

Abteilung Anatomie und Zellbiologie

Professor Dr. Tobias Böckers

Murine neurale Zellkulturen:
Immunzytochemische Untersuchung zur
geschlechtsspezifischen Proliferation und Differenzierung in
Abhängigkeit von Behandlung mit bFGF

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

Matthias Max Johannes Winkler

Hamburg

2004

Amtierender Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	S. 5
2. Material und Methodik	S. 8
2.1 Materialien.....	S. 8
2.2 Voruntersuchungen zu Kultivierungsbedingungen und Immunzytochemie	S. 10
2.3 Methodik.....	S. 11
2.4 Versuchsaufbau.....	S. 14
2.5 Statistische Verfahren.....	S. 14
3. Ergebnisse	S. 16
3.1 Wachstum in Suspensionskultur.....	S. 16
3.2 Wachstum adhaerent kultivierter Zellen.....	S. 16
3.2.1 Entwicklung der Gesamtzellzahl.....	S. 16
3.2.2 BrdU-positive Zellen.....	S. 19
3.2.3 Nestin-positive Zellen.....	S. 23
3.2.4 GFAP-positive Zellen.....	S. 27
3.2.5 MAP2-positive Zellen.....	S. 29
4. Diskussion	S. 33
4.1 Ergebniszusammenfassung.....	S. 33
4.2 Die Rolle von bFGF bei der Differenzierung neuraler Zellen. Proliferationskinetik.....	S. 34
4.3 Die Rolle von bFGF bei der Differenzierung neuraler Zellen. Morphologische Untersuchungen.....	S. 36
4.4 Modell zur Differenzierung neuraler Zellen.....	S. 38
4.5 Einfluss des Geschlechts.....	S. 40
4.6 Anwendbarkeit der Methode zur Zellersatztherapie.....	S. 41
5. Zusammenfassung	S. 42
6. Literaturverzeichnis	S. 43
Danksagung	S. 46

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidine-Biotine-Complex
Ak	Antikörper
AkV	Antikörperverdünner
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-uridin
BSA	bovines Serumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DIV	Day in vitro
dStz	determinierte Stammzelle
ED	Embryonic day
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
gZZ	Gesamtzellzahl
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethan-Sulfonsäure)
ICM	Inner cell mass
m. und ♂	männlich
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MEM	Minimal essential medium
MW	Mittelwert
p _B	p-Wert für den Parameter „ B ehandlung“
p _G	p-Wert für den Parameter „ G eschlecht“
p _Z	p-Wert für den Parameter „ Z eit“
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
SAW	Standardabweichung
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
w. und ♀	weiblich
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Reife Säugetier-Nervenzellen gelten im Allgemeinen als nicht mehr teilungsfähig, wenn gleich Ausnahmen von diesem Diktum beschrieben wurden (*Alvarez-Buyulla und García-Verdugo 2002*). Im Laufe der embryonalen Entwicklung des ZNS, die beim Menschen um den 19. Embryonaltag beginnt, entstehen Nerven- und Gliazellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, so genannten neuralen Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen sind Neuraepithelzellen, die sich aus dem Ektoderm ableiten. Im Verlaufe eines komplizierten, als Neurulation bezeichneten Prozesses beginnen diese Zellen mit der Morphogenese des ZNS und schaffen dabei die Grundlage für dessen spätere Form und Funktion. Mit zunehmender Reife der ZNS-Anlage entstehen aus den Vorläuferzellen Neuro- und Glioblasten, aus denen sich schließlich die Funktionszellen bilden: Gliazellen, denen die Fähigkeit zur geringen Zellteilung erhalten bleibt und postmitotische Neurone (*Sadler 1998*).

Aus jener Eigenschaft der Nervenzellen rühren die Probleme der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, her. Bei dieser Erkrankung kommt es zu irreversiblen und durch Zellteilung eben nicht mehr ausgleichbarem Nervenzelluntergang in bestimmten Hirnregionen.

Neben Pathogenese, Klinik und Therapie ist bei dieser Erkrankung besonders auch die Epidemiologie bedeutsam: Morbus Alzheimer ist der häufigste Grund für Demenz bei alten Menschen. In den USA sind 7% der Menschen über 65 und möglicherweise sogar bis zu 40% der Menschen über 80 Jahren betroffen. Man geht dort von etwa fünf Millionen Erkrankten aus. Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung in den westlichen Ländern betrachtet, wird die zukünftige Bedeutung dieser Erkrankung noch deutlicher. Die alten Menschen sind der am schnellsten wachsende Anteil der Bevölkerung der westlichen Länder. In den USA geht man davon aus, dass sich dort in den nächsten 25 Jahren sowohl die Anzahl der Erkrankten, als auch die Behandlungskosten verdreifachen werden (*Price 2000*). Da bei der Pathogenese ein Mangel an Acetylcholin eine wichtige Rolle spielt, werden unter anderem reversible Cholinesterasehemmer zur Behandlung der Erkrankung eingesetzt. Diese können jedoch den zugrundeliegenden degenerativen Prozess nicht aufhalten und sind darüber hinaus durch eine hohe Zahl unerwünschter Nebenwirkungen belastet (*Poek und Hacke 2001*). Als alternative Behandlungsmethoden werden zunehmend Zellersatztherapien diskutiert.

Die Grundlage solcher Zellersatztherapien stellt die Erforschung neuraler Proliferations- und Differenzierungsprozesse dar und ist ein von weltweit vielen Gruppen bearbeitetes Feld. Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesem Thema. In ihr soll eine Zellkultivierungsmethode untersucht werden mit dem Ziel, aus primärem murinem neuralen Gewebe eine hohe Anzahl von Neuronen zu gewinnen und diese sicher in Kultur zu halten. Das zu beschreibende Verfahren bedient sich dabei zweier Kultivierungstechniken und des Wachstumsfaktors bFGF (Synonym FGF 2), dessen Wirkungen auf das Wachstum und die Differenzierung neuraler Zellen untersucht und beschrieben werden sollen. bFGF ist ein Mitglied der FGF-Polypeptid-Familie, die bei vielen Prozessen der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt (*Ray et al. 1997*). Die Einflüsse von bFGF auf neurale Zellen sind bereits häufig untersucht worden: seit der Arbeit von *Gensburger et al. (1987)* ist bekannt, dass bFGF einen wachstumsfördernden Effekt auf neurale Zellen hat. *Meltzer et al. (1998)* zeigten, dass bFGF wachstumsfördernd auf Neurone wirkt, während *Morrow et al. (2001)* einen fördernden Effekt auf Gliazellen fanden. Auch eine Stimulation der Proliferation Nestin-positiver Vorläuferzellen durch bFGF ist beschrieben worden (*Vicario-Abejón et al. 1995*). Als Vermittler dieser Prozesse können FGF-Rezeptoren gelten, deren Präsenz in murinen Gehirnen von *Bernard et al. (1991)* nachgewiesen werden konnte. Bisher jedoch nicht berücksichtigt wurden mögliche Unterschiede dieser Prozesse in Abhängigkeit vom Geschlecht der kultivierten Zellen, was ein zusätzlicher Gegenstand dieser Arbeit sein soll.

Die Kultivierung der primären Zellen in **Suspensionskultur** geschieht in Anlehnung an die Kultivierung von embryonalen ICM-Stammzellen (Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste) (*Robertson 1987*) sowie von embryonalen Stammzellen einer etablierten Stammzelllinie (*Okabe et al. 1996*). Dieses Verfahren dient dazu, die Stammzellen zur Differenzierung anzuregen. In der vorliegenden Arbeit wird den in Suspensionskultur kultivierten Zellen bFGF zugeführt.

Nach der Kultivierung in Suspensionskultur werden die Zellen in **Adhaesionskulturen** überführt um dort ihre Proliferations- und Differenzierungscharakteristika mit Methoden der Immunzytochemie quantitativ und morphologisch-deskriptiv zu beschreiben und auch den Effekt des Entzuges von bFGF untersuchen zu können. Hierfür werden folgende Marker verwendet: BrdU zur Markierung von DNA-Synthese und Zellproliferation (*Ellwart und Dörmer 1985*), GFAP zur Markierung des für Astrozyten typischen Intermediärfilamentproteins (*Reeves et al.*

1989), MAP2 zur Markierung eines in reifen Neuronen exprimierten, mit Mikrotubuli verknüpften Proteins (*Dotti et al. 1987*) und Nestin zur Markierung des für neuroepitheliale Stammzellen typischen Intermediärfilamentproteins (*Lendahl et al. 1990*). Anhand der folgenden drei Fragen soll die Zellkultivierungsmethode charakterisiert werden:

1. Welche Proliferations- und Differenzierungsprozesse neuraler Zellen finden in Abhängigkeit von bFGF im Laufe der Kultivierung statt?
2. Hat das Geschlecht einen Einfluss auf diese Proliferations- und Differenzierungsprozesse?
3. Ist die Methode im Rahmen einer Zellersatztherapie anwendbar?

2. Material und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere

Erwachsene C57BL/6J (B6) Mäuse wurden über Nacht verpaart, wobei der Tag nach der Paarungsnacht als ED 0 gezählt wurde. ED 13 Embryonen (SSL 10,5 bis 11 mm) wurden am 14. Tag nach der Verpaarung gewonnen. Das Geschlecht der Embryonen wurde visuell durch Beurteilung der Gonadenanlage im Dunkelfeld bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung unterscheidet sich die Hodenanlage von der Ovarialanlage durch die erhaltenen Keimstränge, sowie durch das Vorhandensein der Arteria testicularis, die am Rand der Gonadenanlage entlangläuft. Das Telenzephalon wurde im Bereich des Hirnstiels vom Dienzephalon getrennt. Im Zwischenhemisphärenspalt waren die Hirnhäute noch so fest mit dem Gewebe des angrenzenden medialen Pallium verwachsen, dass dieses Gewebe beim Abpräparieren der Meningen verloren ging. Der Rest der Großhirnanlage wurde entnommen und für die Zellkultur verwendet.

2.1.2 Kulturmedium

N3L-Medium:

- MEM (Biochrom) und HAM F 12 (Gibco/BRL) werden im Verhältnis 1:1 gemischt und die folgenden Zusätze hinzugefügt:
- Insulin (25 µg/ml) (Sigma)
- Laminin (1 µg/ml) (Sigma)
- Progesteron (20 nM) (Sigma)
- Putreszin (100 µM) (Sigma)
- Selen (30 nM) (Sigma)
- Transferrin (50 µg/ml) (Sigma)
- Gentamicin (0,05%) (Gibco/BRL)

bFGF (25 ng/ml) (Gibco/BRL)

2.1.3 Zellkultur

- 3,5 cm-Ø-Suspensionskulturschälchen (Nunc)
- 24er Lochplatten (Falcon)
- Deckgläschen selbst beschichtet mit (Assistent)
- Laminin (10 µg/ml) und (Sigma)
- Poly-Ornithin (15 µg/ml) (Sigma)
- Trypsin (Sigma)

- „Sammelpuffer“:
 - KCl (4 mM) (Merck)
 - HEPES (10 mM) (Sigma)
 - Glucose (2,25 mg/ml) (Merck)
 - BSA (1 mg/ml) (Sigma)
 - in 0,9%iger Kochsalzlösung

2.1.4 Immunzytochemie

- Saponin (Sigma)
- Antikörper:
 - Monoklonales Rabbit-anti-GFAP (Accurat)
 - Monoklonales Mouse-anti-MAP2 (Sigma)
 - Monoklonales Mouse-anti-Nestin (BD Biosciences)
 - Biotinylierter Anti-mouse (Vector)
 - Biotinylierter Anti-rabbit (Vector)
- Vectastain ABC-Kit (Vector)
- DAB (Aldrich)
- Fertige Reagenzien im „BrdU Labeling and Detection Kit II“: (Roche)
 - „Äthanol-Fixans“:
 - 70% Äthanol
 - in Glycin-Puffer (pH 2)
 - Monoklonaler Mouse-anti-BrdU
 - „Inkubationspuffer“:
 - $MgCl_2$ (0,66 mM)
 - 2-Mercaptoethanol (1 mM)
 - in TRIS-Puffer (66 mM)
 - Alkalische-Phosphatase markierter Anti-mouse
 - „Farbsubstratlösung“:
 - Nitroblautetrazolium
 - 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat
 - in TRIS-HCl Puffer (100 mM)
- Glyceringelatine (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Xylol (Merck)

- PB:
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (83 mM) (Merck)
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (105 mM) (Merck)
 - in bidestilliertem Wasser
- PBS:
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (2,8 mM)
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (7,8 mM)
 - NaCl (0,15 M) (Merck)
 - in bidestilliertem Wasser
- AkV:
 - 0,5% BSA (Sigma)
 - 0,05% Natriumazid (NaN_3) (Merck)
 - in PBS
- 2 %ige Paraformaldehydlösung:
 - Paraformaldehyd (0,02 g/ml) (Merck)
 - in bidestilliertem Wasser und
 - PB im Verhältnis 1:1
- TRIS-HCl:
 - 50 mM TRIS ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (USB)
 - in HCl (Zugabe bis pH 7,6) (Merck)

2.2 Voruntersuchungen zu Kultivierungsbedingungen und Immunzytochemie

Um das endgültige, weiter unten (vergleiche **2.3.1 Zellkultur**) beschriebene Kultivierungsverfahren zu entwickeln war es zunächst nötig, einige Voruntersuchungen zu den optimalen Kultivierungsbedingungen sowie zur Technik der immunzytochemischen Antigendetektion durchzuführen.

