurden 17 Tiere operiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten perfundiert. Bei allen Tieren dieser Gruppe erfolgte die Implantation in den Hippocampus. Jeweils fünf Tiere, deren Gehirne nach unterschiedlichen Versuchsdauern (2 d, 1 W, 2 W, 3 W, 4 W) aufgearbeitet wurden, wurden mit einer Zellcharge KCB 55 implantiert. Zwei Tiere dienten als Kontrolltiere, sie erhielten anstelle der Zellsuspension eine NaCl-Injektion. Ein Kontrolltier wurde dazu verwendet, die Autofluoreszenz des Implantationsbereiches im akuten Zustand zwei Tage nach der OP zu beurteilen,

das andere wurde nach einem Monat analysiert, um den Injektionsbereich ohne USSC zu einem Zeitpunkt der abklingenden Immunreaktion zu beurteilen.

2.12.5 Perfusion

Die Tiere, die mit unmarkierten USSC implantiert wurden, wurden in Narkose gelegt und auf einer Unterlage mit Gummiringen befestigt. Der Thorax wurde eröffnet und die linke Herzkammer angeschnitten. Eine an eine Perfusionspumpe (505S, Watson Marlowe) angeschlossene Kanüle wurde durch die linke Herzkammer in die Aorta geschoben und Kanüle sowie das Herz mit einer Klammer fixiert. Anschließend wurde der rechte Vorhof mit einem kleinen Schnitt geöffnet. Nach 2-minütiger Perfusion des Tieres mit kalter PBS Lösung (4° C, Pumprate 35 ml/min) wurde 15 min mit 4% PFA perfundiert. Die anschließend entnommenen Gehirne wurden für mindestens einen Tag in 4 % PFA bei 4° C nachfixiert.

2.13 Markierung der USSC durch Lipofektion mit USPIO

2.13.1 Markierung der USSC und *in vitro*-Vorversuche

Die Markierung der USSC erfolgte mit dem Kontrastmittel SINEREM (Fa. Guerbet), das aus so genannten USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron-oxide particles) besteht, sowie dem Lipofektions-Reagenz Metafectene® (Hoehn et al., 2002). Hierzu wurden 108 mg SINEREM mit 900 µl DMEM und 54 µl Metafectene® gemischt und für eine Stunde inkubiert. 0,5 Mio. USSC wurden anschließend mit 155 µl fertiger Transfektionslösung versetzt und für zwei Tage inkubiert (Lipofektion). Für die *in vitro*-Versuche, die der Etablierung des Markierungsverfahrens mit den USSC dienten, wurden KCB 295/9 und 55/9 verwendet. Nach erfolgter Markierung der USSC wurden Vitalitätsprüfungen mit Trypanblau durchgeführt. Bei der USPIO-Markierung werden die Eisenpartikel in die Lysosomen der Zellen inkorporiert, was anschließend durch eine Eisenfärbung (Perl's Prussian Blue Staining) verifiziert werden konnte. Die Eisenfärbungen der markierten Zellen wurden sowohl vier Stunden nach der Lipofektion als auch eine Woche später nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Waschen mit PBS
2. Fixierung mit 1% H₂O₂ in Methanol, 15 min
3. Spülen mit Leitungswasser, 15 min
4. 1:1 Mischung 2% K₄[Fe(CN)₆]₂ in Aqua dest. und 2% HCl, 30 min

5. DAB-Entwicklung (0,2 mg/ml DAB-Lösung, 1 ml+ 4 μ l 1% H_2O_2), 10 min
6. 3 x Waschen mit Aqua dest.
7. Aufsteigende EtOH-Reihe (50%, 70%, 90%, 100%)
8. Benetzen mit Rotihistol
9. Eindeckeln mit Entellan

Um die Nachweisgrenze der USSC mit Hilfe der Kernspintomographie (MRT) *in vitro* zu untersuchen, wurden 100, 1.000, 10.000 und 50.000 USSC in jeweils 5 μ l DMEM suspendiert und in zuvor gebohrte Löcher einer mit Agarosegel gefüllten Kulturschale (Phantom, Abb. 2.8) gegeben. Als Negativ-Kontrolle dienten hierbei 5 μ l zellfreies Medium (DMEM). Alle befüllten Löcher des Phantoms wurden anschließend mit Agarosegel verschlossen.

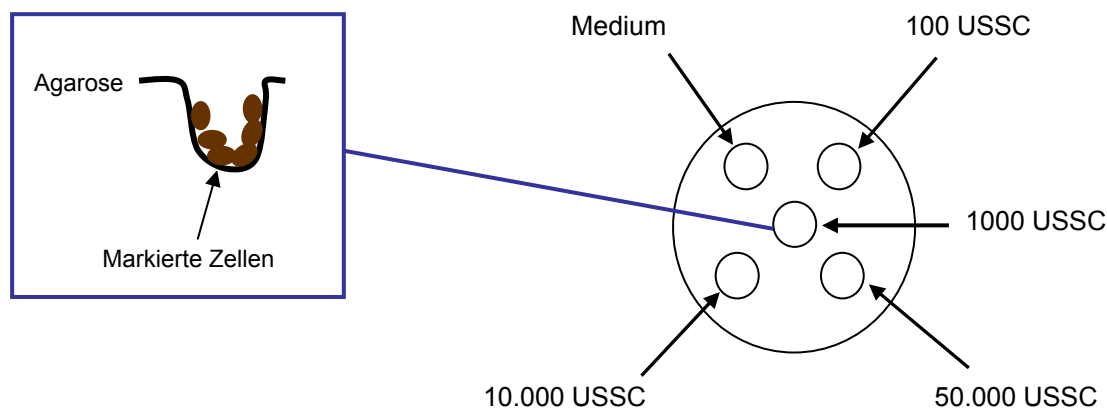


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Zellkultur-Vorversuche mit USPIO-markierten USSC. Um die Nachweisgrenze der so markierten USSC mittels MRT zu bestimmen, wurden definierte Mengen der USSC in ein Phantom gegeben und anschließend im MRT gemessen.

Bei der Analyse des Phantoms im MRT (Fa. Brucker BioSpec, durchgeführt im MPI für Neurologische Forschung, Köln) konnte so die Detektionsgrenze für die nach dem oben beschriebenen Protokoll markierten USSC bestimmt und für die anschließenden Implantationsexperimente abgeschätzt werden.

2.13.2 Implantation und Analyse USPIO markierter USSC *in vivo*

Für die Implantationsexperimente wurden 75.000 USPIO-markierte, in 1 μ l DMEM suspendierte KCB 55/12 stereotaktisch in den Cortex oberhalb des Corpus callosum einer adulten Wistar-Ratte implantiert (Dr. Ralph Weber, MPI Köln). Unmittelbar nach der Implantation sowie nach 4, 7, 11, 15, 2x und 27 Tagen wurde die Position der

implantierten Zellen mit Hilfe des MRT (4,7 Tesla, Fa. Brucker BioSpec) bestimmt. Es wurden dreidimensionale T2*-gewichtete Gradientenecho-Bilder aufgenommen. Die Repetitionszeit (TR) betrug 100 ms, die Echozeit (TE) 30 ms. Die Bildauflösung (Matrix) betrug hierbei 256 x 256 x 64 Bildpunkte, der Messbereich (Field of view) 2 x 2 x 1 cm, was eine Auflösung von insgesamt 78 x 78 x 156 μm ergibt. Die jeweilige Messzeit für diese oben genannte Sequenz betrug 1 h 45 min.

2.14 Aufarbeitung der Gehirne

Die perfundierten Gehirne wurden anschließend an die PFA-Nachfixierung in 20% Sukrose-Lösung gegeben und bis zum Absinken auf den Gefäßboden bei 4° C aufbewahrt (i. d. R. 1-2 d). Die so kryokonservierten Rattenhirne wurden mit -20 bis -30° C kaltem Methylbutan eingefroren und bei -80° C gelagert.

Alle Hirne wurden anschließend mit Hilfe eines Cryotoms (CM 3050, Firma Leica) in 20 μm dicke Gefrierschnitte geschnitten. Hierzu wurde mit einem Skalpell jeweils das Cerebellum abgetrennt, um ein stabileres Aufbringen auf den Objektträger zu gewährleisten. Das verbliebene Großhirn wurde parallel zum Schneidemesser mit Cryotomec auf den Objektträger aufgeklebt, koronal geschnitten und auf Histobond Objektträger (OT) (Fa. Marienfeld) aufgezogen. Jeder gesammelte Schnitt wurde hierbei nummeriert und darüber hinaus mit der laufenden Schnittnummer versehen, um später den exakten Abstand zwischen einzelnen Schnitten und somit auch die Position des Schnittes im Hirn bestimmen zu können. Die Objektträger- und Kammertemperatur betrug $-20 \pm 2^\circ \text{C}$. Alle Schnitte wurden getrocknet und anschließend bei -30° C gelagert.

2.15 Auswertung der Implantationsexperimente

2.15.1 Semiquantitative Bestimmung hTau-immunpositiver Zellen

Drei Monate nach Implantation in unterschiedliche Hirnareale wurden drei Rattenhirne ausgehend von der jeweiligen Implantationsstelle in 400 μm Abständen sowohl in rostro-caudale Richtung mit hTau-AK gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Hierbei wurden die Hirnareale, in denen immunpositive Zellen beobachtet wurden, in Skizzen des Rattenatlas (Paxinos und Watson, 1998) markiert. Anschließend wurden die einzelnen Areale entsprechend der Anzahl der in ihnen gezählten Zellen farblich nach dem in Abb. 2.9 abgebildeten Schema codiert:

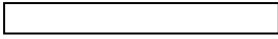
	Keine Zellen
	1-10 Zellen
	11-20 Zellen
	21-30 Zellen
	> 30 Zellen

Abb. 2.9: Farbcodierung der Zelldichte nach immunhistochemischer hTau-Färbung von Hirnschnittpräparaten. Mit dunkler werdendem Blauton wurden mehr Zellen pro Fläche im markierten Hirnareal gezählt.

2.15.2 Immunhistochemische Identifizierung der USSC im Rattenhirn

Bei der Analyse der mit Nuc-AK gefärbten Hirnschnittpräparate war zwischen unterschiedlichen immunpositiven Strukturen zu differenzieren. Nuc-immunpositive Strukturen zeichneten sich durch eine gleichmäßige Färbung in Zellkerngröße aus bzw. durch einen intensiv gefärbten Ring am äußeren Rand des Kerns. Die Größe des jeweiligen Zellkerns konnte durch die korrespondierende DAPI-Färbung festgestellt werden. Zytoplasmafärbungen und autofluoreszente Signale wurden ausgeschlossen. Letzteres wurde dadurch überprüft, ob das Signal lediglich mit dem Grünfilter des Mikroskops sichtbar war und nicht gleichzeitig mit dem Rotfilter.

2.15.3 Bestimmung der Lokalisation und Verteilung der USSC *in vivo*

Zur Bestimmung der Position und Verteilung der USSC wurden ausgehend vom Implantationsbereich in rostro-caudale Richtung in Abständen von höchstens 400 µm Hirnschnitte mit dem Nuc-Antikörper gefärbt. Der Abstand vom ersten bis zum letzten Gehirnschnitt, in denen USSC nachgewiesen werden konnten, wurde so für alle fünf Zeitpunkte der drei Experimente rechnerisch bestimmt. Immunpositive Strukturen in den Plexi der Ventrikel wurden für diese Auswertung nicht miteinbezogen, da es sich hierbei nicht um Verteilung bzw. Ausbreitung durch das Hirnparenchym handelt. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass die USSC bereits bei Implantation in den Hippocampus-Bereich in das Ventrikelsystem gelangten und sich an den Plexi abscheiden konnten. Die Hirnareale, in denen USSC immunhistochemisch identifiziert werden konnten, wurden anschließend in Skizzen des Paxinos-Rattenatlas übertragen. Alle während der Analyse eines Rattenhirns vorgefundenen USSC wurden dabei jeweils in Skizzen der theoretischen Implantationsstelle bei etwa -3,5 mm Bregma eingezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferation und Zellzyklusausstieg der USSC

Um den Anteil proliferierender USSC nach distinkten XXL-Inkubationszeiten zu ermitteln, wurde dem Kulturmedium 23 h vor der Fixierung 10 μ M BrdU zugesetzt. In proliferierende USSC eingelagertes BrdU konnte anschließend mit Hilfe einer immunocytochemischen Färbung detektiert und quantifiziert werden. Da ausdifferenzierte Zellen postmitotisch sind, also keine Zellteilung mehr durchlaufen, sollte der Anteil sich teilender und BrdU-einlagernder USSC mit dem Anteil von undifferenzierten Zellen sowie Progenitoren in der USSC-Kultur korrelieren (Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services, 2001).

Drei unabhängig voneinander durchgeführte BrdU-Experimente ergaben $67,3 \pm 1,1\%$ proliferierende USSC unter Naiv-Bedingungen, was die Proliferationsfähigkeit der USSC (SA 5/8, KCB 55/13) in Zellkultur und somit die gute Vermehrbarkeit der neonatalen Nabelschnurblutstammzellen in Kultur zeigt (Abb. 3.1). Eine Woche nach XXL-Inkubation der USSC ergab sich eine signifikante Reduktion des Anteils BrdU-inkorporierender USSC gegenüber der Proliferations-Bedingung auf $6,4 \pm 0,6\%$. Zwei Wochen nach XXL-Inkubation blieb der Anteil proliferierender USSC ebenfalls auf niedrigem Niveau ($6,1 \pm 2,1\%$) und konnte nach drei Wochen Inkubation schließlich nicht mehr detektiert werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass bereits nach einer Woche XXL-Inkubation der überwiegende Anteil der USSC den Zellzyklus verlassen hat, was eine essentielle Voraussetzung einer Zelle zur Differenzierung darstellt. Es wurde mit 23 h eine lange BrdU-Inkubationszeit gewählt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich der Anteil proliferierender USSC bei Beginn der XXL-Inkubation drastisch reduziert. Durch die lange BrdU-Inkubation wurde sichergestellt, dass auch nach einer und zwei Wochen XXL-Differenzierung der sehr geringe BrdU-inkorporierende Anteil der USSC noch bestimmbar war.

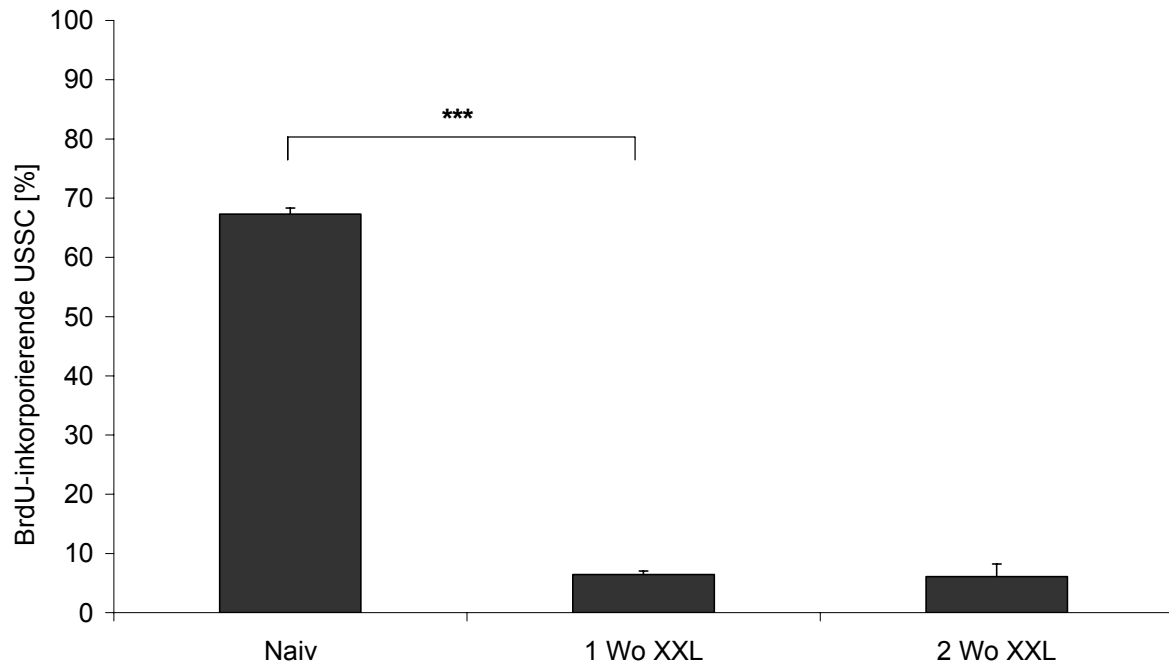


Abb. 3.1: Bestimmung des Anteils BrdU-inkorporierender USSC abhängig von der Kulturbedingung. Die Detektion des bei der Zellteilung eingebauten BrdUs zeigte eine hochsignifikante Reduktion des Anteils proliferierender USSC nach einer Woche XXL-Inkubation. Nach drei Wochen XXL-Inkubation konnten keine BrdU-inkorporierenden USSC mehr beobachtet werden. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet. ($n=3$)

Obwohl die BrdU-Inkorporation eine weit verbreitete und häufig angewandte Methode zur Proliferationsdetektion darstellt, wird immer wieder die Spezifität dieser Methode in Frage gestellt. So besteht die Möglichkeit, dass BrdU anstatt während der Proliferation einer Zelle während der DNA-Degradation in der letzten Phase der Apoptose eingebaut und anschließend detektiert wird (Cooper-Kuhn und Kuhn, 2002). Um sicherzustellen, dass es sich bei den BrdU-einbauenden USSC um proliferierende und nicht um apoptotische Zellen handelt, wurden TUNEL- und BrdU-Färbungen an parallelen Kulturen durchgeführt und der jeweilige Prozentsatz gefärbter Zellen quantifiziert und verglichen. Diese Experimente wurden mit 4 d XXL-differenzierten Kulturen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt zum einen mit einer noch gut detektierbaren Proliferationsrate, zum anderen jedoch gegenüber der Naiv-Bedingung auch mit einer erhöhten Apoptoserate zu rechnen war.

Bei diesem Experiment ergab sich nach 23 h BrdU-Inkubation ein signifikant größerer Anteil BrdU-einlagernder USSC als TUNEL-positiver USSC (Abb. 3.2). Dieses Resultat schließt somit statistisch aus, dass die BrdU-Inkorporation auf apoptotische Zellen zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis wird darüber hinaus durch die Tatsache bekräftigt, dass Kerne apoptotischer USSC sich im Gegensatz zu proliferierenden

USSC durch eine kleine runde Morphologie ausgezeichneten, was in Abb. 3.3 veranschaulicht wird.

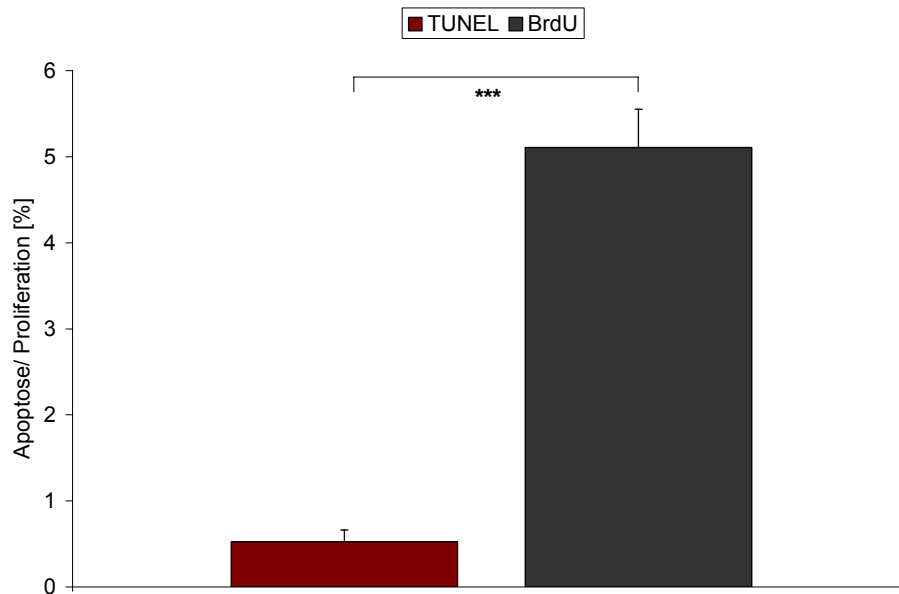


Abb. 3.2: Quantifizierung BrdU-einlagernder und TUNEL-positiver USSC. Aus den relativen Anteilen markierter Kerne wird ersichtlich, dass der Anteil BrdU-immunpositiver USSC signifikant größer ist und daher die BrdU-Inkorporation in der überwiegenden Zahl der Zellen nicht durch Einlagerung bei Apoptose zustande kommen kann. Analysiert wurden parallele Kulturen von SA 5/13 nach vier Tagen XXL-Differenzierung und 23 h BrdU-Inkubation. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an, als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet ($n=4$).

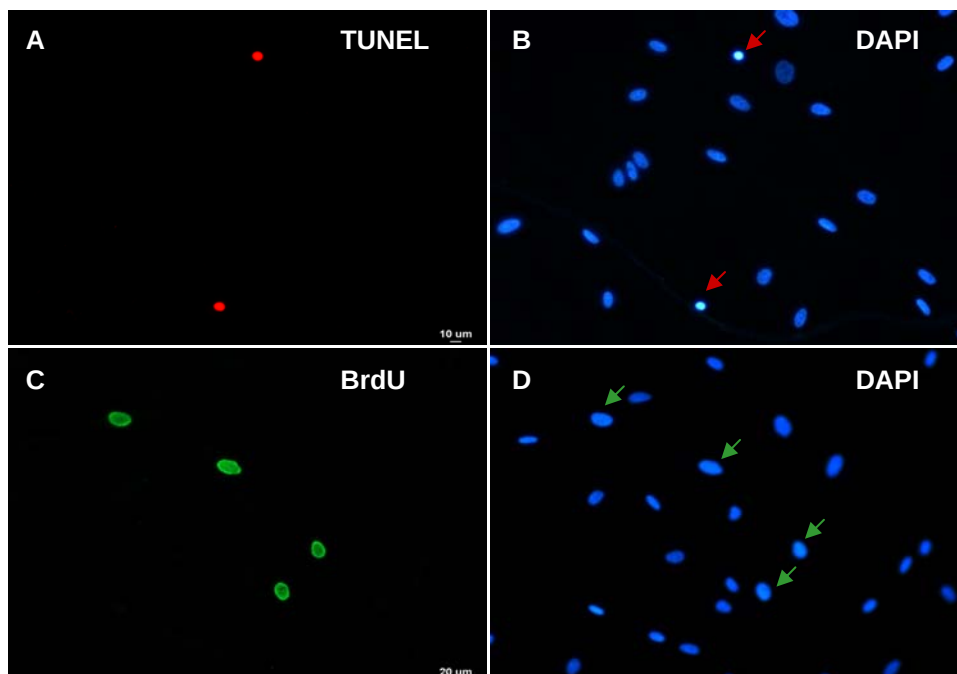


Abb. 3.3: Vergleichende BrdU- und TUNEL-Färbung in parallelen USSC-Kulturen (SA 5/13). Korrespondierende DAPI-Kernfärbungen sind jeweils durch Pfeile markiert, wodurch deutlich wird, dass sich die Kernmorphologien apoptotischer USSC (A+B) und proliferierender, BrdU-einlagernder USSC (C+D) unterscheiden.

3.2 Zellreduktion durch XXL- Inkubation

Während der XXL-Inkubation konnte unabhängig von der verwendeten USSC-Charge eine signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. Am größten war dieser Effekt auf das Überleben der USSC innerhalb der ersten Woche. Beispielhaft wurden Zellen der KCB 295 naiv und nach bis zu vier Wochen XXL-Inkubation jeweils wöchentlich quantifiziert. Hierzu wurden pro Bedingung zufällig gewählte mikroskopische Gesichtsfelder einer DAPI-Zellkernfärbung, wie im Material und Methodenteil beschrieben, ausgewertet. Es ergab sich dabei innerhalb der ersten Woche der XXL-Inkubation eine signifikante Reduktion der Zellmenge auf $53,7 \pm 2,4\%$ der Ausgangspopulation. Innerhalb von vier Wochen XXL-Inkubation reduzierte sich die Ausgangsmenge dieser Zellen auf etwa ein Fünftel ($21,9 \pm 3,0\%$) (Abb. 3.4).

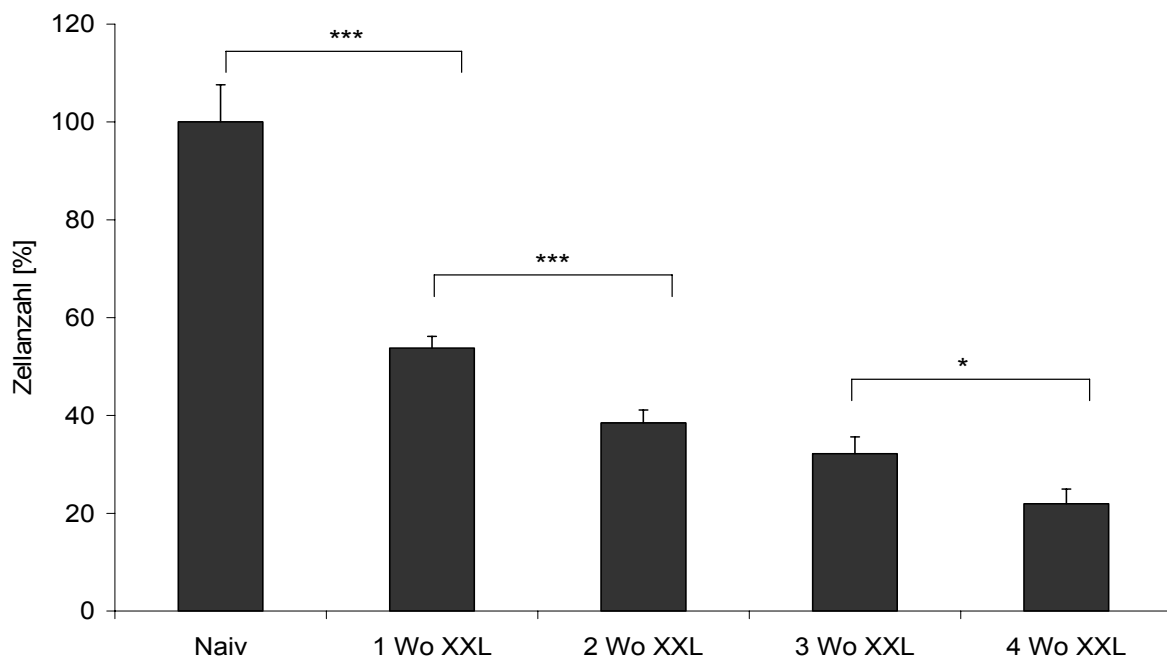


Abb. 3.4: Reduktion der Zellmenge abhängig von der Inkubationsdauer in XXL-Medium. Beispielhaft ist hier die Quantifizierung der Zellcharge KCB 295 dargestellt. Nach vier Wochen XXL-Inkubation konnte eine Reduktion der Ausgangszellmenge auf etwa ein Fünftel beobachtet werden, wobei in den ersten zwei Wochen das Zellsterben stärker war als in den letzten zwei Wochen. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an, als signifikant wurde $p < 0,05$ (*) und als extrem hochsignifikant $p < 0,001$ (***) gewertet. ($n=3$)

3.3 Neurale Differenzierung der USSC durch XXL- Medium

3.3.1 Morphologische Veränderungen der USSC

Durch Inkubation der USSC mit XXL-Medium konnte bereits in den ersten Tagen eine deutliche morphologische Veränderung beobachtet werden. Abb. 3.5 zeigt links naive USSC (SA 5/11) unter Proliferationsbedingungen (DMEM/30% FCS), die sich durch ihren spindelförmigen, fibroblastoiden Phänotyp auszeichnen. Rechts sind

USSC (SA 5/8) nach drei Tagen XXL-Inkubation abgebildet, die bereits eine neuro-nenähnliche Morphologie aufwiesen und in ihrer Dichte durch XXL-Medium schon reduziert wurden.

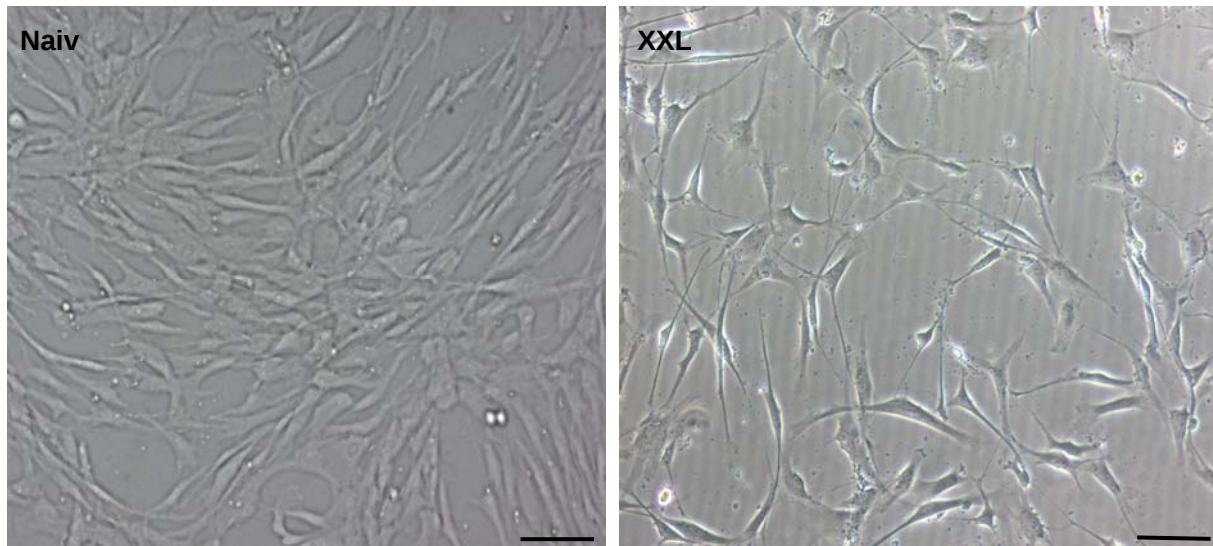


Abb. 3.5: Morphologien naiver und XXL-inkubierter USSC. Die unterschiedlichen Morphologien der USSC unter Proliferationsbedingungen (SA 5/11) im Vergleich zur Differenzierungsbedingung sind bereits nach kurzer XXL-Inkubationszeit (3 d, SA 5/8) auszumachen. Maßbalken: 100 μm .

3.3.2 Expression unterschiedlicher neuronaler Proteine

Zur Analyse des neuronalen Differenzierungspotentials in Zellkultur wurden auf zuvor mit PDL/Laminin beschichteten Glasdeckgläschen kultivierte USSC mit dem Differenzierungsmedium XXL inkubiert. Als kritisch für die Differenzierung erwies sich hierbei die richtige Zelldichte. Nur subkonfluent gewachsene USSC konnten im Gegensatz zu konfluenten Kulturen mit XXL-Medium differenziert werden. Nach verschiedenen Inkubationszeiten in XXL-Medium wurde die Expression unterschiedlicher Marker anhand von immunocytochemischen Färbungen untersucht.

Um den Verlauf der neuronalen Differenzierung zu quantifizieren, wurden sowohl naive USSC als auch XXL-differenzierte Zellen bis zum Versuchsende nach vier Wochen wöchentlich mit einem Anti-Neurofilament-Antikörper (NF) gefärbt und quantifiziert. Hierbei nahm ausgehend von undifferenzierten USSC, die auch einen geringen Anteil NF-immunpositiver Zellen enthielten ($30,3 \pm 3,9\%$), der Prozentsatz NF-immunpositiver USSC stetig zu. Nach zwei Wochen XXL-Inkubation war der Anstieg gegenüber der naiven Bedingung (DMEM/30% FCS) hochsignifikant ($64,7 \pm 4,8\%$) (Abb. 3.6). Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der USSC-Chargen KCB 295,

SA 33 und SA 5, die in bis zu vier unabhängigen Experimenten quantifiziert und der jeweilige Prozentsatz NF-immunpositiver USSC verrechnet wurde.

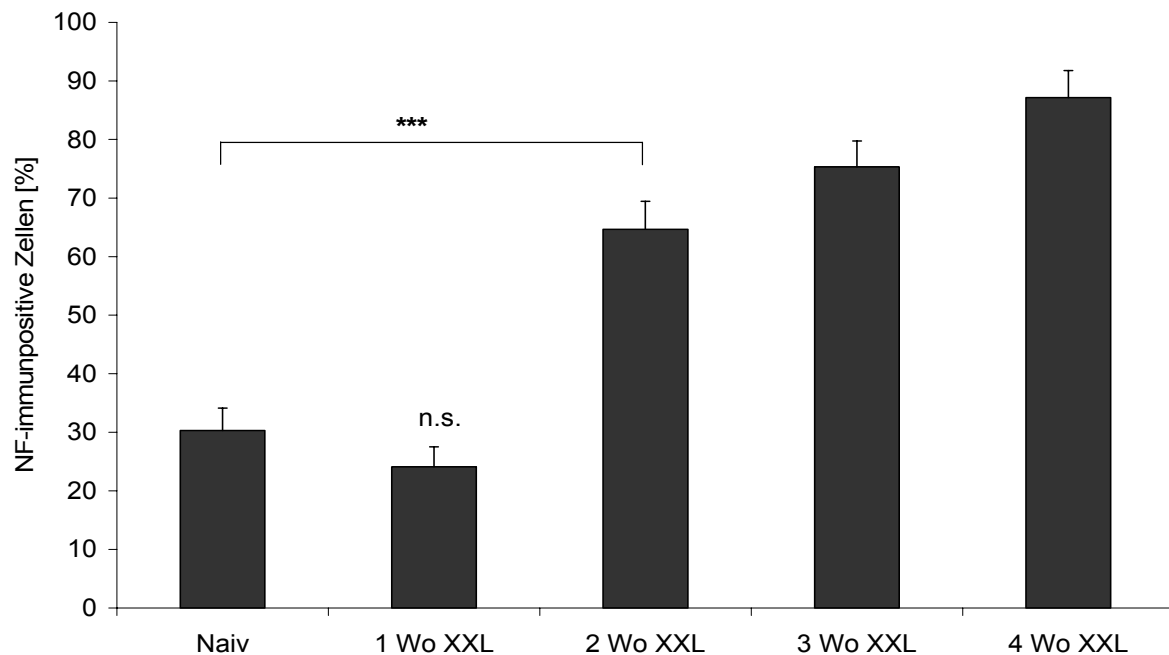


Abb. 3.6: Neurofilament-Immunreaktivität in USSC.

Die Berechnung des Prozentsatzes NF-immunpositiver Zellen abhängig von der XXL-Inkubationsdauer ergibt einen stetigen Anstieg dieser Population (n= 2-4). Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an, als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet. n.s.= nicht signifikant.

Abhängig von der verwendeten USSC-Charge wurden unterschiedliche Absolutwerte erreicht. Der Trend der Neurofilamentzunahme konnte jedoch in allen untersuchten USSC-Chargen (KCB 55, KCB 295, KCB 13, SA 33, SA 5) beobachtet werden.

Durch Abb. 3.7, welche die beispielhafte Quantifizierung der NF-Expression von KCB 259 zeigt, wird deutlich, dass es sich bei der NF-immunpositiven Population nach vier Wochen nicht um dieselben Zellen handelt, die bereits unter naiven Bedingungen NF exprimierten. Werden jeweils die absoluten Zellzahlen der Kultur gemeinsam mit der Anzahl NF-immunpositiver Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld über die Inkubationszeit aufgetragen, ergibt sich, dass neben einer Selektion der neuronalen Population auch eine Differenzierung der USSC durch XXL-Medium stattfindet.

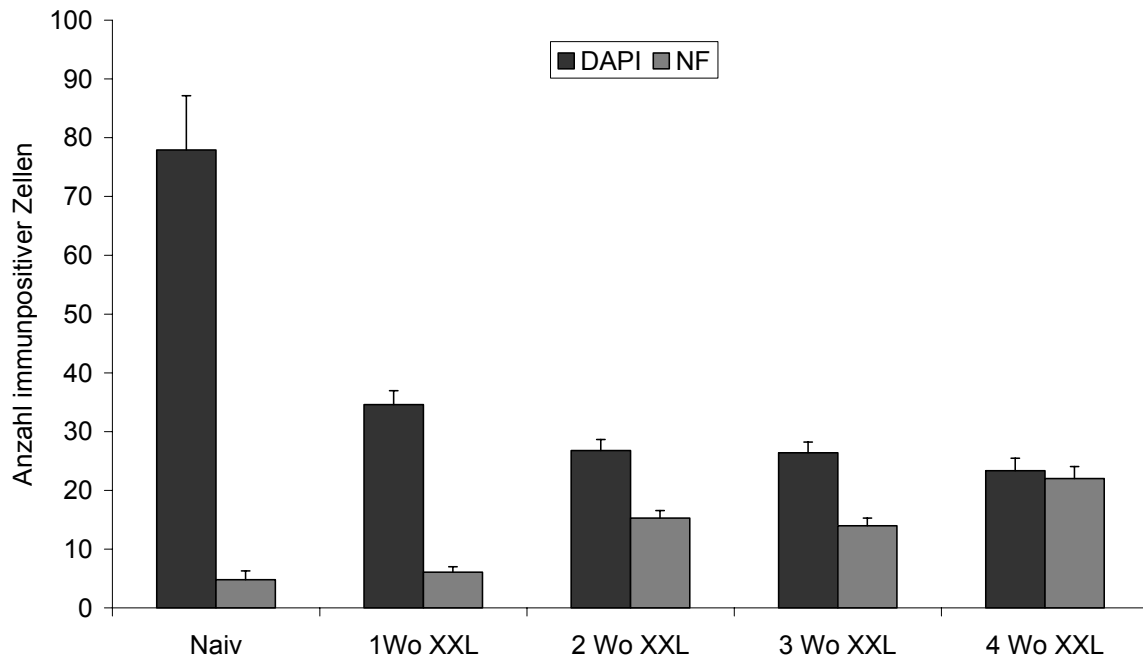


Abb. 3.7: Quantifizierung NF-immunpositiver USSC im Vergleich zur Gesamtzellmenge.

Die exemplarische Quantifizierung der immunocytochemischen NF-Färbungen mit KCB 295 zeigt die deutliche Zunahme des Anteils NF-immunpositiver Zellen. Die absolute Zellmenge nimmt während der XXL-Inkubation stetig ab, jedoch entspricht der Anteil der NF-immunpositiven naiven USSC nicht der NF-exprimierenden Population nach vier Wochen, sondern es findet zusätzlich zur Selektion der Zellen eine neuronale Differenzierung statt. Der Fehlerbalken gibt jeweils den Standardfehler an.

Des Weiteren konnte Doublecortin (DCX), ein neuronaler Progenitor-Marker (Couillard-Despres et al., 2005), sowohl in undifferenzierten als auch in XXL-differenzierten USSC beobachtet werden. Dieser Marker wurde ebenso wie NF unter naiven Bedingungen und bis zu zwei Wochen XXL-Inkubation quantifiziert. Hierbei stellte sich die Frage, ob die DCX-Expression mit zunehmender NF-Expression ebenso ansteigt, oder im Zuge der neuronalen Differenzierung der USSC herunterreguliert wird. Die Quantifizierung der DCX-Immunfärbung mit KCB 55 und SA 5 ergab in vier unabhängigen Experimenten eine signifikante Zunahme der DCX-Expression nach einer Woche XXL-Inkubation, die somit rein rechnerisch mit NF überlappen muss (Abb. 3.8). Durch diese Ergebnisse stellte sich weiterhin die Frage, inwieweit diese Co-Expression eines neuronalen Proteins wie NF und des neuronalen Progenitor-Markers DCX physiologisch ist, bzw. ob diese auch in Primärkulturen zu beobachten ist. Daher wurden primäre Cortex-Kulturen der Ratte (E16, 1 div) durch DCX- /NF-Doppelfärbung untersucht. Bei dieser Analyse ergab sich, dass auch in primären Cortex-Kulturen der Ratte NF und DCX in den selben Zellen co-exprimiert werden und somit die Differenzierung der USSC mit XXL-Medium in Bezug auf die hier analysierten Markerproteine physiologisch verläuft (Abb. 3.9).