2.2.1 Kultivierungstechnik

Durch die Verwendung eines serumhaltigen Mediums als primärem Kultivierungsmedium, das erst nach 24 Stunden durch das serumfreie N3L-Medium ersetzt wurde, ergaben sich Probleme bei der Kultivierung sowie bei der Passage der in Suspensionskultur kultivierten Zellen. Die Zellen formten keine Aggregate, sondern bildeten einen gleichmäßigen Zellrasen. Während des Passageprozesses formten sich Zellaggregate, die sich kaum dispergieren ließen. Diejenigen einzelnen Zellen, die nach der Passage zum adhaerenten Wachstum in die Lochplatten ausgesät

wurden, wuchsen oft nicht mehr an. Nach 24 Stunden fanden sich viele abgeschwommene Zellen im Kultivierungsmedium.

Daraufhin wurde auf die Verwendung von Serum im primären Kulturmedium verzichtet und die Zellen sogleich im serumfreien N3L-Medium ausgesät. Darunter bildeten die Zellen in der Suspensionskultur Aggregate (**Abb. 2c**), die sich dann während der Passage verhältnismäßig gut dispergieren ließen.

2.2.2 Immunzytochemie

Zur Detektion von mitotischen Zellen wurde zunächst ein PCNA-Ak (Leinco Technologies) verwendet. Unter mikroskopischer Betrachtung von mehreren Kulturen, bei denen die Detektion mittels PCNA-Antikörper und Färbung nach ABC-Methode durchgeführt worden war zeigte sich, dass es zu keinen spezifischen Färbereaktionen mit Zellen gekommen war. Darüber hinaus fanden sich immer wieder Zellen, bei denen auch das Zytoplasma eine Färbereaktion zeigte. Auch bei der Gegenprobe mit teilungsaktiven SHEP-Neuroblastomzellen zeigte sich dieses Bild. Aus diesem Grunde wurde die Markierung von mitotischen Zellen nun durch Zugabe und Detektion von BrdU versucht, was zu spezifischen Färbereaktionen führte (**Abb. 6**).

Zur Detektion der Zellen, die ein gliazellspezifisches Antigen exprimierten, wurde zunächst ein Vimentin-Ak (BioTrend) verwendet. Bei der Betrachtung von mehreren Kulturen, bei denen die Antigen-detektion mit dem Vimentin-Ak und die Färbung nach ABC-Methode durchgeführt wurde, zeigte sich, dass es zu keinerlei Färbereaktion mit Zellen gekommen war. Zur Gegenprobe wurden Hirnschnitte von erwachsenen B6-Mäusen mit dem selben Vimentin-Ak inkubiert und nach ABC-Methode gefärbt, wonach es zu einer kräftigen Färbereaktion kam. Darauf hin wurde ein GFAP-Ak versucht, mit dem sich Zellen dann spezifisch anfärben ließen (**Abb. 9**).

2.3 Methodik

2.3.1 Zellkultur

Nach Geschlechtsbestimmung wurden die Gehirne wie oben erläutert präpariert und nach Geschlechtern getrennt in „Sammelpuffer“ gesammelt. Das Gewebe mehrerer Embryonen wurde gepoolt, um daraus die Zellen für die Zellkultur zu gewinnen. Das Gewebe wurde für die Dauer von zehn Minuten in einer 0,1%igen Trypsinlösung bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mechanisch dissoziiert und durch ein steriles Nylonnetz (Porengröße 30 µm) filtriert. 2×10^6 Zellen wurden in 3,5 cm-Ø-Suspensionskulturschälchen in einem Volumen von 2,5 ml N3L-Medium ausgesät.

Die Zellen wurden unter Zugabe von bFGF im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem wasserdampfgesättigtem, 5% CO₂ enthaltendem Luftgemisch inkubiert. Dieser Zeitpunkt entsprach DIV 0.

Zur Bestimmung der Wachstumskurve in Suspensionskultur wurde jeden Tag (von DIV 1 bis DIV 6) je Geschlecht ein Schälchen entnommen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben dissoziiert (nur fünfminütige Trypsininkubation) und die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt.

Da am DIV 4 für beide Geschlechter die höchste Zellzahl vorlag (**Abb. 3** und **Tab. 2**), wurden die Zellen für die Untersuchungen an adhaerent wachsenden Zellen zu diesem Zeitpunkt passagiert. Dafür wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Methode dissoziiert (nur fünfminütige Trypsininkubation) und anschließend mit einer Dichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen/cm² in einem Volumen von 500 µl auf mit Laminin und Poly-Ornithin beschichteten Deckgläschen in 24er Lochplatten ausgesät. Als Medium wurde weiterhin das N3L-Medium verwendet, jedoch erhielt je Geschlecht nur die Hälfte der Zellen weiterhin bFGF, die andere Hälfte nur ein entsprechendes Volumen Medium. Die Zellen wurden nach der Passage noch für unterschiedlich lange Zeiträume (bis DIV 5, DIV 9 oder DIV 13) weiter inkubiert. Unter Abnahme und Zugabe von 250 µl N3L-Mediums, sowie Zugabe von bFGF für das Volumen von 500 µl wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen und schließlich fixiert. Ein zusammenfassendes Schema zur Zellkultur ist in (**Abb. 1**) dargestellt.

2.3.2 Immunzytochemie

2.3.2.1 Nachweis von GFAP, MAP2 und Nestin

Die Zellen wurden mit PBS gespült, anschließend mit 2%igem Paraformaldehyd für 15 min fixiert und wieder mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit 0,05% Saponin in PBS für die Dauer von 30 min permeabilisiert und für eine Stunde mit 1% BSA in PBS geblockt. Dann wurden die Zellen mit den 1. Antikörpern in AkV über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert, wobei der GFAP-Ak 1:1250, der MAP2- und der Nestin-Ak je 1:1000 verdünnt wurden. Die Zellen wurden mit PBS gespült und für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Mouse-, bzw. Rabbit-Ak, jeweils 1:500 in AkV verdünnt, inkubiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gespült. Danach wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (0,625% Avidin und 0,625% Biotin in PBS) aus dem Vectastain ABC-Kit zugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der an die zytosolischen Proteine der Zellen gebundene Antigen-Antikörper-Komplex mit

0,075% DAB und 0,05% H₂O₂ in TRIS-HCl gefärbt (Färbung nach ABC-Methode). Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser gespült. Die Deckgläschen wurden aus den Lochplatten entfernt, mit Isopropanol und Xylol entwässert und auf Objektträgern eingedeckelt.

2.3.2.2 Nachweis von BrdU

Am Tag vor der Fixierung wurde den betreffenden Kulturen BrdU, in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt und für eine Dauer von 20 h inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gespült, anschließend mit „Äthanol-Fixans“ für 20 min bei -20°C fixiert und wieder mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit 0,05% Saponin in PBS für die Dauer von 30 min permeabilisiert und für eine Stunde mit 1% BSA in PBS geblockt. Die Zellen wurden nun mit dem monoklonalen Mouse-BrdU-Ak 1:500 in „Inkubationspuffer“ verdünnt über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gespült und für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Alkalische-Phosphatase-markiertem, in PBS 1:500 verdünntem, Mouse-Ak inkubiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gespült, danach für die Dauer von 40 min mit der „Farbsubstratlösung“ gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Deckgläschen wurden aus den Lochplatten entfernt, mit Isopropanol und Xylol entwässert und auf Objektträgern eingedeckelt.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der in Suspensionskultur herangewachsenen Zellen, wurde mit der Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau zur Färbung nicht-vitaler Zellen unter einem 10er Objektiv durchgeführt und in Einfachzählungen jedes Schälchens jeweils die vier Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt. Das Verhältnis nicht-vitaler zu vitalen Zellen schwankte etwa zwischen 1:3 und 1:5. Stets fand sich auch Zelldetritus.

Zur Bestimmung der Zellzahl der nach der ABC-Methode gefärbten Zellen, wurden ein 40er Objektiv und DIC oder die normale Durchlichttechnik verwendet. Die Deckgläschen wurden entlang eines Durchmessers durchgemustert, wobei in jedem zweiten Gesichtsfeld die Anzahl der gefärbten Zellen bzw. die Anzahl aller gefärbten und ungefärbten Zellen (zukünftig Gesamtzellzahl) ausgezählt wurde. Die Fläche eines Gesichtsfeldes betrug $37 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Durchschnittlich wurde pro Deckgläschen die Zellzahl auf 18 Gesichtsfeldern ausgezählt und aus diesen Werten ein Mittelwert gebildet.

Zur Bestimmung der Zellzahl der Zellen, die mit der „Farbsubstratlösung“ gefärbt worden waren, wurden ein 63er Ölimmersionsobjektiv und DIC verwendet. Die Deckgläschen wurden wie oben beschrieben durchgemustert, wobei die Fläche eines Gesichtsfeldes hier $15 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ betrug. Im Durchschnitt wurde pro Deckgläschen die Zellzahl auf 29 Gesichtsfeldern ausgezählt und aus diesen Werten ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde zum Vergleich mit der Anzahl der gegen die anderen Antigene immunreaktiven Zellen auf die Fläche des 40er Objektivs normiert.

2.4 Versuchsaufbau

Für die Untersuchungen des Wachstums in Suspensionskultur wurden je Geschlecht und Kultivierungsdauer drei unabhängige Kulturen angelegt und aus getrennten Zählungen ein Mittelwert gebildet. Nur zur Bestimmung der Zellzahl am DIV 4 wurden bei beiden Geschlechtern je sechs verschiedenen Kulturen verwendet.

Die Untersuchungen an den Adhaesionskulturen wurden als Doppeluntersuchungen mit Zellmaterial aus zwei unabhängigen Suspensionskulturen durchgeführt. Dabei wurde für jeden Untersuchungszeitpunkt am DIV 4 Zellmaterial aus jeweils zwei Suspensionskulturschälchen entnommen, vereint, gezählt und dann nach Geschlechtern getrennt auf zwei Lochplatten in je 16 Löcher mit oder ohne bFGF ausgesät. Je zwei der Adhaesionskulturen wurden nach der Fixierung als Duplikate der immunzytochemischen Detektion eines der vier Antigene unterzogen. An je einer einzelnen Adhaesionskultur erfolgte dann auch die Bestimmung der Gesamtzellzahl. Dieser Vorgang wird für die Beobachtungszeitpunkte DIV 5, DIV 9 und DIV 13 durchgeführt.

Somit waren zur Ermittlung der Anzahl immunreaktiver Zellen für jeden Beobachtungszeitpunkt beide Geschlechter, + und – bFGF sowie für jedes Antigen 2x2 Kulturen, für die Ermittlung der Gesamtzellzahl 2x1 Kultur verfügbar.

Bei der Darstellung der Untersuchungsergebnisse aus den Suspensions- wie auch den Adhaesionskulturen werden sowohl eine Gesamtanalyse ohne Berücksichtigung des Geschlechts, als auch eine nach Geschlecht differenzierte Analyse vorgelegt. Eine geschlechtsspezifische Analyse der Morphologie der immunreaktiven Zellen erschien im Rahmen der durchgeführten rein deskriptiven Untersuchung nicht angezeigt.

2.5 Statistische Verfahren

Zur Prüfung der statistischen Wertigkeit wurde bei den Adhaerenzkulturen für die Marker BrdU, GFAP, MAP2 und Nestin für die Parameter „Behandlung“, „Geschlecht“

und „Zeit“ mittels des Anova-Tests eine orientierende Varianzanalyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p = 0,05$ festgelegt. Im Text werden bei den jeweiligen Markern nur die p-Werte derjenigen Parameter erwähnt, die unterhalb des Signifikanzniveaus lagen. Eine Gesamtdarstellung der ermittelten p-Werte ist in (Tab. 1) wiedergegeben.

Tabelle 1: Gesamtdarstellung der p-Werte der orientierend durchgeführten Anova-Varianzanalyse für die Marker BrdU, GFAP, MAP2 und Nestin für die Parameter Behandlung, Geschlecht und Zeit. Diejenigen p-Werte, die unterhalb des Signifikanzniveaus von $p = 0,05$ liegen, sind mit einem Sternchen (*) markiert.