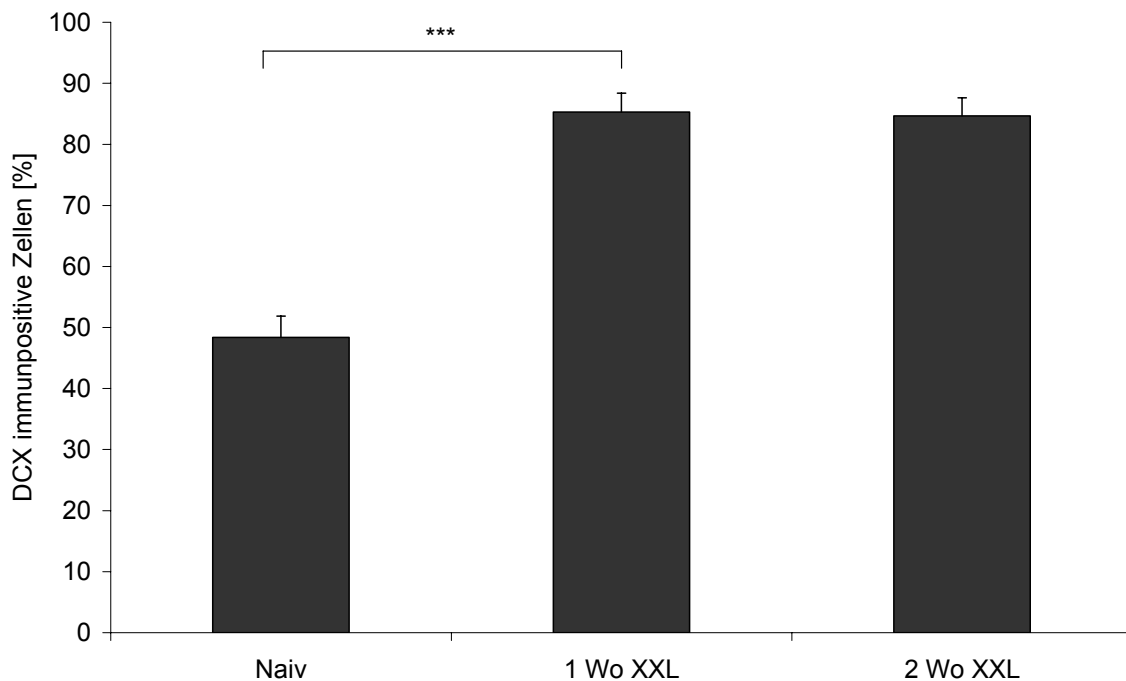


Abb. 3.8: Graphische Darstellung des Prozentsatzes DCX-immunpositiver USSC in Abhängigkeit von der XXL-Inkubationsdauer. Bereits nach einer Woche XXL-Differenzierung der USSC-Chargen KCB 55 und SA 5 ergibt sich ein signifikanter Anstieg der DCX-Expression gegenüber der naiven Bedingung. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet ($n=4$).

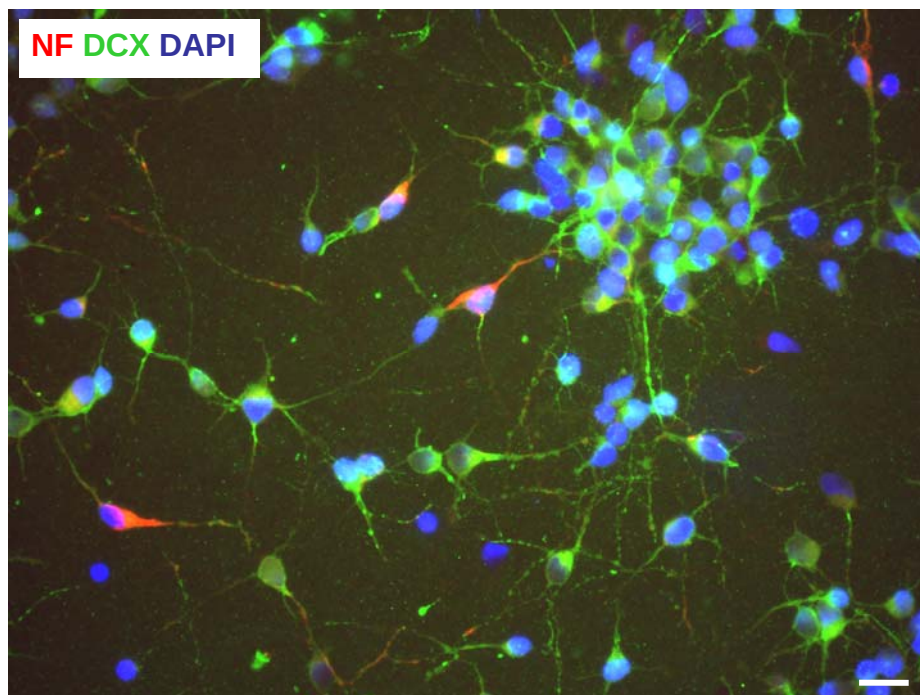


Abb. 3.9: NF- und DCX-Doppelfärbung von primären Cortex-Kulturen der Ratte (E16, 1 div). Die Abbildung zeigt die Co-Expression der beiden Markerproteine. Besonders deutlich ist die Co-Expression der Cortexneurone in dieser Färbung bei den Zellen zu erkennen, die vorwiegend im Soma NF-exprimieren (rot) und DCX-exprimierende Ausläufer aufweisen (grün). Die Zellkerne aller Zellen wurden mit DAPI markiert. Maßbalken: 20 μm .

Neben den beiden bereits erwähnten Markerproteinen DCX und NF exprimierten die USSC nach XXL-Inkubation weitere neuronale Proteine wie z.B. β -III-Tubulin, eine neuronenspezifische Isoform des Tubulins sowie Synaptophysin, einem Protein synaptischer Vesikel (Abb. 3.10). Bezogen auf die Differenzierung der USSC mittels XXL-Medium wurde die Expression der neuronalen Proteine NF und β -III-Tubulin bereits zu Anfang der Inkubation beobachtet, wohingegen die Expression des Synaptophysins immuncytochemisch erst zu späten Zeitpunkten, etwa nach vier Wochen XXL-Differenzierung, beobachtet wurde.

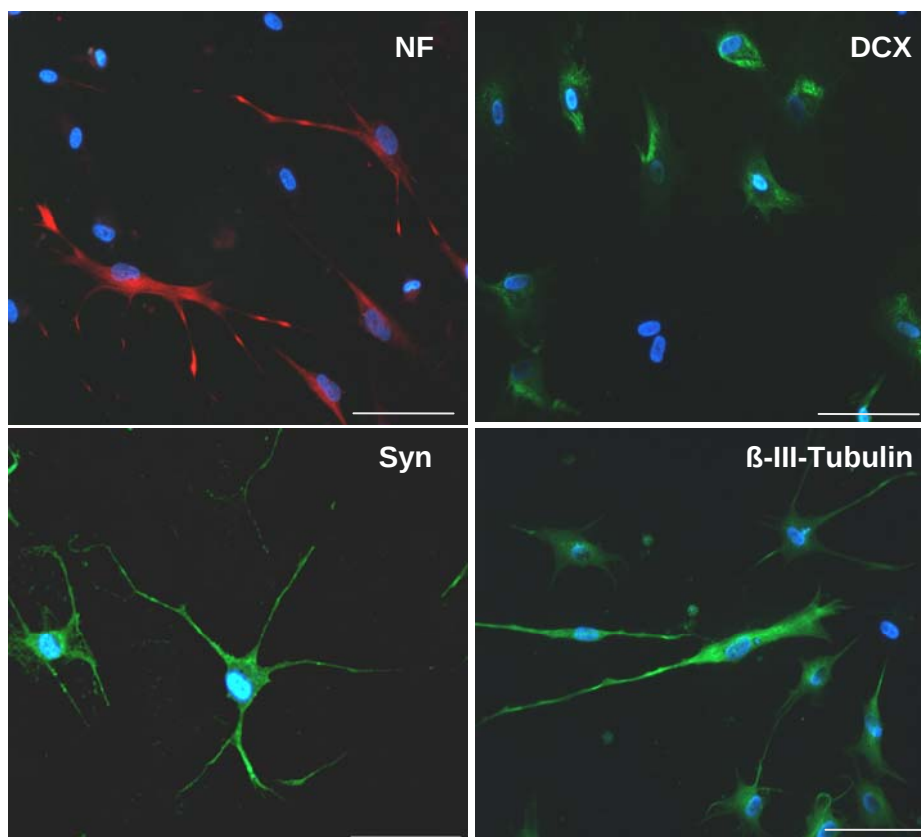


Abb. 3.10: Immuncytochemische Färbungen der neuronalen Marker. Neurofilament (NF), Doublecortin (DCX), Synaptophysin (Syn) und β -III-Tubulin werden in USSC exprimiert. Maßbalken: 100 μ m.

3.3.3 Expression glialer Proteine

Neben der neuronalen Differenzierung konnte auch die Expression des Astrozyten-Markers GFAP (gliales saures fibrilläres Protein) sowie Vimentin beobachtet werden. Bei Vimentin handelt es sich ebenfalls um ein Intermediärfilament von Gliazellen, allerdings ist dieses Protein nicht astrozytenspezifisch, sondern wird auch in einer Reihe anderer Zellen, wie z.B. in Fibroblasten, exprimiert. Die Expression beider Marker

wurde sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen beobachtet (Abb. 3.11).

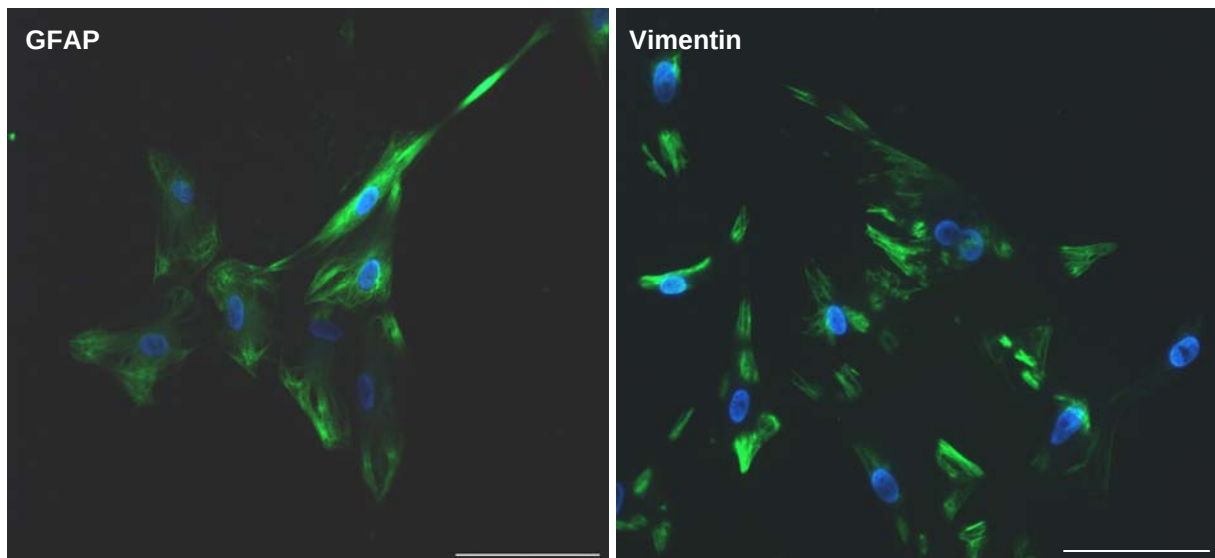


Abb. 3.11: Immuncytochemische Färbungen glialer Marker. GFAP und Vimentin werden in USSC ebenfalls exprimiert. Maßbalken: 100 μ m.

GFAP wurde transient exprimiert, mit einem Maximalanteil immunpositiver Zellen nach etwa zwei Wochen XXL-Inkubationszeit. Anschließend verringerte sich der Prozentsatz GFAP-exprimierender Zellen, bis nach vier Wochen Inkubationszeit deutlich weniger GFAP-immunpositive Zellen beobachtet werden konnten. Abb. 3.12 zeigt die Quantifizierung der GFAP-Expression in SA 33 über einen Zeitraum von vier Wochen in XXL-Medium. Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, dass sich der Anteil GFAP-immunpositiver USSC ab der dritten Woche XXL-Inkubation signifikant reduzierte.

Nach etwa zwei Wochen XXL-Inkubation wurden in Doppelfärbungen USSC beobachtet, die zeitgleich den neuronalen Marker NF zusammen mit dem Astrozytenmarker GFAP exprimierten. Während nach etwa einer Woche XXL-Inkubation der gliale Phänotyp der USSC überwog, wurde zu späteren Inkubationszeiten (z.B. nach drei Wochen) vor allem neuronale Differenzierung der USSC beobachtet. Dieser Befund der Co-Expression lässt auf eine gemeinsame Vorläuferzelle der neuronalen und glialen Subpopulation während der XXL-Inkubation der USSC schließen. Nach längeren Inkubationszeiten wurden deutlich weniger GFAP-immunpositive, wohl aber mehr NF-immunpositive USSC beobachtet. Abb. 3.13 illustriert den Zeitverlauf nach unterschiedlichen XXL-Inkubationszeiten sowie die Co-Expression der beiden Intermediärfilamente anhand einer NF/GFAP-Doppelfärbung von SA 33.

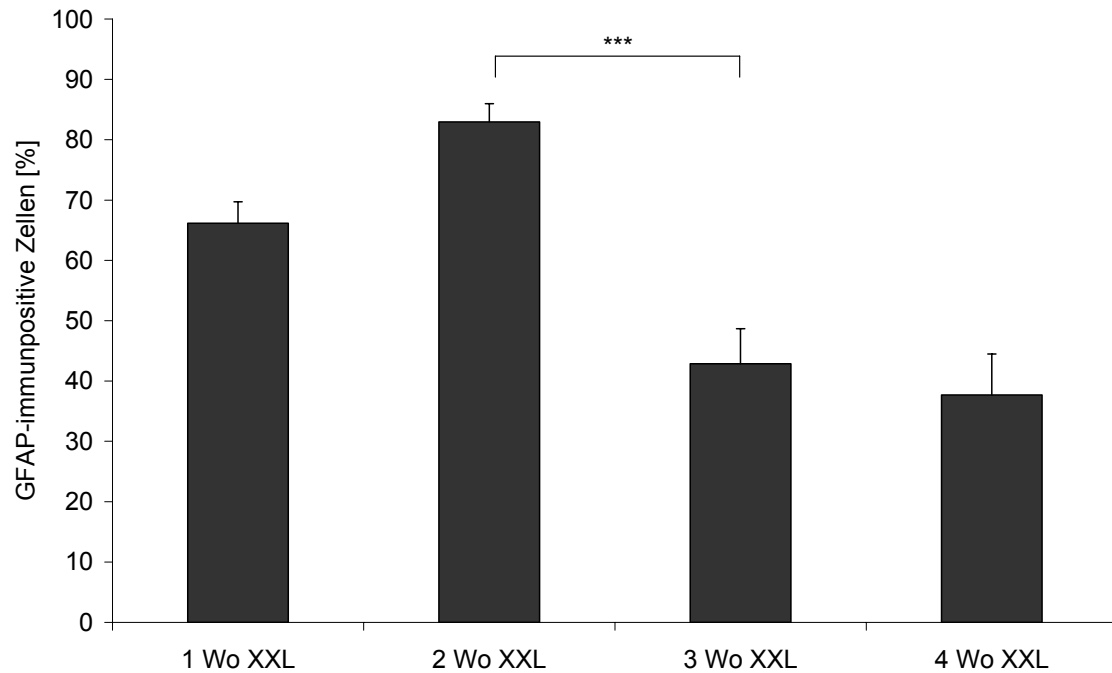


Abb. 3.12: Quantifizierung der GFAP-Expression in USSC. Repräsentativ ist die Expression von SA 33 gezeigt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an, als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet.

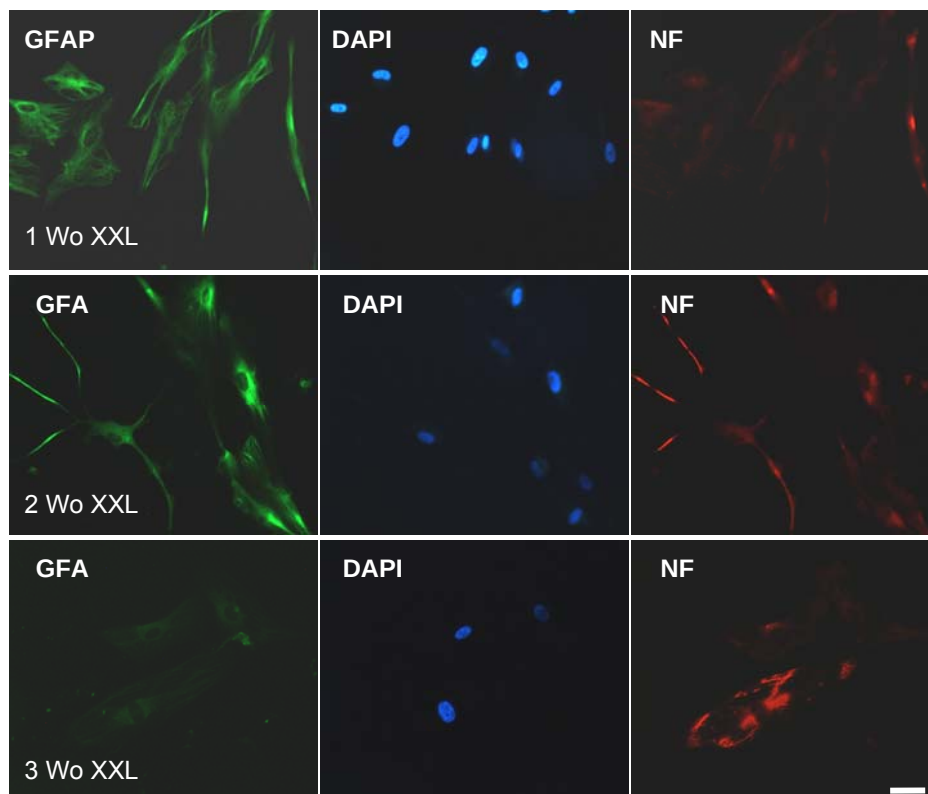


Abb. 3.13: Repräsentative immuncytochemische Anti-GFAP und Anti-NF Doppelfärbungen der USSC (SA 33). Der gliale Marker GFAP ist bereits nach einer Woche XXL-Inkubation deutlich immuncytochemisch nachweisbar. Nach zwei Wochen Inkubationsdauer kann die Co-Expression von GFAP und NF in einigen Zellen beobachtet werden, was auf eine gemeinsame Vorläuferzelle der neuronalen und glialen Population hinweist. Nach längeren Inkubationszeiten (z.B. drei Wochen) werden kaum noch GFAP-, wohl aber NF-immunpositive USSC beobachtet. Maßbalken: 100 μm .

3.3.4 Expression unterschiedlicher Transmitter-synthetisierender Enzyme

Mittels immuncytochemischer Färbungen konnten unterschiedliche Transmitter- Subtypen der USSC identifiziert werden. Neben dem Neurotransmitter GABA, der sowohl nach XXL-Inkubation als auch bereits in naiven USSC nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Expression einiger Transmitterenzyme beobachtet. Analysiert wurde die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), Dopa-Decarboxylase (DDC) und Cholin-Acetyltransferase (CAT). Während die Enzyme TH und DDC auf einen dopaminergen oder noradrenergen Transmittersubtyp hinweisen, ist CAT ein Enzym cholinergischer Neurone (Abb. 3.14).

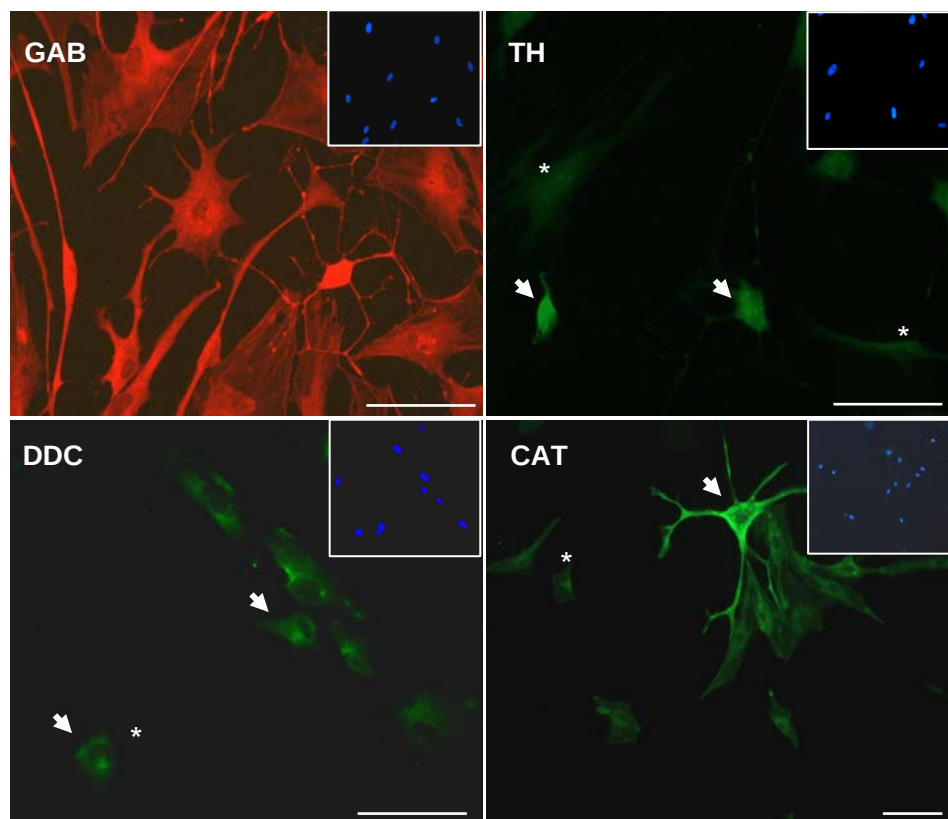


Abb. 3.14: Immuncytochemische Färbungen des Neurotransmitters GABA sowie der Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH), Dopa-Decarboxylase (DDC) und Cholin-Acetyltransferase (CAT). Nach XXL-Inkubation zeigen die immuncytochemischen Färbungen die Entwicklung unterschiedlichster Transmitter-Subtypen in USSC auf. Die jeweiligen korrespondierenden DAPI-Färbungen sind rechts oben klein dargestellt, um jeweils immunpositive und -negative USSC erkennbar zu machen. Bei den Abbildungen der TH-, DDC- und CAT-Färbung sind beispielhaft immunpositive USSC mit einem Pfeil gekennzeichnet, immunnegative mit einem Stern. Die Abbildung der GABA-Färbung zeigt ausschließlich immunpositive USSC, was dem hohen Expressionsanteil Rechnung trägt. Maßbalken: 100 μ m.

Die Quantifizierungen der einzelnen Immunfärbungen ergaben, dass der Neurotransmitter GABA über den Versuchszeitraum von vier Wochen sowie auch unter naiven Bedingungen stets auf hohem Niveau exprimiert wurde (88,6% - 98,3 %). Ab

einer Inkubationszeit von etwa drei Wochen nahm der Anteil GABA-immunpositiver USSC jedoch erstmalig von $97,4 \pm 0,6\%$ auf $88,7 \pm 2,1\%$ leicht ab (Abb. 3.15). Die Expression der Tyrosinhydroxylase erfolgte im Gegensatz zu GABA auf konstant niedrigem Niveau. Im Mittel betrug der Anteil TH-immunpositiver USSC (KCB 295 und SA 33) unter Proliferationsbedingungen sowie nach XXL-Differenzierung $12,9 \pm 1,1\%$ (Abb. 3.16). Die Transmitterenzyme CAT und DDC wurden fluktuierend exprimiert. Nach zwei Wochen XXL-Inkubation zeigte die Quantifizierung von KCB 295 und SA 33 den größten Anteil CAT-exprimierender USSC mit $90,6 \pm 2,6\%$, der sich in den darauf folgenden Wochen jedoch auf $56,4 \pm 4,7\%$ verringerte (Abb. 3.17). Die Quantifizierung von DDC ergab für die USSC-Chargen KCB 295 und SA 33 von der naiven Bedingung bis zu zwei Wochen XXL-Inkubation ebenfalls einen ansteigenden Anteil DDC-immunpositiver USSC mit einem Maximalanteil immunpositiver Zellen von $96,8 \pm 2,3\%$ nach zwei Wochen. Anschließend sank auch hier der Anteil immunpositiver USSC auf $57,2 \pm 5,2\%$ ab (Abb. 3.18).

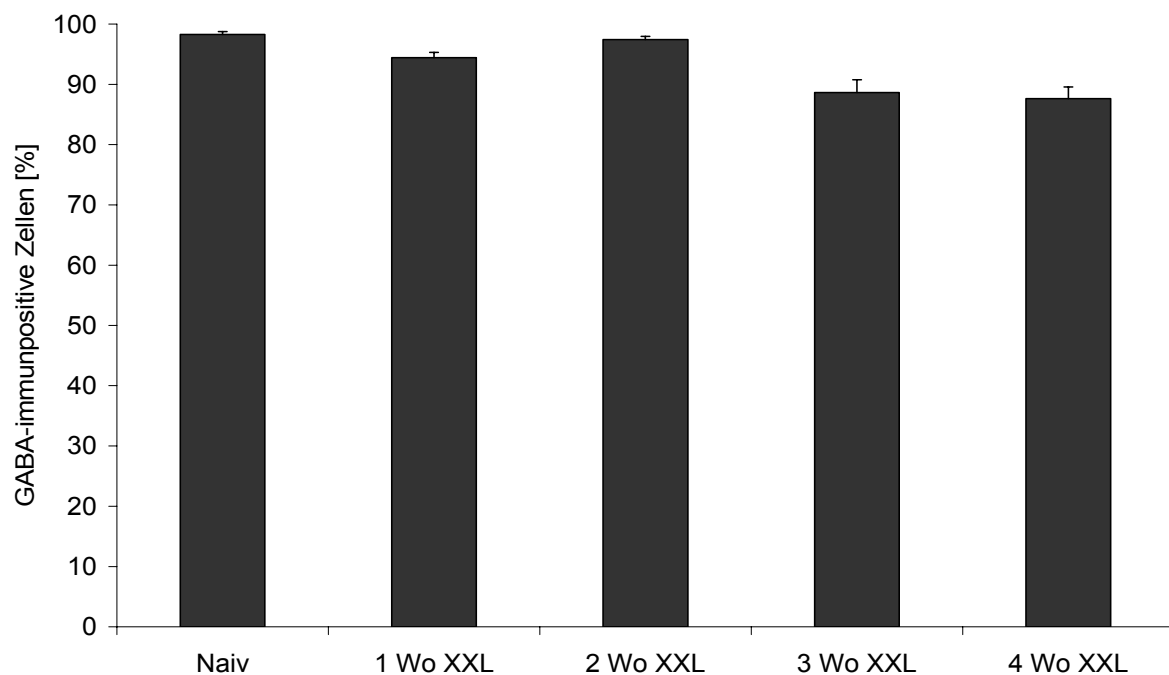


Abb. 3.15: Prozentsatz GABA-immunpositiver USSC (KCB 295 und SA 33) abhängig von der Inkubationszeit in XXL-Medium. Nach drei Wochen XXL-Differenzierung ist eine leichte Reduktion des Anteils GABA-immunpositiver USSC gegenüber zwei Wochen XXL zu beobachten. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

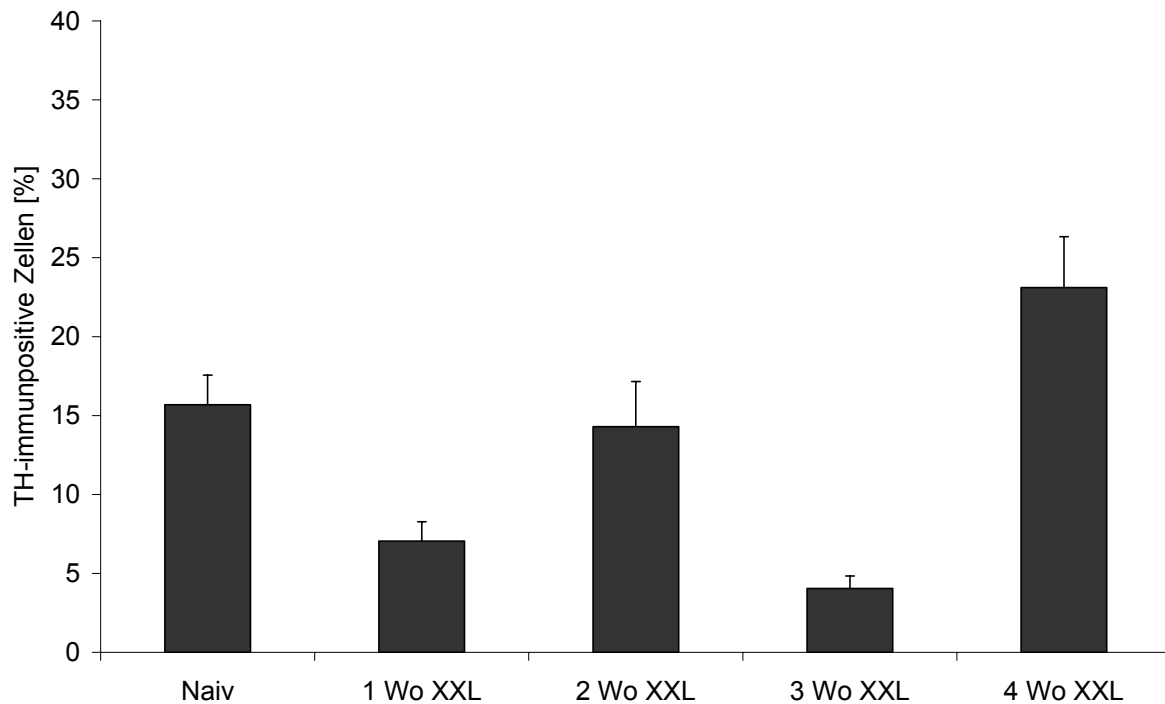


Abb. 3.16: Prozentsatz Tyrosinhydroxylase (TH)-exprimierender USSC (KCB 295 und SA 33) abhängig von der Differenzierungsdauer in XXL-Medium. Hierbei ergab sich eine TH-Expression auf durchgehend niedrigem Niveau. Über beide analysierten USSC-Chargen und alle Kultivierungsbedingungen gemittelt, ergab sich ein Expressionsanteil von $12,9 \pm 1,1\%$ TH-immunpositiver USSC. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

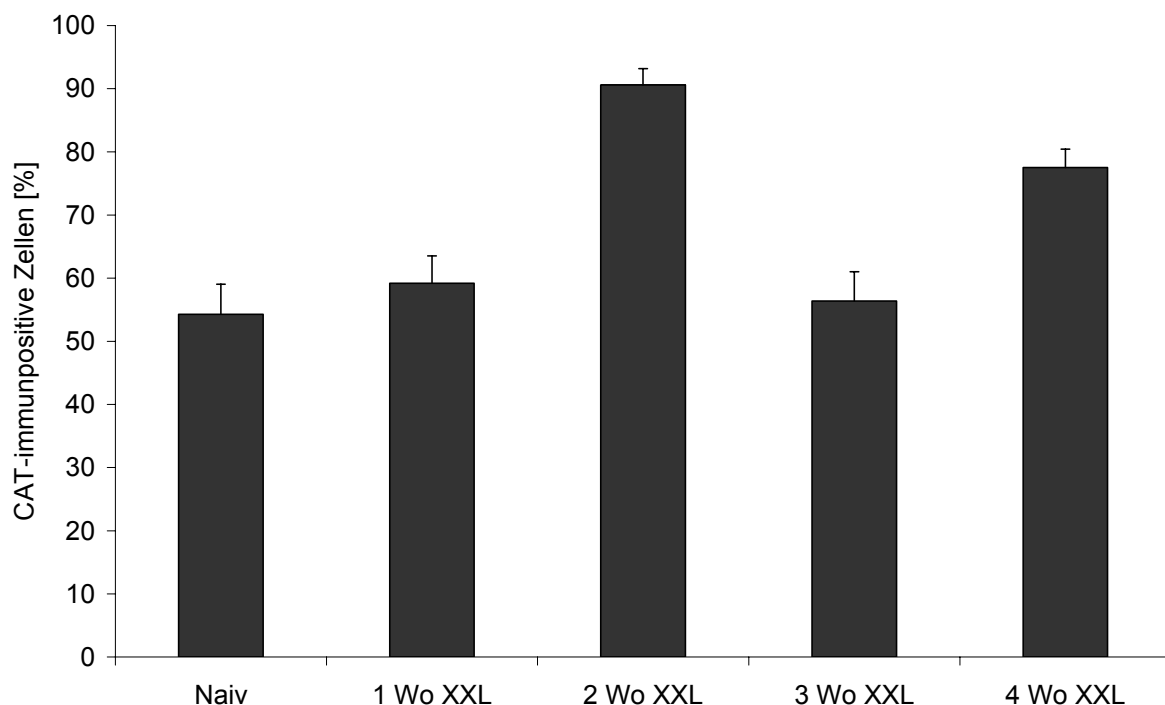


Abb. 3.17: Anteil Cholin-Acetyltransferase (CAT)-exprimierender USSC (KCB 295 und SA 33) abhängig von der Differenzierungsdauer in XXL-Medium. Hierbei ergab sich eine schwankende Expression des Enzyms, die nach etwa zwei Wochen Inkubation maximal war. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

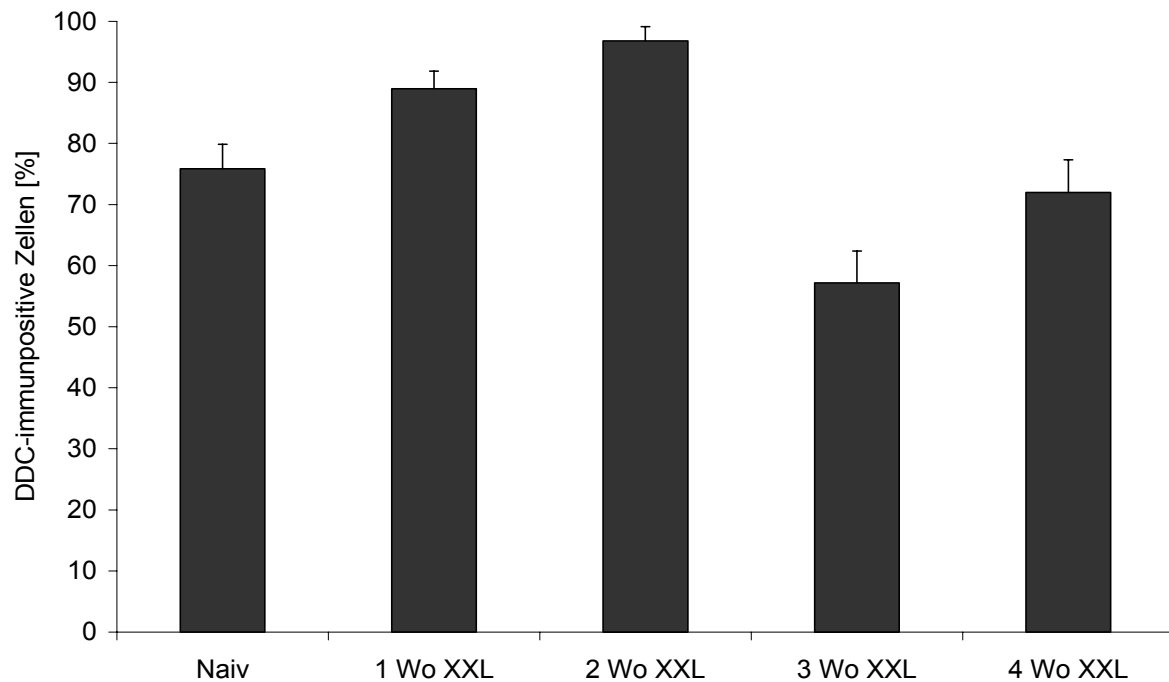


Abb. 3.18: Quantifizierung Dopa-Decarboxylase (DDC)-exprimierender USSC (KCB 295 und SA 33) abhängig von der Differenzierungsdauer in XXL-Medium. Vergleichbar zur CAT-Expression war auch hier nach zwei Wochen eine maximale Expression des Enzyms zu beobachten. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

Durch die einzelnen Quantifizierungen der immunocytochemischen Analysen der USSC unter naiven Bedingungen und nach XXL-Inkubation ergaben sich rechnerisch zwangsläufig Hinweise auf eine Co-Expression der untersuchten Proteine. Daher wurde dieser Sachverhalt in GABA/TH-, GABA/DDC- und GABA/CAT-Doppelfärbungen näher untersucht. Für die GABA/TH-Co-Expression konnte dabei folgende Kinetik beobachtet werden: Während zu Anfang der XXL-Differenzierung (bis zu zwei Wochen) in nahezu allen Zellen GABA exprimiert wurde und TH kaum detektierbar war, wurden nach zwei Wochen GABA und TH co-exprimierende Zellen beobachtet. Nach vier Wochen XXL-Differenzierung traten Zellen auf, die TH-immunopositiv waren, aber kein GABA exprimierten. Sowohl für GABA/CAT- und GABA/DDC-Färbungen ergaben sich zu jedem Zeitpunkt Zellen, die beide Marker co-exprimierten oder nur eines der beiden Proteine zeigten. Eine gerichtete Regulation dieser Transmitter-synthetisierenden Enzyme war nicht ersichtlich. In Abb. 3.19 und 3.20 sind beispielhafte GABA/TH- sowie GABA/CAT- und GABA/DDC-Färbungen abgebildet, die diese Beobachtungen verdeutlichen sollen.

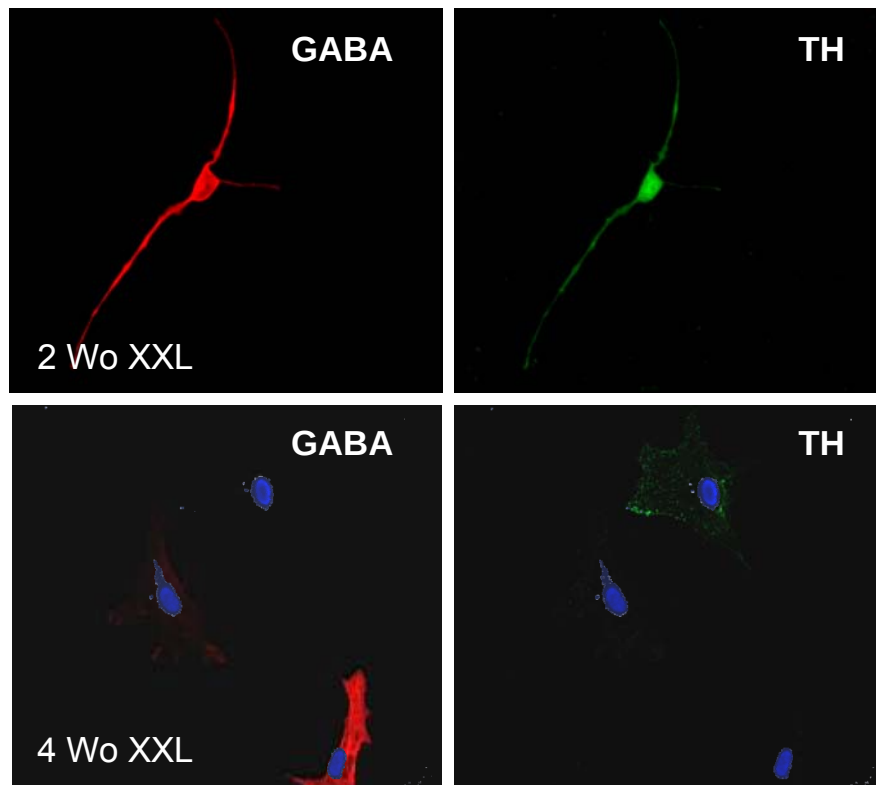


Abb. 3.19: Immunocytochemische Färbungen der USSC mit Anti-GABA und Anti-TH AK. Nach zwei Wochen in XXL wurde Co-Lokalisation dieser Marker beobachtet, nach vier Wochen konnten TH-exprimierende, aber GABA-immunnegative USSC beobachtet werden.

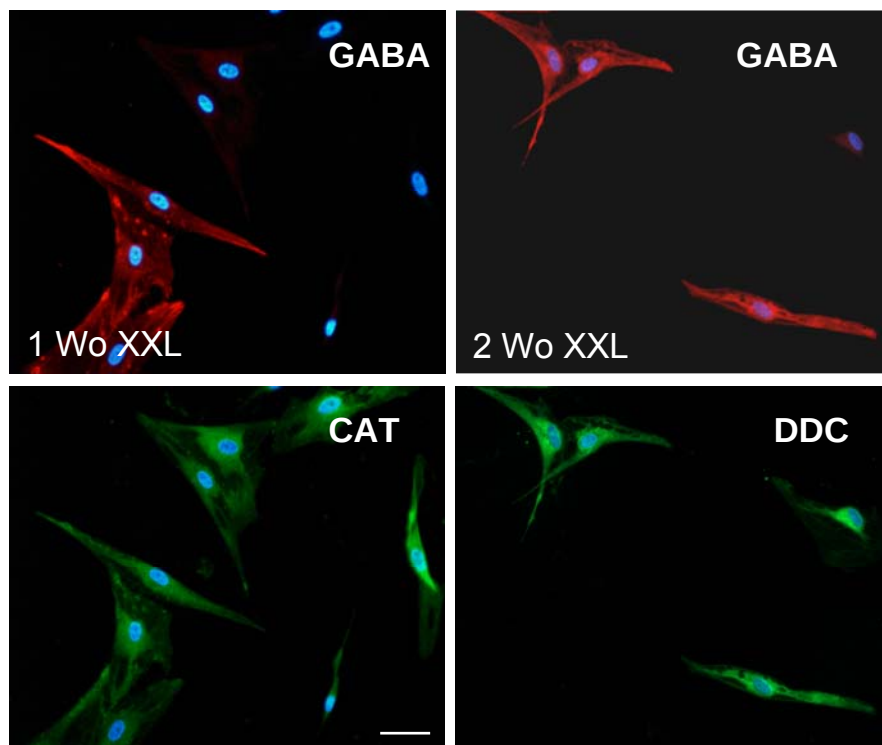


Abb. 3.20: Immunocytochemische Färbungen der USSC mit Anti-GABA und Anti-CAT sowie -DDC AK. Co-Lokalisationen sowie getrennte Expression von GABA/CAT und GABA/DDC sind nach XXL-Differenzierung bei beiden Transmitter-synthetisierenden Enzymen unabhängig von der Inkubationsdauer zu beobachten. Maßbalken: 100 μ m.

3.3.5 Immuncytochemischer Nachweis spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle

Da spannungsabhängige Na⁺-Kanäle eine essentielle Voraussetzung zur Bildung von Aktionspotentialen darstellen und somit zur Funktionalität einer erregbaren Nervenzelle beitragen, wurde der Besatz der naiven und XXL-differenzierten USSC mit spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen immuncytochemisch überprüft. Mit Hilfe eines Antikörpers konnte hierbei sowohl in naiven als auch in XXL-differenzierten USSC (vier Wochen XXL) ein Proteinabschnitt zwischen den Segmenten III und IV der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle nachgewiesen werden (Abb. 3.21)

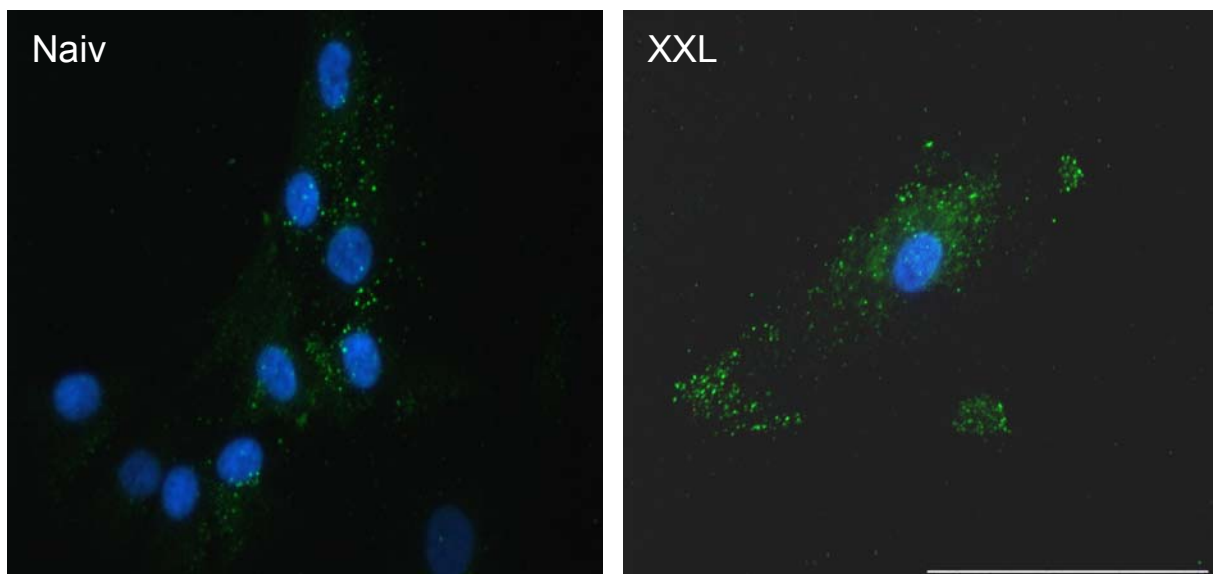


Abb. 3.21: Immuncytochemische Färbungen mit einem Anti-Na⁺-Kanalprotein AK. Immunpositive Strukturen sind sowohl in naiven Zellen als auch nach vier Wochen XXL-Differenzierung in den USSC zu beobachten. Im Gegensatz zu der eher geringen und ungeordnet wirkenden Färbung in naiven Zellen, konnten nach XXL-Differenzierung Cluster von Na⁺-Kanälen um den Kern sowie an den Fortsätzen der USSC beobachtet werden. Maßbalken: 50 µm.

3.3.6 Kontrollversuch: XXL-Inkubation von humanen Fibroblasten

Neben unterschiedlichen USSC-Chargen wurden auch humane Hautfibroblasten als Kontrollzellen mit XXL-Medium inkubiert und hinsichtlich ihrer NF-, GFAP- und GABA-Expression immuncytochemisch analysiert. Als Kontrollmarker, und um die Güte der Färbung beurteilen zu können, diente Vimentin, welches auch in Fibroblasten exprimiert wird. Während Vimentin nach XXL-Inkubation der Fibroblasten in 100% der Zellen detektiert werden konnte, ließen sich keine GFAP- oder NF-immunpositiven Zellen identifizieren. Allerdings zeigte die Anti-GABA-Färbung der Fibroblasten einen den USSC vergleichbaren hohen Anteil GABA-immunpositiver Zellen. Darüber hinaus konnte der zelltoxische Effekt des XXL-

Mediums auch bei der Fibroblasten-Kultur beobachtet werden, was deutlich macht, dass es sich bei der mittels Immuncytochemie detektierten Expression neuraler Marker nicht um ein durch Zellsterben erklärbares Artefakt handelt.

3.4 Nachweis der neuronalen Differenzierung der USSC durch quantitative PCR

Um die neuronale Differenzierung der USSC in Zellkultur durch XXL-Medium mit einer zweiten Methode zu bestätigen, wurden Zelllysate der USSC unter Wachstumsbedingungen (DMEM/30% FCS) und nach XXL-Inkubation gesammelt und hinsichtlich ihres Expressionslevels der NF- und Syn-cDNA untersucht. Die für diese Analyse verwendeten Proben und die zugehörigen Kulturbedingungen sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

Tab. 3.1 : Analysierte qPCR-Proben sowie die jeweiligen Kultivierungsbedingungen und Zellchargen

Probe	USSC	Inkubationsbedingung
1	55/18	7 d DMEM/30% FCS
2	55/18	7 d XXL
6	55/13	3 d DMEM/30% FCS
7	55/13	10 d XXL
9	55/13	3 d DMEM/30% FCS
10	55/13	10 d XXL
17	55/15	2 d DMEM/30% FCS
18	55/15	12 d XXL

Aus jeder Probe wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Expression der Gene für Neurofilament und Synaptophysin mit Hilfe der quantitativen RT-PCR analysiert. Jeweils zwei Proben wurden in einem Experiment generiert und analysiert, so dass insgesamt vier unabhängige Experimente durchgeführt wurden. Bei allen analysierten Probensätzen ergab sich hierbei eine signifikante Erhöhung der NF- und Syn-Expression. Die Expressionen wurden jeweils mit Hilfe von drei verschiedenen Referenzgenen (ODC, 18S und GAPDH) quantifiziert. Somit konnte zusätzlich zur immuncytochemischen Analyse der USSC durch eine unabhängige Methode die neuronale Differenzierung der USSC mittels XXL-Medium gezeigt werden. In Abb. 3.22 sind repräsentativ die NF-

und Syn-Expressionen der Proben 9 und 10, bezogen auf die GAPDH-Expression, abgebildet.

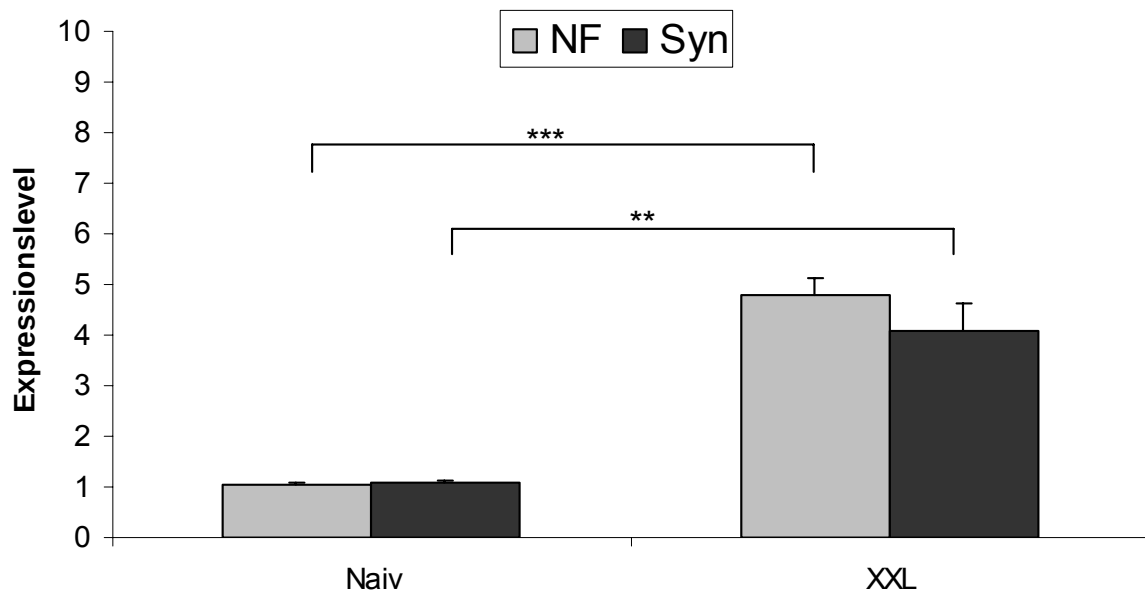


Abb. 3.22: Induktion der NF- und Syn-cDNA nach Inkubation der USSC in XXL-Medium im Vergleich zur Naiv-Bedingung. Das Diagramm stellt repräsentativ den Expressionslevel der Proben 9 und 10 dar, Referenzgen war GAPDH. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet, wobei $p < 0,01$ als hochsignifikant (**) und $p < 0,001$ (***) als extrem hochsignifikant gewertet wurde.

3.5 Effekte der Einzelkomponenten des XXL-Mediums auf Zellmenge und Differenzierung

Alle dem XXL-Medium zugesetzten Komponenten wurden bezüglich ihres Einflusses auf die USSC analysiert. Hierbei wurde jeweils eine Komponente des XXL-Mediums weggelassen (NXL-Medium). Durch Wechsel des Grundmediums von DMEM/30% FCS auf N2-Medium wurde außerdem der Einfluss des FCS auf die Entwicklung der USSC analysiert. Hierbei ergab sich, dass durch Inkubation der Zellen in NXL-Medium, unabhängig davon welche Faktoren zugesetzt wurden, weniger USSC neuronal differenziert werden konnten als im kompletten XXL-Medium. Dies zeigt den wesentlichen Anteil des FCS am Differenzierungserfolg. Nach Inkubation in NXL-Medium ohne den Zusatz von db-cAMP oder IBMX blieben die USSC undifferenziert, sowohl morphologisch als auch immunocytochemisch bezüglich der NF-Expression, was den großen Einfluss der intrazellulären cAMP-Erhöhung auf die Differenzierung deutlich macht. Die Inkubation der USSC im NXL-Medium ohne Retinsäure (RA)-Zusatz zeigte zwar eine morphologisch neuronal differenziert wirkende Kultur, dieser Eindruck konnte jedoch immunocytochemisch nicht bestätigt werden, da im Vergleich

zu einer in XXL-inkubierten Kultur lediglich ein geringer Teil der Zellen NF-immunpositiv war. Nach Quantifizierung der Zellzahlen unter den einzelnen Kulturbedingungen konnten die Substanzen cAMP, IBMX und RA als diejenigen identifiziert werden, die neben der Differenzierung auch zur Verringerung der Zellzahl führten und daher in den zugesetzten Konzentrationen zumindest für eine Subpopulation der USSC zelltoxisch war. Während NXL jeweils ohne cAMP-, IBMX- oder RA-Zusatz gegenüber der Kulturbedingung mit allen Komponenten zu einer erhöhten Zellanzahl führte, wurde ohne die Wachstumsfaktoren bFGF und NGF erhöhter Zelltod und somit eine verringerte Zellanzahl beobachtet. Beide Wachstumsfaktoren wirken daher unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen zellprotektiv (Abb. 3.23).

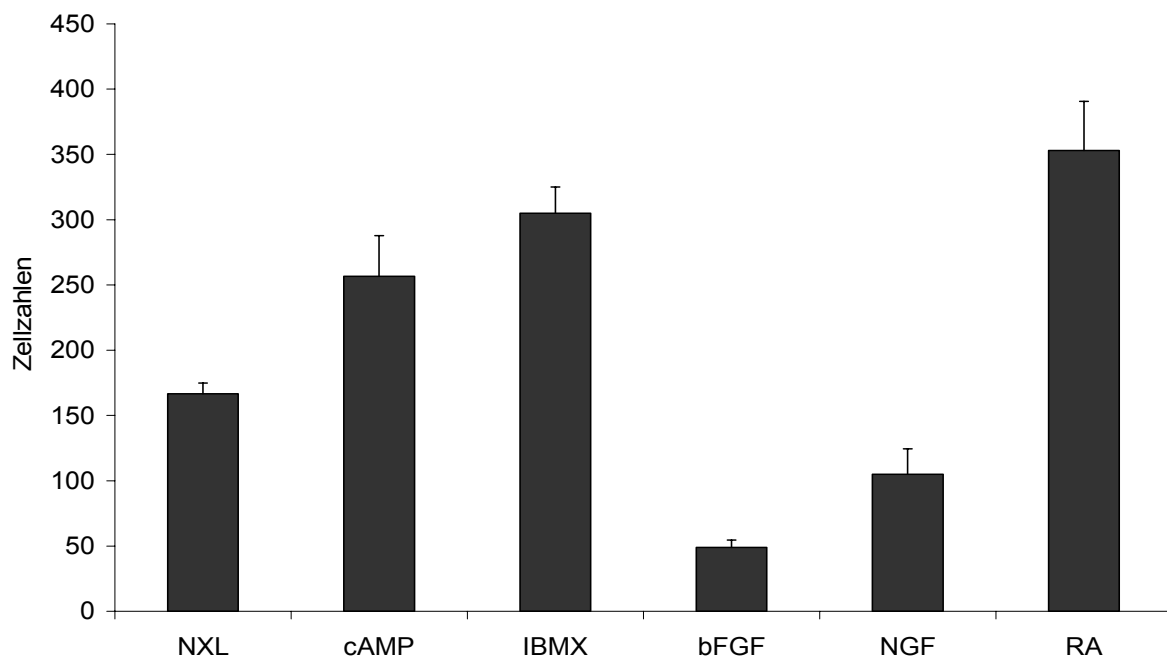


Abb. 3.23: Mittelwerte der unter den verschiedenen Kulturbedingungen bestimmten Zellzahlen pro mikroskopischem Gesichtsfeld. NXL: Alle XXL-Medium-Komponenten (cAMP, IBMX, RA, bFGF und NGF) in N2 als Basismedium. cAMP: NXL ohne cAMP. IBMX: NXL ohne IBMX. bFGF: NXL ohne bFGF. NGF: NXL ohne NGF. RA: NXL ohne RA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (n=3)

3.6 Reversible Induktion des dopaminergen Phänotyps durch DA-Medium

Nach Inkubation der USSC in XXL-Medium konnte nur ein geringer Prozentsatz TH-immunpositiver Zellen nachgewiesen werden. Um diesen Anteil in Kultur zu erhöhen, wurden die USSC nach vorausgegangener XXL-Inkubation zusätzlich mit DA-Medium versetzt. Dieses Medium wurde bereits erfolgreich zur Induktion des dopaminergen Phänotyps bei embryonalen, striatalen Mauszellen und NT2-Zellen verwendet (Stull und Iacovitti, 2001). Die Inkubationsdauer des DA-Mediums wurde al-

lerdings zeitlich limitiert, da mit zunehmender Inkubationsdauer eine Reduktion der Zellzahl, bezogen auf die XXL-Bedingung, zu beobachten war (Abb. 3.24).

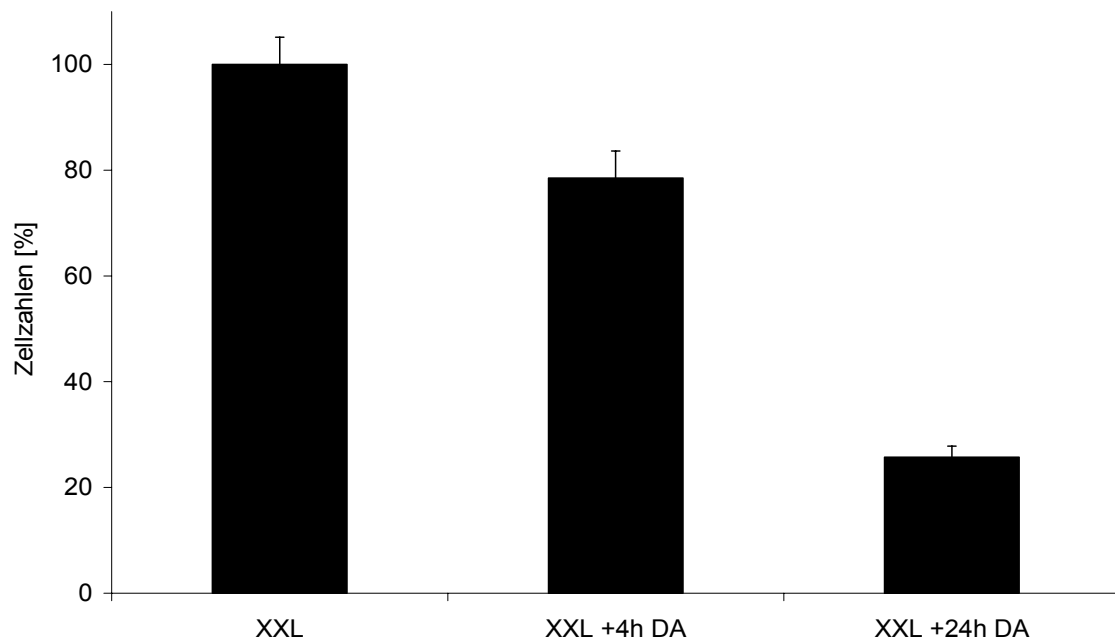


Abb. 3.24: Zellzahlen der einzelnen Kulturbedingungen bzw. Inkubationszeiten bezogen auf die XXL-Bedingung. Sichtbar ist der zelltoxische Effekt des DA-Mediums, der mit steigender Inkubationszeit zunimmt. Der Fehlerbalken gibt jeweils den Standardfehler an.

Um den Effekt des DA-Mediums auf den Anteil TH-immunpositiver USSC zu quantifizieren, wurden drei unabhängige Experimente (TH1, 2, 3) mit unterschiedlichen KCB 55 Passagen und XXL-Inkubationszeiten durchgeführt. Die Chargennummer und XXL-Differenzierungszeit der jeweiligen Zellen bzw. des jeweiligen Experiments sind in Tab. 3.2 aufgelistet:

Tab.: 3.2 Für die TH-Experimente verwendeten USSC-Chargen und deren Vorinkubationsdauer in XXL-Medium

Experiment	Zellen	XXL-Inkubationszeit
TH1	55/9	14 d
TH2	55/18	11 d
TH3	55/14	14 d

Bei allen drei Experimenten wurden die Zellen nach Inkubation im XXL-Medium zusätzlich für 4 oder 24 Stunden mit DA-Medium induziert. Die immuncytochemische Analyse aller drei Versuche anhand einer TH-Färbung zeigte eine deutliche Erhöhung des Anteils TH-immunpositiver USSC nach 4 h und 24 h DA-Inkubation gegenüber der XXL-differenzierten Kultur (Abb. 3.25).

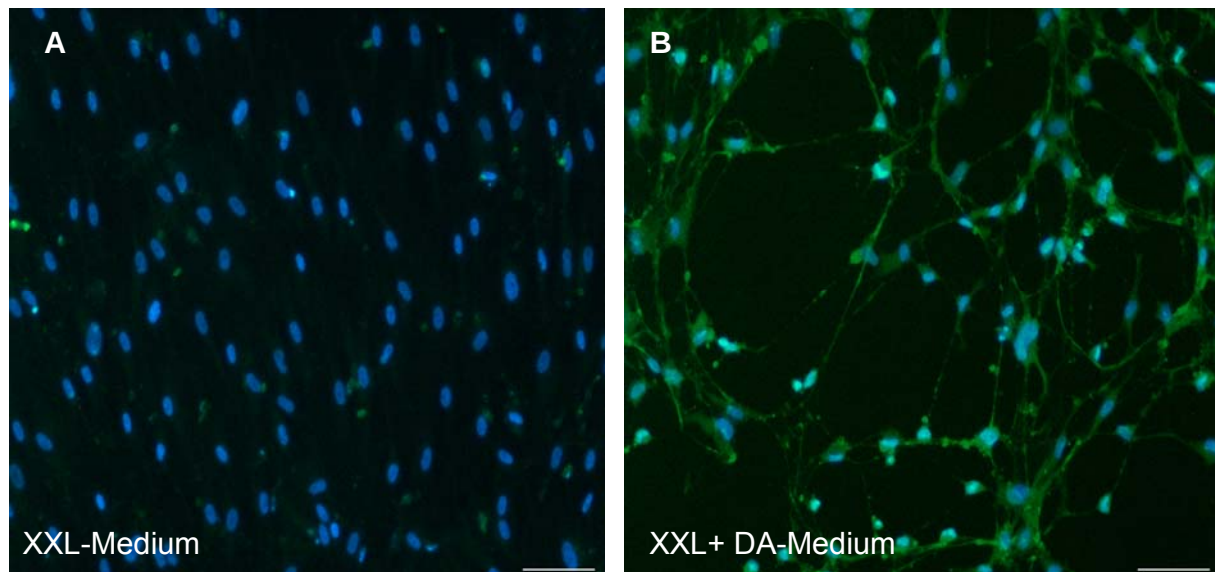


Abb. 3.25: Anti-TH-Färbung einer XXL-Medium-inkubierten Kultur (A) im Vergleich zu einer korrespondierenden Kultur, die die letzten 4 h in DA-Medium inkubiert wurde (B). Die TH-Färbungen zeigen deutlich die Induktion der TH-Immunreaktivität nach DA-Medium-Inkubation. Maßbalken: 100 μ m.

Nach 4 h DA-Medium-Inkubation ergab die Quantifizierung der TH-Immunfärbungen einen hochsignifikanten Anstieg des Prozentsatzes TH-exprimierender USSC gegenüber der XXL-Bedingungen. Nach 24 h DA-Medium war in allen drei Versuchen der Anteil TH-exprimierender Zellen nicht signifikant höher als nach 4 h. Nach erneuter Inkubation der Zellen in DMEM/30% FCS (Proliferations-Bedingung) nach Inkubation in DA-Medium erfolgte ein deutlicher Rückgang des Anteils TH-exprimierender USSC. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass durch die hier gewählten Versuchsbedingungen die Induktion des dopaminergen Phänotyps nur reversibel erreicht werden kann (Abb. 3.26). Vergleicht man den Prozentsatz TH-immunpositiver USSC nach Entzug des DA-Mediums in DMEM/30% FCS mit dem im Rahmen der TH-Quantifizierung unter Naiv-Bedingungen exprimierten Anteil, so sind diese vergleichbar. Der Prozentsatz TH-immunpositiver Zellen bei den jeweiligen Kulturbedingungen ist in Abb. 3.26 beispielhaft anhand von TH2 dargestellt.

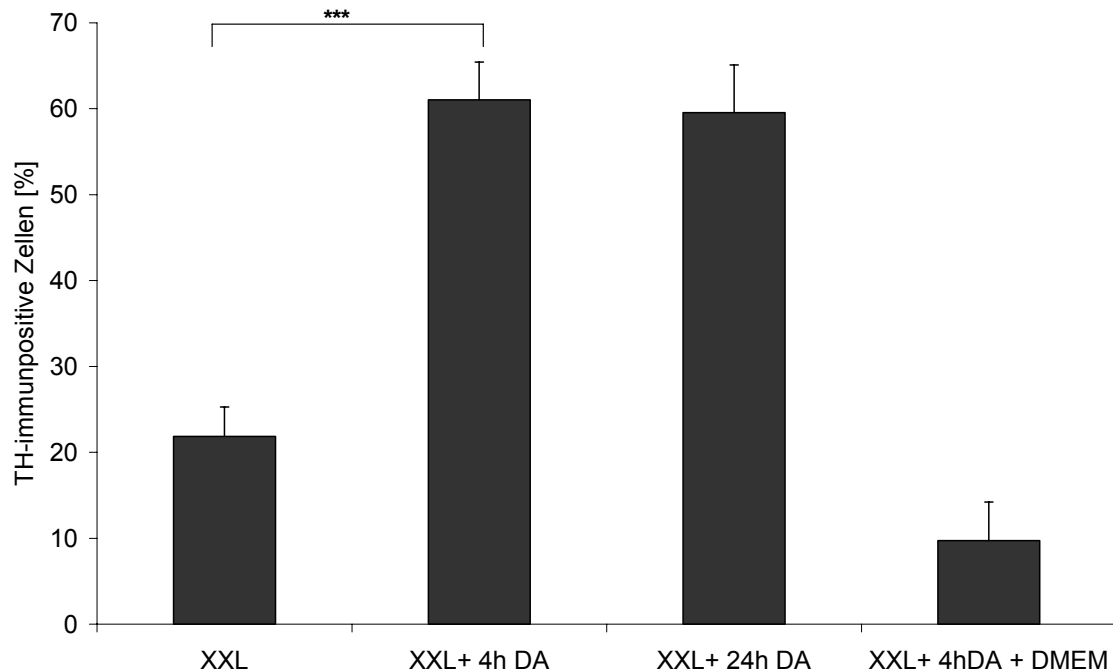


Abb. 3.26: Grafische Darstellung des Prozentsatzes TH-immunpositiver Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. Der Fehlerbalken gibt jeweils den Standardfehler an. Als extrem hochsignifikant wurde $p < 0,001$ (***) gewertet. ($n=3$)

Neben der Bestimmung des Anteils TH-immunpositiver USSC wurde anhand der GABA-Färbung zusätzlich die Morphologie der Zellen beurteilt. Nach Inkubation in DA-Medium wurde in allen drei Experimenten eine auffällige Abrundung der Zellso-mata beobachtet, die ebenfalls quantifiziert wurde. Darüber hinaus wurde eine Ver-änderung der Kernmorphologie beobachtet. Anhand der DAPI-Zellkernfärbung wur-den alle Kerne gezählt, die deutlich von der normalerweise zu beobachtenden ovalen Kernform abwichen. Neben einem kleinen Anteil fragmentierter Kerne wurden unre-gelmäßig gefaltete Kerne beobachtet (Abb. 3.27).

Die Auszählung der runden Somata pro Gesichtsfeld und die der veränderten Kerne ergaben hierbei einen ähnlichen Verlauf wie die der TH-Quantifizierung (Tab. 3.3). Bei allen drei Experimenten (TH1, 2, 3) konnte beobachtet werden, dass der Einfluss des DA-Mediums auf die TH-Expression, die Morphologie der Somata und auf die Faltungen der Zellkerne nach 4 h DA-Medium-Inkubation reversibel war. Die graphi-sche Darstellung der tabellarischen Daten verdeutlicht die parallele Regulation aller drei quantifizierten Effekte nochmals (Abb. 3.28).

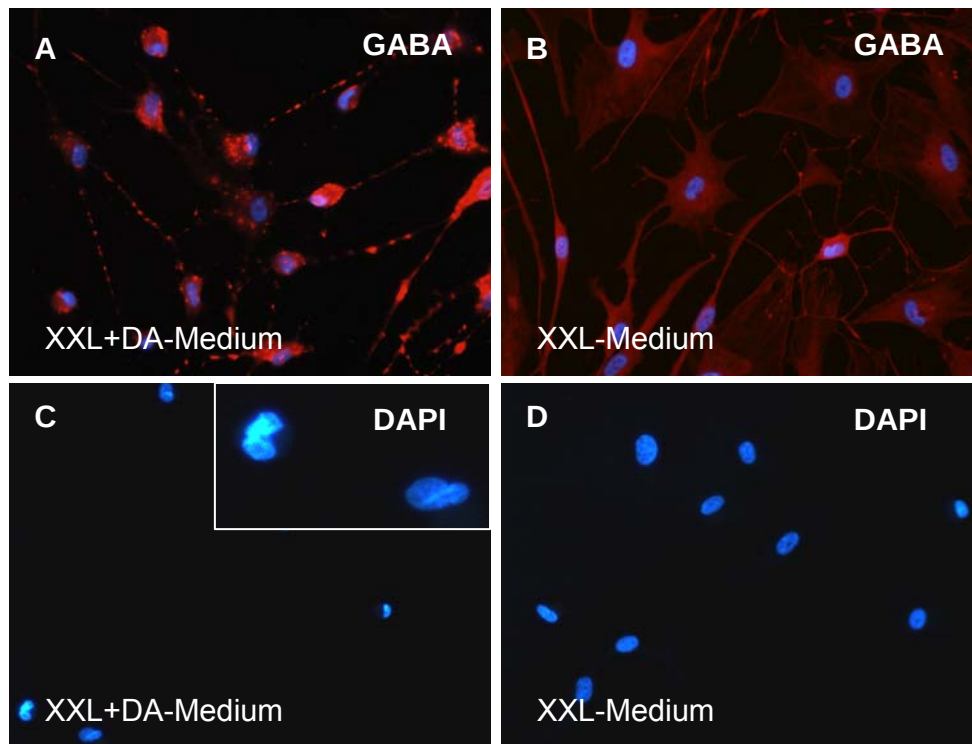


Abb. 3.27: Morphologische Veränderungen der USSC nach DA-Medium-Inkubation. Die Abbildung zeigt Beispiele abgerundeter Somata (A) nach 4 h DA-Medium im Vergleich zur XXL-Bedingung (B), die anhand der GABA-Immunfärbung ausgewertet wurden. Die DAPI-Zellkernfärbung der USSC zeigt die Veränderungen der Kernmorphologie nach Inkubation in DA-Medium (C) im Vergleich zur Inkubation in XXL-Medium (D).

Tab. 3.3: Jeweilige Prozentsätze TH-immunpositiver USSC, abgerundeter Somata und veränderter Kerne in Abhängigkeit von der Kulturbedingung [%].

Experiment	XXL	XXL⇌4hDA	XXL⇌24hDA	XXL⇌4hDA⇌DMEM
TH1 Soma	2,9	28,5	43,0	0
TH2 Soma	1,4	53,5	38,0	0
TH3 Soma	1,4	39,3	16,2	0,8
TH1 Kern	8,3	45,7	66,1	7,9
TH2 Kern	7,4	42,0	63,6	8,6
TH3 Kern	4,6	27,4	30,1	3,3

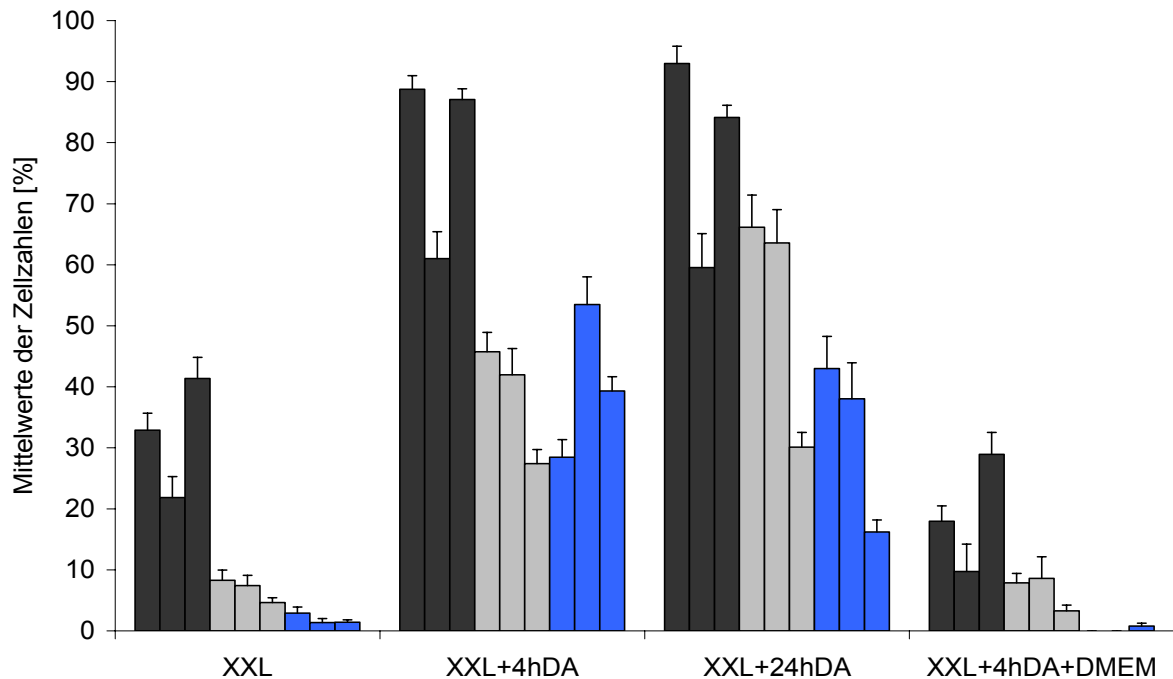


Abb. 3.28: Die Darstellung der Ergebnisse aller drei Experimente (TH1, 2, 3) in einem Diagramm verdeutlicht die parallele Regulation aller drei Ereignisse. Die Schwarzen Balken zeigen den Prozentsatz TH-immunpositiver Zellen, die grauen den Anteil der Zellen mit abgerundetem Soma und die blauen Balken den Anteil der veränderten Zellkerne unter den verschiedenen Kulturbedingungen. Der Fehlerbalken gibt jeweils den Standardfehler an. (n=3)

Da die Überlebensfähigkeit dopaminerger, TH-exprimierender Zellen aus bisher noch unbekannten Gründen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als sehr begrenzt angesehen wird, wurde überprüft, ob nach Induktion mit DA-Medium im Vergleich zur XXL-Bedingung vermehrt apoptotische USSC zu beobachten sind (Lindvall et al., 2004; Liste et al., 2004). Dazu wurde jeweils die Hälfte einer XXL-differenzierten Kultur (SA 5/14) entweder über Nacht mit DA-Medium inkubiert oder auf XXL-Medium belassen. Bei beiden Teilen wurde anschließend der Prozentsatz apoptotischer Zellen bestimmt. Hierbei ergab sich, dass der Anteil apoptotischer Zellen im zusätzlich mit DA-Medium inkubierten Teil der Kultur gegenüber der XXL-Kultur signifikant erhöht war (Abb. 3.29). Dennoch war der Anteil apoptotischer USSC nach DA-Medium-Inkubation deutlich kleiner als der Anteil der jeweiligen in Tab. 3.3 dargestellten Effekte. Statistisch konnten die letztgenannten Effekte nicht auf apoptotische Zellen mit Zytoplasmakondensationen oder Kernfragmentierungen zurückgeführt werden.

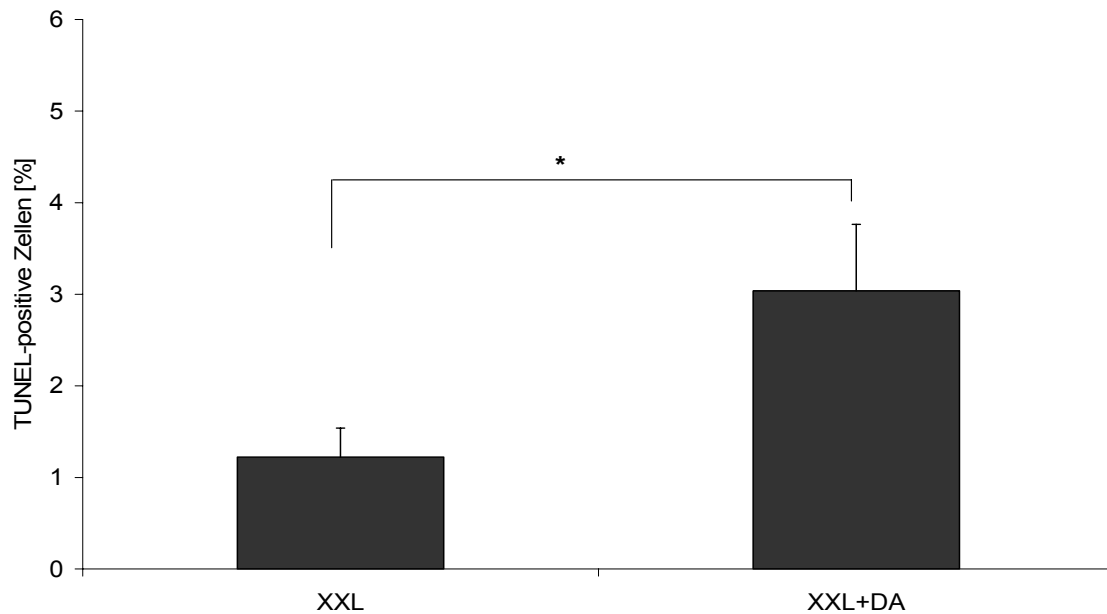


Abb. 3.29: Immunocytochemisch bestimmter Anteil apoptotischer USSC unter XXL- oder XXL+DA-Bedingung. Der Fehlerbalken gibt jeweils den Standardfehler an. Als signifikant wurde hierbei $p < 0,05$ (*) gewertet. (n=3)

Um auszuschließen, dass es sich bei den USSC, die durch DA-Medium eine Abrundung des Somas bzw. gefaltete Kerne zeigten, nicht um apoptotische Zellen handelt, wurden zusätzlich Fluoreszenzaufnahmen der TUNEL-Färbung und Hellfeldaufnahmen desselben mikroskopischen Gesichtsfeldes aufgenommen. Beim Vergleich der Aufnahmen ergab sich, dass keine der USSC mit abgerundetem Soma oder gefalteten Kernen apoptotisch war (Abb. 3.30). Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass die beobachteten Effekte nach Inkubation mit DA-Medium nicht auf apoptotische USSC zurückzuführen sind.

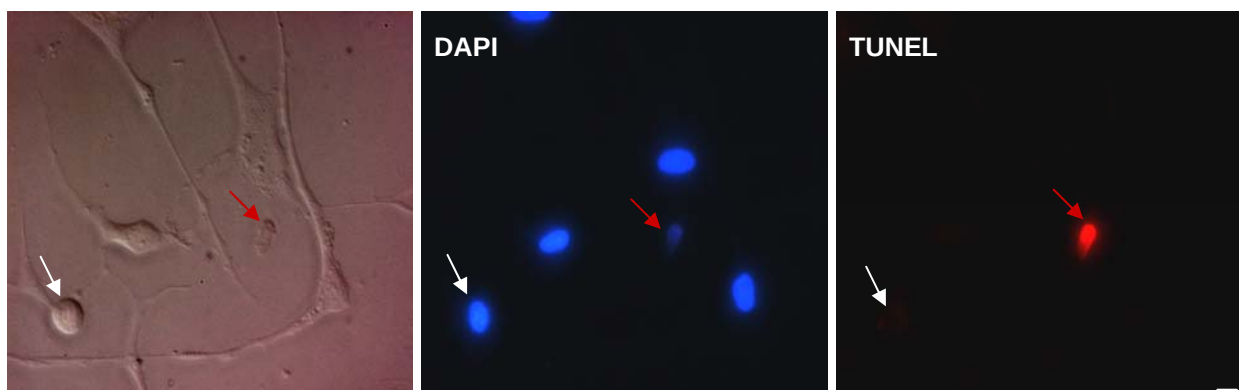


Abb. 3.30: Die repräsentative Aufnahme einer DA+XXL-Medium-inkubierten USSC-Kultur zeigt, dass die Zelle mit abgerundetem Soma (weißer Pfeil) nicht apoptotisch ist, wohl aber die mit rotem Pfeil markierte Zelle, die diese Morphologie nicht aufweist. Darüber hinaus zeigt die apoptotische USSC keinen gefalteten Kern, sondern die für apoptotische Zellen typische Kernpyknose. Maßbalken: 10µm.

Da Dopamin aufgrund seines Potentials zur Radikalbildung für seine Zelltoxizität bekannt ist, wurden USSC-Kulturen nach XXL-Vorinduktion anstelle des DA-Mediums auch mit demselben Medium ohne Dopamin-Zusatz (A-Medium) inkubiert (Liste et al., 2004). Darüber hinaus sollte durch diese Experimente überprüft werden, ob Dopamin die zur TH-Induktion der USSC führende Schlüsselsubstanz im DA-Medium darstellt. Die Bestimmung der jeweiligen Zellzahlen unter DA- und A-Medium nach 4 h Inkubation ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied. Somit konnte gezeigt werden, dass Dopamin nicht zur Reduktion der Zellzahl im DA-Medium gegenüber der XXL-Bedingung führt. Durch die Inkubation der USSC in Dopamin-freiem A-Medium wurde ebenfalls die Induktion der TH-Expression, eine Abrundung der Somata sowie Kerneinfaltungen beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass Dopamin nicht der entscheidende TH-induzierende Faktor des DA-Mediums ist.

Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde darüber hinaus der Expressionslevel der neuronalen Proteine NF-M und Synaptophysin (Syn) nach Inkubation in DA-Medium im Vergleich zur alleinigen XXL-Medium-Inkubation analysiert. In Tab. 3.4 sind die USSC bzw. deren Kultivierungsbedingungen, die in vier unabhängigen Experimenten analysiert wurden und in diese Auswertung eingegangen sind, aufgelistet:

Tab. 3.4: USSC-Chargen und Kulturbedingungen der Proben, die mittels quantitativen PCR analysiert wurden.

Probe	USSC	Inkubationsbedingung
2	55/18	7 d XXL
3	55/18	7 d XXL+ 14 h DA
7	55/13	10 d XXL
8	55/13	10 d XXL+ 4 h DA
10	55/13	10 d XXL
11	55/13	10 d XXL+ 4 h DA
18	55/15	12 d XXL
19	55/15	12 d XXL+ 15 h DA

Aus jeder Probe wurde jeweils die total-RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Die mittels quantitativer PCR analysierten Probensätze ergaben alle vier eine signifikante Erhöhung der NF- und Syn-Expression nach zusätzlicher DA-Medium-Inkubation im Vergleich zur alleinigen XXL-Medium-Bedingung. Somit konnte neben der Erhöhung des Prozentsatzes TH-immunpositiver USSC durch DA-Medium auch

die Induktion der neuronalen Marker NF und Syn auf cDNA-Ebene gezeigt werden. Die Expression wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Referenzgenen (ODC, 18S und GAPDH) quantifiziert. In Abb. 3.31 ist beispielhaft die NF- und Syn-Expression der Proben 10 und 11 bezogen auf GAPDH dargestellt.

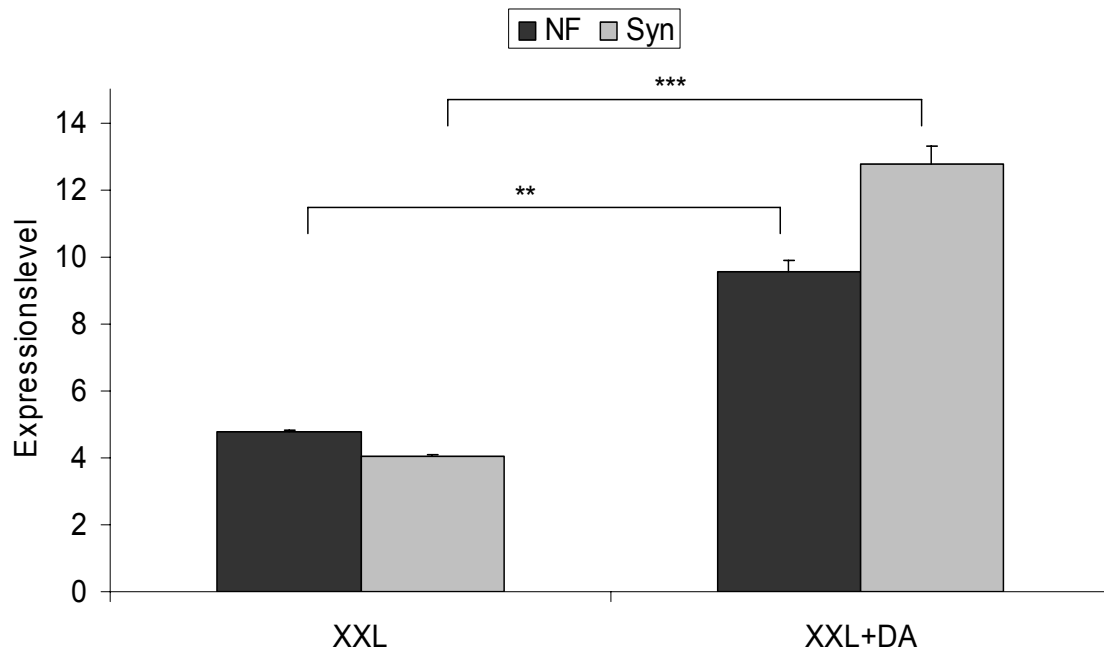


Abb. 3.31: Induktion der NF- und Syn-cDNA nach Inkubation der USSC in XXL-Medium versus XXL+DA-Medium. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Expressionslevel der Proben 10 und 11, als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet, wobei $p < 0,01$ (**) als hochsignifikant und $p < 0,001$ (***) als extrem hochsignifikant gewertet wurde.

Bei der Expressionsanalyse der dopaminergen Marker TH und des Dopamintransporters (DAT) konnte unter keiner der analysierten Kulturbedingungen die Expression eines dopaminergen Markers detektiert werden. Um die Zuverlässigkeit der verwendeten Assays zu überprüfen, wurde Kontroll-cDNA aus fötalem und adultem menschlichen Gehirn analysiert. In diesem Fall konnte jedoch die Expression der beiden dopaminergen Gene detektiert werden.

3.7 Funktionalitätstest der USSC mit Hilfe der Patch-clamp Technik

Um die Funktionsfähigkeit der mit Hilfe der Immuncytochemie identifizierten spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle zu überprüfen, wurden sowohl naive als auch XXL-differenzierte USSC mit Hilfe der Patch-clamp Technik abgeleitet. Im Labor von Frau Dr. K. Schnizler, Zentrale Forschung Physik der Bayer AG (Bayer Technologie Services) wurden die in Tab. 3.5 aufgelisteten Zellen gemessen:

Tab. 3.5 zeigt die mit Hilfe der Patch-clamp Technik abgeleiteten USSC bzw. deren Kulturbedingungen

Zellen	Kulturbedingung	Experimente
KCB 55/12	DMEM/30% FCS	n=3
SA 20/6	DMEM/30% FCS	n=3
KCB 55/15	30 d XXL	n=4
KCB 55/15	20 d XXL	n=5
SA 20/7	21 d XXL	n=3
SA 20/7	26 d XXL	n=7
SA 20/6	32 d XXL	n=1

Bei diesen Messungen konnten in den naiven USSC durch positiver werdende Klemmspannungen (ca. -30 mV), also bei Depolarisierung der Zellen, schnell aktivierende Ströme beobachtet werden (n=3). Der Maximalstrom betrug bei +10 mV etwa 783 pA. Bei anschließend weiter positiver werdender Klemmspannung sowie bei negativen Potentialen verringerte sich der Membranstrom jedoch. Repräsentative Messspuren einer USSC-Ableitung sind in Abb. 3.32 A dargestellt. Das mit Hilfe der Strom-Spannungskurve graphisch ermittelte Umkehrpotential, also das Membranpotential, bei dem kein Strom fließt, betrug für diese Ströme etwa 70 mV (Abb. 3.32 B). Berechnungen des Umkehrpotentials verschiedener Ionen unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Hilfe der Nernst-Gleichung ließen auf einen Na^+ -getragenen Strom schließen (s. Material und Methoden). Darüber hinaus weist die oben geschilderte Kinetik des Kanals ebenfalls auf einen spannungsabhängigen Na^+ -Kanal hin. Die beobachteten Ströme konnten darüber hinaus in allen Fällen mit 1 μM TTX, einem Inhibitor spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, reversibel geblockt werden. In Tab. 3.6 sind die jeweiligen Membranpotentiale und abgeleiteten Membranströme pro Spannungspuls einer repräsentativen Messung aufgetragen:

Tab. 3.6 zeigt die Membranströme beim jeweils angelegten Membranpotential einer repräsentativen USSC-Ableitung

Membranpotential [mV]	Membranstrom [pA]
-130.0	-146
-110.0	-93
-90.0	-64
-70.0	-56
-50.0	-72
-30.0	-92
-10.0	-622
10.0	-783
30.0	-554
50.0	-378
70.0	524

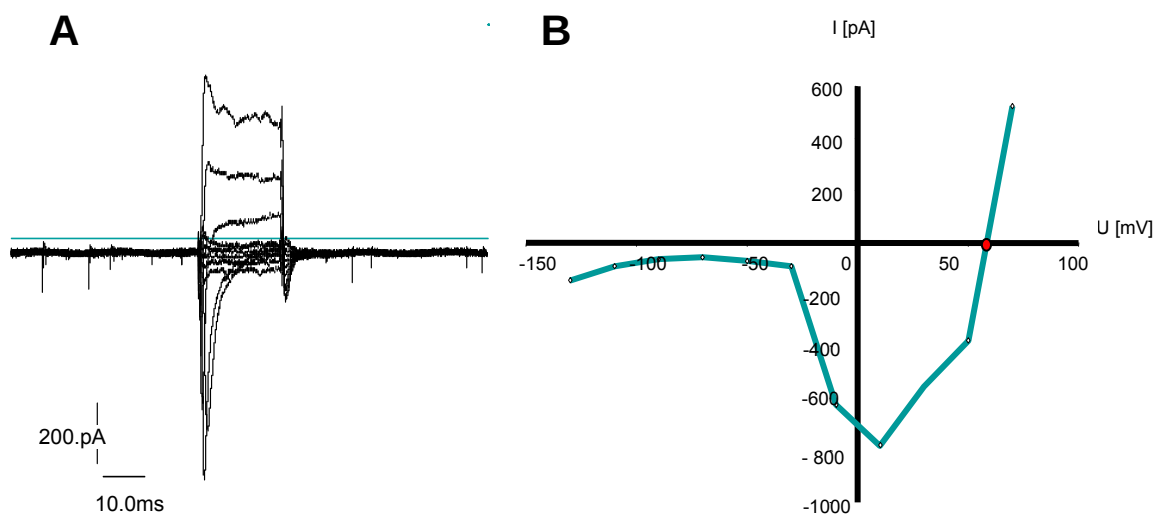


Abb. 3.32: Repräsentative Ableitung einer naiven USSC. (A) zeigt die übereinander gelegten Messspuren der gemessenen Ionenströme bei den unterschiedlichen Spannungspulsen (s. Material und Methoden). Die Messspuren zeigen die schnell aktivierende und inaktivierende Kinetik des Kanals, die auf einen spannungsabhängigen Na^+ -Kanal hinweist. (B) zeigt die Abhängigkeit des Membranstromverlaufs vom Membranpotential. Die Strom/Spannungskurve ergibt das Umkehrpotential des fließenden Ions im Schnittpunkt mit der X-Achse und bestätigt, dass es sich hierbei um einen Natriumstrom handelt.

Unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen konnten jedoch in undifferenzierten SA 20/6 sowie in allen differenzierten USSC keine spannungsabhängigen Na^+ -Ströme gemessen werden.

3.8 Funktionalitätstest der USSC durch HPLC-Analyse

Um die Fähigkeit der USSC zur Dopaminfreisetzung zu untersuchen, wurden Zellüberstände im Institut für Physiologische Psychologie der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf von Frau Dr. Angelica de Souza-Silva (Arbeitsgruppe Prof. Huston) mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysiert. Die USSC wurden für diese Experimente auf 6-well Zellkulturplatten kultiviert und differenziert, um eine möglichst große Zellmenge mit möglichst wenig Medium (1ml pro Well) versetzen zu können und damit die Konzentration des potentiell ausgeschütteten Dopamins im Medienüberstand zu erhöhen. Um sicherzustellen, dass die Differenzierung der USSC auf beschichteten Plastikzellkulturplatten (s. Material und Methoden) genauso erreicht werden kann wie auf beschichteten Glas-CS, wurde dies zunächst in Vorversuchen getestet.

Jede untersuchte Zellprobe wurde zuerst mit reinem DMEM und anschließend mit 56 mM KCl in DMEM versetzt, so dass sowohl spontan freigesetztes (a-Probe) als auch durch KCl-Depolarisierung (b-Probe) ausgeschüttetes Dopamin nachgewiesen werden konnte. Bei jedem Versuch wurden humane Fibroblasten als Kontrollzellen mitgeführt. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass das im DA-Medium bereits enthaltene Dopamin entfernt und nicht durch die HPLC-Analyse des Überstandes nachgewiesen wurde. Die HPLC-Analytik ergab, dass neben Dopamin auch der Hauptmetabolit des Dopamins, DOPAC, in den Proben nachweisbar war. Die Dopaminmengen wurden in [pg] pro [ml] gemessen. Mit Hilfe einer anschließend durchgeführten Proteinbestimmung wurde der Proteingehalt pro Probe bestimmt und so die gemessenen Dopaminmengen mit der jeweiligen Zellmenge korreliert. In Tab. 3.7 sind die USSC und ihre jeweiligen Kulturbedingungen aufgelistet, die in die HPLC-Auswertung dieser Arbeit eingegangen sind. Markiert wurden diejenigen USSC, in deren Medienüberständen Dopamin nachgewiesen werden konnte:

Tab. 3.7 zeigt die in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangenen HPLC-Proben bzw. deren Zellchargen und Kulturbedingungen.

Experiment 1	Zellen	Kulturmedium
Probe		
1	KCB 55/15	DMEM/30% FCS
1b	KCB 55/15	DMEM/30% FCS
2	KCB 55/15	10 d XXL

2b	KCB 55/15	10 d XXL
3	KCB 55/15	10 d XXL+DA
3b	KCB 55/15	10 d XXL+DA
Experiment 2		
4	KCB 55/13	10 d XXL
4b	KCB 55/13	10 d XXL
7	KCB 55/13	10 d XXL+ DA
7b	KCB 55/13	10 d XXL+ DA
Experiment 3		
2	SA 5/6	DMEM/30% FCS
2b	SA 5/6	DMEM/30% FCS
10	SA 5/5	11 d XXL
10b	SA 5/5	11 d XXL
9	SA 5/5	11 d XXL+DA
9b	SA 5/5	11 d XXL+DA
14	SA 5/6	5 d XXL
14b	SA 5/6	5 d XXL
13	SA 5/6	5 d XXL+DA
13b	SA 5/6	5 d XXL+DA
Experiment 4		
14	SA 5/8	DMEM/30% FCS
14b	SA 5/8	DMEM/30% FCS
2	SA 5/8	7 d XXL
2b	SA 5/8	7 d XXL
1	SA 5/8	7 d XXL+DA
1b	SA 5/8	7 d XXL+DA
10	SA 5/8	7 d XXL
10b	SA 5/8	7 d XXL
9	SA 5/8	7 d XXL+DA
9b	SA 5/8	7 d XXL+DA
Experiment 5		
6	SA 5/13	DMEM/30% FCS
6b	SA 5/13	DMEM/30% FCS

2	SA 5/10	14 d XXL
2b	SA 5/10	14 d XXL
1	SA 5/10	14 d XXL+DA
1b	SA 5/10	14 d XXL+DA
10	SA 5/10	14 d XXL
10b	SA 5/10	14 d XXL
9	SA 5/10	14 d XXL+DA
9b	SA 5/10	14 d XXL+DA
Experiment 6		
6	SA 5/14	DMEM/30% FCS
6b	SA 5/14	DMEM/30% FCS
10	SA 5/13	7 d XXL
10b	SA 5/13	7 d XXL
9	SA 5/13	7 d XXL+DA
9b	SA 5/13	7 d XXL+DA
Experiment 7		
12	KCB 55/12	DMEM/30% FCS
12b	KCB 55/12	DMEM/30% FCS
6	KCB 55/10	13 d XXL
6b	KCB 55/10	13 d XXL
5	KCB 55/10	13 d XXL+DA
5b	KCB 55/10	13 d XXL+DA

Hierbei ergibt sich, dass in 19 von den 26 untersuchten USSC bzw. Kulturbedingungen (s.o.) Dopamin mittels HPLC-Analyse in den Kulturüberständen detektiert werden konnte. Das entspricht 73% der Messungen. Beschränkt man sich auf die unter Differenzierungsbedingungen kultivierten USSC, so wurden 20 verschiedene Proben analysiert und in 14 Überständen Dopamin nachgewiesen. Hier beträgt der Prozentsatz Dopamin-ausschüttender USSC somit 70%.

Durch HPLC-Analyse konnte darüber hinaus in 60% der Proben nach XXL+DA-Inkubation mehr Dopamin im Medienüberstand gemessen werden als in der jeweiligen korrelierenden Probe der XXL-Bedingung. Bezieht man jedoch auch die Proben der USSC mit ein, die unter Proliferationsbedingungen kultiviert wurden, ergibt sich, dass in 66% der Messungen in Proben der Naiv-Bedingung mehr Dopamin gemes-

sen wurde als in einer oder beiden korrelierenden Differenzierungsbedingungen (XXL und/oder XXL+DA). Darüber hinaus konnte Dopamin sowohl nach Inkubation in DMEM (a-Probe) als auch in DMEM/ 56 mM KCl (b-Probe) detektiert werden.

Die Ergebnisse der HPLC-Analysen deutlich, dass USSC in der Lage sind, Dopamin zu synthetisieren und dieses auch auszuschütten.

3.9 Etablierung der Nachweismethoden zur USSC-Identifizierung *in vivo*

In Hinblick auf durchzuführende Implantationsexperimente wurde nach einem möglichst einfachen Markierungsverfahren gesucht. In dieser Arbeit wurden die USSC mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 oder mit Eisenpartikeln (USPIO) in Zellkultur markiert oder jedoch immunhistochemisch identifiziert. Voraussetzung für das Markierungsverfahren waren neben der einfachen Handhabung die Stabilität der Markierung sowie die Tatsache, dass endogene Eigenschaften der USSC, wie z.B. deren Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit, nicht beeinflusst werden. Für die immunhistochemische Identifizierung war zuerst in Zellkultur sicherzustellen, dass das Antigen in möglichst allen USSC zu finden ist, eine einfache Korrelation zwischen Signalzahl und Zellzahl bietet, humanspezifisch ist und bei eventuell stattfindender Differenzierung der USSC *in vivo* nachweisbar bleibt.

3.9.1 Zellkulturexperimente mit PKH26-markierten USSC

Die Markierung der USSC mit PKH26 (Abb. 3.33) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um zu testen, ob das Differenzierungsverhalten der Zellen durch die PKH26-Markierung verändert wurde, wurden die USSC anschließend mit XXL-Medium differenziert und ihre neuronale Differenzierungsfähigkeit anhand von NF-Färbungen überprüft. In Abb. 3.34 sind PKH26-markierte USSC in Kultur abgebildet, die die Heterogenität dieser Zellmarkierungsmethode deutlich machen.

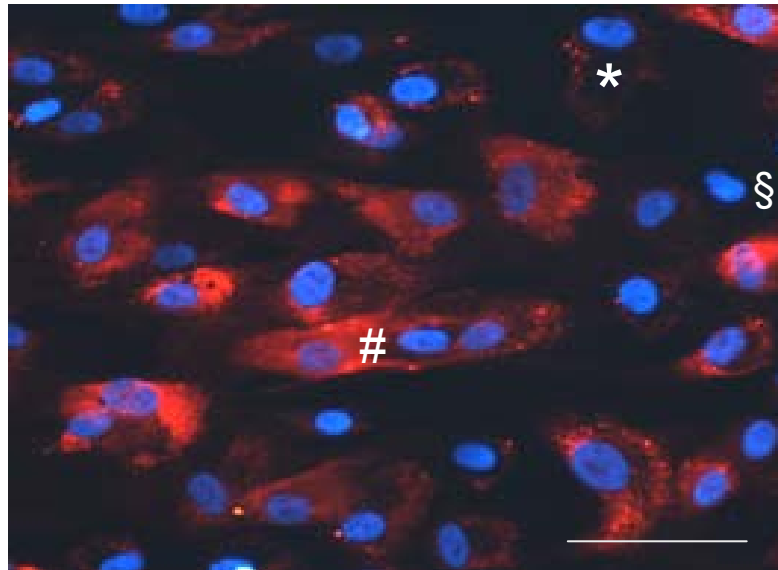


Abb. 3.33: PKH26-markierte USSC in Zellkultur. Zu beachten ist die unterschiedliche Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes: Während in einigen Zellen eine eher punktförmige Markierung (*) der USSC zu erkennen war, zeigte sich in anderen Zellen eine gleichmäßige Anfärbung (#). Einige USSC blieben nach der Markierungsprozedur gänzlich unmarkiert (§). Maßbalken: 100 μ m

Um sicherzustellen, dass PKH26-markierte USSC ebenfalls durch XXL-Medium differenziert werden können und so gegenüber den unmarkierten USSC vergleichbare Eigenschaften aufweisen, wurden immunocytochemische NF-Färbungen durchgeführt. Abb. 3.34 zeigt eine PKH26-markierte NF-exprimierende USSC, die somit die Vergleichbarkeit der unmarkierten und PKH26-markierten Population zeigte.

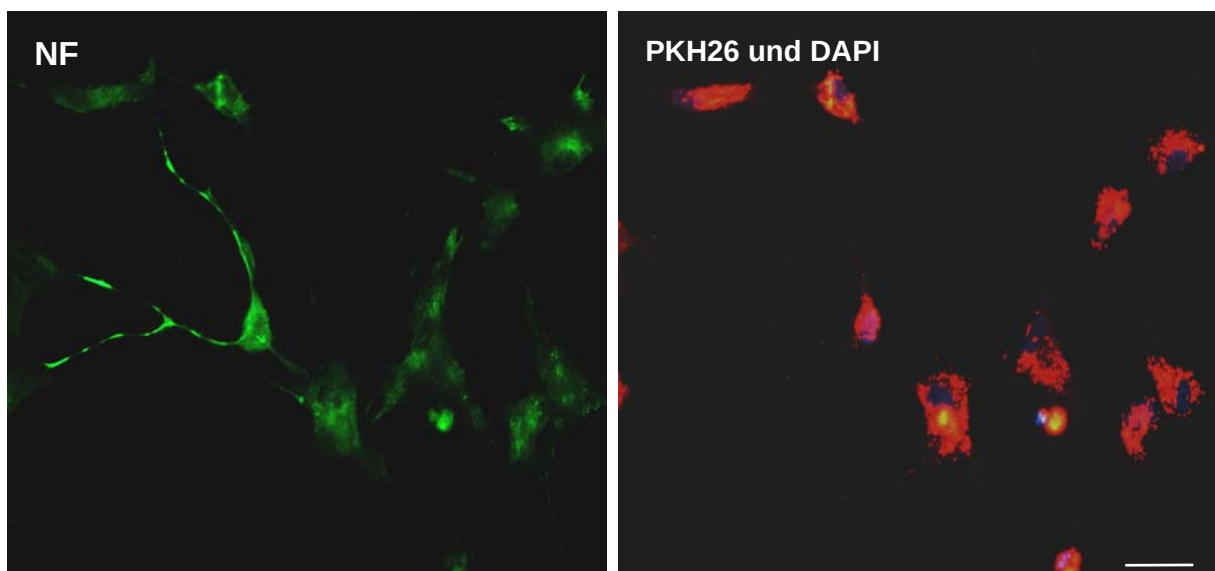


Abb. 3.34: NF-Färbung einer PKH26-markierten XXL-differenzierten USSC-Kultur. Maßbalken: 100 μ m

Um in einem Vorversuch die Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes in den USSC zu untersuchen, wurden diese zusammen mit primären Rattenastrozyten als Co-Kultur im Proliferationsmedium (DMEM/FCS) ausgesät. Anhand von DAPI-Zellkern- und GFAP-Färbungen der Co-Kultur wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt, inwieweit die DAPI-gefärbten Zellkerne den USSC bzw. den Rattenastrozyten zuzuordnen sind (Abb. 3.35). Bei Austreten des Markierungsfarbstoffes PKH26 sollte dieser mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops außerhalb der Zellen im Kulturmedium sichtbar sein. Wenn davon ausgegangen würde, dass Rattenastrozyten in der Lage wären, ausgetretenes PKH26 aufzunehmen, wären Zellen zu identifizieren, die im Fluoreszenzmikroskop sowohl rot als auch aufgrund der Immunfärbung grün erscheinen würden. Die Auswertung der Färbungen ergab Bereiche, in denen die PKH26-Markierung der USSC und die GFAP-Färbung der Astrozyten gut zu unterscheiden waren. Jedoch existierten auch Bereiche, in denen die Zuordnung eines Zellkerns (DAPI-Färbung) zu einer USSC oder einem Rattenastrozyt nicht zweifelsfrei gelang. In keinem Fall konnte jedoch eine deckungsgleiche Färbung des PKH26-Farbstoffes und der GFAP-Färbung, oder ausgetretener Farbstoff außerhalb der Zellen beobachtet werden.

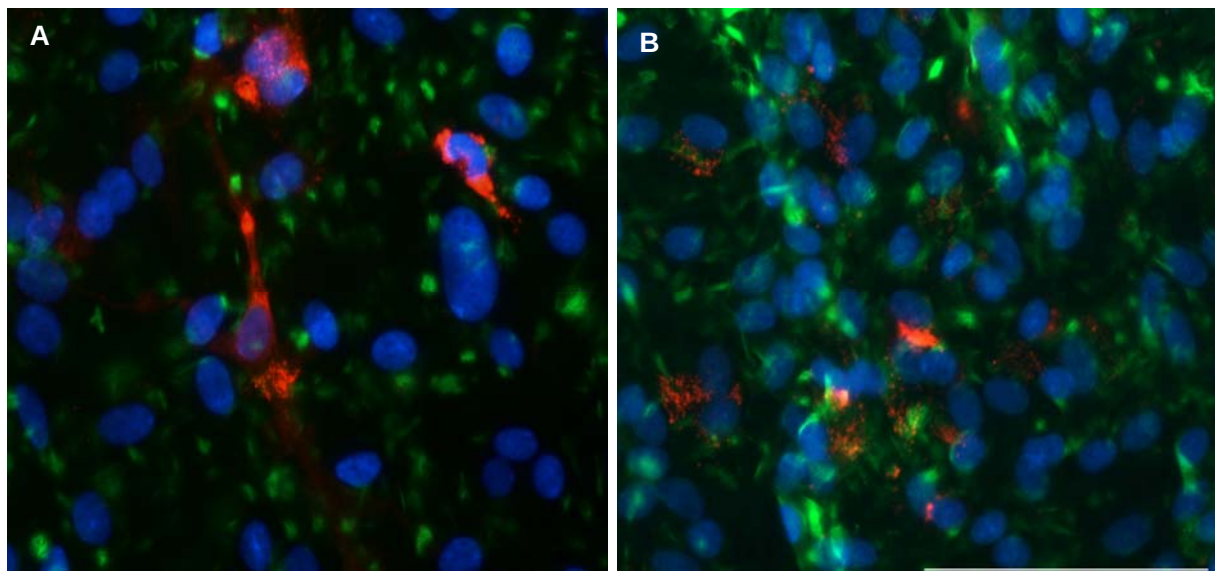


Abb. 3.35: Immuncytochemische GFAP- (grün) und DAPI- (blau) Färbung einer sieben Tage alten USSC/Ratten-Co-Kultur. Beide Abbildungen zeigen den Astrozytenrasen, auf den mit rotem Fluoreszenzfarbstoff PKH26-markierte USSC ausgesät wurden. Während in (A) deutlich drei PKH26-markierte USSC den entsprechenden Zellkernen zuzuordnen waren, war die zweifelsfreie Zuordnung der Zellkerne zum markierten Zelltyp in (B) nicht eindeutig möglich.

3.9.2 *In vitro*-Experimente mit USPIO-markierten USSC

Um die USSC *in vivo* zu identifizieren und deren mögliche Migration im lebenden Tier zu verfolgen, wurden die USSC auch mit Eisenpartikeln, so genannten USPIO (ultrasmall paramagnetic iron-oxide particles), markiert. Diese Experimente ergaben, dass das ursprünglich für embryonale Stammzellen der Maus entwickelte Markierungsprotokoll (Hoehn et al., 2002) auf die USSC übertragbar war und nicht zu einem erhöhten Zellsterben führte. Letzteres wurde durch Zählen des Anteils der mit Trypanblau gefärbten Zellen in der Zellsuspension sichergestellt. Um die erfolgreiche Markierung der Zellen mit USPIO zu verifizieren, wurden anschließend Eisenfärbungen (Perl's Prussian Blue Staining) durchgeführt. Diese Färbungen ergaben, dass die Menge der inkorporierten USPIO und somit die Intensität der Färbungen variierten, jedoch 100% der USSC in den untersuchten Kulturen mit USPIO beladen werden konnten (Abb. 3.36).

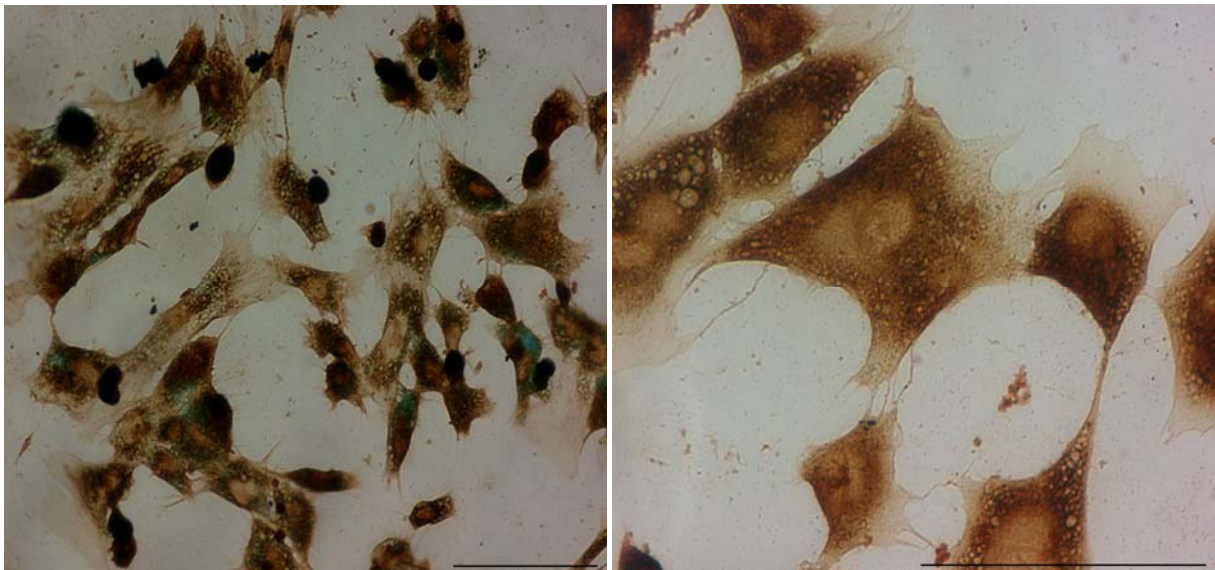


Abb. 3.36: USPIO-markierte USSC nach Eisenfärbung (Perl's Prussian Blue Staining). Maßbalken: 100 μ m

Die mit USPIO markierten USSC wurden anschließend in Löcher einer mit Agarose beschichteten Platte gegeben und so die kleinstmögliche Zellmenge bestimmt, die unter den gewählten Markierungsbedingungen mit Hilfe der MRT *in vivo* noch nachweisbar wäre. Hierbei ergab sich eine Nachweisgrenze der so markierten USSC von 1.000 Zellen (Abb. 3.37).

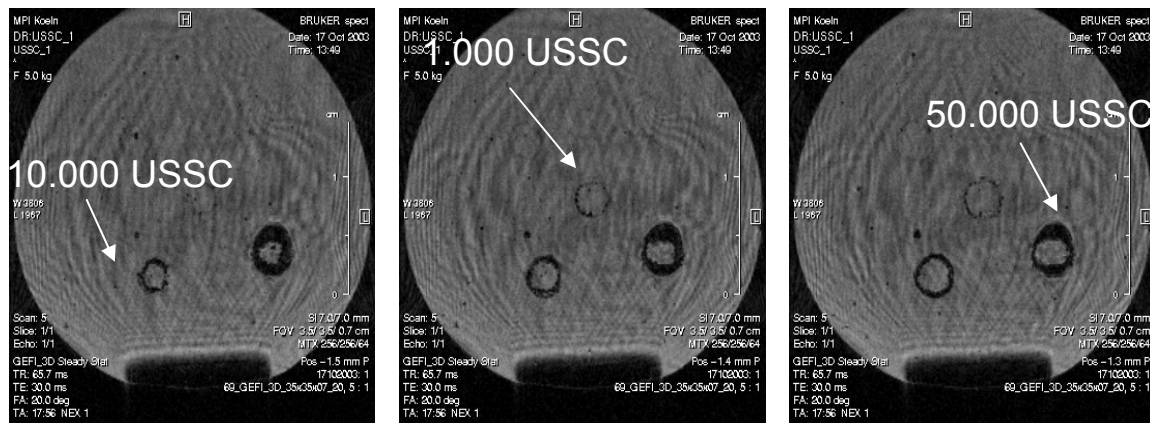


Abb. 3.37: MRT-Bilder (3 verschiedene Schichten) eines mit unterschiedlichen Zellzahlen befüllten Phantoms. Die Bestimmung der MRT-Nachweisgrenze der mit USPIO markierten USSC ergab für die gewählten Versuchsbedingungen 1.000 USSC, sichtbar durch den hypointensen Bereich (Ring) bei der Applikationsstelle von 1000 USSC. Geringere USSC-Konzentrationen konnten in den Bohrlöchern des Phantoms jedoch nicht mehr detektiert werden.

Aufgrund der Kapillarkräfte im Agarosegel des Phantoms erschienen die ausplattierten USSC nicht punktförmig in der jeweiligen Bohrung, sondern ergaben ringförmige hypointense Bereiche in den unterschiedlichen Schichten der MRT-Aufnahme.

3.9.3 Spezifität des für die USSC-Identifizierung verwendeten Antikörpers

Als Antigen, mit dessen Hilfe implantierte USSC immunhistochemisch identifiziert werden sollen, wurde der humane Kern (Nuc) gewählt, bei dem eine einfache Korrelation zwischen Färbesignal und Zellzahl besteht. In einer USSC-Kultur (KCB 55/14) wurden unter Proliferations- und XXL-Bedingungen die Gesamtzahlen (DAPI-Färbung) sowie die Anti-Nuc-immunpositiven USSC verglichen, um so Aufschluss über die Persistenz des Antigens in differenzierten USSC zu erhalten. Diese Experimente ergaben 100% Überlappung des DAPI- und Nuc-Signals unter Proliferationsbedingungen sowie nach XXL-Differenzierung (Abb. 3.38).

In Zellkultur-Vorversuchen wurden des weiteren Rattenastrozyten und Rattenmikroglia zusammen mit USSC gefärbt, um die Humanspezifität des Antikörpers sicherzustellen. Der Vorversuch (nicht gezeigt) ergab eine eindeutige Spezifität des Antikörpers gegenüber humanen Zellen, da keine der Rattenzellen bei diesem Versuch angefärbt wurde.

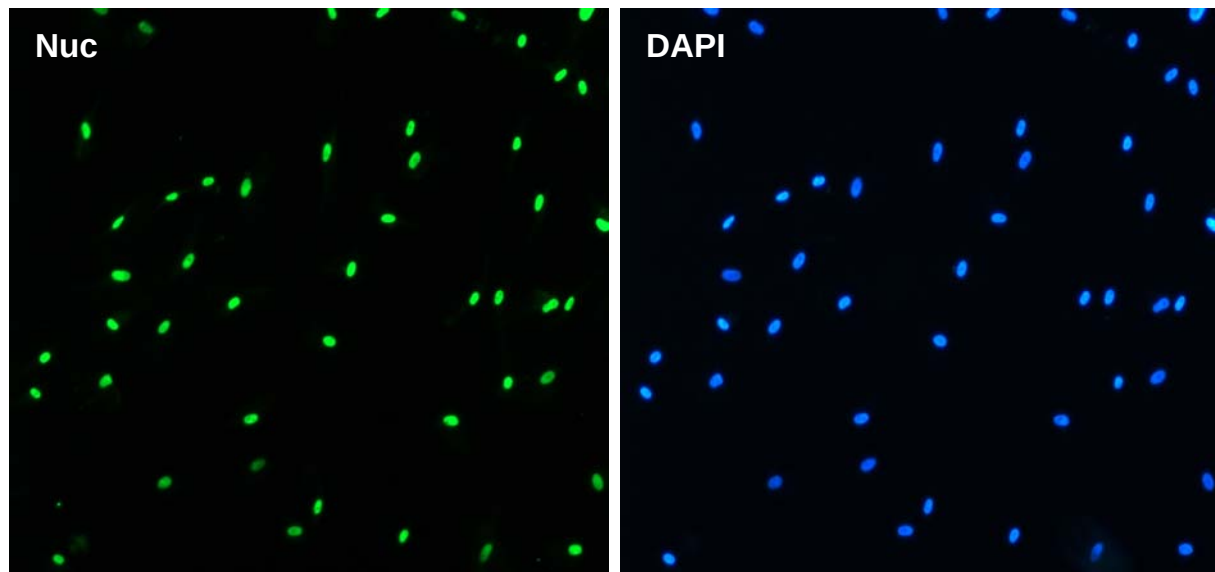


Abb. 3.38: Anti-Nuc und DAPI-Färbung einer XXL-differenzierten USSC-Kultur. Die Färbungen von KCB 55/14 nach einer Woche XXL-Differenzierung zeigten 100% Überlappung beider Signale. Hieraus ergab sich, dass Anti-Nuc-Immunfärbungen zur Identifizierung der USSC geeignet sind, da das Protein auch nach Differenzierung der USSC noch nachweisbar ist.

3.10 Identifizierung PKH26-markierter USSC nach Implantation

3.10.1 Verteilung PKH26-markierter Zellen

Alle in den folgenden Abschnitten beschriebenen Implantationen wurden von Frau Dr. Claudia Rosenbaum durchgeführt. Die Versuchstiere, die mit PKH26-markierten USSC implantiert wurden, wurden nach dem Aufarbeiten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert. In Tab 3.8 sind die in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingehenden Versuchstiere, die mit PKH26-markierten USSC implantiert wurden, sowie der jeweilige Implantationsort, aufgelistet:

Tab. 3.8: Auflistung der Versuchstiere, denen PKH26-markierte USSC in verschiedene Hirnareale implantiert wurden (Implantationsregionen: C= Cortex, H=Hippocampus, B= Basalganglien, SN= Substantia nigra).

Versuchsdauer	Analysierte Tierzahl	Implantationsregionen
2 Tage	n=5	2X SN,C,B,H
1 Woche	n=5	C, H, SN, 2X B
1 Monat	n=6	2X SN,2X H, C, B
3 Monate	n=3	B, C, H

Der rote Fluoreszenzfarbstoff PKH26 wurde über den gesamten Bereich des geschnittenen Gehirns lokalisiert und anschließend in koronare Schnitt-Diagramme des Paxinos-Rattenatlas (Paxinos und Watson, 1998) übertragen. Hierbei wurde PKH26 zwei Tage nach der Implantation unmittelbar am Implantationsort, unabhängig von dessen Position im Rattenhirn, beobachtet. Die Färbung trat sowohl linienförmig im Stichkanal als auch in Tropfenform auf (Abb. 3.39 und Abb. 3.41).

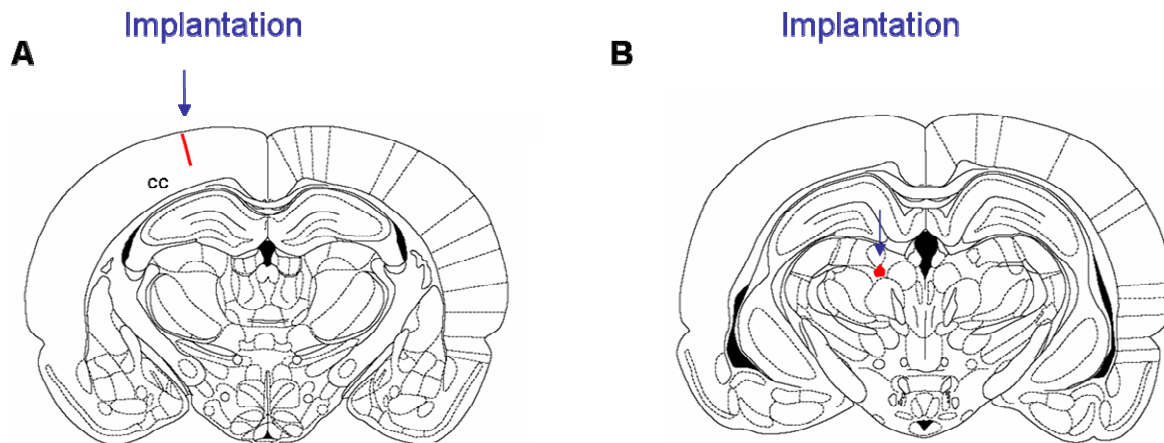


Abb. 3.39: Schematische Darstellung der Position PKH26-markierter USSC (rot). Die Abbildung zeigt zwei repräsentative Implantationen (blaue Pfeile) in den Cortex (A) und die Basalganglien (B) und die jeweils festgestellten Positionen der PKH26-markierten USSC nach zwei Tagen.