Marker	Behandlung	Geschlecht	Zeit
BrdU	0,0001*	0,1373	0,0002*
GFAP	< 0,0001*	0,0613	< 0,0001*
MAP2	0,0214*	0,9836	< 0,0001*
Nestin	< 0,0001*	0,2939	< 0,0001*

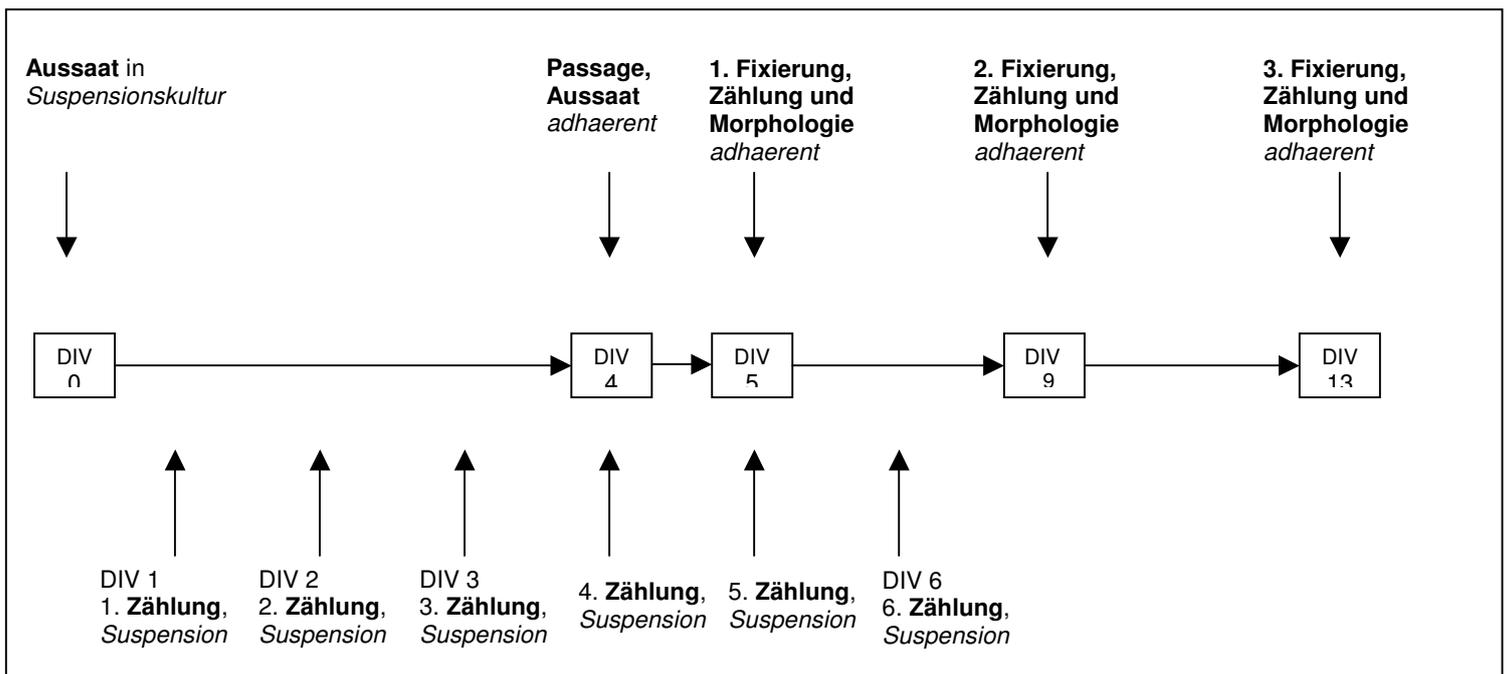


Abbildung 1: Schema zur Zellkultur.

Alle Zellen werden am DIV 0 in Suspensionskultur ausgesät. Jeden Tag (von DIV 1 bis DIV 6) wird eine Zählung der heranwachsenden Zellen durchgeführt. Am DIV 4 werden die nicht für die kontinuierliche Zählung vorgesehenen Zellen passagiert und in eine Kultivierungsmethode überführt, die ein Anwachsen der Zellen erlaubt. Die nun adhaerent wachsenden Zellen werden für unterschiedlich lange Zeiträume weiter kultiviert: eine Gruppe wächst für einen weiteren Tag (Fixierung am DIV 5), eine zweite für weitere fünf Tage (Fixierung am DIV 9) und die letzte Gruppe weitere neun Tage (Fixierung am DIV 13). Der gesamte Kultivierungsprozess von DIV 0 bis DIV 13 wird unabhängig zweimal durchgeführt. Die adhaerenten Zellkulturen werden für jede Messung in Duplikaten weitergeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum in Suspensionskultur

3.1.1 Morphologie

Sechs bis acht Stunden nach der Aussaat am DIV 0 lagen die Zellen einzeln in der Suspensionskultur vor. Bei den meisten Zellen handelte es sich um kleine runde Zellen, einige wiesen jedoch einen Fortsatz auf, oder waren bereits bipolar (**Abb. 2a**). Am DIV 1 hatten sich bereits Aggregate entwickelt, zwischen denen einzelne Zellen lagen. Während diejenigen Zellen, die sich in den Zentren der Aggregate befanden weiterhin ihre runde Form beibehielten, bildeten die an den Rändern der Aggregate gelegenen Zellen häufig Fortsätze aus. Über Zellen mit solchen Fortsätzen waren einzelne Aggregate mit anderen verbunden (**Abb. 2b**). Die Aggregate nahmen bis zum DIV 4 deutlich an Größe zu. Die an den Rändern gelegenen Zellen differenzierten sich weiter. Dort ließen sich zahlreiche bi- oder multipolare Zellen beobachten. Im Zentrum befindliche Zellen behielten ihre runde Form bei. Die Dichte einzelne Aggregate verbindender Fortsätze nahm ebenfalls zu (**Abb. 2c**). Abgesehen von der größeren Anzahl im Medium schwimmender Zellen, änderte sich das Bild bis zum DIV 6 nicht (**Abb. 2d**).

3.1.2 Wachstumsverlauf

Am DIV 0 wurden je Geschlecht $2,0 \times 10^6$ Zellen pro Suspensionskulturschälchen ausgesät. Zum DIV 1 kam es zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl pro Schälchen. Danach nahm die Zellzahl bis zu einem Maximum am DIV 4 stetig zu, um danach kontinuierlich abzunehmen.

In der Phase stetigen Zellwachstums von DIV 1 bis DIV 4 zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied. In den Anfangs- und Endphasen, mit jeweils abnehmenden Zellzahlen, fanden sich jedoch geringfügig höhere Zellzahlen in den weiblichen Kulturen (**Abb. 3** und **Tab. 2**).

3.2 Wachstum adhaerent kultivierter Zellen

3.2.1 Entwicklung der Gesamtzellzahl

Am ersten Tag nach der Aussaat auf die beschichteten Deckgläschen (DIV 5) war noch kein Unterschied des Mittelwertes der Gesamtzellzahl zwischen den mit oder ohne bFGF weiterkultivierten Kulturen auszumachen. Zum DIV 9 fand sich bei den +bFGF-Kulturen ein Anstieg der Gesamtzellzahl, der sich mit etwas abgeflachtem Kurvenverlauf bis zu DIV 13 fortsetzte. Bei den -bFGF-Kulturen kam es zu einem

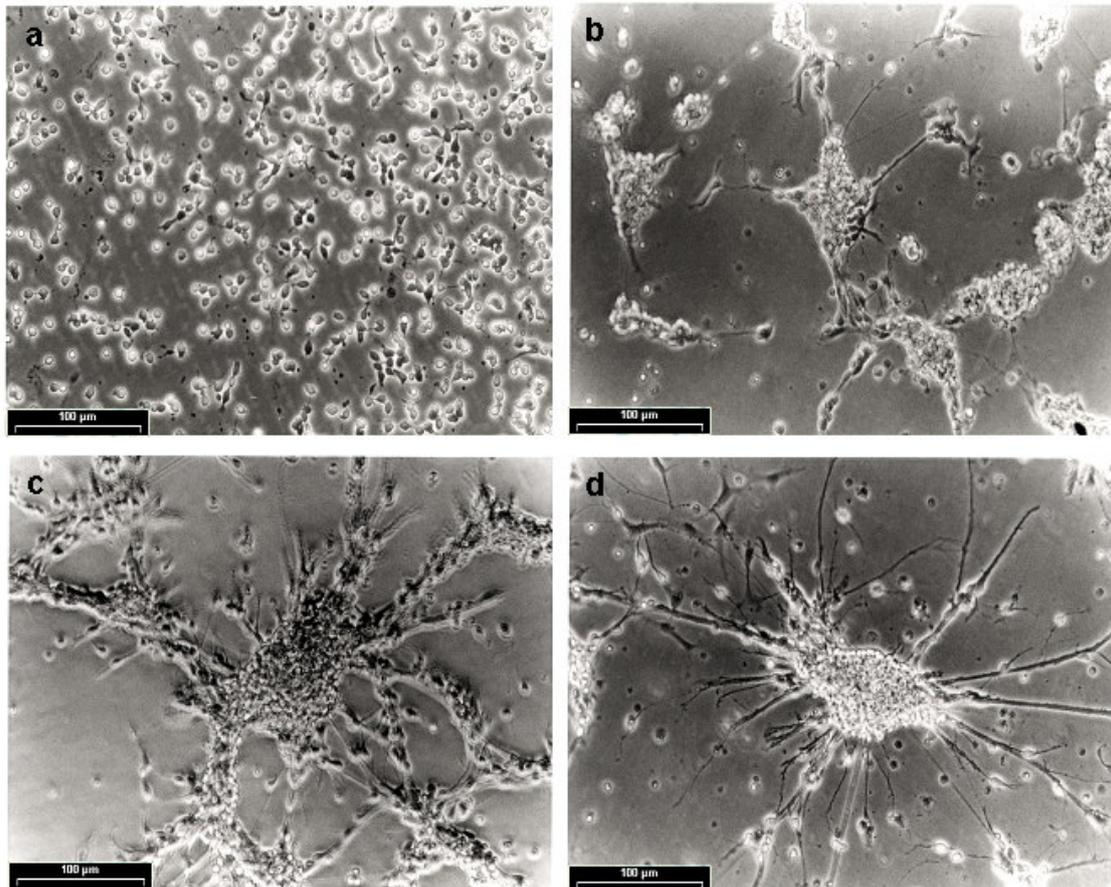


Abbildung 2: Morphologie in Suspensionskultur, unter kontinuierlicher Behandlung mit bFGF heranwachsender Zellen, zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten im Phasenkontrast. Aufnahmen von **a)** DIV 0 (sechs bis acht Stunden nach der Aussaat), **b)** DIV 1, **c)** DIV 4, **d)** DIV 6. Der Messbalken entspricht 100 µm.

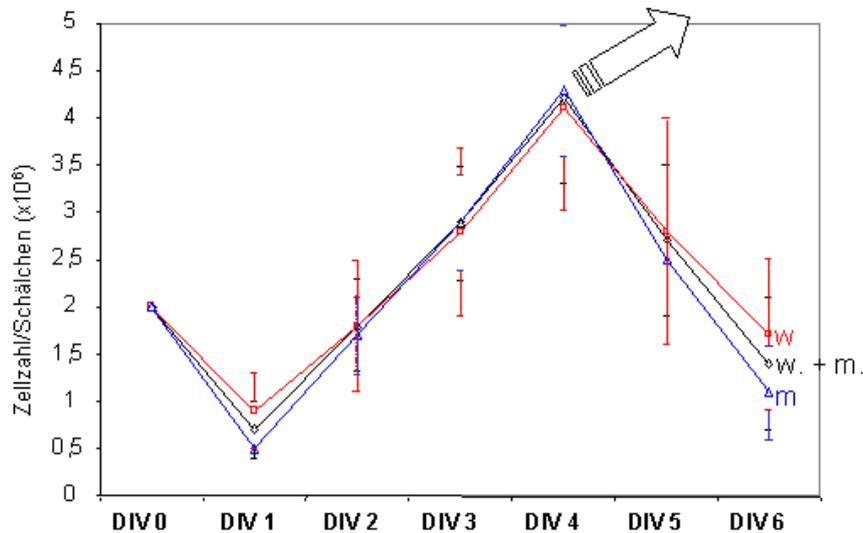


Abbildung 3: Zellwachstum in **Suspensionskultur** von DIV0 (Tag der Aussaat) bis DIV6. Differenzierte Werte für weibliche (w.) und männliche (m.) Kulturen sowie ein aus diesen gebildeter gemeinsamer Wert (w.+m.). Jeder dargestellte Wert entspricht einem Mittelwert, der mit Hilfe der Zählkammer für jedes der Geschlechter und jeden DIV unabhängig dreimal durch das Auszählen der Zellzahl eines einzelnen Schälchens ermittelt wurde. Für die Berechnung des Mittelwertes am DIV 4 wurden für jedes Geschlecht sechs Schälchen ausgezählt. Die Balken geben die Standardabweichung wieder. Am DIV 4 Passage der Zellen und Aussaat als adhaerente Kulturen.

Tabelle 2: Messwerte zur Bestimmung des Zellwachstums in **Suspensionskultur**. Jeder Wert wurde durch das Auszählen der Zellzahl eines einzelnen Schälchens mit Hilfe der Zählkammer ermittelt. Die Bestimmung wurde für jedes der Geschlechter und jeden DIV unabhängig dreimal durchgeführt und aus diesen Werten der jeweilige Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SAW) errechnet. Für die Berechnung des Mittelwertes am DIV 4 wurden für jedes Geschlecht sechs Schälchen ausgezählt. Schließlich wurde für jeden DIV ein gemeinsamer Mittelwert gebildet (MW w.+m.) und auch hier die Standardabweichung berechnet.

Nr. der Zählung	Geschlecht	DIV0 (x10 ⁶)	DIV1 (x10 ⁶)	DIV2 (x10 ⁶)	DIV3 (x10 ⁶)	DIV4 (x10 ⁶)	DIV5 (x10 ⁶)	DIV6 (x10 ⁶)
1.	weiblich	2,0	1,3	2,5	3,8	4,6	3,5	1,8
2.		2,0	0,8	1,2	2,6	3,8	1,5	0,8
3.		2,0	0,5	1,8	2,1	2,8	3,5	2,4
4.						5,8		
5.						3,3		
6.						4,5		
MW + SAW		2,0 ± 0	0,9 ± 0,4	1,8 ± 0,7	2,8 ± 0,9	4,1 ± 1,1	2,8 ± 1,2	1,7 ± 0,8
1.	männlich	2,0	0,5	1,3	3,5	4,8	2,5	0,7
2.		2,0	0,5	1,7	2,8	4,8	2,5	1
3.		2,0	0,5	2,1	2,5	4,4	2,5	1,6
4.						4,5		
5.						4,3		
6.						2,8		
MW + SAW		2,0 ± 0	0,5 ± 0	1,7 ± 0,4	2,9 ± 0,5	4,3 ± 0,7	2,5 ± 0	1,1 ± 0,5
MW w.+m. + SAW		2,0 ± 0	0,7 ± 0,3	1,8 ± 0,5	2,9 ± 0,6	4,2 ± 0,9	2,7 ± 0,8	1,4 ± 0,7

Rückgang der Gesamtzellzahl bis zum DIV 9, die dann bis zum DIV 13 nahezu konstant blieb.