Eine Woche nach Implantation wurden die markierten Zellen sowohl im ursprünglichen Stichkanal der Implantationsnadel identifiziert (Abb. 3.41), als auch abweichend davon verteilt in media-laterale Richtung außerhalb der Verlängerung des Stichkanals. Wären derartige laterale Verteilungen entlang distinkter Hirnstrukturen und Fasertrakte, wie z.B. dem Corpus callosum (CC), bereits zwei Tage nach Implantation zu beobachten gewesen, würde vermutlich eine rein physikalische Verteilung, etwa durch den Implantationsdruck, vorliegen. So weisen die vorliegenden Beobachtungen jedoch, die Gleichförmigkeit der Implantation vorausgesetzt, auf das Migrationspotential der implantierten USSC hin. Abb. 3.40 zeigt zwei repräsentative schematische Darstellungen der Verteilung PKH26-markierter USSC eine Woche nach Implantation in den Cortex (A) bzw. den Hippocampus (B).

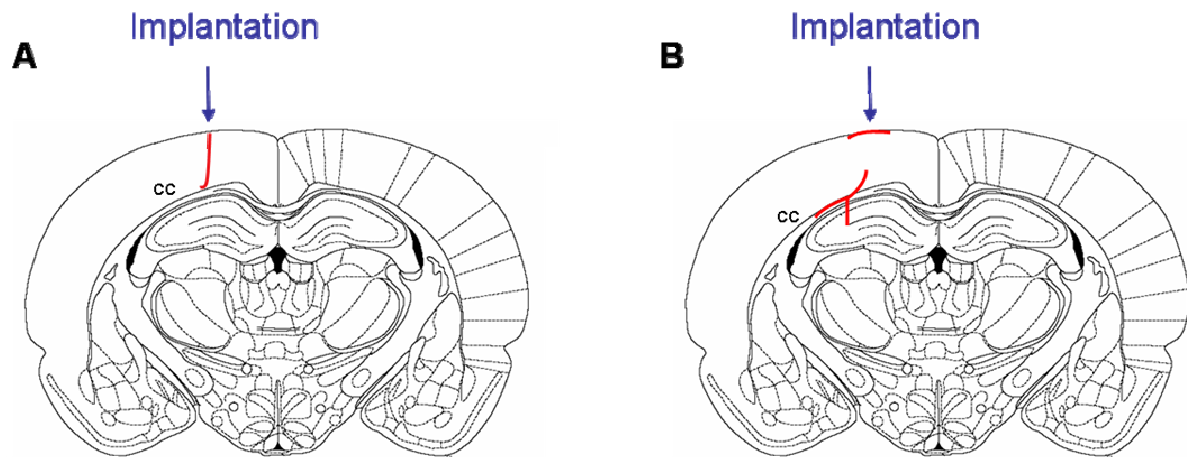


Abb. 3.40: Schematische Darstellung der USSC-Verteilung (rot) dargestellt eine Woche nach stereotaktischer Implantation in den Cortex (A) und in den Hippocampus (B). Vor allem nach Implantation (blauer Pfeil) in den Hippocampus der Ratte konnte eine laterale Bewegung der USSC entlang des Corpus callosums (CC) beobachtet werden, die Rückschlüsse auf potentielle migratorische Aktivität der USSC *in vivo* zulässt.

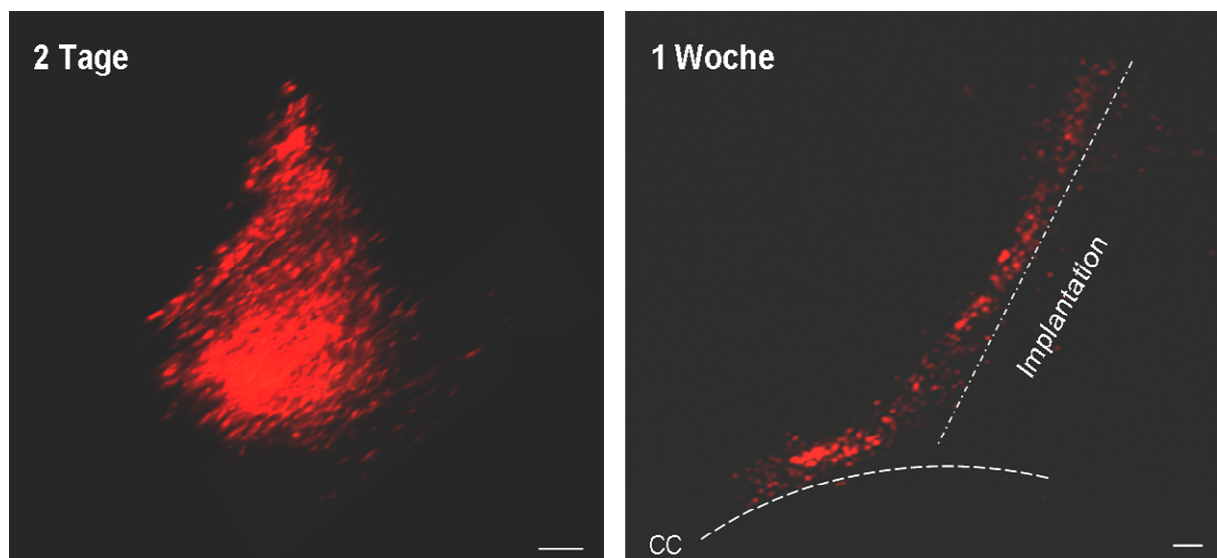
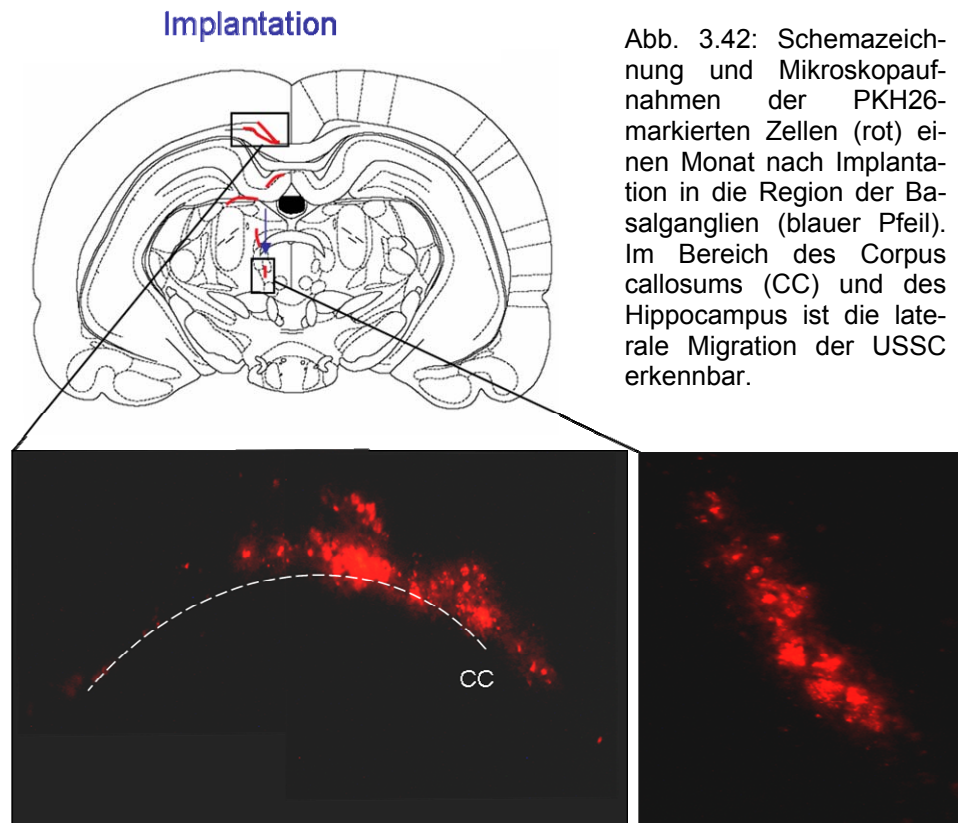


Abb. 3.41: PKH26-markierte USSC *in vivo*. Zwei Tage nach Implantation in den Bereich der Basalganglien in Tropfenform (links), sowie eine Woche nach Implantation in den Cortex, linienförmig im Stichkanal verteilt. Nach einer Woche sind fluoreszierende Zellen darüber hinaus lateral vom Stichkanal am Übergang zum Corpus callosum (CC) und entlang des CC sichtbar (rechts). Maßbalken: 100 μ m.

Einen Monat nach Implantation der PKH26-markierten USSC wurden diese im Implantationsbereich und wiederum lateral davon im Bereich des CC sowie des Hippocampus beobachtet (Abb. 3.42).



Drei Monate nach Implantation wurden PKH26-markierte Zellen weit entfernt vom Implantationsbereich detektiert. Nach Implantation in den Hippocampus wurden PKH26-markierte Zellen beispielsweise im Cerebellum gefunden, was eine Verteilungsdistanz von etwa 10 mm bedeutete (Abb. 3.43).

Einen und drei Monate nach Implantation der PKH26-markierten USSC wurde unabhängig von der Implantationsregion Fluoreszenz in Zellschichten des Hippocampus oder Cortex beobachtet. In Abb. 3.44 ist diese Beobachtung repräsentativ durch Fluoreszenz im Bereich der Pyramidalzellschicht des Hippocampus drei Monate nach erfolgter Implantation abgebildet.

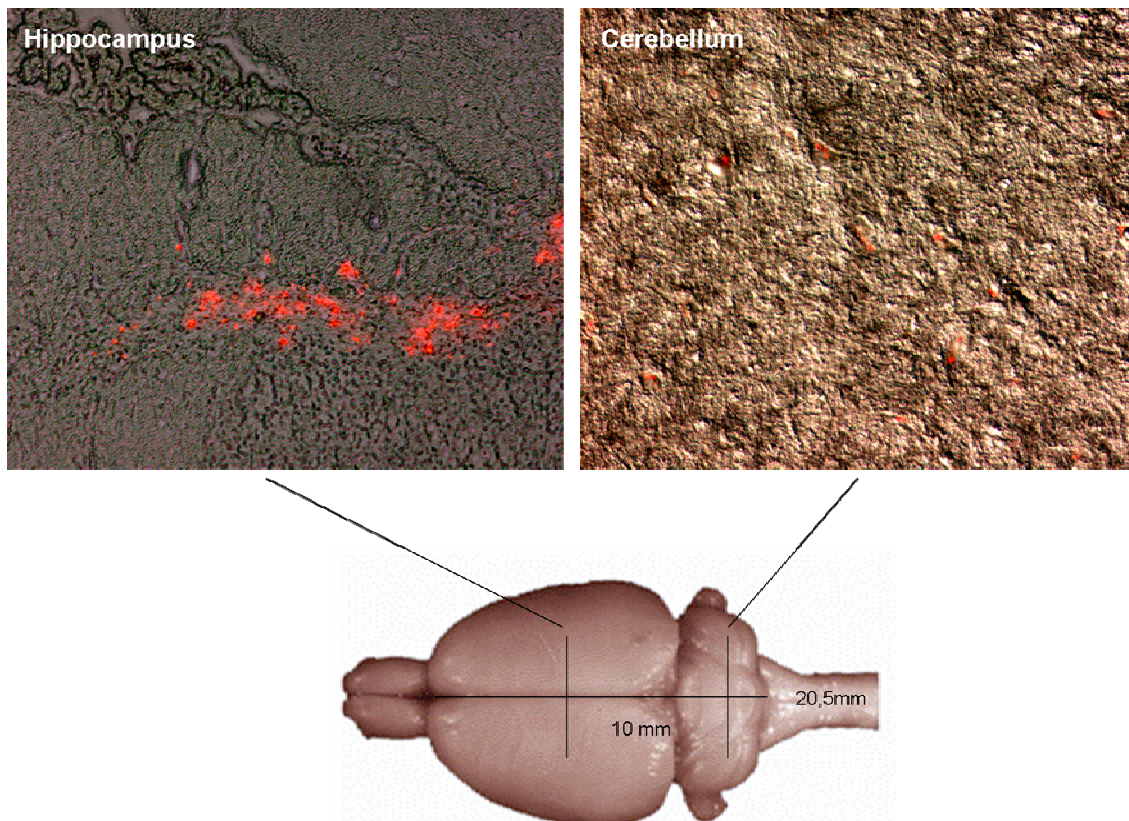


Abb. 3.43: PKH26-markierte Zellen im Hippocampus und Cerebellum. Drei Monate nach stereotaktischer Implantation in den Bereich des Hippocampus wurden weit verteilt im Hirnparenchym PKH26-markierte Zellen gefunden.

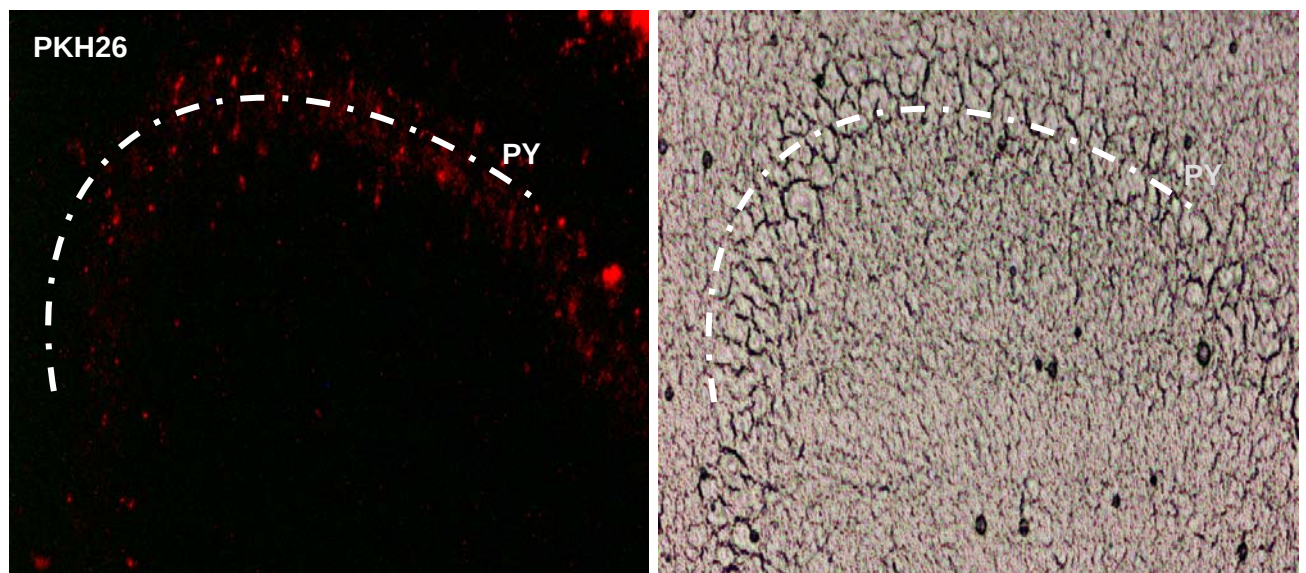


Abb. 3.44: PKH26-Markierung in ganzen Zellschichten. Repräsentativ ist eine fluoreszierende Zellschicht im Bereich der Pyramidalzellen des Hippocampus als Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme (Py = Pyramidalzellschicht) gezeigt. Diese Beobachtungen wurden einen und drei Monate nach der Implantation PKH26-markierter Zellen gemacht.

Aufgrund der oben beschriebenen Effekte, der Markierung ganzer Zellschichten, wurde die PKH26-Markierung ab einer einmonatigen Verweildauer der Zellen im Ge-

hirn der Ratte als nicht mehr zuverlässig erachtet. Dennoch deuten die frühen Implantationsexperimente und die Analyse der Zellverteilung nach einer Woche auf ein migratorisches Potential der Zellen hin, vor allem im Bereich des Corpus callosum. In keinem der analysierten Hirne war eine Quantifizierung der überlebenden USSC möglich. Zum einen, da durch die unterschiedlich starken Anfärbungen mit PKH26 die Grenze zwischen Hintergrundsignal und schwach gefärbter USSC nicht eindeutig zu ziehen war. Zum anderen war durch die unterschiedlichen Verteilungen des Farbstoffes (gepunktet, flächig etc.) keine eindeutige Korrelation zwischen Anzahl der roten Fluoreszenzsignale und der Zellen möglich.

3.10.2 Immunhistochemische Untersuchung des Phänotyps PKH26-markierter Zellen

3.10.2.1 GFAP- und NeuN-Färbungen

Um den Phänotyp der implantierten USSC festzustellen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Um gliale Differenzierung zu identifizieren, wurde mit einem Anti-GFAP-Antikörper gefärbt, um neuronale Differenzierung sichtbar zu machen mit einem Anti-NeuN-Antikörper. Die Immunfärbungen wurden in ausgewählten Hirnen nach einer Woche, einem Monat und nach drei Monaten durchgeführt. Zwei Tage nach Implantation wurden keine Phänotypanalysen durchgeführt, da dieser Zeitpunkt als zu früh für jegliche Differenzierung erachtet wurde. Die Auswertung der Anti-GFAP-Färbungen ergab jeweils eine starke Färbung im Bereich der Implantationsstelle unabhängig von der Position der Implantation und Überlebenszeit des Versuchstieres, was durch Induktion des Intermediärfilamentes GFAP in reaktiven Astrozyten bzw. die Ausbildung einer so genannten Glianarbe zu erklären ist (Abb. 3.46). Eine Woche nach Implantation wurden in keinem der gefärbten Hirnschnittpräparate und Tiere glial differenzierte USSC beobachtet (Abb. 3.45 A+B).

Einen Monat und drei Monate nach Implantation der USSC in die Region der Substantia nigra bzw. des Hippocampus wurden jedoch jeweils im Bereich des Striatums PKH26-markierte, GFAP exprimierende Zellen detektiert (Abb. 3.45 C+D). Aufgrund der bereits beschriebenen Beobachtungen, die einen und drei Monate nach Implantation PKH26-markierter USSC gemacht wurden, erscheint es jedoch fraglich, ob es sich bei PKH26-markierten und GFAP-immunpositiven Zellen tatsächlich um markierte USSC handelt. Andere Interpretationsmöglichkeiten dieser Beobachtung sind im Diskussionsteil dieser Arbeit erörtert.

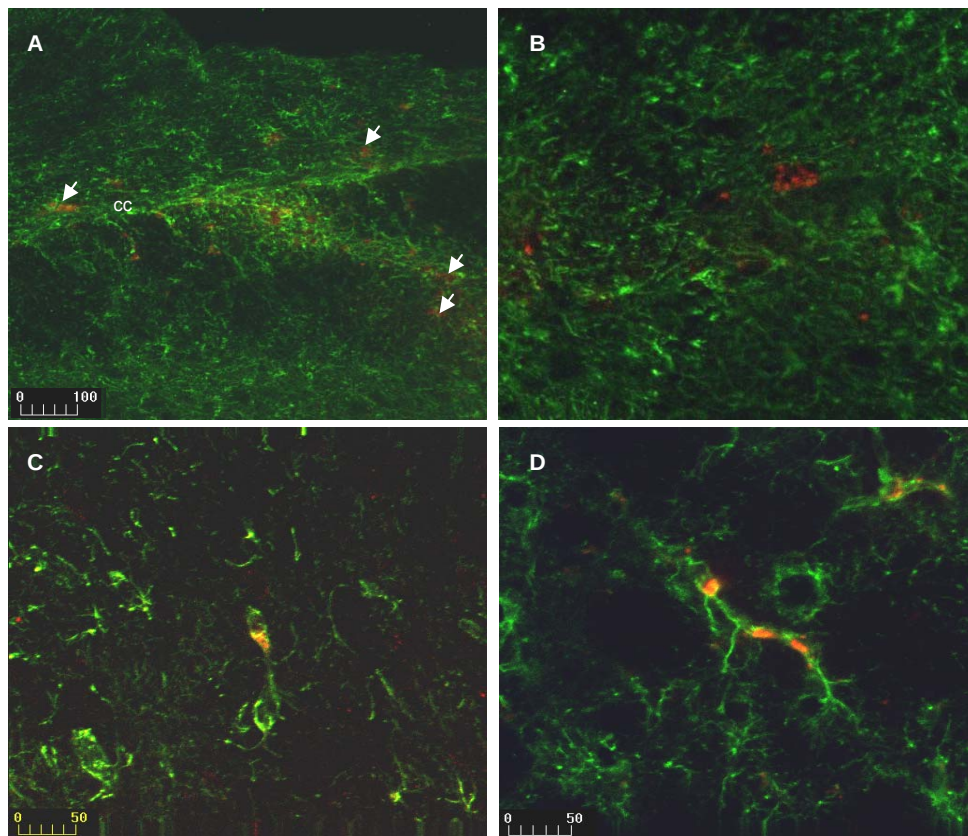


Abb. 3.45: Konfokale Aufnahmen immunhistochemischer Anti-GFAP-Färbungen. (A) zeigt hierbei die im Implantationsbereich (Cortex, Corpus callosum (CC) und Hippocampus) eine Woche nach Implantation entstandene Glianarbe durch Induktion des GFAP in reaktiven Astrozyten. Der Implantationsbereich ist durch die PKH26-markierten USSC (rot) zu identifizieren. Die vergrößerte Abb. (B) zeigt deutlich, dass keine PKH26-markierten USSC ventral des CC GFAP exprimieren und somit nicht glial differenziert sind. C zeigt PKH26-markierte GFAP exprimierende Zellen einen Monat nach Implantation, D drei Monate nach Implantation. In beiden Fällen wurden GFAP exprimierende PKH26-markierte Zellen im ipsi-lateralen Striatum gefunden.

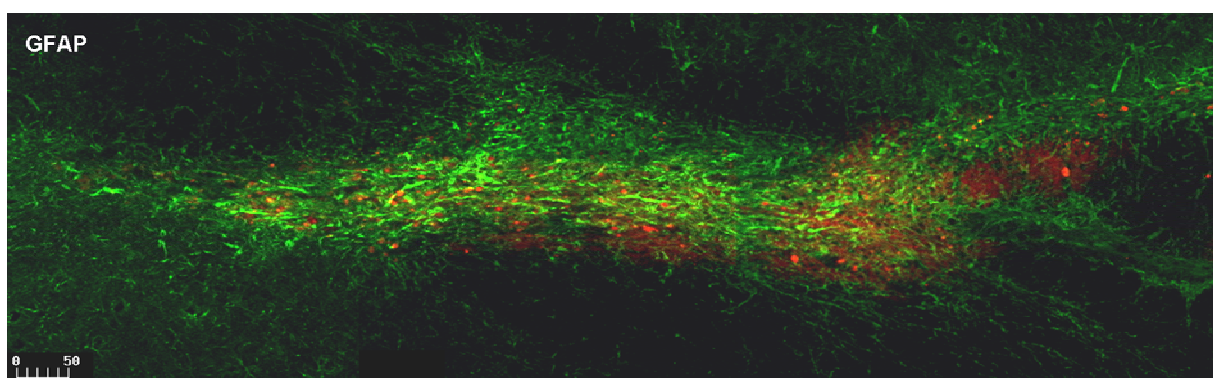


Abb. 3.46 zeigt den Implantationsbereich eines Tieres drei Monate nach USSC-Implantation. Von links nach rechts ist die Injektionsspur in dorso-ventraler Richtung im Cortex abgebildet. In diesem Bereich erfolgt die GFAP-Expression (grün) aufgrund der Implantation selbst und zeigt die entstandene Glianarbe.

Die Analyse der neuronalen Differenzierung nach immunhistochemischer NeuN-Färbung ergab eine Woche nach Implantation der USSC in den Hippocampus NeuN-

immunpositive, PKH26-markierte Zellen in dieser Hirnstruktur. Auffällig ist die Lokalisation dieser Zellen exakt in der Ebene des durch die Implantation durchtrennten Gyrus dentatus. Oberhalb, unterhalb und in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus selbst lokalisierte USSC wiesen keine NeuN-Färbung auf. In keinem anderen Versuchstier wurden eine Woche nach Implantation PKH26-markierte NeuN-immunpositive Zellen beobachtet, und nur bei diesem Tier kam es zu Durchtrennung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und zur Lokalisation der PKH26-markierten USSC exakt in dieser Ebene (Abb. 3.47). Es wurden jedoch mehrere Hirnschnittpräparate dieses Tieres unabhängig von einander gefärbt, wodurch das beschriebene Ergebnis bestätigt werden konnte.

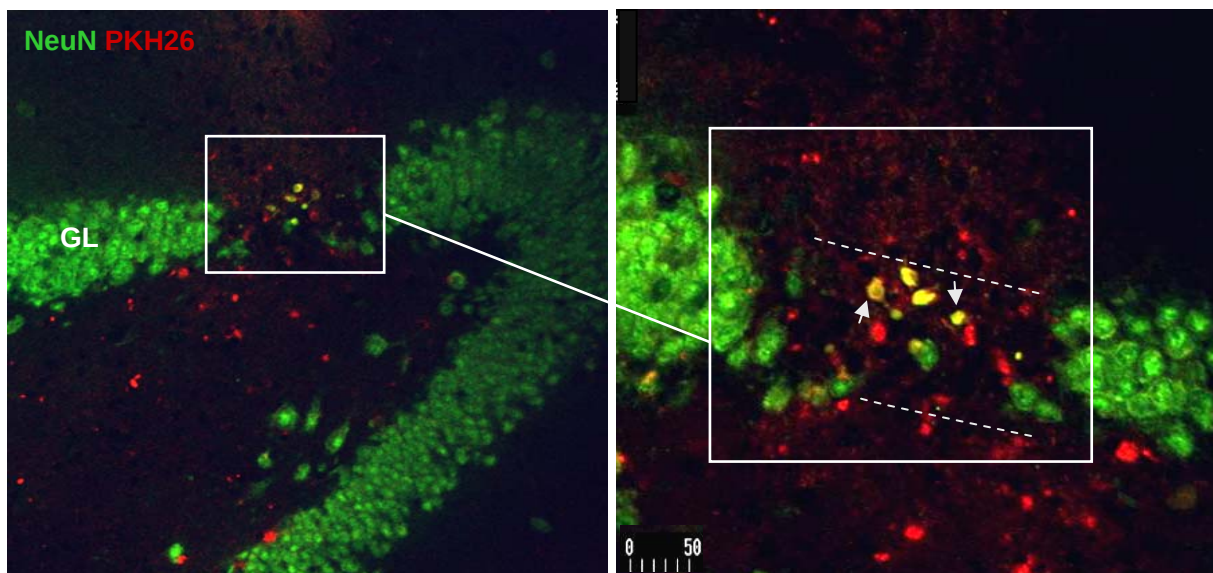


Abb. 3.47: Die konfokale Aufnahme einer NeuN-Immunfärbung. Eine Woche nach Implantation der markierten USSC in die Region des Hippocampus einer adulten Ratte ist die Co-Expression des neuronalen Kernmarkers NeuN (grün) und der PKH26-markierten USSC (rot) im Gyrus dentatus zu sehen. Zu beachten ist, dass diese Co-Lokalisation (gelb) lediglich in der Ebene der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (GL, gestrichelte Linie) zu beobachten ist (weiße Pfeile) und nicht außerhalb.

Die NeuN-Färbungen an Hirnschnittpräparaten einen und drei Monate nach Implantation zeigten NeuN-immunpositive Zellen mit einem geringen Anteil an PKH26-Markierung in ganzen Zellschichten des Cortex sowie des Hippocampus (Abb. 3.48). Würde man dieses Ergebnis als PKH26-Markierung, und somit als neuronale Differenzierung der USSC *in vivo* interpretieren, würde dies bedeuten, dass ganze Zellschichten des Versuchstieres durch USSC ersetzt werden. Diese Anreicherung des PKH26 in gesamten Zellschichten zusammen mit der unglaublich großen Anzahl PKH26-markierter Zellen legt jedoch vielmehr den Schluss nahe, dass die PKH26-

Markierung einen und drei Monate nach Implantation nicht mit lebenden USSC korreliert und daher eine andere Nachweismethode verwendet werden sollte.

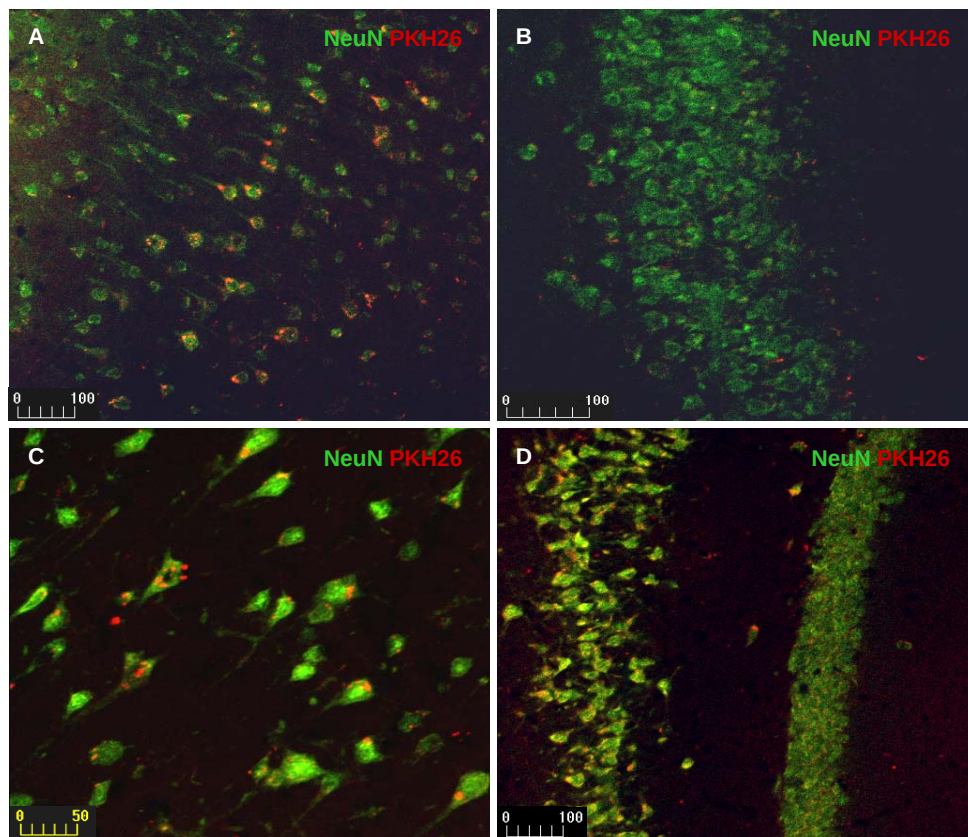


Abb. 3.48: Konfokale Aufnahmen von repräsentativen NeuN-Färbungen einen (A+B) und drei Monate (C+D) nach Implantation. Die Analyse der implantierten Gehirne ergab in allen Fällen eine Anreicherung feiner, roter PKH26 Partikel im Bereich von Zellschichten. (A) zeigt den ipsilateralen Cortex, (B) die Pyramidalzellschicht des ipsilateralen Hippocampus einen Monat nach Implantation in den Cortex. (C) zeigt PKH26-Markierung im kontralateralen Cortex, (D) im ipsi-lateralen Bereich der Pyramidalzell- und Körnerzellschicht des Hippocampus drei Monate nach Implantation in den Hippocampus.

3.10.2.2 hTau-Färbungen

Um die Morphologie der implantierten USSC beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem gegen humanes Tau-Protein gerichteten Antikörper, einem frühen neuronalen Marker (Fricker et al., 1999), durchgeführt. Analysiert wurden Hirne (n=3), in die drei Monate zuvor mit PKH26-markierten USSC in verschiedene Hirnareale (Cortex, Hippocampus, Basalganglien) implantiert wurden, sowie ein unimplantiertes Tier als Kontrolle. In allen drei implantierten Hirnen konnten, im Gegensatz zum Kontrolltier, hTau-immunpositive Zellen detektiert werden. Aufgrund des Fehlens solcher Signale im nicht implantierten Tier wurde von der Humanspezifität des Antikörpers ausgegangen. PKH26 und das hTau-Färbesignal konnten aufgrund des Färbeprotokolls bzw. der PKH-Instabilität gegenüber den ver-

wendeten Reagenzien nicht in einem Hirnschnittpräparat zusammen korreliert werden (Haas et al., 2000).

Die hTau-immunpositiven Zellen wurden im Cortex, Hippocampus und Striatum aller drei implantierten Tiere detektiert und zeigten eine neuronenähnliche Morphologie (Abb. 3.49). Außerhalb der genannten Hirnareale wurden keine hTau-immunpositiven Zellen beobachtet. Im Folgenden sind repräsentative Abbildungen der hTau-immunpositiven Zellen drei Monate nach Implantation in den Hippocampus abgebildet.

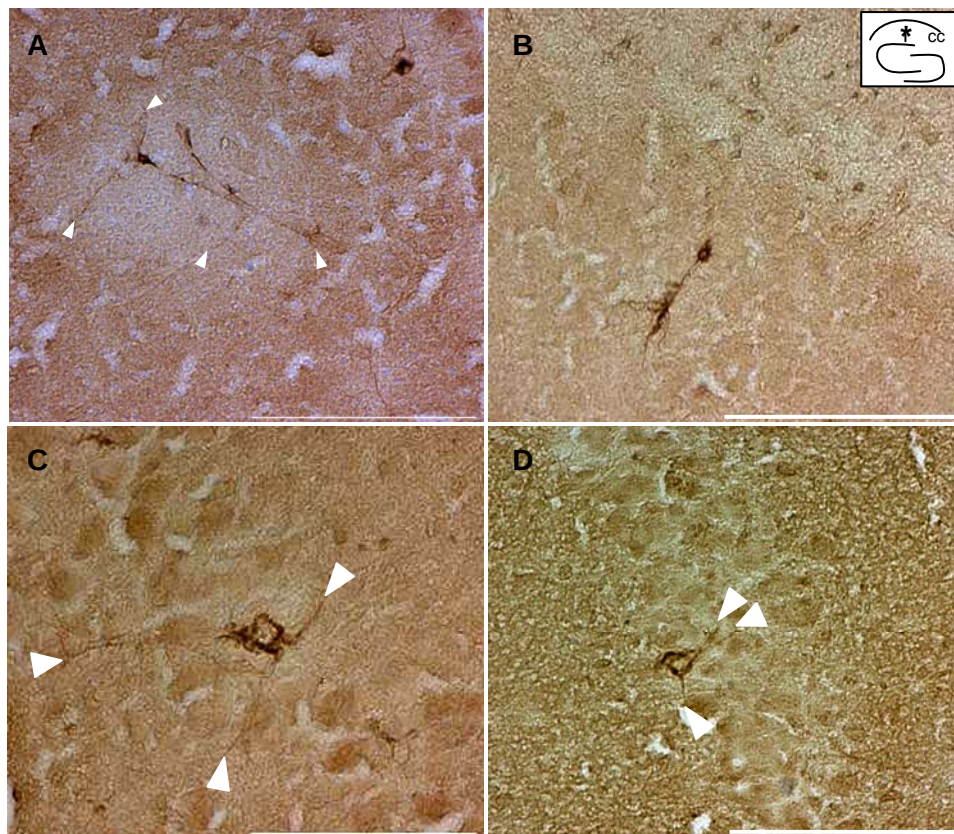


Abb. 3.49: Exemplarische Abbildungen hTau-immunpositiver Zellen drei Monate nach unilateraler, stereotaktischer Implantation von USSC in die Hippocampus-Region einer adulten Ratte. (A) zeigt eine Zelle mit neuronenähnlicher Morphologie im Cortex und (B) im Hippocampus orthogonal zum Corpus callosum ausgerichtet (genaue Orientierung s. kleine Abbildung). (C+D) zeigen die morphologische Integration der hTau-immunpositiven Zellen in die Pyramidalschicht des ipsilateralen Hippocampus. Maßbalken: 100 μ m.

Drei Monate nach Implantation der USSC wurde die Verteilung der hTau-immunpositiven Zellen semiquantitativ bestimmt. Dazu wurden immunpositive Zellen in den markierten Arealen gezählt und entsprechend der Zellzahl farbcodiert. Dunkel kolorierte Areale stehen hierbei für eine hohe Zelldichte (s. Material und Methoden).

In Abb. 3.50 ist die Verteilung hTau-immunpositiver Zellen am Beispiel eines in den Cortex implantierten Tieres dargestellt.

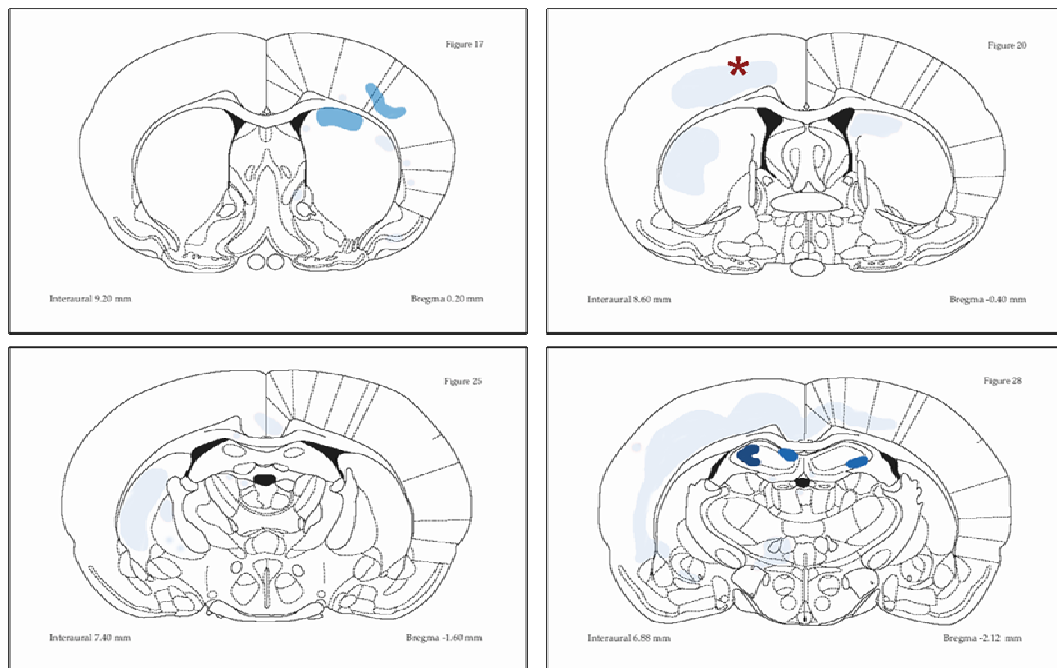


Abb. 3.50: Repräsentative Darstellung der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Anti-hTau-Färbung drei Monate nach Implantation. * markiert hierbei die unilaterale Implantationsstelle im Cortex. Bei der Auswertung wurde mit Farbcodierung gearbeitet: Dunkle Blautöne stehen für eine hohe Zelldichte, helle für eine geringere. Zu beachten ist neben der Anreicherung der Zellen im Cortex, Hippocampus und Striatum die Präsenz der Zellen in beiden Hemisphären.

Weitergehende Untersuchungen unter Einbeziehung kürzerer Versuchszeiten oder nach NaCl-Implantation bei einem weiteren Kontrolltier waren aufgrund der Tatsache, dass der verwendete polyklonale Anti-hTau-Antikörper aus dem Handel genommen wurde, leider nicht möglich. Die durchgeführten Experimente weisen dennoch auf migratorisches Potential der implantierten USSC hin und darüber hinaus auf die Präsenz der Zellen bis zu drei Monate nach Implantation sowie neuronales Differenzierungspotential (hTau-Expression) und eine neuronähnliche Morphologie der USSC *in vivo*.

3.10.2.3 ED-1-Färbungen der implantierten Gehirne

Um die Stärke der unspezifischen Immunantwort abzuschätzen, wurden Immunfärbungen mit einem Anti-ED-1 Antikörper (AK) durchgeführt. Durch den ED-1 AK konnten Makrophagen und aktivierte Mikroglia identifiziert werden. Die Analyse von Rattegehirnen eine Woche nach Implantation ergab hierbei einen großen Anteil ED-1-immunpositiver Strukturen (Abb. 3.51). Vor allem im Bereich der Implantationsstelle

wurden ED-1 und PKH26 gemeinsam detektiert, was auf die Phagozytierung der USSC durch Makrophagen oder aktivierte Mikroglia hinweist.

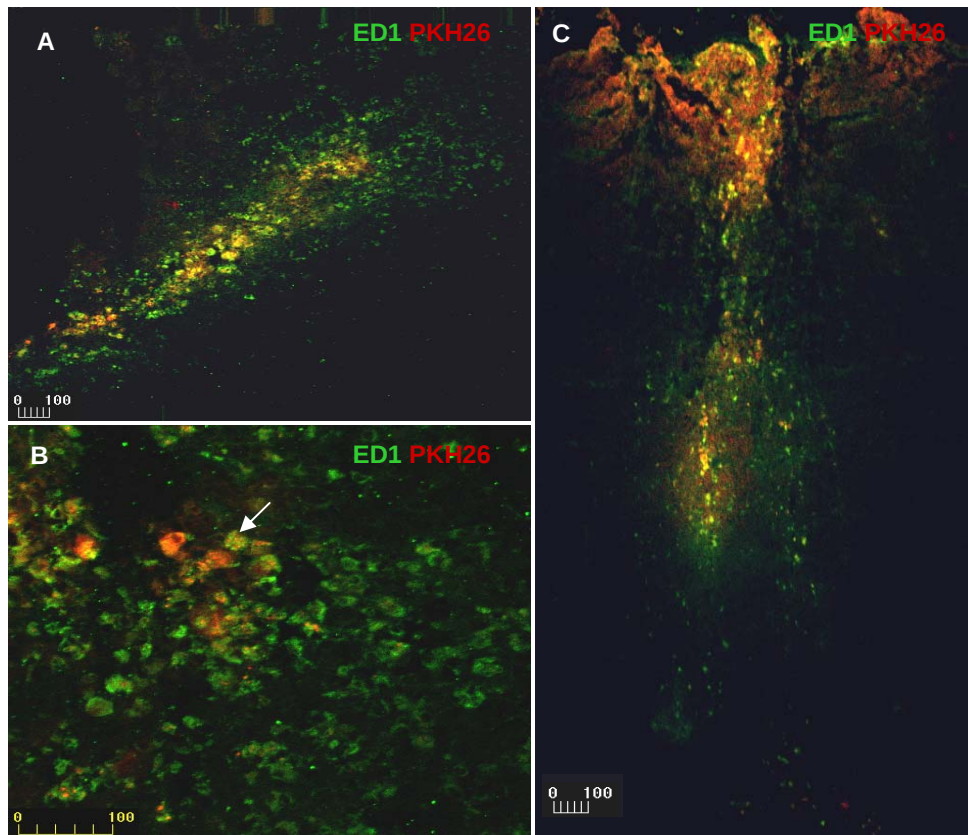


Abb. 3.51: Konfokale Aufnahmen repräsentativer ED-1 Färbungen (grün) eine Woche nach Implantation. Diese Färbungen zeigen ED-1-immunpositiver-Zellen im Bereich der PKH26-markierten USSC (rot). In (B) ist deutlich eine PKH26-markierte ED-1 exprimierende Zelle zu sehen (Pfeil), was auf Phagozytierung der USSC durch Makrophagen oder Mikroglia hinweist. (C) zeigt, dass sich die ED-1-immunpositiven Zellen auf den Implantationsbereich beschränken. Abgebildet ist ein Ausschnitt vom äußersten Cortexrand in ventraler Richtung.

Auch einen Monat nach Implantation der USSC konnten ED-1-exprimierende PKH26-markierte Zellen beobachtet werden, die auf Phagozytose der implantierten Zellen hinweisen. In Abb. 3.52 sind mehrere dieser Zellen nach Implantation der USSC in den Bereich der Substantia nigra abgebildet. Durch die konfokalen Aufnahmen wird ersichtlich, dass sich der PKH26-Farbstoff im Inneren und die grüne Fluoreszenz der ED-1-Färbung am äußeren Rand der Zelle befinden. Einen Monat nach Implantation wurden insgesamt weniger PKH26-markierte Zellen gefunden als nach einer Woche. Es erscheint daher plausibel, dass zu diesem späteren Zeitpunkt auch weniger ED-1-immunpositive Zellen beobachtet wurden.

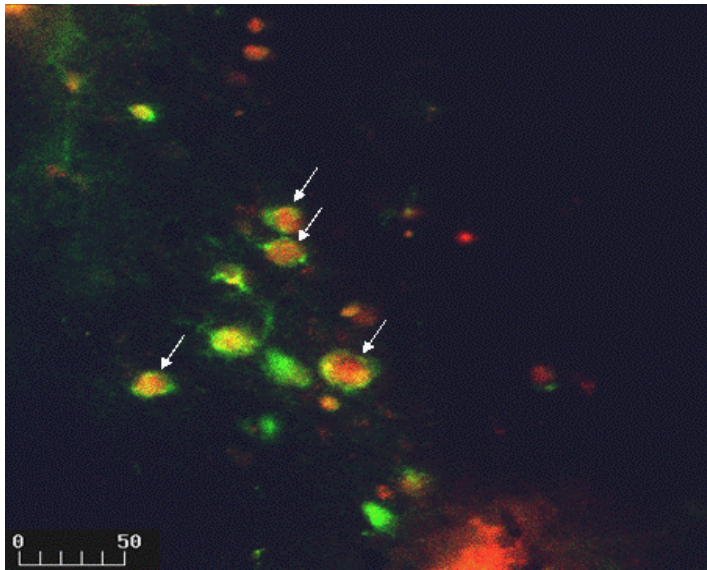


Abb. 3.52 Konfokale Aufnahme eines ED-1-gefärbten Hirnschnittpräparates. Einen Monat nach Implantation in der Substantia nigra sind deutlich mehrere Zellen (Pfeile) mit roter PKH26-Markierung innen und grüner ED-1-Färbung außen zu sehen, die auf Phagozytose der markierten USSC hindeuten.

3.10.3 PKH26-Kontrollversuch und Autofluoreszenz

Zur Überprüfung der ED-1-Färbungen wurden Kontrollversuche durchgeführt. Um festzustellen, ob PKH26 bei der Phagozytose der USSC abgebaut wird oder nach Aufnahme in Mikroglia oder Makrophagen weiterhin sichtbar bleibt, wurden zwei Tiere mit zuvor abgetöteten PKH26-markierten USSC implantiert. Die Aufarbeitung und anschließende Analyse der Tiere ergab, dass eine Woche sowie einen Monat nach Implantation die markierten USSC immer noch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren (Abb. 3.53). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass mit der Methode der PKH26-Markierung phagozytierte USSC im Rattenhirn nicht von unphagozytierten USSC unterschieden werden können. Darüber hinaus könnten Makrophagen oder Mikroglia nach Phagozytose von PKH26-markierten USSC fälschlicherweise als USSC interpretiert werden.

Abb. 3.54 zeigt ED-1-Färbungen des mit toten, markierten USSC implantierten Gehirns und bestätigt die massive Ansammlung aktivierter Makrophagen bzw. Mikroglia im Implantationsbereich.

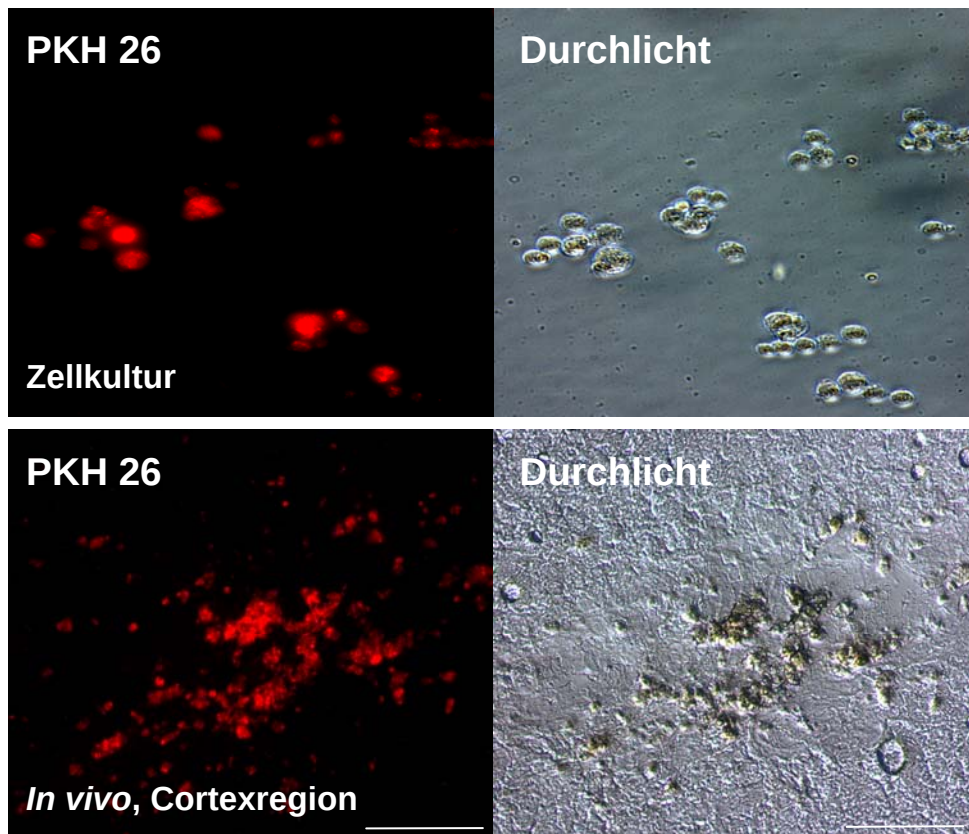


Abb. 3.53: Aufnahmen toter PKH26-markierter USSC in Zellkultur als Fluoreszenzaufnahme und im Durchlicht. Die Abbildung zeigt deutlich die abgerundeten, nicht-adhärenenten Zellkörper in Zellkultur. Die Analyse des Gehirns einen Monat nach Implantation abgetöteter und PKH26-markierter USSC in den Cortex zeigt deutlich rote Fluoreszenz. Maßbalken: 100 μm

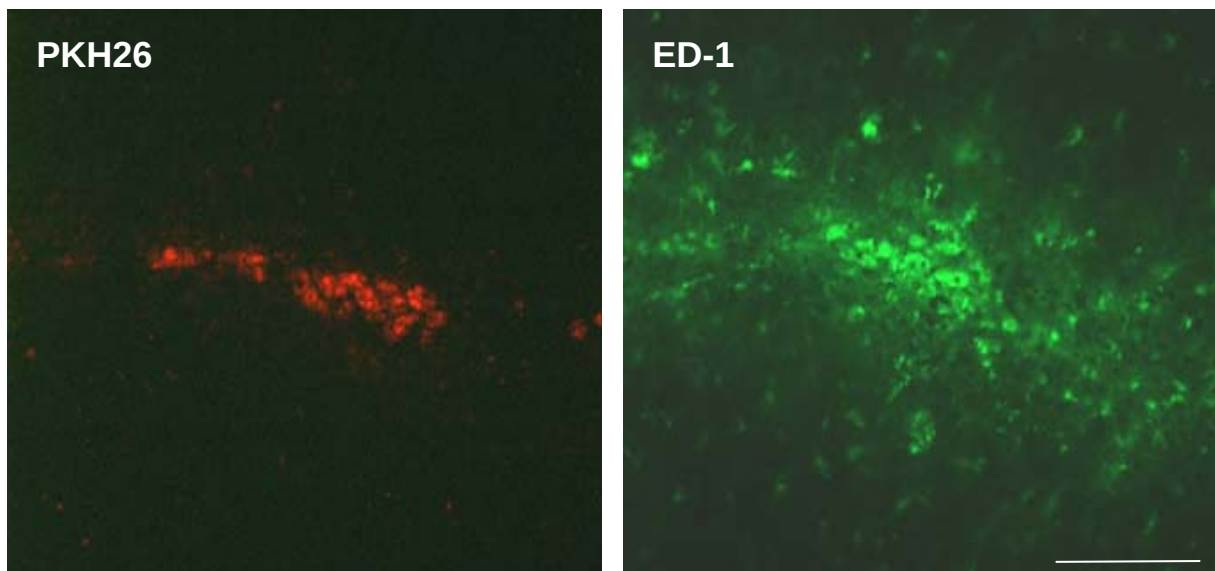


Abb. 3.54: Tote PKH26-markierte USSC nach Implantation in die Cortex-Region. Die Abbildungen zeigen die rote Fluoreszenz des PKH26-Farbstoffes und die ED-1-Färbung des folgenden Hirnschnittpräparates im selben Hirnbereich, wodurch die Präsenz aktivierter Makrophagen und Mikroglia bzw. die Phagozytose der USSC aufgezeigt wird. Maßbalken: 100 μm .

Für die Detektion der roten Fluoreszenz nach Implantation der markierten getöteten USSC kommen zwei mögliche Erklärungen in Betracht: Zum Einen besteht die Möglichkeit, dass PKH26 in den toten USSC trotz offensichtlich stattfindender Phagozytose bzw. Vorhandensein von Makrophagen und/ oder aktivierten Mikroglia nicht abgebaut werden konnte. Zum Anderen kann es sich bei der beobachteten Fluoreszenz auch um Autofluoreszenz der phagozytierenden Zellen selbst, oder die der toten USSC handeln. Beide Interpretationsmöglichkeiten zeigen jedoch deutlich, dass die PKH26-Markierung keine adäquate Zellmarkierungsmethode zur Implantation darstellt, da die rote Fluoreszenz im Gehirn des Versuchstieres nicht eindeutig mit lebenden, implantierten USSC korreliert werden kann.

3.11 Identifizierung der USSC mit Hilfe der Kernspintomographie

Mit USPIO markierte USSC wurden in den Cortex adulter Wistar-Ratten implantiert, um eine mögliche Wanderung der USSC im lebenden Tier zu beobachten. Unmittelbar nach der Implantation sowie 4, 7, 11, 15, 21 und 27 Tage danach wurde die Position der implantierten USSC in den Ratten (n=2) mit Hilfe eines 4,7 Tesla-Tier-Kernspintomographen untersucht (MPI für Neurologische Forschung, Köln). Es wurden hochauflösende dreidimensionale T2*-gewichtete Bilder aufgenommen, wobei im Bereich der Implantationsstelle zu allen Messzeitpunkten ein hypointenses Signal detektiert werden konnte, das durch Suszeptibilitätsartefakte der eisenhaltigen USSC ausgelöst wurde. Die generierten MRT-Aufnahmen zeigten außerdem den über der Implantationsstelle liegenden Stichkanal. Eine Migration oder Ansammlung der mit USPIO markierten USSC in andere Hirnregionen konnte jedoch zu keinem Messzeitpunkt beobachtet werden (Abb. 3.55).

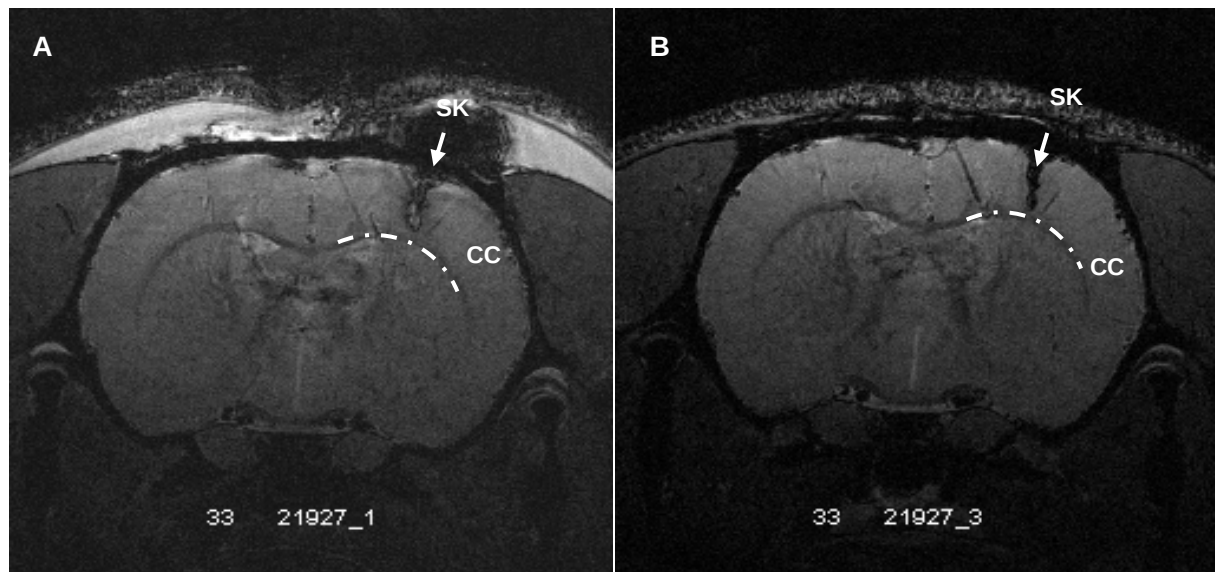


Abb. 3.55: MRT-Bilder einer mit USPIO-markierten USSC-implantierten Ratte. (A) zeigt die Position der implantierten Zellen im rechten Cortex unmittelbar nach der Implantation durch Signalreduktion in einer koronaren Schnittebene des Gehirns. 27 Tage später (B) kann im selben Tier keine Positionsveränderung des hypointensen Bereichs beobachtet werden. CC: Corpus callosum, SK: Stichkanal.

3.12 Immunhistochemische Identifizierung unmarkierter USSC *in vivo*

3.12.1 Lokalisationen der USSC im Rattenhirn

Um das Überleben und die Verteilung der USSC im Rattenhirn mit einer weiteren Methode zu analysieren, wurde die immunhistochemische Färbung mit dem gegen den humanen Kern gerichteten Antikörper (Nuc) etabliert. Für die Analyse der Lokalisation und Verteilung der USSC mittels immunhistochemischer Auswertung wurden engere Zeitfenster gewählt und die Gehirne zwei Tage sowie 1, 2, 3 und 4 Wochen nach Implantation analysiert. In Tab. 3.9 sind alle Versuchstiere aufgelistet, denen unmarkierte USSC in die Hippocampus-Region implantiert wurden, ebenso wie die Kontrolltiere die NaCl-Injektionen erhielten.

Tab. 3.9: Auflistung der Versuchstiere, denen unmarkierte USSC in den Bereich des Hippocampus implantiert wurden.

Versuchsdauer	Analysierte Tierzahl	Implantation
2 Tage	4	55/11,55/16, 55/14, NaCl
1 Woche	3	55/11, 55/16, 55/14
2 Wochen	3	55/11, 55/16, 55/14
3 Wochen	3	55/11, 55/16, 55/14
4 Wochen	4	55/11,55/16, 55/14, NaCl

Bei der immunhistochemischen Detektion der implantierten USSC mussten die Nuc-immunpositiven Zellen von den ebenfalls in großer Zahl vorhandenen, autofluoreszenten Zellen (Makrophagen, Mikroglia) bzw. Strukturen (Blut, Extrazellulärmatrix) unterschieden werden. Dies wurde zum einen durch Kontrolle der Kongruenz der Nuc-immunpositiven Strukturen mit der DAPI-Kernfärbung gewährleistet. Zum anderen wurden autofluoreszente Strukturen durch Analyse der jeweiligen Strukturen mit dem anderen Fluoreszenzfilter des Mikroskops ausgeschlossen (Abb. 3.56). In keinem der beiden Kontroll-Tiere konnten Strukturen entdeckt werden, für die diese beiden Kriterien ebenfalls zuträfen.

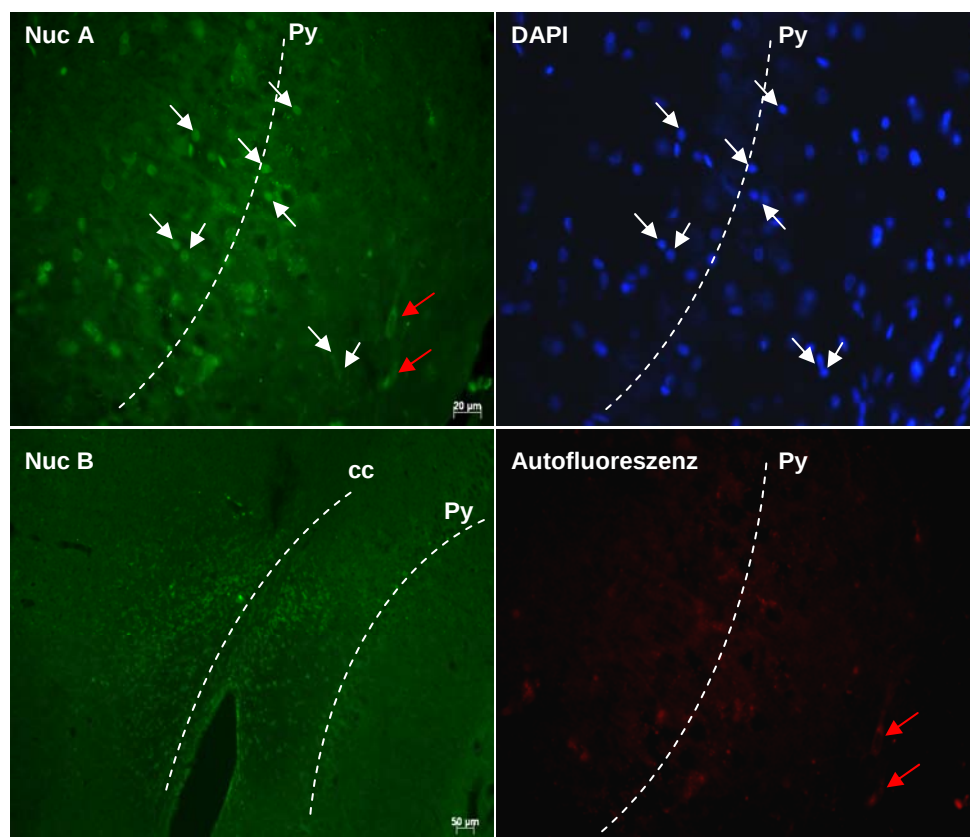


Abb. 3.56 Repräsentative Nuc-Färbung mit korrespondierender DAPI-Färbung sowie sichtbare Autofluoreszenz. (A) zeigt die Nuc-immunpositive Zellen in der Region der Pyramidalzellschicht (Py) des Hippocampus und ihre korrelierende DAPI-Färbung sowie die Autofluoreszenz dieses Bildausschnittes eine Woche nach Implantation. Die weißen Pfeile markieren beispielhaft Nuc-immunpositive USSC bzw. ihre jeweiligen Kerne in der DAPI-Färbung. Alle so markierten Zellen sind im Rotfilter, der die Autofluoreszenz zeigt, nicht sichtbar. Die roten Pfeile markieren im Gegensatz dazu zwei autofluoreszente Zellen, die sowohl im Rotfilter als auch nach der Nuc-Färbung sichtbar sind (aktivierte Mikroglia oder Makrophagen). Die zweite Nuc-Färbung (B) zeigt immunpositive Zellen im Corpus callosum (CC) zwei Wochen nach Implantation. Diese Färbung zeigt beispielhaft, wie die implantierten Zellen in Verbänden vorgefunden wurden.

Durch Analyse der Nuc-gefärbten Hirnschnittpräparate wurden die USSC bis zu vier Wochen nach Implantation in den analysierten Rattenhirnen sowie in den Plexi cho-

rioideae der Ventrikel identifiziert. Durch starke Anhäufung der Nuc-immunpositiven USSC im Implantationsbereich, vor allem zwei Tage nach Implantation, war jedoch wiederum keine Quantifizierung der USSC im Rattenhirn möglich. Neben der Ausbreitung der USSC *in vivo* wurden auch die USSC-Positionen bestimmt. Zur besseren Übersicht wurden alle detektierten USSC-Lokalisationen der Versuchstiere unterschiedlicher Überlebensdauer jeweils in einem Schnitt (theoretische Implantationsposition) zusammengefasst und schematisch mit Hilfe der Skizzen des Paxinos-Rattenatlas dargestellt (Paxinos und Watson, 1998). Die drei Experimente, die jeweils fünf Versuchstiere umfassten und jeweils mit derselben USSC-Charge am selben Tag implantiert wurden, wurden hierbei einzeln dargestellt. Zusätzlich zu den hier dargestellten Hirnarealen konnten die USSC nach Implantation in den Plexi chorioideae der Ventrikel (lateraler und dritter Ventrikel) identifiziert werden. Aus Abbildung 3.57 wird ersichtlich, dass die USSC in allen Experimenten im Cortex und in Abschnitten des Corpus callosum detektiert wurden, die bei der Implantation der USSC jeweils durchstoßen wurden. Die Anreicherung der USSC in den Plexi der Ventrikel kam wahrscheinlich durch die Injektion selbst zustande. So erscheint es plausibel, dass bei der Injektion in den Hippocampus das Ventrikelsystem verletzt wurde, wodurch USSC in den Liquorraum und somit auch in die Plexi gelangt sein könnten. Bei einer Gruppe der Versuchstiere konnten keine Nuc-immunpositiven Zellen im eigentlichen Injektionsort detektiert werden. Hier muss davon ausgegangen werden, dass entweder nicht tief genug injiziert wurde, oder durch caudal-rostral verschobene Implantations-Koordinaten in den angrenzenden lateralen Ventrikel anstelle des Hippocampus injiziert wurde. In Abb. 3.57 ist die Verteilung der Nuc-immunpositiven Zellen in den 15 implantierten Versuchstieren über die zunehmende Experimentdauer im Einzelnen dargestellt.

Bei der Auswertung von Tier D59, zwei Wochen nach Implantation von KCB 55/11, wurden Nuc-immunpositive Zellen auch in der kontralateralen Hirnhemisphäre detektiert, was somit wiederum Migrationspotential der implantierten Zellen aufzeigt. Misst man den Abstand der Zellverbände in beiden Hemisphären, beträgt die zurückgelegte Distanz der Zellen etwa 4,8 mm und somit bei einer Verweildauer der USSC im Rattengehirn von zwei Wochen die geschätzte Migrationsgeschwindigkeit der Zellen etwa 15 μm pro Stunde. Mögliche Gründe dafür, dass eine kontralaterale Migration bei den anderen Experimenten nicht beobachtet werden konnte, werden im Diskussionsteil dieser Arbeit erörtert.

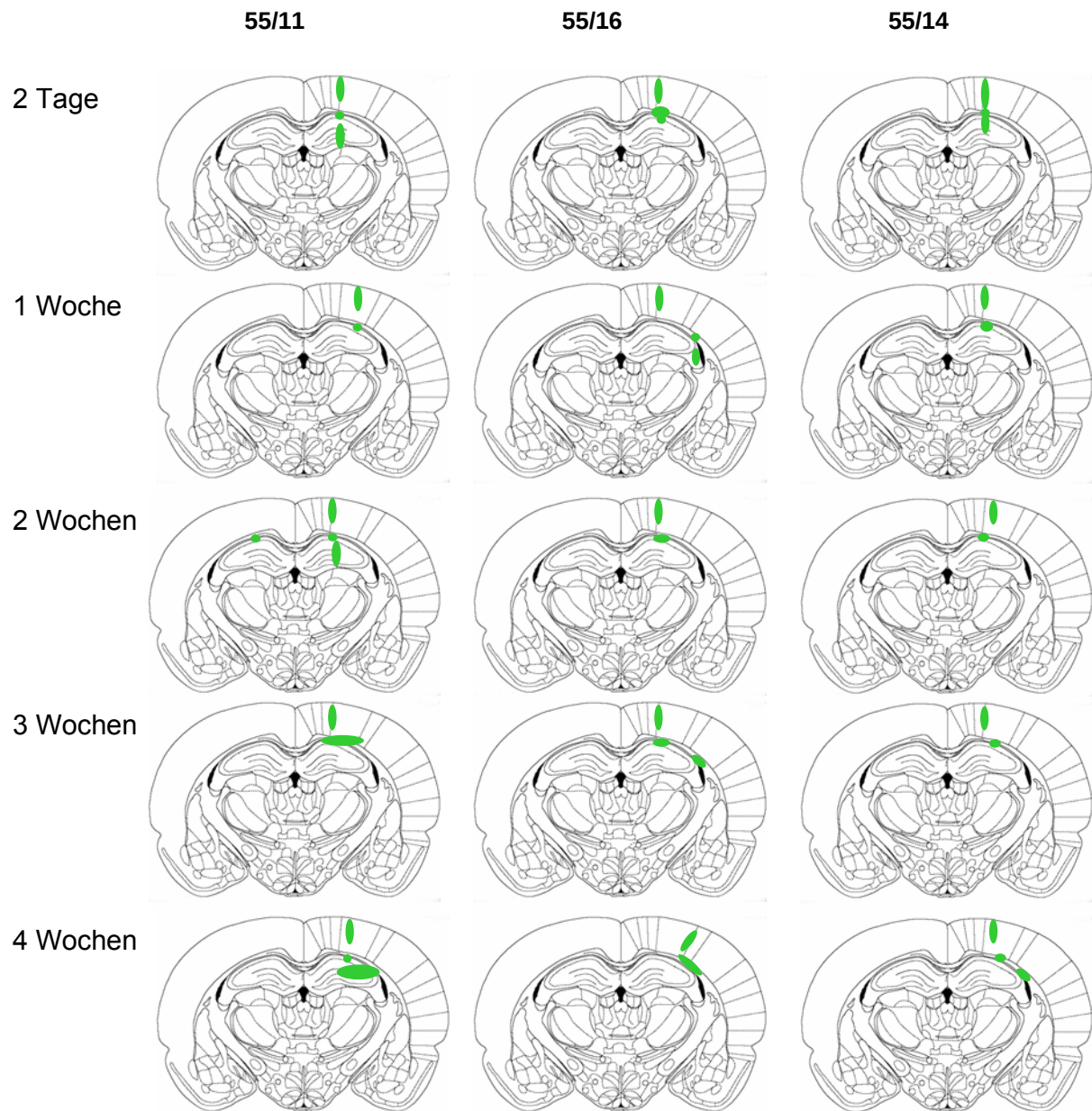


Abb. 3.57: Schematische Darstellung der Verteilung Nuc-immunpositiver USSC nach den unterschiedlichen Versuchszeiten.

3.12.2 Ausbreitung der USSC nach Implantation

In allen analysierten Tieren (n=15) wurde der Abstand des ersten Schnittes und des letzten Schnittes bestimmt, in dem Nuc-immunpositive Zellen identifiziert werden konnten. Mit Hilfe der laufenden Schnittnummern und der Schnittdicke (20 µm) ließ sich so rechnerisch die Ausbreitung der USSC in rostro-caudaler Richtung im jeweiligen Gehirn feststellen. Die detektierten Ausbreitungsstrecken sind im Einzelnen in Tab. 3.10 aufgelistet:

Tab. 3.10: Errechnete Ausdehnung der USSC-Verteilung in rostro-caudaler Richtung im adulten Rattenhirn nach Implantation unterschiedlicher USSC-Passagen und Versuchszeiten

Versuchsdauer	55/11	55/16	55/14
2 Tage	1180 μm	600 μm	2060 μm
1 Woche	840 μm	400 μm	1460 μm
2 Wochen	1480 μm	800 μm	1600 μm
3 Wochen	60 μm	1180 μm	800 μm
4 Wochen	800 μm	400 μm	1600 μm

Aus Tabelle 3.10 wird ersichtlich, dass die festgestellten Verteilungsräume der USSC nach Implantation erhebliche Schwankungen aufweisen. Zusammenfassend wurde in keinem der drei Experimente eine kontinuierliche Zunahme der Ausbreitungsdistanz festgestellt. Dennoch wurde in 11 der 15 implantierten Tiere (73%) eine Verteilung der USSC außerhalb der rechnerisch bestimmten Breite des Stichkanals von 700 μm , der Breite des Außendurchmessers einer 22-gauge-Kanüle, beobachtet. Eine deutlich weitere Verteilung der USSC (> 800 μm - 2060 μm) in rostro-caudaler Richtung wurde in 7 der 15 Versuchstiere festgestellt, also bei 47% der Versuchstiere. Zusammen mit den bereits erläuterten Ergebnissen bestehen daher wiederum Hinweise auf migratorische Aktivität der USSC *in vivo*. Die in Tab. 3.10 dargestellten Daten können dies jedoch nicht alleine belegen. Die errechnete Ausbreitung der implantierten Zellen in rostro-caudaler Richtung kann ebenfalls zu einem großen Anteil durch physikalisch passive Verteilung anstelle von aktiver Migration zustande kommen. Die genauen individuellen anatomischen Gegebenheiten am Implantationsort, bzw. das Einhalten der exakten Implantationskoordinaten kann genauso wie beispielsweise der Implantationsdruck oder die Zellcharge erhebliche Bedeutung für die Migrationstätigkeit haben.

3.13 Tumorinzidenz

Um zu beurteilen, ob durch die Implantation der USSC Tumorbildung induziert werden konnte, wurden Rattengehirne zwei Tage, eine Woche und einen Monat nach der Implantation PKH26-markierter USSC stichprobenartig (je $n=3$) mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt. Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbungen wurde die Gleichförmigkeit des umliegenden Gewebes sowie dessen Symmetrie beurteilt. Da zwei Tage nach der Implantation der USSC nicht mit einer Tumorentwicklung zu rechnen war, wurden diese Hirnschnittpräparate als Kontrollfärbungen zur Beurteilung der anderen

Hirnschnittpräparate älterer Versuchstiere genutzt (Abb. 3.58). In Abb. 3.59 und 3.60 sind beispielhaft HE-gefärbte Hirnschnittpräparate eine Woche sowie einen Monat nach Implantation abgebildet. In keinem der aufgearbeiteten Rattengehirne und in keinem der mittels HE-Färbung analysierten Gehirne wurden auffällige Wucherungen oder Asymmetrien festgestellt, weder bei Versuchstieren, die mit PKH26-markierten USSC implantiert wurden, noch nach Implantation unmarkierter Zellen. Es wird daher angenommen, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen kein massives Tumorwachstum nach Implantation der USSC stattfand

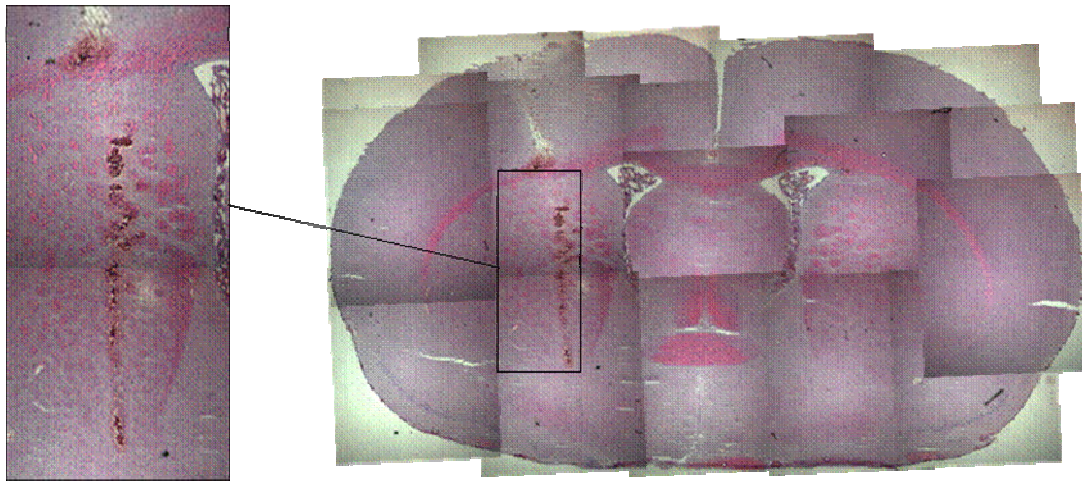


Abb. 3.58: Repräsentative HE-Färbungen zwei Tage nach USSC-Implantation. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die implantierten USSC als dunkelviolette Spur im Bereich der Basalganglien. Da zu diesem frühen Zeitpunkt nach Implantation nicht mit Tumorbildung zu rechnen war, dienten diese Präparate als Kontrollfärbungen.

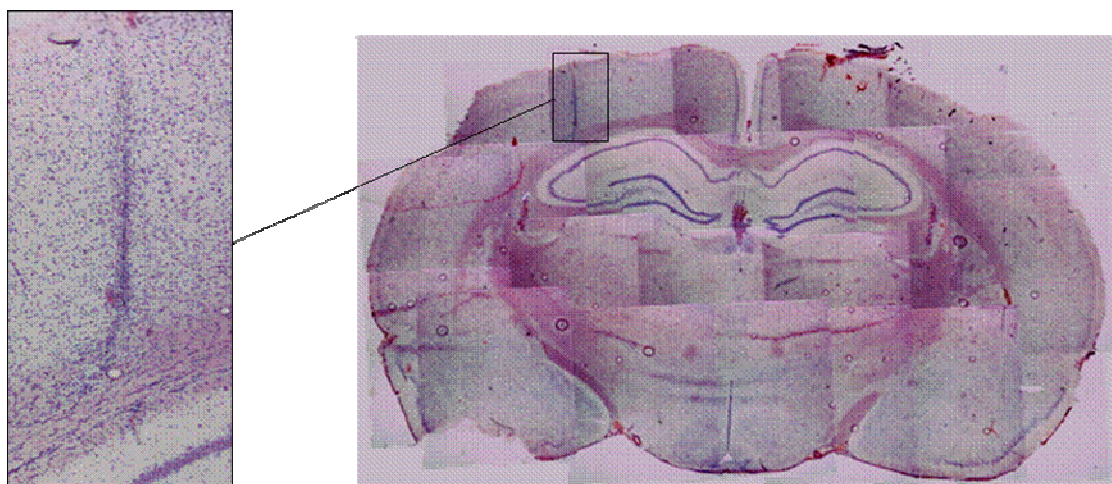


Abb. 3.59: Repräsentative HE-Färbungen eine Woche nach USSC-Implantation im Bereich des Cortex. In keinem gefärbten Hirnschnittpräparat konnten Unterschiede zur Kontrollfärbung nach zwei Tagen sowie Hinweise auf Tumorbildung beobachtet werden.

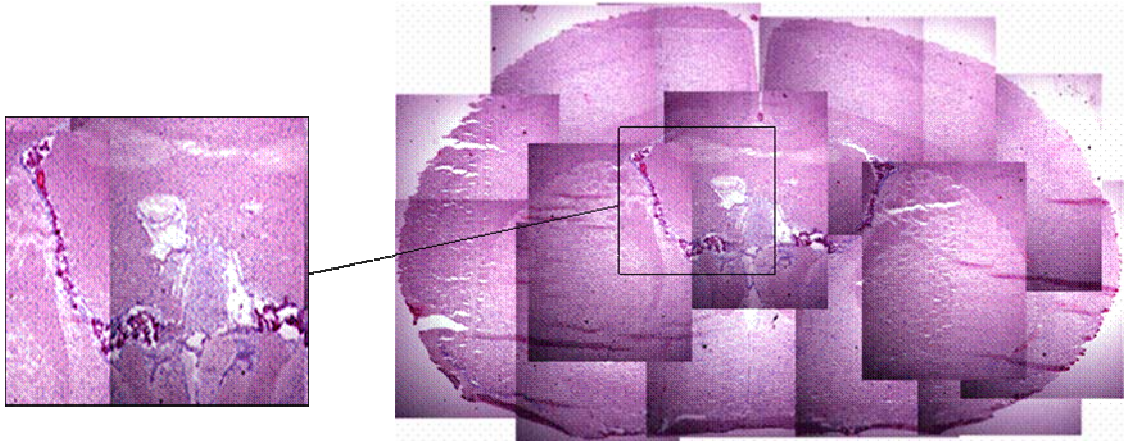


Abb. 3.60: Repräsentative HE-Färbungen einen Monat nach USSC-Implantation im Bereich des Hippocampus. Auch hier konnten nach eingehender Analyse des zunächst unregelmäßig wirkenden Bereiches um den 3. Ventrikel (vergrößerter Ausschnitt) keine Hinweise auf Tumorbildung festgestellt werden.

Gestützt wird diese These auch durch die Tatsache, dass die implantierten Versuchstiere weder Verhaltensauffälligkeiten, die beispielsweise auf das Empfinden von Schmerzen schließen lassen würden, noch äußerlich erkennbare Knoten oder Wucherungen aufwiesen. Eine ausführlichere Analyse des Tumorpotentials der USSC mit spezifischeren Markern (beispielsweise mit Proliferationsmarkern) sowie die Untersuchung von Gehirnen nach längerer USSC-Verweildauer sind zu empfehlen, konnten jedoch im Rahmen dieser umfangreichen Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Differenzierung der USSC in Zellkultur

4.1.1 Neuronale Differenzierung durch XXL-Medium

Die neuronale Differenzierung der USSC durch Inkubation in XXL-Medium wird in der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden gezeigt. Zum einen durch immunocytochemische Färbungen und zum anderen durch quantitative RT-PCR. Der Hauptmarker der immunocytochemischen Analyse ist Neurofilament (NF), ein Intermediärfilament, das aus drei unterschiedlich schweren Ketten (NF-L, NF-M, NF-H) aufgebaut ist. Die NF-Expression stellt ein frühes Ereignis der Embryonalentwicklung im PNS und im ZNS dar und wird zusammen mit dem ersten axonalen Auswachsen in postmitotischen Zellen beobachtet (Cochard und Paulin, 1984). NF wird selektiv in neuronalem Gewebe exprimiert und ist daher neuronal spezifisch. Die Tatsache, dass bereits in naiven USSC neuronale Marker nachgewiesen werden konnten, zeigt den Einfluss des Laminins, mit dem die CS beschichtet wurden, auf die neuronale Differenzierung. Die USSC, die in den Arbeiten von Kögler et al. (2004, und teilw. unveröffentlichte Daten von Kourion Therapeutics) mittels PCR auf die Expression von NF-cDNA hin untersucht wurden, zeigten keine Expression dieser Proteine unter naiven Bedingungen. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit immunocytochemisch analysierten naiven USSC wurde dort die Expression ohne vorherige Aussaat auf Laminin-beschichtete Oberflächen untersucht. Die graphische Darstellung der absoluten Zahlen NF-immunpositiver USSC zusammen mit der jeweiligen Gesamt-Zellzahl nach distinkten XXL-Inkubationszeiten zeigt jedoch, dass es sich nach vier Wochen nicht nur um die angereicherten NF-immunpositiven USSC der naiven Bedingung handelt. So konnte gezeigt werden, dass XXL-Inkubation neben der Anreicherung neuronaler USSC auch zur Differenzierung der Stammzellen führt.