Die Zellzahl hatte sich bei den kontinuierlich mit bFGF behandelten Kulturen vom DIV 5 zum DIV 13 in etwa verdreifacht, während sie sich bei den Kontrollkulturen um den Faktor 0,7 verringerte. Beim Vergleich der Zellzahl der +bFGF-Kulturen mit derjenigen der Kontrollkulturen am DIV 13 fand sich eine vierfach höhere Zellzahl zugunsten der +bFGF-Kulturen (**Abb. 4** und **Tab. 3**).

Die Zelldichte der kontinuierlich behandelten Zellen am DIV 13 war mit umgerechnet $3,5 \times 10^5$ Zellen/cm² höher als die Zelldichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen/cm², mit der die Zellen am DIV 4 ausgesät worden waren.

Es fand sich in den Adhaesionskulturen von DIV 5 bis DIV 13 kein Anzeichen für eine geschlechtsspezifische Wachstumsdynamik (**Abb. 5** und **Tab. 3**).

Die als Adhaesionskultur wachsenden Zellen bildeten, je nach bFGF-Zugabe und Kultivierungsdauer, stets einen mehr oder weniger dichten Zellrasen, jedoch keine Aggregate.

3.2.2 BrdU-positive Zellen

3.2.2.1 Morphologie

Typisch für die Morphologie der BrdU-positiven Zellen am DIV 5 war ihr gemeinsames Auftreten in Clusters. Die Zellen dieser Clusters verfügten über einen großen Kern, wenig Zytoplasma und keine Fortsätze. Diese Morphologie fand sich in den Kulturen gleichermaßen, unabhängig von der Art der Behandlung mit bFGF (**Abb. 6a** und **6b**). Auffällig war eine unterschiedliche Ausprägung der Differenzierungsmerkmale in Regionen hoher bzw. geringer Zelldichte. Bei den +bFGF-Kulturen am DIV 13, bei denen die Zelldichte zugenommen hatte, lagen die BrdU-positiven Zellen in einem dichten Zellrasen, umgeben von BrdU-negativen Zellen und Fortsätzen (**Abb. 6c**), während die BrdU-positiven Zellen in Regionen geringerer Zelldichte selbst Fortsätze ausbildeten (**Abb. 6e**). Ebenso bildeten bei den Kontrollkulturen mit rückläufiger Zelldichte am DIV 9 die BrdU-positiven Zellen selbst Fortsätze aus. Diese konnten sich eher flächig darstellen (**Abb. 6d**), oder dünn und filamentartig in Erscheinung treten (**Abb. 6f**). Insgesamt waren Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild zwischen DIV 5- und DIV 9-Kulturen stärker ausgeprägt als solche zwischen DIV 9- und DIV 13-Kulturen.

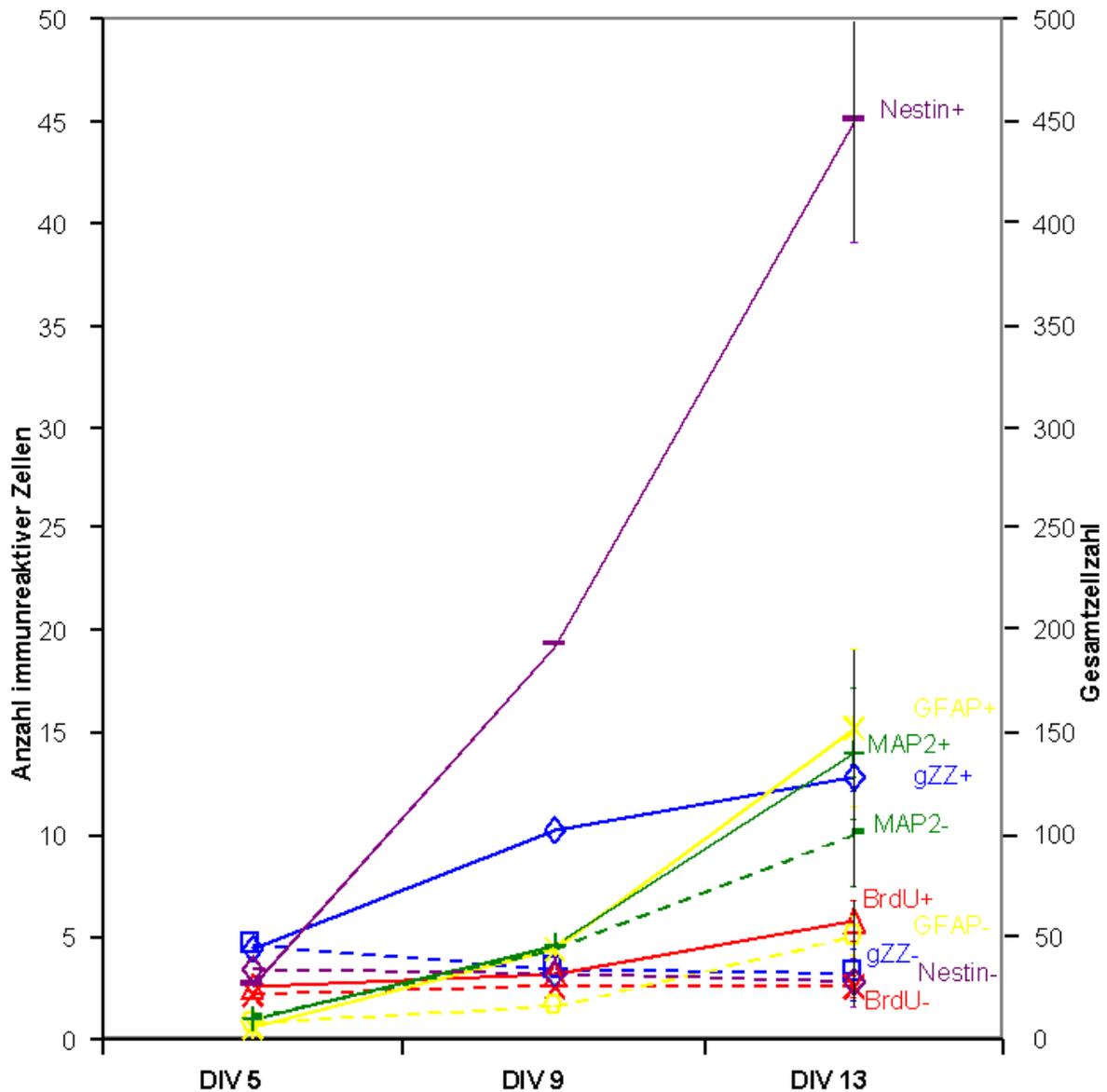


Abbildung 4: Darstellung der Anzahl der Zellen (gemeinsame Mittelwerte weiblicher und männlicher Kulturen), die für eines der vier Antigene immunreaktiv sind, sowie der Gesamtzellzahl (gZZ) in Adhaesionskultur in Abhängigkeit von Behandlung und Kultivierungsdauer. Jeder dargestellte Wert entspricht dem jeweiligen, das Geschlecht unberücksichtigt lassendem gemeinsamen Mittelwert, ermittelt durch Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern (BrdU 29 Gesichtsfelder) eines Deckgläschens, die pro Geschlecht, Behandlung und Kultivierungsdauer viermal (gZZ zweimal) durchgeführt wurde. Die Balken, die zur besseren Übersichtlichkeit nur für DIV 13 gezeigt sind, geben die Standardabweichung wieder. Das + hinter dem Namen des Antigens zeigt an, dass die Zellen kontinuierlich mit bFGF behandelt wurden, das – einen Entzug des bFGF. Beachte die zwei unterschiedlichen Ordinaten!

Tabelle 3: Messwerte zur Bestimmung der Gesamtzellzahl in weiblichen (w.) und männlichen (m.) **Adhaesionskulturen**, ± bFGF nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer. Die „Zahl/Kultur“ entspricht dem Mittelwert der Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern eines Deckgläschens. Die Auszählung wurde pro Geschlecht, Behandlung und Kultivierungsdauer unabhängig zweimal durchgeführt und aus diesen Einzelzählwerten der jeweilige Mittelwert (MW w./m.) und die Standardabweichung (SAW) errechnet. Schließlich wurde für jeden DIV ± bFGF ein gemeinsamer Mittelwert gebildet (MW w.+ m.) und die Standardabweichung berechnet.

Marker	Behandlung	Geschlecht	DIV												
			5			9			13						
			Zahl/ Kultur	MW w./m. SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. SAW	MW w.+m. +SAW				
Gesamtzellzahl	+bFGF	weiblich	41	43 ± 2,8	44,5 ± 2,5	97	98 ± 1,4	103,3 ± 6,4	138	130,5 ± 10,6	129,5 ± 6,4				
			45			99			123						
		männlich	47	46 ± 1,4		106	108,5 ± 3,5		130						
			45			111			127						
		-bFGF	weiblich	43		43 ± 0	46,5 ± 4,1		44	36 ± 11,3		35,0 ± 7,2	39	30,5 ± 12,0	32,0 ± 12,5
				43					28				22		
	männlich		51	50 ± 1,4	36	33 ± 4,2		46							
			49		30			21							

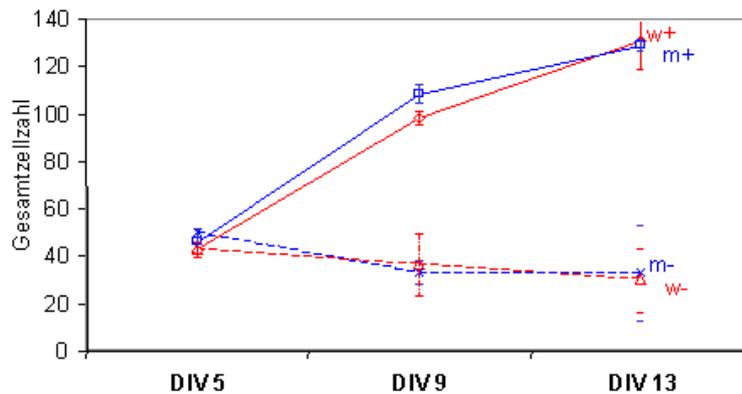


Abbildung 5: Nach Geschlecht aufgeschlüsselte Darstellung der Gesamtzellzahl in **Adhaesionskultur** in Abhängigkeit von Behandlung und Kultivierungsdauer. Jeder dargestellte Wert entspricht dem jeweiligen Mittelwert, ermittelt durch Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern eines Deckgläschens, die pro Geschlecht, Behandlung und Kultivierungsdauer unabhängig zweimal durchgeführt wurde. Die Balken geben die Standardabweichung wieder. Das + hinter dem Geschlechtssymbol zeigt an, dass die Zellen kontinuierlich mit bFGF behandelt wurden, das – einen Entzug des bFGF.

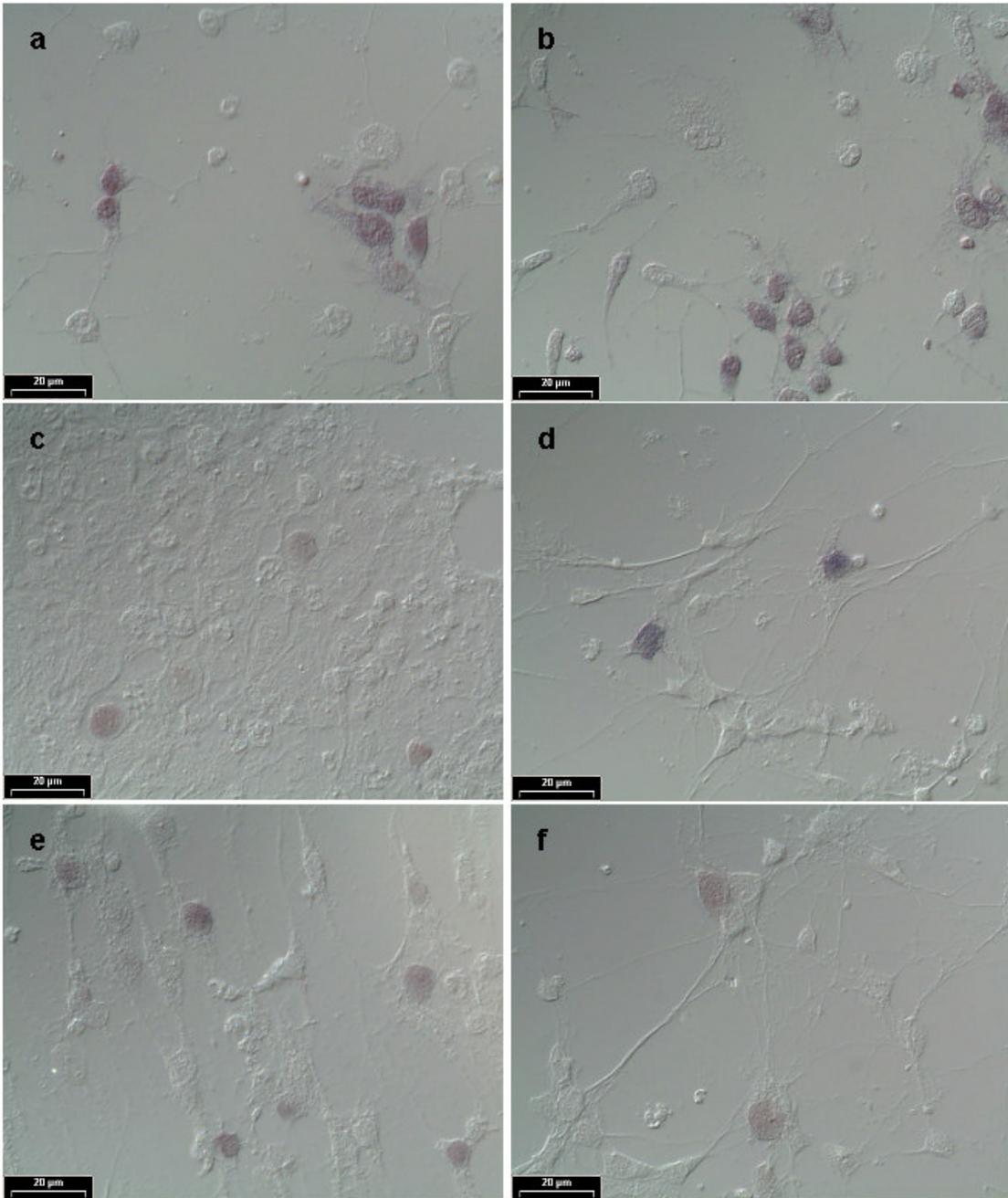


Abbildung 6: Morphologie BrdU-positiver Zellen im DIC. Aufnahmen von unterschiedlich lang kultivierten BrdU-positiven Zellen unter kontinuierlicher Gabe von bFGF (**a, c, e**) und nach Entzug von bFGF (**b, d, f**), nach 5 (**a, b**), 9 (**d, f**) und 13 (**c, e**) DIV. Der Messbalken entspricht 20 µm.

3.2.2.2 Wachstumsverlauf

Am DIV 5 ließ sich für den Mittelwert der Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Gesichtsfeld kein Unterschied für die beiden Behandlungsgruppen feststellen. Am DIV 9 lag die Anzahl BrdU-positiver Zellen in den +bFGF-Kulturen geringfügig über der Kontrolle. Zum DIV 13 kam es bei den +bFGF-Kulturen jedoch zu einem deutlichen Anstieg, während die Anzahl BrdU-positiver Zellen bei den bFGF-Kulturen über die ganze Zeit unverändert blieb ($p_z = 0,0001$). Am DIV 13 war die Anzahl BrdU-positiver Zellen in den bFGF+ Kulturen etwa doppelt so groß wie in den Kontrollkulturen ($p_B = 0,0002$) (**Abb. 4** und **Tab. 4a**).

Am DIV 13 lag der relative Anteil BrdU-positiver Zellen bei den +bFGF-Kulturen bei 5%, bei den –bFGF-Kulturen bei 8%.

Bei Betrachtung der geschlechtsspezifischen Wachstumsdynamik scheint mit zunehmender Kulturdauer und Wachstumsdynamik ein geringer Wachstumsvorteil für weibliche Kulturen unter bFGF-Stimulierung zu verschwinden, während er sich in den –bFGF-Kulturen zu erhalten scheint (**Abb. 7, BrdU** und **Tab. 4a**).

3.2.3 Nestin-positive Zellen

3.2.3.1 Morphologie

Bei den Nestin-positiven Zellen fanden sich am DIV 5 für die unterschiedliche Art der Behandlung mit bFGF keine morphologischen Unterschiede. Typisch waren Zellen mit randständigen Kernen und kräftig angefärbtem Zytoplasma. Die meisten Zellen wiesen einen einzelnen feinen kurzen Fortsatz auf. Zusätzlich ließen sich Zellen finden, die zwei oder mehr, oder aber gar keine Fortsätze entwickelt hatten (**Abb. 8a** und **8b**). Bei den +bFGF-Kulturen nahm die Länge und die Dicke der Fortsätze zum DIV 9 zu. Teilweise wiesen die Fortsätze Verzweigungen auf, auch fanden sich nun mehr Zellen, mit mehr als nur einem Fortsatz. Vereinzelt fanden sich Zellen, die mit flächigem Zytoplasma und kurzen Fortsätzen morphologische Ähnlichkeiten zu Astrozyten zeigten (**Abb. 8c**). Diese Befunde trafen auch für die Morphologie der Zellen am DIV 13 zu: Fortsatzlänge und –dicke nahmen noch weiter zu, teilweise bildeten die Fortsätze dichte Geflechte (**Abb. 8e**). Im Gegensatz dazu wirkte die Morphologie der Zellen der –bFGF-Kulturen am DIV 9 kaum verändert gegenüber den Befunden am DIV 5 (**Abb. 8d**). Eingestreut zwischen die Nestin-positiven Zellen fanden sich stets in größerer Zahl auch Nestin-negative Zellen.

Tabelle 4: Anzahl **a)** BrdU- und **b)** Nestin-positiver Zellen in weiblichen (w.) und männlichen (m.) Adhaesionskulturen, \pm bFGF nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer. Die „Zahl/Kultur“ stellt den Mittelwert der Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern (BrdU 29 Gesichtsfelder) eines Deckgläschens dar. Die je vier Einzelzählwerte pro Geschlecht, Kultivierungsdauer und Behandlung entstammen aus Duplikaten der Adhaesionskulturen, die aus je zwei unabhängigen Adhaesionskulturen passagiert wurden. Es wurden daraus nach Geschlecht getrennte (MW w./m.) und gemeinsame (MW w.+m.) Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen (SAW) gebildet.

a

Marker	Behandlung	Geschlecht	DIV								
			5			9			13		
			Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW
BrdU	+bFGF	weiblich	2,8	3 $\pm 0,2$	2,7 $\pm 0,4$	2,9	3,6 $\pm 1,7$	3,3 $\pm 1,2$	6,0	5,9 $\pm 0,4$	5,9 $\pm 1,1$
			3,3			3,3			5,3		
			3,0			2,0			6,0		
			3,0			6,0			6,3		
		männlich	2,5	2,3 $\pm 0,2$		3,2	3,0 $\pm 0,5$		5,3	5,9 $\pm 1,6$	
			2,3			3,1			3,8		
			2,0			2,3			7,5		
			2,3			3,5			6,8		
	-bFGF	weiblich	1,3	2,2 $\pm 0,7$	2,3 $\pm 0,5$	1,0	3,1 $\pm 2,5$	2,6 $\pm 2,0$	3,5	3,0 $\pm 0,6$	2,7 $\pm 0,6$
			3,0			0,9			2,3		
			2,3			5,3			3,5		
			2,3			5,3			2,8		
		männlich	2,3	2,3 $\pm 0,4$		0,8	2,1 $\pm 1,5$		2,0	2,4 $\pm 0,3$	
			2,8			0,8			2,8		
			2,0			2,8			2,3		
			2,0			3,8			2,3		

b

Marker	Behandlung	Geschlecht	DIV								
			5			9			13		
			Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW
Nestin	+bFGF	weiblich	2,8	2,7 $\pm 1,0$	2,7 $\pm 0,8$	25,4	19,8 $\pm 3,8$	19,2 $\pm 2,8$	39,6	41,9 $\pm 3,0$	44,9 $\pm 6,3$
			3,9			17,1			41,9		
			1,6			17,6			40,0		
			2,4			18,9			46,1		
		männlich	2,9	2,7 $\pm 0,8$		16,2	18,7 $\pm 1,8$		41,4	47,8 $\pm 7,9$	
			3,7			19,6			41,0		
			1,7			20,3			56,7		
			2,4			18,8			52,1		
	-bFGF	weiblich	4,7	3,4 $\pm 1,3$	3,5 $\pm 0,9$	3,5	3,2 $\pm 1,5$	3,2 $\pm 1,5$	3,3	2,6 $\pm 0,6$	2,9 $\pm 1,3$
			4,3			5,3			2,4		
			2,3			2,8			2,9		
			2,4			1,7			1,8		
		männlich	4,4	3,6 $\pm 0,7$		3,5	3,1 $\pm 1,7$		3,1	3,1 $\pm 1,8$	
			3,6			5,4			5,6		
			2,8			1,6			2,1		
			3,6			1,9			1,7		

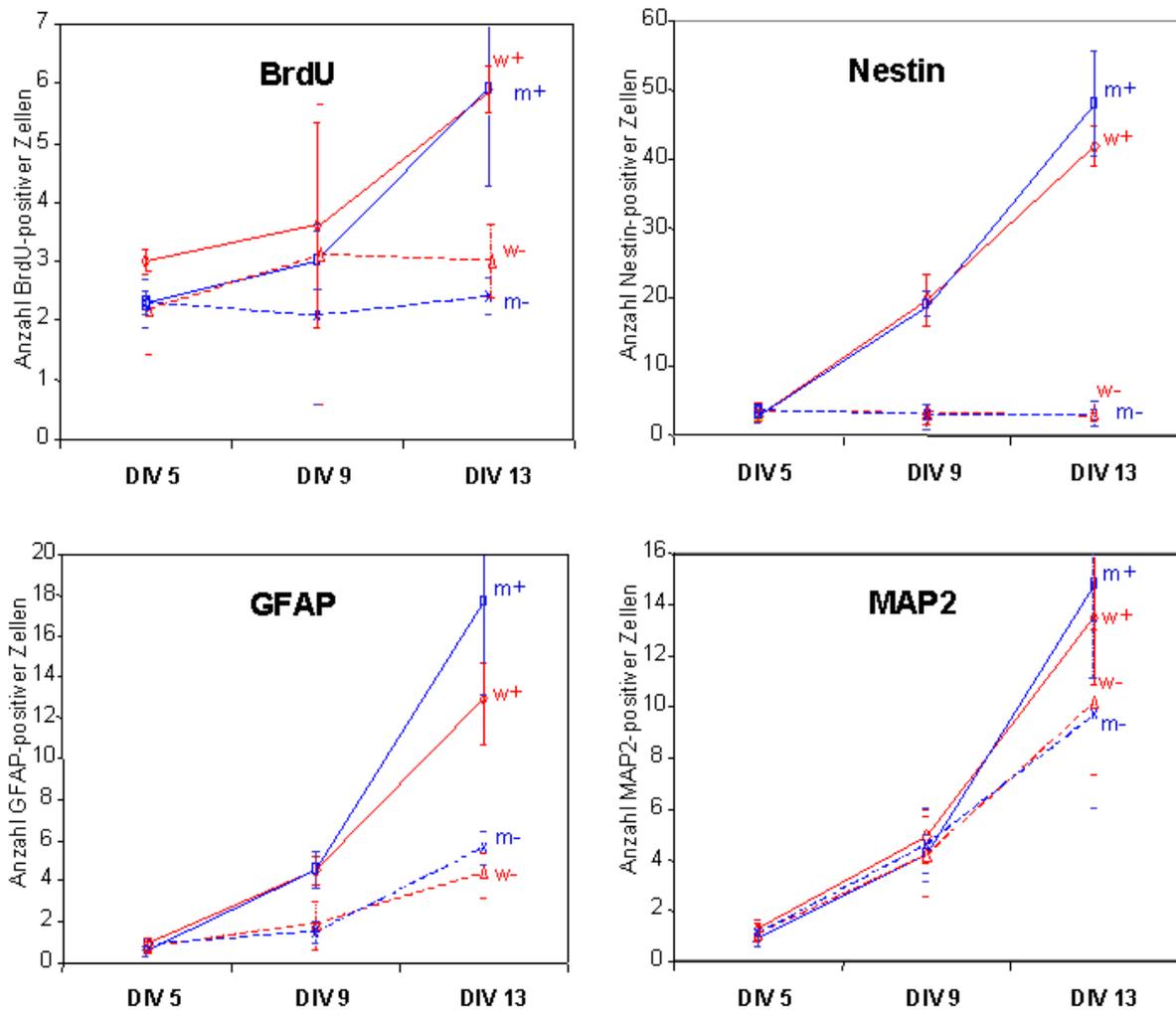


Abbildung 7: Nach Geschlecht aufgeschlüsselte Darstellung der Anzahl der immunreaktiven Zellen in Adhaesionskultur für das jeweils angegebene Antigen in Abhängigkeit von Behandlung und Kultivierungsdauer. Jeder dargestellte Wert entspricht dem jeweiligen Mittelwert, ermittelt durch Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern (BrdU 29 Gesichtsfelder) eines Deckgläschens, die pro Geschlecht, Behandlung und Kultivierungsdauer viermal durchgeführt wurde. Die Balken geben die Standardabweichung wieder. Das + hinter dem Geschlechtssymbol zeigt an, dass die Zellen kontinuierlich mit bFGF behandelt wurden, das – einen Entzug des bFGF. Beachte die unterschiedlichen Maßstäbe der Ordinaten!