Die neuronale Differenzierung der USSC durch Inkubation in XXL-Medium wird zusätzlich durch die Expression weiterer neuronaler Marker und neuronaler Progenitor-Marker gezeigt. Zu den während der Neurogenese früh detektierbaren neuronalen Proteinen zählt auch beta-III-Tubulin, eine neuronenspezifische Isoform des Tubulins, sowie Tau-Protein, welches Mikrotubuli-assoziiert vorliegt (Katsetos et al., 2003). Beide Proteine können auch zu einem geringen Anteil in naiven- sowie in XXL-differenzierten USSC-Kulturen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde Synaptophysin, ein Protein synaptischer Vesikel, sowie NeuN nach längerer XXL-

Inkubationszeit in USSC exprimiert. Beide Proteine werden reiferen Neuronen zugeordnet (Couillard-Despres et al., 2005). Immuncytochemische Färbungen der USSC weisen auf Synaptophysin-Expressionen in großen Teilen oder in einigen Fällen im gesamten Zytoplasma der Zellen hin, obwohl es sich um ein an den Synapsen lokalisiertes Protein handelt. Dies kann durch hohes Zellsterben während der XXL-Inkubation und die daraus resultierende geringere Zelldichte und den fehlenden Kontakt der USSC mit Nachbarzellen erklärt werden.

Auch als Progenitor-Marker geltende Proteine wie Nestin und Doublecortin (DCX) konnten in USSC detektiert werden. Während Nestin als neuraler Progenitor-Marker beschrieben ist, stellt DCX einen Marker entstehender Neurone dar, der z.B. während der Neurogenese aus endogenen Progenitoren im Hippocampus exprimiert wird (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005). Bei Induktion der endogenen Neurogenese in Versuchstieren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die DCX-Expression mit zunehmender Neurogenesetätigkeit ebenso wie die BrdU-Inkorporation der proliferierenden Stammzellen zunimmt. In Paradigmen zur Analyse der Regeneration wie z.B. bei Rückenmarksverletzungen oder der Kultivierung von Dorsalganglien wird DCX jedoch nicht exprimiert (Couillard-Despres et al., 2005). Letzteres konnte auch in für diese Arbeit durchgeführten Experimenten bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Anstieg der Population DCX-immunpositiver USSC über eine zweiwöchige XXL-Inkubationsdauer beobachtet. Vergleicht man die Quantifizierung des DCX mit der des NF, wird offensichtlich, dass beide Proteine zum selben Zeitpunkt in der USSC-Kultur exprimiert werden und somit eine Co-Lokalisation in Betracht gezogen werden muss. Um festzustellen, ob diese Co-Expression physiologisch ist, wurden Primärkulturen kortikaler Neurone (E16, 1div) ebenfalls immuncytochemisch auf die Co-Expression von DCX und NF hin untersucht. Hierbei ergab sich, dass auch in kortikalen Neuronenprimärkulturen DCX mit NF co-exprimiert wird.

Neben der immuncytochemischen Analyse der USSC nach XXL-Medium-Inkubation konnte die neuronale Differenzierung der Zellen auch durch quantitative RT-PCR gezeigt werden. Die Analyse der USSC, die mit XXL-Medium inkubiert wurden, ergab gegenüber naiven Bedingungen eine hochsignifikante Induktion der neuronalen Gene NF-M und Synaptophysin. Studien der Expression der unterschiedlichen NF-Ketten während der Embryonalentwicklung hatten gezeigt, dass alle drei Ketten, die leichte (NF-L), mittlere (NF-M) und schwere Kette (NF-H), simultan exprimiert werden

(Cochard und Paulin, 1984), so dass die stellvertretende Analyse der mittleren NF-Kette bzw. deren Induktion die neuronale Differenzierung der USSC bestätigt.

4.1.2 Gliale Differenzierung durch XXL-Medium

Neben neuronalen Markern konnte transient auch die Expression des astroglialen Proteins GFAP beobachtet werden. Immuncytochemische Analysen der USSC-Kulturen nach XXL-Inkubation ergaben zeitweise die Co-Expression des neuronalen Markers NF und des Astrozyten-Markers GFAP, was auf eine gemeinsame Vorläuferzelle der beiden Populationen hinweist (Rao, 1999). Während die NF-Expression ausgehend von einer Woche XXL-Inkubation bis zu drei Wochen zunahm, verhielt es sich mit dem Verlauf der GFAP-Expression entgegengesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies anhand der XXL-Inkubation von SA 33 exemplarisch gezeigt, zum einen anhand von GFAP/NF-Doppelfärbungen, zum anderen durch Quantifizierung der GFAP-immunpositiven USSC nach einer bis zu vier Wochen XXL-Inkubation.

4.1.3 Co-Expression von Transmitterphänotypen durch XXL-Medium

Während der XXL-Inkubation konnte die Co-Expression verschiedenster Transmitterphänotypen beobachtet werden. Da der inhibitorische Neurotransmitter GABA während der gesamten XXL-Inkubationsdauer, also zu Zeitpunkten, wo auch Tyrosinhydroxylase (TH), Dopa-Decarboxylase (DDC) und Cholin-Acetyltransferase (CAT) beobachtet werden konnte, stets auf hohem Niveau exprimiert wurde (89-98%), sind Co-Expressionen dieser Transmitter-synthetisierenden Enzyme zusammen mit GABA die Folge. Die gemeinsame Expression der Neurotransmitter-Enzyme mit GABA wurde daher anhand von Doppelfärbungen analysiert. Für GABA/TH-Färbungen ergab sich hierbei eine zeitabhängige Entwicklung. Während der ersten zwei Wochen wurde GABA von weit über 90% der USSC in Kultur exprimiert, TH-immunpositive USSC wurden kaum beobachtet. Nach drei Wochen XXL-Inkubation reduzierte sich der Anteil GABA-immunpositiver USSC erstmals auf unter 90% und TH-immunpositive USSC, die beide Marker co-exprimierten, wurden beobachtet. Nach vier Wochen XXL-Inkubation wurden erstmals TH-immunpositive und GABA-immunonegative USSC beobachtet. Ein physiologisches Beispiel für die Co-Expression des GABAergen und dopaminergen Phänotyps sind mesostriatale dopaminerge Neuronen der Substantia nigra, bei denen diese Co-Expression bereits beobachtet wurde (Gonzalez-Hernandez et al., 2001). Darüber hinaus wurde während der Reifung primärer Rattenzellen in Zellkultur eine ähnliche Transmitterentwicklung

beobachtet (Koller et al., 1990; Siebler et al., 1988). Für DDC und CAT wurde ein anderer Verlauf festgestellt. Nach zwei Wochen XXL-Inkubation wurde sowohl für DDC als auch für CAT der Maximalanteil immunpositiver USSC beobachtet, der sich in den folgenden Wochen wieder verringerte.

Es ist jedoch anzumerken, dass zur Bestimmung des GABAergen Phänotyps der Neurotransmitter selbst nachgewiesen wurde, wobei bei anderen Transmitter-Subtypen Transmitterenzyme nachgewiesen wurden. Es ist zwar durchaus vorstellbar, dass eine Zelle unter Kulturbedingungen in gleich bleibendem Maße einen Neurotransmitter bereithält und auf Enzymebene eine Regulation auftritt, dennoch sollten Neurotransmitter nicht unmittelbar mit einem Transmitter-synthetisierenden Enzym verglichen werden. Auch die Möglichkeit einer negativen Rückkopplung zwischen Neurotransmitter und der Expression des synthetisierenden Enzyms darf nicht vernachlässigt werden. In zukünftigen Studien wird daher die Expression des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD anstelle des Neurotransmitters analysiert werden.

Die XXL-Inkubation humaner Fibroblasten, die als Kontrollzellen dienten, ergab ebenfalls GABA-immunpositive Zellen. Es stellt sich somit die Frage, ob humane Fibroblasten zur Synthese von GABA fähig sind, oder ob die Methode, eine GABAerge Zelle mittels immuncytochemischer Anti-GABA Färbung zu identifizieren, nicht geeignet ist. Bei der immuncytochemischen Analyse der XXL-differenzierten USSC war zu beobachten, dass immunpositive Zellen wie z.B. DDC-, CAT- oder auch GABA-immunpositive häufig distinkt lokalisiert zu finden waren. Es ergab sich daher der Eindruck der klonalen Vermehrung der USSC in Zellkultur, da sich benachbarte USSC durch die gleiche immuncytochemische Markerexpression auszeichneten, im Gegensatz zu weiter entfernt wachsenden USSC. Diese These kann jedoch durch die vorliegende Arbeit nicht bewiesen werden. Eine Möglichkeit hierzu stellt z.B. die Kultivierung einer GFP-markierten USSC zusammen mit unmarkierten USSC dar, wobei anschließend alle aus der markierten USSC hervorgegangenen Zellen immuncytochemisch typisiert werden könnten.

4.2 Proliferation und Zelltod der USSC

Die Ergebnisse der BrdU-Proliferationsexperimente zeigten, dass sich etwa 67% ($\pm 1,1\%$) der naiven USSC-Population innerhalb von 23 h geteilt hat, was durch Einbau und anschließenden Nachweis des BrdU detektiert werden konnte. Nach ein und zwei Wochen XXL-Inkubation teilen sich innerhalb von 23 h nur noch etwa 6% aller

USSC, nach drei Wochen war dieser Anteil bereits nicht mehr detektierbar. Diese Daten belegen zum einen die guten Proliferationseigenschaften der USSC in Zellkultur unter den hier beschriebenen Bedingungen. Zum anderen wird durch die Reduktion der BrdU-immunpositiven USSC nach XXL-Inkubation ersichtlich, dass ein großer Teil der Zellpopulation aus dem Zellzyklus ausgetreten ist. Das Verlassen des Zellzyklus einer Zelle stellt eine wichtige Voraussetzung zur Differenzierung dar und ist ein wichtiger Schritt während der Embryonalentwicklung (Ohnuma und Harris, 2003). Die Ergebnisse der BrdU-Experimente bestätigen daher die immuncytochemischen Färbungen der USSC und zeigen indirekt deren Differenzierung.

Um die Spezifität der BrdU-Inkorporation für proliferierende Zellen zu zeigen, wurde in parallelen USSC-Kulturen zum einen der Anteil BrdU-inkorporierender USSC bestimmt, zum anderen der Prozentsatz apoptotischer USSC mit Hilfe des TUNEL-Kits nachgewiesen (Cooper-Kuhn und Kuhn, 2002). Diese Experimente ergaben, dass der Anteil apoptotischer USSC zwar durch XXL-Inkubation gegenüber der Proliferationsbedingung ansteigt, jedoch weit unter dem jeweiligen Anteil BrdU-inkorporierender Zellen verbleibt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass BrdU-einlagernde Zellen nicht mit der Population apoptotischer USSC identisch sind. Folglich zeigen diese BrdU-Experimente tatsächlich die Proliferation bzw. den durch XXL-Medium induzierten Ausstieg eines Großteils der USSC aus dem Zellzyklus.

4.3 Zusammensetzung des XXL-Mediums

Die Komponenten des XXL-Mediums werden in der Literatur mehrfach im Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung genannt. Neu ist jedoch die Kombination dieser Substanzen, die nicht etwa phasenweise einzeln, sondern gemeinsam zur neuronalen Differenzierung der USSC verwendet wurden (Müller und Rosenbaum, 2001). So ist z.B. bekannt, dass Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, zur neuronalen Differenzierung vieler Zelltypen führen (Pan et al., 2005; Rind und Whittemore, 1999; Sammons et al., 2000). Im XXL-Medium sind mit IBMX (Isobutylmethylxanthin), einem Phosphodiesterase-Inhibitor, und db-cAMP, einem membrangängigen Derivat von cAMP, zwei Substanzen enthalten, die zur Erhöhung des cAMP-Spiegels beitragen. Wurden diese Substanzen nicht zugesetzt, verringerte sich in NXL-Experimenten zwar das Zellsterben, aber es konnte jedoch auch keine Differenzierung der USSC festgestellt werden, weder immuncytochemisch noch morphologisch. Darüber hinaus spielt cAMP auch während der Neurogenese eine wichtige Rolle bei der axonalen Wegfindung und bei der Dendritogenese eines ent-

stehenden Neurons. Auch Retinsäure (RA) führt zur neuronalen Differenzierung verschiedenster Zelltypen (Guan et al., 2001) und ist ebenfalls während der Embryogenese von großer Bedeutung. Die Wachstumsfaktoren NGF und bFGF haben unter den hier dargestellten Versuchsbedingungen zellprotektive Eigenschaften gezeigt. So wurde das Überleben der USSC mit XXL-Medium ohne einen der Wachstumsfaktoren eingeschränkt und führte zu erhöhtem Zellsterben während der Inkubation. Vor allem für NGF ist die protektive Wirkung schon lange bekannt. Rita Levi-Montalcini konnte bereits 1987 zeigen, dass das Überleben zentraler und peripherer Neurone von diesem Faktor abhängt (Levi-Montalcini, 1987). NGF ist neben seinen protektiven Eigenschaften aber auch für neuronale Differenzierung bzw. Induktion der Neurogenese essentiell und führt so zur vermehrten Expression von Neurofilament (Greene, 1978; Kaplan und Stephens, 1994; Tsuneishi et al., 1993). Der ebenfalls im XXL-Medium enthaltene bFGF spielt ebenso wie RA eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des posterioren neuralen Ektoderms während der Embryogenese. Zusätzlich scheint Serum bzw. die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren einen erheblichen Beitrag zur Differenzierung zu leisten. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass unter der NXL-Bedingung mit allen XXL-Faktoren im N2-Medium weniger USSC NF-immunpositiv waren als im Vergleich zum XXL-Medium, dem 15% FCS zugesetzt wurde.

4.4 Induktion des dopaminergen Phänotyps

Durch zusätzliche Inkubation XXL-differenzierter USSC in DA-Medium konnte der Anteil TH-exprimierender USSC erhöht werden. Unabhängig von der Dauer der Vordifferenzierung in XXL-Medium und der Zellpassage der USSC konnte dieser Effekt in drei unabhängigen Experimenten nach 4 h DA-Medium beobachtet werden. Nach 24 h DA-Medium-Inkubation wurde keine weitere Steigerung der TH-immunpositiven Population beobachtet, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um eine schnelle Kinetik bzw. Induktion des Transmitterzyklus handelt und der Prozess nach 4 h seinen Höhepunkt erreicht bzw. das Maximum bereits überschritten hatte. Eine ähnlich schnelle Kinetik wurde in der Literatur bereits für die Induktion der neuronalen Differenzierung einer humanen Neuroblastom-Zelllinie und anderer Zellsorten beschrieben. Auch dort wurden die Zellen mit TPA inkubiert, dem Phorbol ester der auch im DA-Medium enthalten ist (Li et al., 1999; Parrow et al., 1992). Der Verlust der dopaminerg induzierten Population nach Entzug des Induktionsmediums legt den Schluss nahe, dass der unmittelbare Kontakt der Zellen mit Faktoren des DA-

Mediums für die TH-Expression verantwortlich ist bzw. dass Signalkaskaden nicht darüber hinaus aktiviert werden konnten. Neben der Erhöhung des Anteils TH-exprimierender USSC konnte eine auffällige Abrundung der Zellsomata beobachtet werden. Dies wurde bereits auch bei anderen Zellkultur-Experimenten, beispielsweise der TPA-Inkubation von Maus-Keratozyten, beobachtet (Li et al., 1999). Die Abrundung von Zellen durch TPA-Inkubation wurde mit Veränderungen der Phospholipid-Zusammensetzung in den Zellmembranen erklärt (Weinstein, 1980). Die gleiche Kinetik der drei beobachteten Effekte, der TH-Induktion, der Veränderung der Zellkerne und die Abrundung der Somata, legt den Schluss nahe, dass alle drei Reaktionen miteinander zusammenhängen.

Bereits mit anderen Zelltypen konnte neuronale Differenzierung durch TPA, bzw. durch Kombination von TPA und cAMP-erhöhenden Substanzen, beobachtet werden (Dutt et al., 1996; Parrow et al., 1992). Auch in den hier durchgeführten Experimenten ergab die quantitative RT-PCR von USSC-Zelllysaten, dass die Expression der neuronalen Gene NF-M und Syn nach zusätzlicher Inkubation mit DA-Medium gegenüber der alleinigen XXL-Inkubation deutlich erhöht war. Die bereits erwähnte Abrundung der Somata kann Einfluss auf die Integrität der Kernmembran haben, was möglicherweise zu einer Art Stauchung der Kerne und somit zu den beobachteten „Einfaltungen“ der Kerne führte.

Die Tatsache, dass die beobachteten Kernfaltungen und Soma-Abrundungen der USSC nach 4 h Inkubation reversibel waren, belegt, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um apoptotische Prozesse der USSC handelte. Da es jedoch auch im Verlauf der Apoptose zu Zytoplasmakondensationen und Veränderungen der Kernmorphologie kommt und die Überlebensfähigkeit dopaminerg, TH-exprimierender Zellen aus bisher noch unbekannten Gründen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als sehr begrenzt angesehen wird (Hurelbrink et al., 2001; Lindvall et al., 2004; Liste et al., 2004), wurde untersucht, ob nach Induktion mit DA-Medium vermehrt apoptotische USSC zu beobachten sind. Außerdem wurde überprüft, ob sich die als apoptotisch identifizierten USSC durch die beschriebene abgerundete Morphologie auszeichneten.

Die durchgeführten TUNEL-Experimente belegten jedoch, dass es sich bei der Population der USSC, die nach DA-Medium-Inkubation eine Abrundung des Somas und Kernfaltung zeigten, nicht um apoptotische Zellen handelt. Im Hellfeld konnte keinem der apoptotischen Kerne diese charakteristische Morphologie zugeordnet werden.

Die Inkubation der vordifferenzierten USSC in A-Medium, d.h. ohne Dopamin-Zusatz, führte ebenfalls zu einem erhöhten Prozentsatz TH-immunpositiver USSC, einer veränderten Kernmorphologie und abgerundeten Somata gegenüber der XXL-Bedingung. Hieraus ergibt sich, dass Dopamin möglicherweise an dem Effekt der TH-Induktion beteiligt ist, jedoch nicht die alleinige Schlüsselsubstanz in diesem Medium darstellt. Vielmehr scheint der Phorbolester TPA eine Schlüsselsubstanz dieses Mediums zu sein.

Auch die Reduktion der Zellmenge durch DA-Medium Inkubation kann durch TPA erklärt werden. Für Maus-Keratozyten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine 24-stündige TPA-Inkubation, im Gegensatz zu einer 6-stündigen zu Zellablösungen von der Kulturschale, und somit auch zur Reduktion der Zellmenge führt (Li et al., 1999).

Durch quantitative PCR der USSC-Zelllysate konnte jedoch in keiner Probe TH-mRNA detektiert werden. Die Analyse der Kontroll-cDNA aus humanem Gehirn (fötal + adult) zeigte hingegen deutliche Signale, wodurch Fehler im Versuchsaufbau und in der Durchführung zur Erklärung dieser Resultate ausgeschlossen sind. Da die Analyse der TH-Expression gemeinsam mit der NF- und Syn- Expression durchgeführt wurde, also RNA und cDNA der Proben gemeinsam präpariert wurden, scheiden auch Fehler in der Probengenerierung zur Erklärung aus. Interpretiert werden kann dieser Befund, der im Widerspruch zur Detektion TH-immunpositiver USSC nach XXL- und DA-Medium-Inkubation mittels immuncytochemischer Färbungen steht, durch Veränderungen in der für TH codierenden cDNA der USSC, welche durch die im Taqman® Assay enthaltenen Primer nicht erkannt werden konnte, wohl aber die Kontroll-cDNA. Literaturrecherchen ergaben, dass mindestens drei verschiedene Splice-Varianten der TH-mRNA existieren (Grima et al., 1987; O'Malley et al., 1987). Daher muss in weiteren Experimenten geklärt werden, ob der TH-Nachweis aus USSC mit den entsprechenden Primern-Varianten möglich ist. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die Expression des TH-Gens nicht gleichzeitig mit dem TH-Protein erfolgt, sondern in einer schnellen Kinetik exprimiert bzw. herabreguliert wird, so dass das Protein mit Hilfe der Immuncytochemie noch nachgewiesen werden kann, die Transkripte jedoch nicht mehr nachweisbar sind. Auch die Möglichkeit einer negativen Rückkopplung zwischen Protein und Gen muss in Betracht gezogen werden (Spector et al., 1967).

TH ist jedoch das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese einer Zelle, das L-Tyrosin zu L-DOPA verstoffwechselt, welches dann weiter zu Dopamin umgesetzt wird. Da durch die HPLC-Analyse Dopamin im Kulturmedium der USSC nachgewiesen werden konnte, zeigt dieses Ergebnis dennoch indirekt das Vorhandensein und die Funktionstüchtigkeit der TH.

4.5 Funktionalität differenzierter USSC

4.5.1 Spannungsabhängige Na⁺-Kanäle und Patch-clamp

Spannungsabhängige Na⁺-Kanäle sind für das Auslösen von Aktionspotentialen auf einer erregbaren Zelle und damit für ihre Funktionalität unerlässlich. Die Tatsache, dass auf XXL-differenzierten USSC elektrophysiologisch keine spannungsabhängigen Na⁺-Ströme bzw. Na⁺-Kanäle messbar waren, ist auf den ersten Blick nicht mit den immuncytochemischen Na⁺-Kanal-Färbungen und der Dopamin-Ausschüttung nach KCl-Depolarisierung vereinbar. Die Tatsache, dass mit Hilfe der Immuncytochemie Proteinsegmente von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen nachgewiesen wurden, lässt zwar nicht den Schluss der Funktionalität dieser Kanäle zu, zeigt aber die Expression des Moleküls auf Proteinebene. Der verwendete Antikörper ist gegen eine hochkonservierte Proteinschleife zwischen Segment III und IV der Kanäle gerichtet, gibt aber darüber hinaus keinen Aufschluss über die Vollständigkeit des Kanals. Eine Mutation des Proteins, bzw. dass Teile des Kanals nicht oder noch nicht exprimiert worden sind, scheint hinsichtlich der Tatsache, dass in einem Teil der undifferenzierten USSC Na⁺-Ströme gemessen werden konnten, nicht sehr wahrscheinlich. Bleibt die Hypothese, dass Komponenten des XXL-Mediums den Kanal blockieren bzw. dazu führen, dass dieser elektrophysiologisch nicht mehr detektierbar war. Die Proteinkinase A (PKA), welche durch cAMP aktiviert wird, kann beispielsweise Na⁺-Kanäle *in vitro* wie auch *in vivo* phosphorylieren. Neben cAMP selbst ist auch der Phosphodiesterase (PDE)- Hemmer IBMX im XXL-Medium enthalten, der zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der Zellen führt und somit ebenfalls die PKA aktiviert. Durch diese Phosphorylierungen, in der Regel 3-4 Phosphatreste pro Kanal, kommt es zu einer Reduktion des Na⁺-Einwärtsstroms, was dessen Detektion mittels Patch-clamp Technik erschweren könnte (Schreibmayer, 1999).

Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass die XXL-Inkubation zu massivem Zellsterben und daher zu einer beträchtlichen Abnahme der Gesamtzellzahl der USSC in Kultur führt. Diese Reduktion der Zelldichte wiederum könnte die Funk-

tionstüchtigkeit der Na^+ -Kanäle beeinträchtigen. Es würde sich daher anbieten, XXL-differenzierte USSC in Co-Kultur mit Primärzellen, wie z.B. Cortexneurone oder Astrozyten der Ratte, zu kultivieren, um Zell-Zellkontakte der USSC herzustellen sowie die Expression der Na^+ -Kanäle unter anderen Kulturbedingungen ohne den Zusatz phosphorylierender Substanzen zu testen. Es ist aus Experimenten mit Rattenprimärkulturen bereits bekannt, dass eine rein neuronale Kultur schlechtere Überlebenschancen gegenüber einer Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen aufweist. Trophische Faktoren, die von Gliazellen sezerniert werden, verlängern die Kultivierungszeit der Neurone erheblich (Schmalenbach und Müller, 1993). Solche Kulturen sind darüber hinaus auch elektrophysiologisch aktiv und konnten im Neurochemischen Labor der HHU-Düsseldorf bereits mit so genannten Multielektroden-Arrays (MEAs) extrazellulär abgeleitet werden. Da es sich bei einer XXL-inkubierten USSC-Kultur mit zunehmender Kulturdauer ebenfalls um eine neuronale Zellpopulation handelt, könnte vor allem die Kombination XXL-differenzierter USSC mit Gliazellen vorteilhaft sein. Darüber hinaus konnte interessanterweise bisher noch von keiner anderen an umbilicalen Stammzellen forschenden Arbeitsgruppe spannungsabhängige Na^+ -Kanäle in neuronal differenzierten Zellen mittel Patch-clamp Technik abgeleitet werden (Sun et al., 2005).

4.5.2 Funktionalitätstest mit Hilfe der HPLC-Analytik

Mit Hilfe der HPLC-Experimente konnte gezeigt werden, dass USSC in der Lage sind, Dopamin zu synthetisieren und dieses auszuschütten. In 73% aller gemessenen USSC-Proben und in 70% der Medienüberstände der USSC, die unter Differenzierungsbedingungen (XXL und XXL+DA) kultiviert wurden, konnte der Neurotransmitter nachgewiesen werden. Eine proportionale Korrelation zwischen der immunocytochemisch bestimmten TH-Expression und der mittels HPLC bestimmten Dopaminmenge wurde jedoch nicht festgestellt. Immunocytochemisch konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz TH-immunpositiver USSC ausgehend von den Proliferationsbedingungen über die XXL-Inkubation zur XXL+DA-Inkubation ansteigt. Mittels der HPLC-Analyse konnte in 60% der Proben nach XXL+DA-Inkubation mehr Dopamin im Medienüberstand gemessen werden als in der jeweiligen korrelierenden Probe der XXL-Bedingung. Bezieht man jedoch auch die Proben der USSC mit ein, die unter Proliferationsbedingungen kultiviert wurden, ergibt sich, dass in 66% der Messungen in Proben der Naiv-Bedingung mehr Dopamin gemessen wurde als in einer oder beiden korrelierenden Differenzierungsbedingungen (XXL und/oder XXL+DA).

Darüber hinaus konnte Dopamin sowohl nach Inkubation in DMEM (a-Probe) als auch in DMEM/ 56 mM KCl (b-Probe) detektiert werden. Werden die Zellen in DMEM inkubiert, kommt es wahrscheinlich zur spontanen Freisetzung des Neurotransmitters. Diese spontane und von einer Depolarisierung unabhängige Freisetzung von Neurotransmittern wird durch Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs gesteuert und ist für mehrere Zelltypen und Kulturbedingungen bereits beschrieben (Ribeiro et al., 2002; Waters und Smith, 2000). Waters und Smith konnten darüber hinaus zeigen, dass bestimmte Substanzen, wie beispielsweise der Phorbol-ester TPA, das Gleichgewicht zwischen dem Anteil der Reservevesikel und der Menge der sofort zur Neurotransmitterausschüttung einsetzbaren Vesikeln verschieben und so den Anteil spontan freigesetzter Neurotransmitter erhöhen. Nach Ribeiro et al. sollen aber auch IBMX wie auch Forskolin diesen Effekt verursachen. TPA, IBMX und Forskolin sind Bestandteile des DA-Mediums, IBMX ist zusätzlich auch im XXL-Medium enthalten und könnte daher auch hier für die beobachtete Zunahme der spontanen Dopaminfreisetzung verantwortlich sein (Ribeiro et al., 2002; Waters und Smith, 2000).

Die Tatsache, dass auch in Medien-Überständen naiver USSC Dopamin detektiert werden konnte, könnte dadurch erklärt werden, dass auch in der Population der naiven Zellen TH-immunpositive USSC immunocytochemisch nachgewiesen werden konnten. Da in einigen der analysierten Medienüberstände keinerlei Dopamin gemessen wurde bzw. die nach Verrechnung mit der jeweiligen Proteinmenge resultierenden Dopaminmengen enorme Schwankungen aufwiesen, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der gewählten Stabilisierung mit 0,1 mM EDTA nicht um die ideale Stabilisierungsmethode handelt. Jedoch wurden alle in der Literatur für ähnliche Fragestellungen beschriebenen Stabilisierungsmethoden (Neal et al., 2003; Park et al., 2005; Studer et al., 1998) im Rahmen dieser Arbeit getestet und die EDTA-Stabilisierung für die am besten geeignete gehalten. In zukünftigen Experimenten soll die Stabilisierung der Proben jedoch weiter optimiert werden.

4.6. Implantationsort Gehirn: Immunreaktion und Autofluoreszenz

Die Auswertung von Hirnschnittpräparaten mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen oder Markierung von Zellen mit fluoreszenten Farbstoffen kann durch das Auftreten autofluoreszenter Zellen oder Substanzen massiv gestört werden. So kommt es beispielsweise durch stereotaktische Implantationen in das Gehirn von Versuchstieren zu Einblutungen in den Läsionsbereich sowie zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Selbst nach Perfusion der Versuchstiere verbleibt ein Teil

des Blutes im Läsionsbereich, wo es durch massive Autofluoreszenz in cryokonservierten Hirnschnittpräparaten PFA-fixierter Tiere sichtbar ist. Aufgrund der Zerstörung der BHS erfolgt Einwanderung von Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems in das Gehirn. Durch die Immunsuppression mittels Ciclosporin A wird zwar die Aktivierung der T-Zellen unterbunden, nicht aber die unspezifische Abwehr durch Makrophagen oder die Aktivierung von Mikroglia. Sowohl Makrophagen als auch aktivierte Mikroglia können implantierte Zellen phagozytieren. Beide Zelltypen können mit Hilfe von ED-1-Färbungen detektiert werden und zeigen darüber hinaus in den Schnittpräparaten cryokonservierter, PFA-perfundierter Tiere eine deutliche Autofluoreszenz. Bei Implantationen in Bereiche des Hippocampus oder Cortex ist darüber hinaus mit weiteren Interferenzen zu rechnen: Die Hippocampus-Formation des Gehirns unterhält mehrere afferente und efferente Faserverbindungen zwischen Strukturen des Hippocampus und mit Cortexanteilen. Die wichtigste Projektion des Cortex zum Gyrus dentatus ist der bereits 1901 durch Ramon y Cajal beschriebene Tractus perforans. Fasern des Tractus perforans haben ihren Ursprung größtenteils in Neuronen der Schichten II und III des Cortex und durchqueren die Pyramidenzellschicht des Subikulums. Das Terminationsgebiet des Tractus perforans erstreckt sich auf die Körnerzelldendriten, welche sich in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht des Gyrus dentatus verzweigen. Teile des Tractus perforans endigen außerdem an den distalen Anteilen der Pyramidenzelldendriten des Hippocampus und des Subikulums. Zum größten Teil verläuft der Tractus perforans ipsilateral, zu einem kleinen Teil aber auch als so genannter "gekreuzter Tractus perforans" auch zum kontralateral gelegenen Gyrus dentatus. Durch Verletzung dieses Fasertraktes, beispielsweise im Bereich des Cortex, kommt es zur anterograden Degeneration der Axone, was in deren Terminationszone, der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus, transneuronalen Veränderungen hervorruft. Eine davon ist auch die Aktivierung und Proliferation von Mikrogliazellen in diesem Bereich (Grampp, 2000), die unter anderem auch durch massive Autofluoreszenz sichtbar wird.

Abgesehen von phagozytierenden, autofluoreszenten Zellen kann auch die Extrazellulärmatrix in der Umgebung der Zellen zu beträchtlicher Autofluoreszenz führen. Durch die Implantation mit einer 22-gauge-Kanüle entsteht eine großflächige Verletzung des Hirngewebes, die ebenfalls fluoresziert. Eine weitere Substanz, die sich v. a. in älteren Versuchstieren findet und zu falschpositiven Signalen in Fluoreszenzfärbungen führen kann, ist Lipofuchsin. Dieses Pigment reichert sich z.B. in den So-

mata von Cortexneuronen der Ratte an und wird dort als getüpfelte autofluoreszente Struktur sichtbar (Eriksdotter-Nilsson et al., 1989; Xu und Grant, 1988).

4.7 Identifizierung implantierter USSC *in vivo*

4.7.1 Identifizierung PKH26-markierter USSC

Um die USSC *in vivo* möglichst einfach identifizieren zu können, wurden sie mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, der sich in die Zellmembran integriert. Anhand der Verteilung der roten Fluoreszenz im Gehirn des Versuchstieres konnten später die USSC lokalisiert werden. Als Nachteil der PKH26-Markierung stellte sich die äußerst heterogene Anfärbung der Zellmembranen heraus, was die Identifizierung der Zellen erschwerte und eine Quantifizierung unmöglich machte. Bei einer möglichen Proliferation der USSC im Rattenhirn würde sich der membranständige Farbstoff darüber hinaus abschwächen und wäre schließlich nicht mehr detektierbar. Nach Injektion PKH26-markierter USSC in verschiedene Hirnareale wurde die rote Fluoreszenz zwei Tage sowie eine Woche nach Implantation am Implantationsort selbst detektiert. Bei einer Versuchsdauer von einem Monat sowie nach drei Monaten wurden neben massiver Fluoreszenz im unmittelbaren Implantationsbereich auch weit verteilt fluoreszente Strukturen beobachtet. Zusätzlich wiesen ganze Zellschichten im Hippocampus oder Cortex fein punktierte, fluoreszierende Färbungen auf. Für diese Beobachtungen können verschiedene Ursachen diskutiert werden: Wie oben bereits erwähnt, führt die Implantation in oder durch den Bereich des Hippocampus zur Verletzung oder Durchtrennung bestimmter Zelltrakte wie z.B. dem Tractus perforans. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation der Mikroglia der Astrozyten, z.B. im Bereich der Molekularschicht des Gyrus dentatus in beiden Hirnhemisphären (Grampp, 2000; Hailer et al., 1999). Die Proliferation der Mikroglia ist bereits drei Tage nach Läsion detektierbar und hält mindestens bis zu einem Monat nach Läsion an. Die Proliferation dieser Zellen könnte so zu einer massiven Zunahme des Autofluoreszenz-Signals führen und in einer PKH26-ähnlichen Intensität erscheinen. Allerdings wurden diese Beobachtungen nur einen und drei Monate nach Implantation gemacht und nicht zu den frühen Zeitpunkten (2d, 1W), wodurch diese Erklärung nur teilweise in Betracht kommt. Das Austreten des Markierungsfarbstoffes PKH26, insbesondere aus toten bzw. phagozytierten USSC, stellt mit zunehmender Verweildauer der USSC *in vivo* eine weitere Interpretationsmöglichkeit dieser Beobachtungen dar. Kleinere freigesetzte PKH26-Partikel könnten sich an physikalisch dichteren

Strukturen, wie beispielsweise der Pyramidalzellenschicht oder der Körnerzellschicht des Hippocampus, abscheiden. In den vor den Implantationen durchgeführten Zellkultur-Experimenten konnte kein Auslaufen von PKH26 beobachtet werden, allerdings wurden hier keine toten oder phagozytierten markierten Zellen in Kultur beobachtet, sondern eine vitale Co-Kultur. Gegen die These der PKH26-Freisetzung spricht, dass es sich bei dem Farbstoff PKH26 um eine lipophile Verbindung handelt, die eine geringe Affinität zu hydrophiler Gewebsflüssigkeit aufweisen dürfte, sondern eher membranassoziiert vorliegen sollte. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit der beobachteten fluoreszierenden Zellschichten ergibt sich aus den Arbeiten von Nitsch et al. (1997), die zeigen konnten, dass Astrozyten in der Lage sind, Zelltrümmer, wie sie beispielsweise nach Verletzung von Fasertrakten und anterograder Degeneration anfallen, zu inkorporieren. Diese Arbeitsgruppe beschrieb auch die Proliferation von Astrozyten nach solchen Fasertraktverletzungen. Die Inkorporation der PKH26-markierten Zellbestandteile der USSC durch reaktive Astrozyten im Bereich des Hippocampus bzw. im Determinationsgebiet von verletzten Fasertrakten könnte also ebenso der beobachteten Anfärbungen ganzer Zellschichten zu Grunde liegen.

Als Kontrollexperiment wurden tote PKH26-markierte USSC ebenfalls in Rattenhirne implantiert und eine Woche sowie einen Monat später analysiert. Hierbei konnte im Implantationsbereich eine massive rote Fluoreszenz beobachtet werden. Zusätzlich wurden durch ED-1-Färbungen phagozytierende Mikroglia und/ oder Makrophagen identifiziert. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die toten USSC bzw. ihre Bruchstücke *in vivo* von Abwehrzellen phagozytiert wurden. Die massive Fluoreszenz kann entweder durch nicht abgebautes PKH26 oder durch die Autofluoreszenz der phagozytierenden Zellen selbst bzw. die der toten USSC erklärt werden. Somit stellt die PKH26-Markierung der USSC, insbesondere bei längeren Versuchszeiten, keine geeignete Methode zur Identifizierung der Zellen *in vivo* dar.

4.7.2 Identifizierung USPIO-markierter USSC mit Hilfe des MRT

Um die Verteilung und insbesondere eine mögliche Migration der USSC im gesunden adulten Rattenhirn *ex vivo* zu analysieren, wurden USSC mit Eisenpartikeln (USPIOs) markiert und in den Cortex oberhalb des Corpus callosum implantiert. Die USSC wurden im Versuchstier unmittelbar nach der Implantation sowie zu mehreren späteren Zeitpunkten mit Hilfe der hochauflösenden Kernspintomographie (MRT) lokalisiert. Im Verlauf des einmonatigen Beobachtungszeitraums zeigten die MRT-Bilder jedoch keine Positionsveränderung der implantierten USSC. Einen Monat

nach Implantation waren die USSC weiterhin als hypointenses Signal an der Implantationsstelle nachweisbar. Vor der Implantation durchgeführte *in vitro*-Phantommessungen hatten ergeben, dass mit den gewählten Versuchsbedingungen noch bis zu 1.000 mit USPIO markierte USSC im MRT dargestellt werden können. Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente müssen daher dahingehend interpretiert werden, dass die USSC entweder am Ort der Implantation verblieben sind oder aber, vorausgesetzt, die Phantommessungen sind auf die *in vivo*-Situation übertragbar, in Zellverbänden unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 Zellen migrierten. Anzumerken bleibt, dass die Versuchstiere (n=2) jeweils mit derselben Charge USSC implantiert wurden und daher zellspezifische oder Versuchstier-spezifische Effekte für das Ergebnis der Versuche bzw. der nicht beobachteten Migration oder Verteilung verantwortlich sein können.

4.7.3 Immunhistochemische Identifizierung unmarkierter USSC

Unmarkierte USSC, die in das adulte Rattenhirn implantiert wurden, konnten immunhistochemisch mit Hilfe eines gegen den humanen Kern gerichteten Antikörpers (Anti-Nuc) identifiziert werden. In zuvor durchgeführten Zellkulturexperimenten hatte sich der Anti-Nuc-Antikörper als geeigneter Marker zur Identifizierung der USSC herausgestellt, da sowohl proliferierende als auch differenzierte USSC identifiziert werden konnten. Sowohl Proliferation als auch Differenzierung könnten nach Implantation der USSC *in vivo* stattfinden und es musste daher sichergestellt werden, dass für diese Fälle die USSC detektierbar blieben. Durch die zusätzlich durchgeführte DAPI-Kernfärbung der Hirnschnittpräparate wurde die Spezifität der Nuc-Färbung durch Überprüfung der Kongruenz mit der DAPI-Färbung sichergestellt. Dies stellte sich als essentiell heraus, da die immunhistochemische Detektion der implantierten USSC durch die Präsenz anderer fluoreszenter, häufig autofluoreszenter Strukturen erschwert wurde. Die gefärbten Nuc-immunpositiven Strukturen zeichneten sich entweder durch homogene Färbung des gesamten Kerns oder aber durch einen intensiv gefärbten Ring am äußeren Kernrand aus. Bei letzterem musste jedoch sichergestellt werden, dass es sich hierbei nicht um eine zytosolische und somit falschpositive Färbung handelte. Weder getüpfelte noch anders unregelmäßig erscheinende Färbungen wurden als immunpositive Zellen gewertet. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass in keinem analysierten Hirnschnittpräparat des zwei Tage oder vier Wochen alten Kontrolltieres (NaCl) eine Färbung festgestellt wurde, für die die erläuterten Kriterien ebenfalls zuträfen.