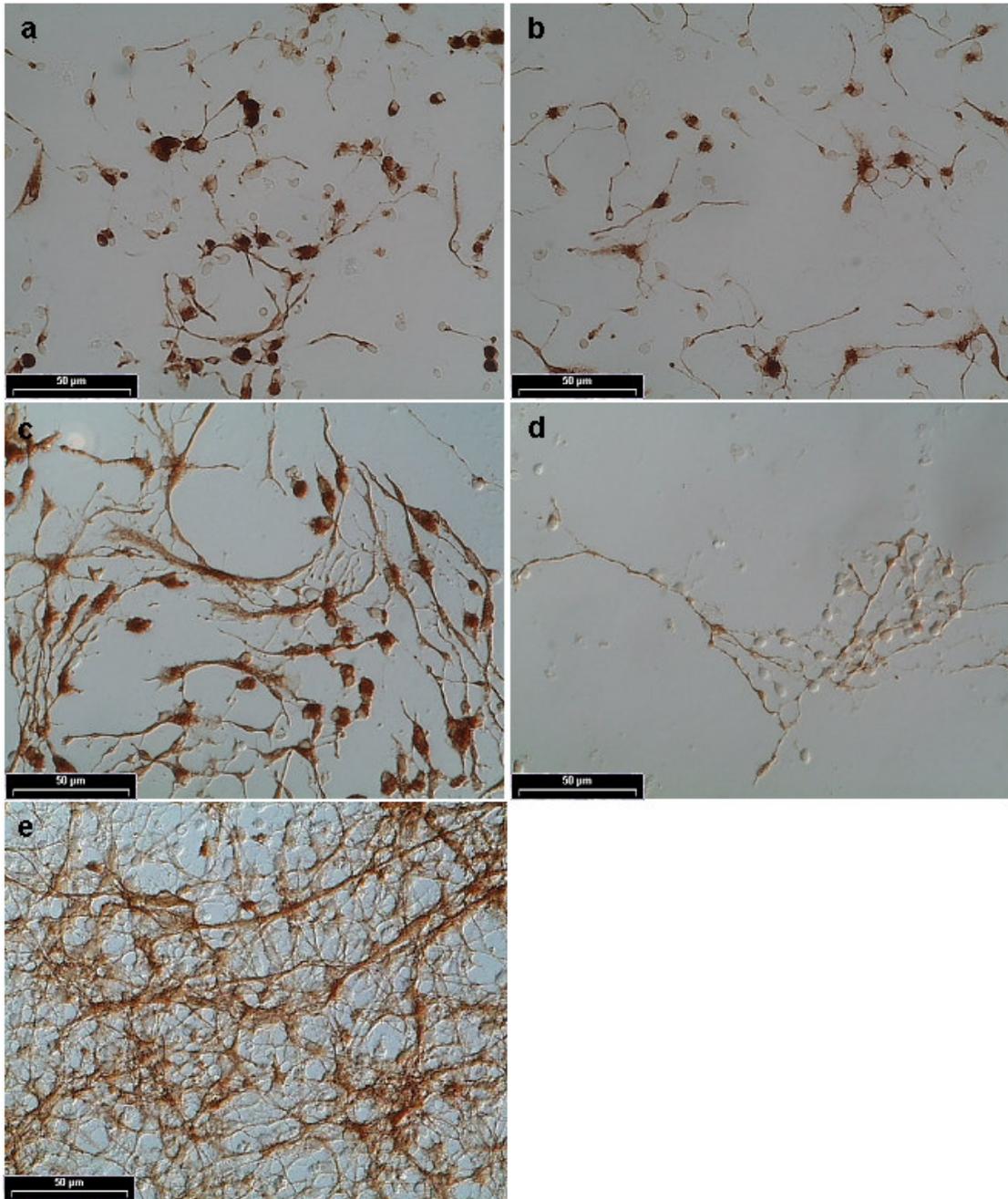


Abbildung 8: Morphologie Nestin-positiver Zellen in Durchlichttechnik (**a, b**) oder DIC (**c, d, e**). Aufnahmen von unterschiedlich lang kultivierten Nestin-positiven Zellen unter kontinuierlicher Gabe von bFGF (**a, c, e**) und nach Entzug von bFGF (**b, d**), nach 5 (**a, b**), 9 (**c, d**) und 13 (**e**) DIV. Der Messbalken entspricht 50 µm.

3.2.3.2 Wachstumsverlauf

Am DIV 5 war für die Mittelwerte der Anzahl Nestin-positiver Zellen pro Gesichtsfeld kein Unterschied vorhanden. Bei den +bFGF-Kulturen kam es zum DIV 9 zu einem steilen Anstieg der Anzahl, der sich, sogar noch steiler verlaufend, zum DIV 13 fortsetzte. Die Anzahl Nestin-positiver Zellen nahm von DIV 5 nach DIV 13 um den Faktor 15 zu. Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl Nestin-positiver Zellen in den Kontrollkulturen von DIV 5 nach DIV 13 nicht zu, tendenziell war sie sogar abnehmend ($p_z < 0,0001$; $p_B < 0,0001$) (**Abb. 4** und **Tab. 4b**).

Der relative Anteil Nestin-positiver Zellen wurde an den DIV 5, 9 und 13 in den +bFGF-Kulturen mit 7, 18 und 35% bestimmt. In den -bFGF-Kulturen wurde der relative Anteil an den DIV 5 und 13 mit 8, respektive 9% bestimmt.

Die geschlechtsspezifische Analyse der Wachstumsdynamik ergibt identische Werte in den nicht-stimulierten Kulturen. Bei den stimulierten Kulturen ergeben sich bei der Betrachtung des letzten Beobachtungszeitpunktes in den männlichen Kulturen geringfügig höhere Zellzahlen (**Abb. 7**, **Nestin** und **Tab. 4b**).

3.2.4 GFAP-positive Zellen

3.2.4.1 Morphologie

Am DIV 5 ließen sich unabhängig von der Art der Behandlung mit bFGF erst sehr wenige GFAP-positive Zellen finden (**Abb. 9a** und **9b**). GFAP-positive Zellen hatten ein zart angefärbtes Zytoplasma, das den Kern, der häufig randständig lag, flächig umschloss. Es fanden sich aber auch Zellen, die mit einem einzelnen feinen kurzen Fortsatz eine den frühen Nestin-positiven Zellen ähnliche Morphologie aufwiesen. An den DIV 9 und 13 zeigten die GFAP-positiven Zellen aus +bFGF-Kulturen mit ihren großen Zellkernen und kräftig gefärbtem Zytoplasma, von dem zahlreiche Fortsätze sternförmig abgingen, eine für Astrozyten typische Morphologie (**Abb. 9c**). Die Fortsätze bildeten teilweise dichte Geflechte (**Abb. 9e**). Auch Zellen aus Kulturen, denen bFGF entzogen worden war zeigten diese Morphologie, lediglich die Dichte der Fortsätze war deutlich geringer (**Abb. 9d**). Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild waren zwischen DIV 5- und DIV 9-Kulturen stärker ausgeprägt als zwischen DIV 9- und DIV 13-Kulturen.

3.2.4.2 Wachstumsverlauf

Am DIV 5 ließ sich für den Mittelwert der Anzahl GFAP-positiver Zellen pro Gesichtsfeld kein Unterschied für die beiden Behandlungsgruppen feststellen. Zum DIV 9 nahm die Anzahl GFAP-positiver Zellen sowohl in den +bFGF-, als auch in den

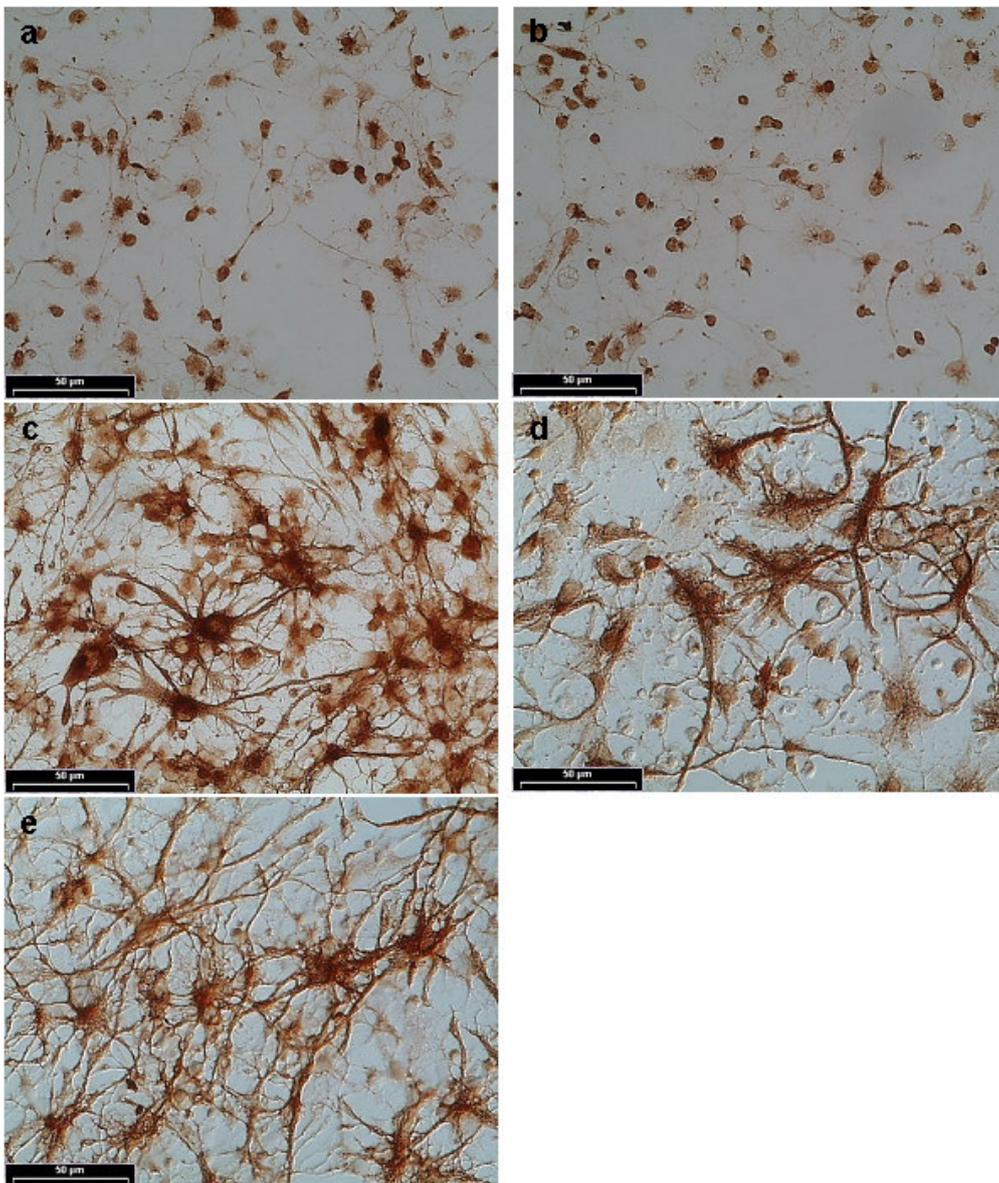


Abbildung 9: Morphologie GFAP-positiver Zellen in Durchlichttechnik (a, b, c) oder DIC (d, e). Aufnahmen von unterschiedlich lang kultivierten GFAP-positiven Zellen unter kontinuierlicher Gabe von bFGF (a, c, e) und nach Entzug von bFGF (b, d), nach 5 (a, b), 9 (c) und 13 (d, e) DIV. Der Messbalken entspricht 50 µm.

–bFGF-Kulturen zu, wobei der Anstieg bei den kontinuierlich behandelten Zellen steiler verlief. Zum DIV 13 nahm die Wachstumsgeschwindigkeit sowohl bei +bFGF- als auch –bFGF-Kulturen zu ($p_z < 0,0001$).

Bei den kontinuierlich behandelten Kulturen erhöhte sich die Anzahl der GFAP-positiven Zellen am DIV 13 gegenüber DIV 5 um das 15fache, bei den Kontrollkulturen um das fünffache ($p_B < 0,0001$) (**Abb. 4** und **Tab. 5a**).

Bei den bFGF+ Kulturen stieg der Anteil GFAP-positiver Zellen von 2 auf 12%, bei den Kontrollkulturen von 2 auf 16%.

Bei der Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Geschlecht und Wachstumsdynamik zeigt sich, in den stimulierten Kulturen ausgeprägter als in den nicht-stimulierten, eine höhere Zellzahl in den männlichen Kulturen (**Abb. 7**, **GFAP** und **Tab. 5a**).

3.2.5 MAP2-positive Zellen

3.2.5.1 Morphologie

Bei den MAP2-positiven Zellen fanden sich am DIV 5 für die unterschiedlichen Behandlungsmethoden mit bFGF keine morphologischen Unterschiede. Typisch waren Zellen, die über einen großen Zellkern, wenig Zytoplasma und einen einzelnen langen dünnen Fortsatz verfügten. Selten war dieser Fortsatz verzweigt oder verfügte über Auftreibungen (**Abb. 10a** und **10b**). Die Morphologie MAP2- und Nestin-positiver Zellen ähnelten sich. Auch am DIV 13 fanden sich für die unterschiedlichen Behandlungsmethoden mit bFGF keine morphologischen Unterschiede der MAP2-positiven Zellen (**Abb. 10c** und **10d**). Auffallend war die starke Längenzunahme der Fortsätze. Viele der Zellen verfügten über mehrere Fortsätze, wobei jedoch eine polare Anordnung zu beobachten war, bei der ein langer Fortsatz stets aus einer kräftig angefärbten Zone des Zellkörpers entsprang (Markierung in **Abb. 10e**). Fortsatzverzweigung trat häufig auf und auch Fortsatzauftreibungen ließen sich weiterhin beobachten. Die Zellen verfügten gegenüber dem Befund am DIV 5 über mehr Zytoplasma.