Da die USSC nach Implantation in mehreren mikroskopischen Ebenen der 20 µm dicken Schnittpräparate lagen und vor allem bei Kurzzeit-Experimenten äußerst dicht gedrängt im Injektionsbereich vorgefunden wurden, wurde die ursprüngliche Idee, die implantierten USSC zu quantifizieren, verworfen. Auch wenn spätere Zeitpunkte, wie z.B. zwei Wochen nach Implantation, das Quantifizieren der USSC eher erlaubt hätten, hätten die bestimmten Zellzahlen dann jedoch auf die theoretisch implantierte Injektionsmenge von 75.000 USSC/µl als Ausgangswert bezogen werden müssen. Durch diesen Bezug würde der Prozentsatz der vitalen USSC-Population *in vivo* zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten jedoch erheblich verfälscht werden, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die gezählte und zur Implantation vorbereitete Zellmenge mit der Zellmenge *in vivo* zum Start des Experiments identisch war. Zellen der Suspension könnten in der Spritze oder dem Eppendorf-Gefäß verblieben sein bzw. von Blut, Gewebsflüssigkeit oder Liquor bereits unmittelbar nach Injektion ausgewaschen worden sein. Als Schnittdicke wurden 20 µm gewählt, da ursprünglich eine immunhistochemische Phänotypisierung als Doppelfärbung angestrebt wurde, was sich aber später aufgrund der beschriebenen Autofluoreszenzen bzw. ihrer Ausschlussmöglichkeit als nicht durchführbar erwies.

4.8 Überleben und Verteilung implantierter USSC *in vivo*

Die oben beschriebene immunocytochemische Auswertung der Hirnschnittpräparate ergab eine Überlebensdauer der USSC von vier Wochen. Die immunpositiven Zellen wurden hierbei in allen Versuchstieren im Bereich des Cortex und des Corpus callosum (CC) identifiziert. Dies erscheint nicht überraschend, da in allen Fällen diese Areale bei der Implantation durchstoßen wurden. Zu allen Zeitpunkten wurden zusätzlich Nuc-immunpositive Zellen in den Plexi chorioideae der Ventrikel, wie dem lateralen (LV) oder dritten Ventrikel (3V), beobachtet. Hierbei erscheint wahrscheinlich, dass die USSC bereits bei der Implantation selbst in das Liquorsystem des jeweiligen Versuchstieres gelangt sind und sich schließlich in den Plexi abgeschieden haben. In einer überraschend großen Anzahl der Versuchstiere wurden die USSC nicht in den eigentlichen Zielkoordinaten im Hippocampus detektiert. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass Schwankungen der tatsächlichen Implantationskoordinaten oder der individuellen Anatomie des Versuchstieres zu diesem Ergebnis geführt haben. Teilweise wurde vermutlich nicht tief genug implantiert, so dass die Zellen nur an den Rand des Hippocampus, dorsal der Pyramidalzellschicht, gelangen konnten. Bei einer anderen Gruppe der Versuchstiere muss anhand der

vorgefundenen Implantationsspuren in den Gehirnen davon ausgegangen werden, dass die USSC in den angrenzenden lateralen Ventrikel anstelle des Hippocampus injiziert wurden. Diese Variationen der Implantationskoordinaten und somit der morphologischen Gegebenheiten am Zielort der Zellen beeinflusste offensichtlich die Verteilung der implantierten Zellen erheblich. Eine physikalisch dichtere Gewebestelle, wie beispielsweise ein angrenzender Fasertrakt, stellt sicherlich eine andere Ausgangsbedingung für die Verteilung der implantierten Zellen dar, als die Implantation der Zellen mitten in einen Fasertrakt hinein. Bei der Aufarbeitung der Versuchstiere, ergab sich bezogen auf die durchschnittliche Größe eines Rattenhirns ein Fehler in der Position des Stichkanals von etwa 3%. Diese Schwankungen könnten ebenfalls durch den von Tier zu Tier variierenden Implantationsdruck zustande gekommen sein, da bei den stereotaktischen Implantationen in der vorliegenden Arbeit die Injektion nicht maschinell gesteuert, sondern von Hand durchgeführt wurde.

In nur einem Tier wurden nach einem Versuchszeitraum von zwei Wochen Nukleus-immunpositive Zellen in der kontralateralen Hemisphäre beobachtet. Als mögliche Migrationsstrecke in die kontralaterale Hemisphäre kommt aufgrund der beobachteten Verteilung der Zellen der CC in Betracht, der bereits auch von anderen Gruppen als Migrationsbahn unterschiedlichster implantierter Zellen beschrieben wurde (Bulte et al., 2003; Hoehn et al., 2002). Die Migrationsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe der detektierten USSC zwei Wochen nach Implantation exemplarisch auf 15 μm pro Stunde geschätzt. Diese näherungsweise bestimmte Geschwindigkeit ist in der gleichen Größenordnung wie die Migrationsgeschwindigkeit endogener Stammzellen der Maus im Rostral Migratory Stream (RMS), von embryonalen Stammzellen (ESZ) nach Implantation in ein Schlaganfallmodell oder in einem Mausmodell für periphere Myelinisierung (EAE-Modell) (Bulte et al., 2003; Hoehn et al., 2002; Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Die Migration der ESZ nach einem Schlaganfall wurde mit etwa 20-30 μm pro Stunde bzw. die der endogenen Stammzellen im RMS mit etwa 30 μm pro Stunde schneller geschätzt.

Die Migration in die kontralaterale Hemisphäre wurde in der Literatur jedoch stets in Zusammenhang mit einer Läsion wie z.B. einer Photothrombose beobachtet (Hoehn et al., 2002; Ji et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit stellt sich daher die Frage, wieso die implantierten Zellen in nur einem Tier in der kontralateralen Hemisphäre vorgefunden wurden. Da zusätzlich zur Implantationsstelle keine Läsionen gesetzt wurden, könnte es sich daher um eine spontane bzw. natürlich aufgetretene Läsion

handeln, die zum Homing der USSC an dieser Position führte. Eine ungerichtete Migration ist auch vorstellbar, die zur zufälligen Anreicherung der USSC an den beschriebenen Positionen führte. Diskutiert werden muss auch, ob die implantierten USSC in der Lage sind, auf endogene Chemokine zu reagieren, wie dies etwa für humane neurale Progenitoren gezeigt werden konnte, die im adulten Rattenhirn entlang des endogenen RMS migrierten (Fricker et al., 1999). Aufgrund der zuvor beschriebenen Schwankungen in der Position der Injektionsstelle erscheint möglich, dass eben diese Position zu anderen Effekten führte, als in den anderen Versuchstieren. Zusätzlich scheint auch plausibel, dass unterschiedliche Passagen der Zellen, die unweigerlich mit einer Variation der Proliferationseigenschaften einhergehen, auch zu Varianzen anderer Eigenschaften wie beispielsweise der Migrationsfähigkeit führen können. Die beobachtete kontralaterale Wanderung der Zellen wurde nach Implantation der jüngsten KCB 55-Passage beobachtet, die für diese Experimente verwendet wurde.

Auch die Verteilung der hTau-immunpositiven Zellen deutet auf kontralaterale Migration der USSC nach Implantation in das Rattenhirn hin, die Humanspezifität des verwendeten hTau-Antikörpers vorausgesetzt. Eine Anreicherung der hTau-immunpositiven Zellen konnte auch im Hippocampus, Cortex und in Arealen beobachtet werden, die an den CC angrenzen.

Um die Verteilung der USSC in rostro-caudaler Richtung zu untersuchen, wurden Hirnschnittpräparate im Abstand von höchstens 400 μm immunhistochemisch analysiert. Bei dieser Bestimmung der USSC-Ausbreitung wurde von einer wolkenartigen Verteilung der Zellen im Rattengehirn ausgegangen, wenngleich dieses Modell fehlerbehaftet ist, da nicht von einer gleichförmigen dreidimensionalen Verteilung der USSC in rostro-caudaler Richtung ausgegangen werden kann. Es wäre im Gegenteil durchaus denkbar, dass die USSC in kleineren Zellverbänden im Gehirn vorliegen, angepasst an die jeweilige morphologische Struktur. Diese Hypothese kann möglicherweise auch die Ergebnisse der MRT-Messungen nach Implantation USPIO-markierter USSC erklären. Kleinen Zellgruppen könnten auch die Erklärung dafür sein, dass mittels MRT keine USSC-Migration beobachtet werden konnte. Die immunhistochemische Analyse des USSC-Verteilungsraums mittels Nuc-Färbung ergab in 47% der Versuchstiere einen deutlich größeren Verteilungsraum ($>800 \mu\text{m}$ – $2060 \mu\text{m}$) als der rechnerisch bestimmte Außendurchmesser der Injektionskanüle (22-gauge, $700 \mu\text{m}$). Durch diese Experimente erscheint möglich, dass die USSC

über migratorisches Potential verfügen, was auch durch die PKH26-Daten und die hTau-immunhistochemische Analyse der Hirnschnittpräparate impliziert wurde. Jedoch bleibt unklar, zu welchem Anteil die USSC aktiv migriert sind und zu welchem Anteil die beobachtete Verteilung der Zellen um die Implantationsstelle sowie in rostro-caudale Richtung auf einfache physikalische Verteilungsphänomene zurückzuführen ist. Dennoch sind diese Beobachtungen mit denen anderer Arbeitsgruppen in Einklang zu bringen, welche die Verteilung implantierter Zellen um den eigentlichen Injektionsort (z.B. Hippocampus) zeigen konnten (Fricker et al., 1999; Hoehn et al., 2002; Suhonen et al., 1996).

Im Zusammenhang mit der Frage nach dem migratorischen Potential der USSC würde sich jedoch anschließend an diese Arbeit anbieten, deren migratorisches Potential auch *in vitro* beziehungsweise den Besatz der USSC mit typischen Rezeptoren chemokiner Substanzen wie beispielsweise CXCR4 zu untersuchen (z.B. mittels FACS-Analyse).

4.9 Differenzierung der USSC *in vivo*

4.9.1 Neuronale Differenzierung der USSC *in vivo*

Die neuronale Differenzierung der USSC kann in der vorliegenden Arbeit anhand der PKH26-Experimente mit kurzen Überlebensdauern der Versuchstiere sowie der durchgeführten hTau-Färbungen diskutiert werden. Eine Phänotypisierung der immunhistochemisch mit Hilfe des Nuc-Antikörpers identifizierten USSC erschien jedoch, wie bereits erläutert, nicht durchführbar. Es scheint daher sinnvoll, die ausführliche Analyse des Phänotyps der USSC nach Implantation mit Hilfe einer anderen Identifizierungsmethode der USSC zu verknüpfen. In Frage kommen würde hierfür beispielsweise die Implantation GFP-markierter USSC oder aber die Analyse der Hirnschnittpräparate mittels *in situ*-Hybridisierung. Letztere Methode würde auch durch das Vorhandensein autofluoreszenter Strukturen nicht beeinträchtigt werden.

Eine Woche nach Implantation der USSC in den Hippocampus wurden in mehreren Hirnschnittpräparaten PKH26-markierte, NeuN-immunpositive Zellen detektiert. Auffällig war, dass diese Zellen exakt in der Ebene des Gyrus dentatus (DG) beobachtet werden konnten. Dorsal und ventral von der Körnerzellschicht des DG sowie in Versuchstieren, die in andere Regionen implantiert worden waren, wurden keine PKH26-markierten NeuN-immunpositiven Zellen beobachtet. Bezüglich der neuronalen Differenzierung der USSC *in vivo* kann daher von Regiospezifität gesprochen werden. Ein

ähnliches Ergebnis wurde auch in der Arbeitsgruppe von F. Gage nach Implantation adulter Hippocampus-Vorläufer in den intakten Hippocampus beobachtet (Suhonen et al., 1996). Ein interessanter Aspekt dieser Beobachtung ist, dass im adulten Gehirn in der subgranulären Zone des DG die Differenzierung endogener Progenitoren zu Neuronen stattfindet (Gage, 2000). Es ist daher möglich, dass auch die Differenzierung der implantierten USSC aufgrund endogener Signalmoleküle und Gradienten in dieser Region erfolgte.

Um die Morphologie der implantierten USSC drei Monate nach Implantation zu analysieren, wurden Teile der aufgearbeiteten Rattenhirne mit einem humanspezifischen Tau-Protein-Antikörper immunhistochemisch analysiert (Fricker et al., 1999). Die hierbei beobachteten immunpositiven Strukturen konnten aufgrund des Färbeverfahrens nicht im selben Schnitt mit PKH26 korreliert werden, so dass diese Möglichkeit zur Verifizierung der USSC entfiel. Allerdings wurden in Kontrolltieren ohne USSC-Implantation keine immunpositiven Signale detektiert, was als Humanspezifität des verwendeten Antikörpers interpretiert wurde. Dennoch bleibt die Möglichkeit, dass keine Humanspezifität des verwendeten Antikörpers besteht und Mikroglia durch eine bereits beschriebene Verletzung von Fasertrakten im Cortex oder Hippocampus in verschiedensten Arealen des Rattenhirns aktiviert wurden (Grampp, 2000; Hailer et al., 1999). Diese Zellen könnten aufgrund ihrer Morphologie im aktivierten Zustand für neuronal differenzierte Zellen gehalten und fälschlicherweise als USSC identifiziert worden sein. Immunhistochemische Analysen eines mit NaCl-implantierten Kontrolltieres, wo ebenfalls Aktivierung von Mikroglia erfolgen sollte, hätten zur eindeutigen Zuordnung der immunpositiven Signale beigetragen. Dieses Experiment konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden, da der verwendete polyklonale hTau-Antikörper aus dem Handel genommen wurde und kein anderer kommerzieller Antikörper geeignet war.

4.9.2 Gliale Differenzierung der USSC *in vivo*

Eine Woche nach Implantation der PKH26-markierten USSC konnte keine gliale Differenzierung der Stammzellen *in vivo* festgestellt werden. Alle GFAP-Immunfärbungen des Injektionsbereiches zeigten deutlich die dort entstandene Glianarbe, die sich durch das Auftreten GFAP-positiver reaktiver Astrozyten darstellen lässt (Lee et al., 2003). Einen und drei Monate nach Implantation wurden im Striatum jedoch PKH26-markierte GFAP-immunpositive Zellen detektiert, die auf eine gliale Differenzierung der USSC *in vivo* hindeuten könnten. Auffällig ist, dass diese Diffe-

renzierung ausschließlich im Striatum und in keinem anderen Hirnareal der Versuchstiere beobachtet wurde. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die PKH26-Markierung der USSC einen und drei Monate nach Implantation, wie bereits erörtert, nicht mehr zuverlässig ist und es sich daher bei den PKH26-markierten Zellen möglicherweise nicht um USSC handeln könnte. Dennoch zeigen konfokale Aufnahmen die distinkte Co-Expression von GFAP-immunpositiven Zellen mit PKH26-markierten Bereichen. In diesem Zusammenhang kommt eine Studie in Betracht, bei der in einem Hirn-Läsionsmodell nach anterograder Degeneration eines Fasertraktes GFAP-immunpositive Zelldebris-inkorporierende Astrozyten beobachtet werden konnten (Bechmann und Nitsch, 1997; Bechmann und Nitsch, 2000). Die dort gemachten Beobachtungen lenken die Interpretation der Ergebnisse wiederum in eine andere Richtung. Es steht hiermit zur Diskussion, ob reaktive endogene Astrozyten in den beobachteten Fällen PKH26-markierte USSC bzw. PKH26 selbst inkorporiert haben könnten und somit keine gliale Differenzierung der USSC *in vivo* stattfand.

4.10 Tumorinzidenz

In keinem der stichprobenartig mittels Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) überprüften Gehirne konnte ein Hinweis auf Tumorbildung festgestellt werden. Bei der Aufarbeitung der Hirne wurde darüber hinaus auf Symmetrie der Hirnmorphologie geachtet und keinerlei Auffälligkeiten registriert. Es wird daher angenommen, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen kein massives Tumorwachstum nach Implantation der USSC stattfand. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass die implantierten Versuchstiere keinerlei Verhaltensauffälligkeiten aufwiesen, die beispielsweise auf das Empfinden von Schmerzen schließen lassen würden, und sich auch äußerlich keine erkennbaren Knoten oder Wucherungen zeigten.

Auch nach Implantation der USSC in Schafe, die im Rahmen einer groß angelegten USSC-Studie erfolgte, konnte über den Untersuchungszeitraum von sieben Jahren keine Tumorgenese beobachtet werden (Kögler et al., 2004). *In vitro* hatte die FACS-Analyse der USSC darüber hinaus ergeben, dass diese Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut weder HLA-I noch HLA-II exprimieren. Vorläufige Ergebnisse von Kögler et al. (2004) weisen daraufhin, dass USSC ebenso wie fötale und adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) nicht immunogen sind und Tumorwachstum als eher unwahrscheinlich erachtet wird (Le Blanc, 2003). Dennoch kann durch die hier

durchgeführten Experimente zur Implantation der USSC in Rattenhirne nicht auf das generelle Tumorpotential dieser Stammzellen geschlossen werden. So konnte gezeigt werden, dass beträchtliche Unterschiede im Tumorrisiko eines Zelltyps abhängig vom Versuchstier bestehen können. Experimente der Arbeitsgruppe des MPI Köln ergaben in diesem Zusammenhang, dass embryonale Maus-Stammzellen nach Implantation in Rattenhirne keinerlei Tumore hervorriefen, sondern migrierten und differenzierten. Nach homologer Transplantation in Mäuse wurde hingegen massives Tumorwachstum beobachtet (Erdo et al., 2003).

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die neurale Differenzierung humaner Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC) in Zellkultur mittels immunocytochemischer Analysen und quantitativer RT-PCR gezeigt werden. Durch Inkubation der USSC in einer Mischung verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (XXL-Medium) wurde immunocytochemisch ein signifikanter Anstieg neuronaler Proteine beobachtet und durch quantitative PCR bestätigt. Neben der Induktion neuronaler Proteine konnte auch die transiente Expression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP) beobachtet werden. Durch Inkubation der USSC in BrdU-haltigem Proliferations- und XXL-Medium konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zellen unter Einfluss des XXL-Mediums den Zellzyklus verlässt. Dies stellt eine essentielle Voraussetzung zur Differenzierung von Zellen dar und untermauert somit indirekt die Differenzierung der USSC durch XXL-Medium.

Nach Inkubation der USSC im XXL-Medium wurde die Expression verschiedener Transmitter-synthetisierender Enzyme wie z.B. der Tyrosinhydroxylase (TH), dem Schlüsselenzym dopaminerg Neurone, beobachtet. Da nach XXL-Differenzierung jedoch nur ein geringer Prozentsatz (im Mittel $12,9 \pm 1,1\%$) der USSC TH exprimierten, wurde diese Population durch ein zusätzliches Induktionsmedium (DA-Medium, Stull und Iacovitti, 2001) selektiv angereichert. Die anschließende immunocytochemische Analyse ergab eine hochsignifikante Induktion des Anteils TH-immunopositiver USSC. Der Entzug dieses Mediums führte jedoch wiederum zum Verlust der Population, so dass gezeigt werden konnte, dass dieses Protokoll nicht zur Generierung dopaminerg differenzierter USSC, wie sie z.B. für Implantationsexperimente im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung wären, geeignet ist. Durch quantitative PCR-Analyse konnte auch belegt werden, dass die Inkubation der USSC in DA-Medium darüber hinaus zur weiteren Induktion neuronaler Gene gegenüber der XXL-Bedingung führt. Die immunocytochemische Analyse ergab die Expression spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle in naiven sowie in XXL-differenzierten USSC. Um die Funktionstüchtigkeit dieser Kanäle zu untersuchen, wurden naive und XXL-differenzierte USSC mittels Patch-clamp Technik elektrophysiologisch analysiert. Durch diese Experimente konnten in einem Teil der naiven USSC spannungsabhängige Na^+ -Ströme abgeleitet werden, jedoch nicht in XXL-differenzierten USSC.

Um die Expression des Dopamin-synthetisierenden Enzyms TH mit der tatsächlichen Fähigkeit der USSC, den Neurotransmitter zu bilden, zu korrelieren, wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Analysiert wurden neben Mediumüberständen naiver USSC auch XXL- und XXL+DA-Medium differenzierte Zellen. Hierbei konnte in 73% aller Medienüberstände und in 70% der Überstände der differenzierten USSC Dopamin nachgewiesen werden. Durch diese Experimente konnte die Ausschüttung von Dopamin (spontan und durch KCl-Depolarisation) und somit die Fähigkeit der USSC zur Dopaminsynthese gezeigt werden.

Um das Potential der USSC in Hinblick auf Zellersatztherapien weiter abschätzen zu können, wurden die Stammzellen stereotaktisch in adulte intakte Rattenhirne implantiert und verschiedene Methoden angewendet, um die USSC *in vivo* zu analysieren. Um die Stammzellen mittels Fluoreszenzmarkierung zu identifizieren, wurden die USSC vor der Implantation mit PKH26 markiert. Bis zu einer Woche konnten die so markierten Zellen im Hirn der Ratte gut identifiziert und mittels zusätzlicher immunhistochemischer Färbungen phänotypisch analysiert werden. Bei diesen Experimenten ergaben sich erste Hinweise auf neuronale Differenzierung der USSC *in vivo*. So konnten eine Woche nach Implantation der USSC exakt im Bereich der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus NeuN-exprimierende PKH26-markierte Zellen nachgewiesen werden. Analysen mit einem gegen humanes Tau-Protein gerichteten Antikörper (hTau) ergaben darüber hinaus immunpositive Zellen in verschiedenen Regionen des Rattenhirns, wie z.B. dem Hippocampus und Cortex. Diese Ergebnisse bedürfen jedoch der Bestätigung durch weitere Methoden sowie darüber hinaus der Abklärung in Hinblick auf eine mögliche Fusion der Stammzellen mit den Rattenzellen. Darüber hinaus wiesen Beobachtungen auf migratorisches Potential der USSC *in vivo* hin. Mehrfach konnte eine Verteilung der PKH26-markierten Zellen außerhalb des Stichkanals in medial-laterale Richtung beobachtet werden, z.B. in der Region des Corpus callosums und des Hippocampus. Auch hTau-immunpositive Zellen wurden bei Analyse der Hirnschnittpräparate außerhalb des Implantationsbereiches beobachtet. Um das Migrationsverhalten genauer untersuchen zu können, wurden die USSC durch Eisenpartikel (USPIO = ultrasmall paramagnetic iron-oxide particles) markiert und die implantierten Tiere in regelmäßigen Abständen mittels MRT untersucht. Zwar hatten Vorversuche eine gelungene Eisenmarkierung der USSC ergeben, eine Wanderung der Zellen konnte *in vivo* mit dieser Methode jedoch nicht festgestellt werden. Ob jedoch keine Migration der USSC stattgefunden hat,

oder ob die Wanderung in kleinen Zellverbänden erfolgte und daher nicht detektiert werden konnte, bleibt offen. Weitere Hinweise auf Migrationsfähigkeit zeigte die immunhistochemische Identifizierung der implantierten USSC. Hierbei ergab sich in 47% der analysierten Tiere nach Implantation in die Region des Hippocampus in rostro-caudaler Richtung ein deutlich größerer Verteilungsraum der immunpositiven Zellen als es dem Außendurchmesser der Implantationskanüle entsprach. Die neuronale Differenzierungsfähigkeit der USSC *in vivo* konnte mit Hilfe dieser Methode nicht näher untersucht werden, da die Auswertungen durch massive Autofluoreszenz v.a. im Implantationsbereich beeinträchtigt wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse muss weiter nach der optimalen Methode gesucht werden, um einerseits die Frage nach der Differenzierung und zum anderen nach der des Migrationspotentials der USSC *in vivo* zu beantworten. Möglichkeiten hierzu wären z.B. die *in situ*-Hybridisierung, bei der sich das Problem der Autofluoreszenz nicht stellen würde, sowie die Implantation GFP-markierter USSC, wodurch möglicherweise eine einfachere Identifizierung der Zellen sowie die immunhistochemische Analyse des Differenzierungspotentials möglich wären. Bezogen auf das bisher nicht eindeutig abzuschätzende Migrationspotential der USSC *in vivo* würde sich neben der *in vitro* Analyse an Modellsystemen die Implantation der USSC in ein Läsionsmodell (z.B. Photothrombose oder Rückenmarksverletzung) anbieten. Das migratorische Potential der Zellen vorausgesetzt, wäre hier mit Attraktion der USSC zu den beschädigten Bereichen zu rechnen.

Bezogen auf die elektrophysiologisch nachweisbare Funktion der USSC sollte die Kultivierung GFP-markierter USSC zusammen mit Primärzellen sowie die Analyse der USSC -Integration auf Hirnschnittpräparaten Aufschluss über deren elektrophysiologische Funktionalität geben.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, Z. und Brown, R.A. (1999) Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motil.Cytoskeleton* 42: 331-343
2. Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., und Alvarez-Buylla, A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425: 968-973
3. Andrews, P.W. (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* 106: 158-167
4. Bechmann, I. und Nitsch, R. (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 911: 192-206
5. Bechmann, I. und Nitsch, R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20: 145-154
6. Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., und Eichler, H. (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22: 625-634
7. Blau, H.M., Brazelton, T.R., und Weimann, J.M. (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105: 829-841
8. Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., und Kuhn, H.G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J.Comp Neurol.* 467: 1-10
9. Bulte, J.W., Ben-Hur, T., Miller, B.R., Mizrachi-Kol, R., Einstein, O., Reinhartz, E., Zywicke, H.A., Douglas, T., und Frank, J.A. (2003) MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain. *Magn Reson.Med.* 50: 201-205
10. Cochard, P. und Paulin, D. (1984) Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J.Neurosci.* 4: 2080-2094
11. Cooper-Kuhn, C.M. und Kuhn, H.G. (2002) Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 134: 13-21
12. Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.G., und Aigner, L. (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.* 21: 1-14

13. Dutt, K., Ezeonu, I., Scott, M., Semple, E., und Srinivasan, A. (1996) Proto-oncogene expression in cAMP and TPA-mediated neuronal differentiation in a human retinal cell line KGLDMSM. *Curr.Eye Res.* 15: 477-485
14. Ehlers, E. (1996) Analytik II, Originalfragen und Kurzlehrbuch zur "quantitativen pharmazeutischen Analytik" nach dem Gegenstandskatalog GKP1.
15. Englund, U., Fricker-Gates, R.A., Lundberg, C., Bjorklund, A., und Wictorin, K. (2002) Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp.Neurol.* 173: 1-21
16. Erdo, F., Buhrle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Focking, M., Kustermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., Hossmann, K.A., und Trapp, T. (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 23: 780-785
17. Eriksson-Nilsson, M., Gerhardt, G., Seiger, A., Olson, L., Hoffer, B., und Granholm, A.C. (1989) Age-related alterations in noradrenergic input to the hippocampal formation: structural and functional studies in intraocular transplants. *Brain Res.* 478: 269-280
18. Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R.I., Tapscott, S.J., und Turner, D.L. (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127: 693-702
19. Fricker, R.A., Carpenter, M.K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M.A., und Bjorklund, A. (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J.Neurosci.* 19: 5990-6005
20. Gage, F.H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438
21. Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A., und Ray, J. (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J.Neurobiol.* 36: 249-266
22. Gilbert, S.F. (2000) *Developmental Biology*, 6th Edition, Sinauer Associates Inc.
23. Gonzalez-Hernandez, T., Barroso-Chinea, P., Acevedo, A., Salido, E., und Rodriguez, M. (2001) Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur.J.Neurosci.* 13: 57-67
24. Grampp (2000) Proliferation von Mikrogliazellen und Astrozyten im Gyrus dentatus der Ratte nach experimenteller Läsion des entorhinalen Kortex.
25. Greene, L.A. (1978) Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J.Cell Biol.* 78: 747-755

26. Grewal, S.S., Kahn, J.P., MacMillan, M.L., Ramsay, N.K., und Wagner, J.E. (2004) Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood* 103: 1147-1151
27. Grima, B., Lamouroux, A., Boni, C., Julien, J.F., Javoy-Agid, F., und Mallet, J. (1987) A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature* 326: 707-711
28. Grove, J.E., Bruscia, E., und Krause, D.S. (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22: 487-500
29. Guan, K., Chang, H., Rolletschek, A., und Wobus, A.M. (2001) Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res.* 305: 171-176
30. Haas, S.J., Bauer, P., Rolfs, A., und Wree, A. (2000) Immunocytochemical characterization of in vitro PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem.* 102: 273-280
31. Hailer, N.P., Grampp, A., und Nitsch, R. (1999) Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur.J.Neurosci.* 11: 3359-3364
32. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100
33. Harris, R.G., Herzog, E.L., Bruscia, E.M., Grove, J.E., Van Arnam, J.S., und Krause, D.S. (2004) Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 305: 90-93
34. Hatfield, S.D., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Nakahara, K., Carthew, R.W., und Ruohola-Baker, H. (2005) Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435: 974-978
35. Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Schwindt, W., und Buhrle, C. (2002) Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 16267-16272
36. Houbaviy, H.B., Murray, M.F., und Sharp, P.A. (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev.Cell* 5: 351-358
37. Hurelbrink, C.B., Armstrong, R.J., Luheshi, L.M., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., und Barker, R.A. (2001) Death of dopaminergic neurons in vitro and in nigral grafts: reevaluating the role of caspase activation. *Exp.Neurol.* 171: 46-58

38. Jain, M., Armstrong, R.J., Elneil, S., Rosser, A.E., und Barker, R.A. (2003) Migration and differentiation of transplanted human neural precursor cells. *Neuroreport* 14: 1257-1262
39. Ji, J.F., He, B.P., Dheen, S.T., und Tay, S.S. (2004) Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 22: 415-427
40. Kaplan, D.R. und Stephens, R.M. (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J.Neurobiol.* 25: 1404-1417
41. Katsetos, C.D., Herman, M.M., und Mork, S.J. (2003) Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil.Cytoskeleton* 55: 77-96
42. Kenney, A.M., Widlund, H.R., und Rowitch, D.H. (2004) Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development* 131: 217-228
43. Kögler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Meida-Porada, G., Muller, H.W., Zanjani, E., und Wernet, P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J.Exp.Med.* 200: 123-135
44. Koller, H., Siebler, M., Schmalenbach, C., und Muller, H.W. (1990) GABA and glutamate receptor development of cultured neurons from rat hippocampus, septal region, and neocortex. *Synapse* 5: 59-64
45. Le Blanc, K. (2003) Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 5: 485-489
46. Lee, C.Y., Pappas, G.D., Kriho, V., Huang, B.M., und Yang, H.Y. (2003) Proliferation of a subpopulation of reactive astrocytes following needle-insertion lesion in rat. *Neurol.Res.* 25: 767-776
47. Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162
48. Lewis, I.D. (2002) Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Intern.Med.J.* 32: 601-609
49. Li, J., Foitzik, K., Calautti, E., Baden, H., Doetschman, T., und Dotto, G.P. (1999) TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 274: 4213-4219
50. Lindvall, O., Kokaia, Z., und Martinez-Serrano, A. (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat.Med.* 10 Suppl: S42-S50

51. Liste, I., Garcia-Garcia, E., und Martinez-Serrano, A. (2004) The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J.Neurosci.* 24: 10786-10795
52. Lois, C. und Alvarez-Buylla (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148
53. Menezes, J.R., Marins, M., Alves, J.A., Froes, M.M., und Hedin-Pereira, C. (2002) Cell migration in the postnatal subventricular zone. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 35: 1411-1421
54. Minguell, J.J., Erices, A., und Conget, P. (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226: 507-520
55. Müller und Rosenbaum (2001) Mischung zur Differenzierung von Stammzellen oder neuronalen Progenitorzellen in neuronale Zellen (Deutsche Patentanmeldung 101 52 264.9-41).
56. Neal, M., Cunningham, J., Lever, I., Pezet, S., und Malcangio, M. (2003) Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44: 791-798
57. Neher, E. und Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802
58. Neuss, S. und Jahnen-Dechent, W. (2004) vdbiol-Rundschreiben, "Stammzellen in der Medizin".
59. Niwa, H., Miyazaki, J., und Smith, A.G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat.Genet.* 24: 372-376
60. Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., und Jacobsen, S.E. (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat.Med.* 10: 494-501
61. O'Malley, K.L., Anhalt, M.J., Martin, B.M., Kelsoe, J.R., Winfield, S.L., und Ginns, E.I. (1987) Isolation and characterization of the human tyrosine hydroxylase gene: identification of 5' alternative splice sites responsible for multiple mRNAs. *Biochemistry* 26: 6910-6914
62. Ogle, B.M., Butters, K.A., Plummer, T.B., Ring, K.R., Knudsen, B.E., Litzow, M.R., Cascalho, M., und Platt, J.L. (2004) Spontaneous fusion of cells between species yields transdifferentiation and retroviral transfer in vivo. *FASEB J.* 18: 548-550
63. Ohnuma, S. und Harris, W.A. (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40: 199-208

64. Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K.C., Philpott, A., und Harris, W.A. (2002) Coordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129: 2435-2446
65. Pan, Y., Chen, X., Wang, S., Yang, S., Bai, X., Chi, X., Li, K., Liu, B., und Li, L. (2005) In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 327: 548-556
66. Park, C.H., Minn, Y.K., Lee, J.Y., Choi, D.H., Chang, M.Y., Shim, J.W., Ko, J.Y., Koh, H.C., Kang, M.J., Kang, J.S., Rhie, D.J., Lee, Y.S., Son, H., Moon, S.Y., Kim, K.S., und Lee, S.H. (2005) In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J.Neurochem.* 92: 1265-1276
67. Park, S.R., Oreffo, R.O., und Triffitt, J.T. (1999) Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone* 24: 549-554
68. Parrow, V., Nanberg, E., Heikkila, J., Hammerling, U., und Pahlman, S. (1992) Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J.Cell Physiol* 152: 536-544
69. Paxinos, G. und Watson, C. (1998) The Rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edition, ISBN 0-125476175, Academic Press 1998.4th:
70. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., und Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147
71. Pschyrembel (1998) Klinisches Wörterbuch (ed 285), Berlin: Walter de Gruyter.
72. Rao, M.S. (1999) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat.Rec.* 257: 137-148
73. Reh, T.A. und Levine, E.M. (1998) Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J.Neurobiol.* 36: 206-220
74. Ribeiro, L., Azevedo, I., und Martel, F. (2002) Effect of cyclic AMP on PC12 cellular content and release of dopamine and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971: 539-541
75. Rind, H.B. und Whittemore, S.R. (1999) Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase regulate the neuronal differentiation of immortalized raphe neurons. *J.Neurosci.Res.* 56: 177-188
76. Roche Lexikon Medizin (2003) 5.Auflage, Urban & Fischer.
77. Sammons, J., Ahmed, N., Khokher, M.A., und Hassan, H.T. (2000) Mechanisms mediating the inhibitory effect of all-trans retinoic acid on primitive hematopoietic stem cells in human long-term bone marrow culture. *Stem Cells* 18: 214-219

78. Schmalenbach, C. und Müller, H.W. (1993) Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. *J.Chem.Neuroanat.* 6: 229-237
79. Schreibmayer, W. (1999) Isoform diversity and modulation of sodium channels by protein kinases. *Cell Physiol Biochem.* 9: 187-200
80. Siebler, M., Koller, H., Schmalenbach, C., und Muller, H.W. (1988) GABA activated chloride currents in cultured rat hippocampal and septal region neurons can be inhibited by curare and atropine. *Neurosci.Lett.* 93: 220-224
81. Sommer, L. und Rao, M. (2002) Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog.Neurobiol.* 66: 1-18
82. Spector, S., Gordon, R., Sjoerdsma, A., und UDENFRIEND, S. (1967) End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol.Pharmacol.* 3: 549-555
83. Staba, S.L., Escolar, M.L., Poe, M., Kim, Y., Martin, P.L., Szabolcs, P., lison-Thacker, J., Wood, S., Wenger, D.A., Rubinstein, P., Hopwood, J.J., Krivit, W., und Kurtzberg, J. (2004) Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N.Engl.J.Med.* 350: 1960-1969
84. Stem Cell report NIH: Department of Health and Human Services (2001) Stem Cells:Scientific Progress and Future Research Directions.
85. Studer, L., Tabar, V., und McKay, R.D. (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat.Neurosci.* 1: 290-295
86. Stull, N.D. und Iacovitti, L. (2001) Sonic hedgehog and FGF8: inadequate signals for the differentiation of a dopamine phenotype in mouse and human neurons in culture. *Exp.Neurol.* 169: 36-43
87. Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., Kim, V.N., und Kim, K.S. (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev.Biol.* 270: 488-498
88. Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Ray, J., und Gage, F.H. (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383: 624-627
89. Sun, W., Buzanska, L., Domanska-Janik, K., Salvi, R.J., und Stachowiak, M.K. (2005) Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 23: 931-945
90. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., und Scott, E.W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545

91. Tranquillo, R.T. (1991) Chemotactic movement of single cells. *ASGSB.Bull.* 4: 75-85
92. Tsuneishi, S., Sano, K., und Nakamura, H. (1993) Serum depletion increases the neurofilament protein mRNA levels in a neuroblastoma cell line, GOTO. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 17: 119-128
93. Wagner, J.E. und Verfaillie, C.M. (2004) Ex vivo expansion of umbilical cord blood hemopoietic stem and progenitor cells. *Exp.Hematol.* 32: 412-413
94. Wagner, W., Ansorge, A., Wirkner, U., Eckstein, V., Schwager, C., Blake, J., Miesala, K., Selig, J., Saffrich, R., Ansorge, W., und Ho, A.D. (2004) Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* 104: 675-686
95. Waters, J. und Smith, S.J. (2000) Phorbol esters potentiate evoked and spontaneous release by different presynaptic mechanisms. *J.Neurosci.* 20: 7863-7870
96. Weinstein, I.B. (1980) Cell culture systems for studying multifactor interactions in carcinogenesis. *Dev.Toxicol.EnvIRON.Sci.* 8: 149-164
97. Wennersten, A., Meier, X., Holmin, S., Wahlberg, L., und Mathiesen, T. (2004) Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J.Neurosurg.* 100: 88-96
98. Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., und Schoneich, J. (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp.Cell Res.* 152: 212-219
99. Wurmser, A.E. und Gage, F.H. (2002) Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 416: 485-487
100. Wurmser, A.E., Nakashima, K., Summers, R.G., Toni, N., D'Amour, K.A., Lie, D.C., und Gage, F.H. (2004) Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 430: 350-356
101. Xu, Q. und Grant, G. (1988) Collateral projections of neurons from the lower part of the spinal cord to anterior and posterior cerebellar termination areas. A retrograde fluorescent double labeling study in the cat. *Exp.Brain Res.* 72: 562-576
102. Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., und Smith, A.G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-548
103. Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.B., Fötter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., Chen, G.J., Rao, M.S., und Freed, W.J. (2004) Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 925-940

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Werner Müller für die Betreuung meiner Arbeit, für die vielen konstruktiven Anregungen, sowie für die Möglichkeit auf vielen nationalen und internationalen Kongressen Erfahrungen sammeln zu können. Auch Prof. Dr. Heinz Mehlhorn danke ich herzlich für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Claudia Rosenbaum für ihre Betreuung und Einführung in zellbiologische Techniken, für die stereotaktischen Implantationen und vor allem für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt außerdem PD Dr. Patrick Küry für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen insbesondere bei schwierigen Abschnitten dieser Arbeit, sowie seine tatkräftige Unterstützung auf dem Gebiet der Molekularbiologie.

Frau Dr. Kathrin Schnizler, Mitarbeiterin der Bayer AG, danke ich sehr für ihren großen Einsatz bei den elektrophysiologischen Fragestellungen dieser Arbeit.

Frau Dr. Angelica de Souza-Silva (Physiologische Psychologie HHU) danke ich für die HPLC-Analysen, dem MPI Köln für die gute Zusammenarbeit auf der Suche nach den USPIO-markierten USSC, sowie Dr. Andreas Muhs, Mitarbeiter von Kourion Therapeutics, für seine Unterstützung bei der Etablierung des Nuc-Antikörper-Protokolls.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen meinen Kollegen und Mitarbeitern des Neurochemischen Labors für ihre stetige Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die das Arbeiten in diesem Labor zu etwas Besonderem gemacht haben. Insbesondere möchte ich mich bei Tom Wiegand für die große Hilfe bei allen Computerproblemen, bei Fabian Kruse für die vielen guten Diskussionen und statistische Unterstützung, bei Marion Hendricks und Jessica Schira für ihre Hilfe in der Zellkultur, sowie Marcia Gasis für die tatkräftige Unterstützung beim Schneiden der Rattenhirne bedanken.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, ohne die weder mein Studium noch die Promotion möglich gewesen wäre, sowie meinem Lebensgefährten Holger Schade, der mich in schwierigen Phasen dieser Arbeit immer liebevoll unterstützt hat. Meinen Eltern und Holger möchte ich darüber hinaus diese Arbeit widmen.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Düsseldorf, den