3.2.5.2 Wachstumsverlauf

Am DIV 5 waren die Mittelwerte der Anzahl MAP2-positiver Zellen pro Gesichtsfeld für kontinuierlich behandelte Kulturen und für die Kontrollkulturen gleich groß. Zum DIV 9 kam es zu einem Anstieg gleicher Steilheit bei beiden Behandlungsgruppen, der auch bis zum DIV 13 anhielt, wobei er nun bei den bFGF+ Kulturen steiler verlief ($p_z < 0,0001$). Bei den kontinuierlich behandelten Zellen nahm

Tabelle 5: Anzahl **a)** GFAP- und **b)** MAP2-positiver Zellen in weiblichen (w.) und männlichen (m.) Adhaesionskulturen, \pm bFGF nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer. Die „Zahl/Kultur“ stellt den Mittelwert der Auszählung von je 18 Gesichtsfeldern eines Deckgläschens dar Die je vier Einzelzählwerte pro Geschlecht, Kultivierungsdauer und Behandlung entstammen aus Duplikaten der Adhaesionskulturen, die aus je zwei unabhängigen Adhaesionskulturen passagiert wurden. Es wurden daraus nach Geschlecht getrennte (MW w./m.) und gemeinsame (MW w.+m.) Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen (SAW) gebildet.

a

Marker	Behandlung	Geschlecht	DIV								
			5			9			13		
			Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW
GFAP	+bFGF	weiblich	1,2	0,9 $\pm 0,2$	0,7 $\pm 0,2$	4,4	4,5 $\pm 0,7$	4,5 $\pm 0,7$	11,6	12,9 $\pm 2,0$	15,3 $\pm 4,2$
			0,7			3,7			12,5		
			0,7			5,4			11,4		
			0,9			4,5			15,8		
		männlich	0,7	0,6 $\pm 0,2$		3,6	4,5 $\pm 0,9$		17,4		
			0,7			5,3			15,4		
			0,5			5,1			24,3		
			0,4			3,8			13,6		
	-bFGF	weiblich	0,6	0,8 $\pm 0,2$	0,8 $\pm 0,2$	3,6	1,9 $\pm 1,2$	1,7 $\pm 0,9$	4,3	4,4 $\pm 1,1$	
			0,6			1,8			4,4		
			1,1			1,5			5,8		
			0,9			0,8			3,1		
		männlich	0,8			0,9 $\pm 0,2$	1,9		1,5 $\pm 0,5$	4,6	
			1,1				1,8			6,2	
			0,9				1,1			6,3	
			0,7				1,0			5,6	

b

Marker	Behandlung	Geschlecht	DIV								
			5			9			13		
			Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW	Zahl/ Kultur	MW w./m. +SAW	MW w.+m. +SAW
MAP2	+bFGF	weiblich	1,4	1,3 $\pm 0,3$	1,1 $\pm 0,3$	4,4	4,9 $\pm 1,0$	4,7 $\pm 0,9$	17,2	13,5 $\pm 3,8$	14,1 $\pm 3,5$
			0,9			5,0			16,3		
			1,3			6,4			10,6		
			1,5			4,1			9,7		
		männlich	0,8	0,9 $\pm 0,3$		4,1	4,2 $\pm 0,7$		19,0		
			1,3			4,1			16,2		
			1,1			5,4			12,1		
			0,6			3,7			11,7		
	-bFGF	weiblich	0,9	1,1 $\pm 0,3$	1,1 $\pm 0,3$	5,5	4,2 $\pm 1,5$	4,4 $\pm 1,4$	11,1	10,2 $\pm 2,7$	
			1,1			5,4			13,6		
			1,5			3,2			7,1		
			0,9			2,7			9,5		
		männlich	0,9			1,1 $\pm 0,4$	5,4		4,6 $\pm 1,4$	8,6	
			0,6				6,2			14,8	
			1,2				3,2			7,1	
			1,6				3,6			8,3	

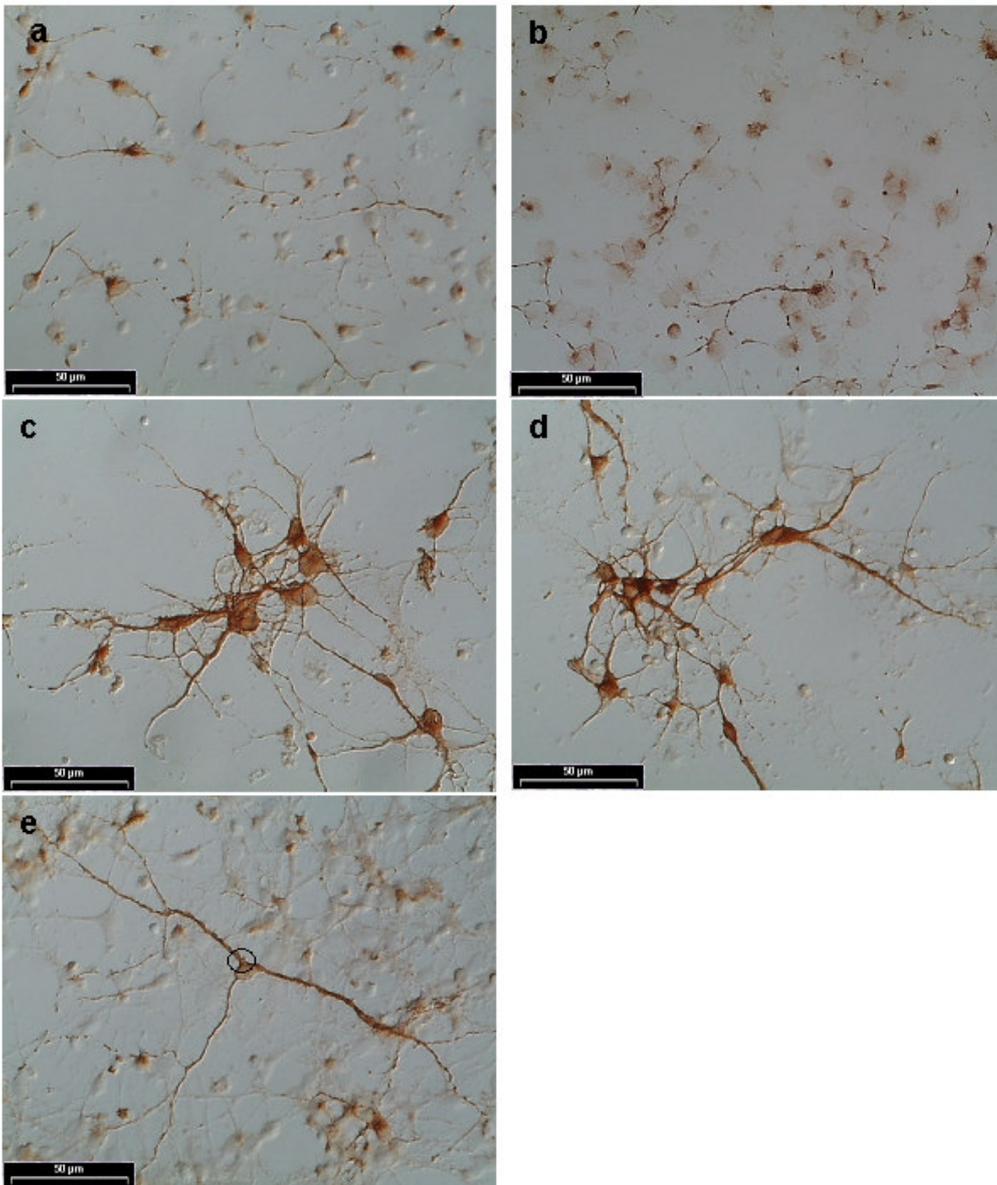


Abbildung 10: Morphologie MAP2-positiver Zellen in Durchlichttechnik (**b**) oder DIC (**a, c, d, e**). Aufnahmen von unterschiedlich lang kultivierten MAP2-positiven Zellen unter kontinuierlicher Gabe von bFGF (**a, c, e**) und nach Entzug von bFGF (**b, d**), nach 5 (**a, b**) und 13 (**c, d, e**) DIV. Kreismarkierung in (**e**) weist auf den kräftig angefärbten Ursprung eines Fortsatzes hin. Der Messbalken entspricht 50 µm.

die Anzahl MAP2-positiver Zellen von DIV 5 nach DIV 13 um das 14fache, bei den Kontrollkulturen um das zehnfache zu ($p_B = 0,0214$) (**Abb. 4** und **Tab. 5b**).

Bei den +bFGF-Kulturen stieg der Anteil MAP2-positiver Zellen von 2% am DIV 5 auf 11% am DIV 13. Bei den Kontrollkulturen, nahm der Anteil von ebenfalls 2 am DIV 5 über 11 am DIV 9 auf 31% am DIV 13 zu.

Die geschlechtsgebundene Betrachtung der Wachstumsdynamik MAP2-exprimierender Zellen zeigt allenfalls in den stimulierten Kulturen am DIV 13 leicht erhöhte Zellzahlen in den männlichen gegenüber den weiblichen Kulturen (**Abb. 7, MAP** und **Tab. 5b**).

4. Diskussion

4.1 Ergebniszusammenfassung

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Das Wachstum der Zellen in Suspensionskultur unter bFGF-Einwirkung führt nach der Lag-Phase zu einer Verfünffachung der Zellzahl zwischen DIV 1 und DIV 4.

Für die Entwicklung der Gesamtzellzahl zeigt sich nach dem Transfer der Zellen aus der Suspensions- in die Adhaesionskultur bei fortgesetzter bFGF-Einwirkung zunächst eine unverändert positive Bilanz, die jedoch in ihrer Dynamik mit nur einer Verdoppelung der Zellzahl zwischen DIV 5 und DIV 9 gegenüber der Suspensionskultur deutlich abgeschwächt ist. In den Kontrollkulturen ohne bFGF nimmt die Gesamtzellzahl sogleich ab, um sich dann nach DIV 9 auf geringem Niveau zu stabilisieren.

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen nimmt in den +bFGF-Kulturen zum DIV 9 geringfügig, zum DIV 13 deutlich zu. In den –bFGF-Kulturen ist kein eindeutiger Anstieg zu beobachten ($p_B = 0,0002$; $p_Z = 0,0001$).

Bei den Nestin-positiven Zellen zeigt sich eine gewisse Parallele zur Entwicklung der Gesamtzellzahl insofern, als dass sich auch hier eine absolute Abhängigkeit von bFGF zeigt: Bei –bFGF-Kulturen kam es nach anfänglich geringer Zellreduktion jenseits von DIV 9 zu einer Stabilisierung auf niedrigem Niveau. Unter bFGF-Einwirkung hingegen zeigt sich – ähnlich der Entwicklung der Gesamtzellzahl – ein sehr steiler Anstieg der Nestin-positiven Zellen, der allerdings in seinem relativen Zuwachs bis zum DIV 13 auf das etwa 15fache des Ausgangswertes den nur etwa dreifachen Zuwachs bei der Gesamtzellzahl um ein Mehrfaches übertraf ($p_B < 0,0001$; $p_Z < 0,0001$).

Die Zahl der Differenzierungsmarker-exprimierenden GFAP- bzw. MAP2-positiven Zellen vervielfacht sich nach der Passage unter bFGF-Einfluss in gleicher Weise und mit steigender Geschwindigkeit. In der –bFGF-Kontrollgruppe hingegen bleibt das Wachstum, besonders der GFAP-positiven Zellen, deutlich zurück (GFAP: $p_B < 0,0001$; $p_Z < 0,0001$ und MAP2: $p_B = 0,0214$; $p_Z < 0,0001$).

Auf Grund der geringen Fallzahl und der nicht-normalverteilten Daten ist bei der Betrachtung der p-Werte jedoch zu beachten, dass diese auch bei Werten unterhalb des Signifikanzniveaus nicht „statistisch beweisend“ sind. Eine Signifikanz zeigt hier nur eine Tendenz auf.

4.2 Die Rolle von bFGF bei der Differenzierung neuraler Zellen.

Proliferationskinetik

Der fördernde Effekt von bFGF auf das Zellwachstum neuraler Zellen ist in der Literatur beschrieben (*Gensburger et al. 1987* und *Okabe et al. 1996*) und konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Im Zentrum des Interesses stehen die Fragen nach der Wirkung, die bFGF auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten neuraler Zellen hat. Kristallisationspunkte dieser Fragen in dieser Untersuchung sind der steile Anstieg Nestin-positiver Zellen unter kontinuierlicher bFGF-Einwirkung sowie der Anstieg differenzierter, GFAP- und MAP2-positiver Zellen und hier insbesondere der deutliche Unterschied bei der Anzahl GFAP-positiver Zellen in Abhängigkeit von bFGF. Dass bFGF einen Anstieg MAP2-positiver Zellen verursacht, ist gezeigt worden (*Meltzer et al. 1998*). Ebenso ist gezeigt worden, dass bFGF einen fördernden Effekt auf GFAP-positive Zellen hat (*Morrow et al. 2001*). Auch eine Stimulation der Proliferation Nestin-positiver Zellen durch bFGF ist beschrieben worden (*Vicario-Abejón et al. 1995*). Bei dieser Vielzahl sowohl proliferations- als auch differenzierungsfördernder Effekte von bFGF liegt die Vermutung nahe, dass dessen Konzentration und/oder Einwirkungsdauer diese Prozesse modulieren. Möglich wäre, dass eine befristete bFGF-Einwirkung auf eine neurale Vorläuferzelle einen irreversiblen Differenzierungsanstoß dieser Zelle in Richtung der neuronalen Linie verursacht, der dann auch nach bFGF-Entzug zur MAP2-Expression führt. Eine kontinuierliche bFGF-Einwirkung hingegen könnte zwei Dinge bewirken: einerseits die Zunahme der Anzahl Nestin-positiver Zellen und andererseits die Differenzierung von GFAP-positiven aus Nestin-positiven Zellen. Die zunehmende Anzahl Nestin-positiver Zellen diene also hauptsächlich als Reservoir für die Entwicklung GFAP-positiver Zellen. Ein indirekter Hinweis dafür ergibt sich aus der hier dargestellten Beobachtung, dass die Differenzierung GFAP-positiver Zellen sehr stark vom bFGF-Entzug und versiegender Nestin-Zellentwicklung betroffen ist; im Gegensatz zur Entwicklung MAP2-positiver Zellen. Aus dem Entzug von bFGF resultierten demnach drei Dinge: eine Beendigung der Wachstumsförderung Nestin-positiver Zellen, eine daraus folgende Verringerung des Ausgangsmaterials für Differenzierungsprozesse in Richtung der glialen Zelllinie mit verminderter Ausbildung GFAP-positiver Zellen und schließlich eine vergleichsweise nur geringe Beeinträchtigung der Entwicklung MAP2-positiver Zellen, da deren Differenzierung bereits irreversibel angeschoben wurde.

In der Literatur finden sich Hinweise, die diese Deutung stützen können: In der bereits oben erwähnten Arbeit von *Meltzer et al. (1998)* findet sich eine Zunahme MAP2-positiver Zellen, die zudem noch von einer Abnahme Nestin-positiver Zellen begleitet ist, nach einmaliger bFGF-Gabe und adhaerenter Kultivierung über zehn Tage. Die gleichzeitige relative Zunahme GFAP-positiver Zellen ist deutlich geringer ausgeprägt. Bei *Qian et al. (1997)* ist die Förderung der Entstehung GFAP-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Höhe der Konzentration von bFGF beschrieben. In adhaerent wachsenden, kontinuierlich mit bFGF behandelten Primärkulturen nahm die Anzahl Gliazellen enthaltender Zellaggregate mit steigender bFGF-Konzentration auf Kosten Neuronen enthaltender Aggregate zu.

Ein weiterer Hinweis auf die Abhängigkeit der Gliaentstehung von der bFGF-Konzentration findet sich auch in Ex-vivo-Arbeiten. *Weise et al. (1993)* untersuchten Gewebsschnitte von embryonalen Rattenhirnen ED 13 bis ED 18 und fanden mit zunehmender Reife des Hirngewebes stärkere bFGF-Immunreaktivität, besonders in Regionen mit vielen postmitotischen Neuronen. Diese Beobachtung gemeinsam mit den von *Bayer und Altman (1991)* beschriebenen Gliazellen im Cortex cerebri von Nagetieren, welche der Entstehung von Neuronen zeitlich nachfolgten, können als Hinweise auf eine fördernde Rolle des bFGF bei der Entstehung von Gliazellen gelten. Die bereits oben erwähnten Autoren *Morrow et al. (2001)* kommen zu dem Schluss, dass durch einen ontogenetisch bedingten bFGF-Anstieg eine gliale Differenzierung der überlebenden Vorläuferzellen induziert wird und dadurch alle späteren Vorläuferzellen auf eine gliale Differenzierung beschränkt bleiben. *Chang et al. (2004)* bestätigen diese Überlegung. In ihrer in-vitro Arbeit an adhaerent wachsenden neuralen Vorläuferzellen von Ratten zeigen sie, dass die von älteren Embryonen stammenden Vorläuferzellen sich eher zu Astrozyten, als zu Neuronen differenzieren. *Gremo und Presta (1999)* untersuchten unter anderem die bFGF-Sekretion durch humane neurale Zellen in-vitro und stellten fest, dass Neurone für die ontogenetisch frühe Sekretion verantwortlich sind, diese Funktion später jedoch von Astrozyten übernommen wird.

Die konzentrationsabhängigen Wirkungen könnten über verschiedene FGF-Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten vermittelt werden (*Johnson und Williams 1993*). So könnte ein FGF-Rezeptor hoher Affinität, der bereits bei einer geringen extrazellulären bFGF-Konzentration stimuliert würde, eine Differenzierung in Richtung neuronaler Linie hervorrufen, während der bei hoher bFGF-Konzentration

zusätzlich aktivierte niedrigaffine FGF-Rezeptor eine gliale Differenzierung induzierte. Dass neurale Zellen verschiedene FGF-Rezeptoren exprimieren konnte gezeigt werden (*Reimers et al. 2001*).

Aus den eigenen Daten kann bezüglich einer Konzentrationsabhängigkeit der differenzierenden Wirkung von bFGF kein Beitrag geleistet werden, da nur eine einzige Konzentration eingesetzt wurde, die allerdings sowohl zu neuronaler als auch glialer Entwicklung anregte.

Unerklärlich bleibt nach der oben formulierten Theorie die in dieser Arbeit getroffene Beobachtung einer zunehmenden Anzahl von GFAP- und MAP2-exprimierenden Zellen in den –bFGF-Kulturen, obwohl doch die Anzahl an Nestin-positiven Vorläuferzellen über die gesamten Kulturdauer bis DIV 13 gleichbleibend nahe null war. Ein hoher Fluss über das winzige Nestin-Kompartiment, mit sich ständig nachbildenden und sofort wieder differenzierenden Zellen könnte zwar eine Erklärung sein, ist aber doch sehr unwahrscheinlich. Sehr viel wahrscheinlicher ist dagegen eine direkte Entstehung von GFAP- und MAP2-positiven Zellen aus Nestin-negativen neuronalen Vorläuferzellen. Eine solche Deutung wird auch unterstützt durch eine Beobachtung bei *Maric et al (2003)*. Sie beschrieben Zellen, die über Oberflächenantigene neuronaler oder glialer Vorläuferzellen verfügen ohne Nestin zu exprimieren. Diese Zellen könnte man als determinierte neurale Stammzellen bezeichnen.

Wo sich beim Vergleich dieser Arbeit mit Literaturangaben ein Unterschied zeigt, ist der Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. Jedoch ist BrdU-Reaktivität kein quantitativer, sondern nur ein qualitativer Hinweis für Proliferationsaktivität, wie sich besonders aus der Zahl BrdU-positiver Zellen der vorgestellten Adhaesionskulturen zeigt, die zwischen DIV 9 und DIV 13 ansteigt, während gleichzeitig das Zellwachstum insgesamt wieder abnimmt. Es ist wichtig sich zu verdeutlichen, dass BrdU kein Marker für Zellteilung, sondern eher für DNA-Synthese ist und darüber hinaus auch nicht stöchiometrisch. Dies bedeutet, dass die Intensität oder das Ausmaß einer BrdU-Färbung nicht notwendigerweise die Höhe der Zellreplikation widerspiegelt (*Rakic 2002*).

4.3 Die Rolle von bFGF bei der Differenzierung neuronaler Zellen. Morphologische Untersuchungen.

In der Morphologie der in Adhaerenzkultur herangewachsenen Zellen spiegeln sich die bei den proliferationskinetischen Untersuchungen gemachten Beobachtungen:

Für die Nestin-positiven Zellen zeigt sich eine starke Abhängigkeit des Grades der Differenzierung von der bFGF-Einwirkung. Die Nestin-positiven Zellen aus den –bFGF-Kulturen zeigen deutlich weniger Fortsätze und eine schwächere Immunreaktivität. Die Reife der GFAP-positiven Zellen hingegen ist deutlich weniger von der bFGF-Behandlung abhängig. Wie die GFAP-positiven Zellen aus den +bFGF-Kulturen zeigen auch jene aus den –bFGF-Kulturen eine kräftige Immunreaktivität und eine reife Morphologie ihrer Zellsomata. Lediglich die Länge ihrer Fortsätze scheint kürzer. Im Gegensatz dazu lässt sich bei MAP2-positiven Zellen bezüglich der Zellreife wie auch der Stärke der Immunreaktivität kein Unterschied für Zellen aus +bFGF- oder –bFGF-Kulturen feststellen.

Die supravitale morphologische Betrachtung an den Suspensionskulturen zeigt eine mit der Dauer der Kultivierung von DIV 0 bis DIV 4 zunehmende neurale Differenzierung mit Ausbildung von Fortsätzen, die von den angetroffenen Zellaggregaten ausgehen und sich zu einem immer dichter werdendem Netz entwickeln. Dazwischen liegen Einzelzellen, die selbst keine Fortsätze ausbilden, oder von solchen erfasst werden. Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund der Entwicklung differenzierter Zellen in Adhaesionskulturen ab dem DIV 5 besonders auffällig: Wenngleich es zu einer kräftigen Zunahme differenzierter Zellen unter bFGF-Einwirkung nach DIV 5 kommt, ließen sich am DIV 5 so gut wie keine differenzierten Zellen nachweisen, obwohl doch alle Zellen während der Suspensionskultur unter kontinuierlichem bFGF-Einfluss standen.

Dieser Widerspruch zur oben postulierten bFGF-Wirkung löst sich vermutlich als Artefakt der Suspensionskultur insofern auf, als dass bei der Passage zur Adhaesionskultur nach tryptisch-mechanischer Zelldissoziation wohl gerade die Aggregate mit den differenzierten Zellen zerstört wurden (die optische Kontrolle des passagierten Zellmaterials in der Zählkammer hatte neben etwa 20 bis 30% Trypanblau aufnehmenden Zellen jeweils auch reichlich Zelldetritus ergeben), so dass bei der Aussaat in die Adhaesionskulturen am DIV 4 hauptsächlich die noch undifferenzierten, als Einzelzellen in der Suspensionskultur enthaltenen Zellen effektiv in die Adhaesionskultur überführt wurden.

Das Zellwachstum in den Suspensionskulturen mit distinkten Zellaggregaten hoher Zelldichte umgeben von auseinander liegenden Einzelzellen ermöglicht Einblicke in die Dynamik der Zelldifferenzierung welche bei den Adhaesionskulturen und ihren mehr oder weniger gleichförmigen Zellrasen nicht zugänglich waren. Es liegt nahe

anzunehmen, dass das Zentrum des Zellaggregates den Kern der Zellproliferation darstellt, in welchem die Zellen zunächst undifferenziert bleiben, während am Rand bei wohl geringerer Proliferationsaktivität Differenzierung einsetzt und damit die Proliferation beendet. Die zwischen den Kolonien eingestreuten Einzelzellen lassen morphologisch Differenzierungszeichen vermissen. Man darf schließen, dass Differenzierung Zellteilung zur Voraussetzung hat. Auch *Ostenfeld und Svendsen (2004)* beobachten in ihrer in-vitro Untersuchung an humanen Neurosphären, dass Differenzierungsprozesse eher am Rand, als im Zentrum der Zellaggregate stattfinden.

4.4 Modell zur Differenzierung neuraler Zellen

Aus den Beobachtungen der hier durchgeführten proliferationskinetischen und morphologischen Untersuchungen zur Rolle von bFGF bei der Differenzierung neuraler Vorläuferzellen lassen sich – vorsichtig und rein spekulativ – Interaktionen des bFGF mit neuronalen Vorläuferzellen im Verlauf der ontogenetischen Bildung des Nervensystems ableiten.

Aus einer pluripotenten Stammzelle könnte durch kontinuierliche bFGF-Einwirkung eine Nestin-positive neurale Vorläuferzelle entstehen. Für diesen Differenzierungsschritt ist die ständige Präsenz von bFGF obligatorisch. Eine einmalige bFGF-Einwirkung könnte in einer solchen pluripotenten Stammzelle eine Determinierung bewirken. Diese Zellen, determinierte neurale Stammzellen, würden sich dann ohne weiteren Bedarf an bFGF und ohne vorher Nestin exprimiert zu haben zu neuronalen oder glialen Zellen differenzieren. Aus den Nestin-positiven Zellen würden sich ebenfalls Neurone, bei einmaliger bFGF-Einwirkung und Gliazellen, bei gleichmäßig hoher bFGF-Einwirkung entwickeln. Hiermit gut in Einklang zu bringen ist eine persönliche Mitteilung von *Reisert (2003)*, die bei Schnittuntersuchungen an embryonalen Mäusegehirnen das Vorhandensein von Nestin-negativen Zellen in den Proliferationszonen beschreibt. Die oben bereits erwähnten *Ostenfeld und Svendsen (2004)* kommen zu dem Schluss, dass sich Astrozyten wahrscheinlich direkt aus Nestin-positiven Vorläuferzellen entwickeln, während für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen niedrige bFGF-Konzentrationen obligatorisch sind.

Nestin-positive Zellen könnten wichtige Funktionen bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, ähnlich einem Baugerüst, haben. Als Intermediärfilament dient Nestin der Organisation und Erhaltung von Zellform und Zellintegrität, und könnte so erst die

vielfältigen morphogenetischen Prozesse der Neurulation ermöglichen (Lendahl et al. 1990). Radiäre Gliazellen, die im sich entwickelnden Nervensystem als Leitstrukturen dienen, zeigen eine positive Nestin-Immunreaktivität (Sultana et al. 2000). Ein weiterer Hinweis auf die Funktion des Nestins bei morphologischen Umbauprozessen findet sich in einer Ex-vivo-Arbeit von Frisé et al. (1995). Die Autoren berichten über eine starke Nestin-Expression der, nach einer Verletzung des ZNS an der Narbenbildung beteiligten, Astrozyten. Moroz et al. (2003) wiederum zeigen anhand von Gewebeschnitten postpartaler Ratten eine verstärkte bFGF-Immunreaktivität von Astrozyten der Substantia nigra, im Anschluss an das Setzen einer lokalen Läsion.

Ob solche determinierten Stammzellen in-vivo existieren ist ungewiss. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die bereits erwähnten Ergebnisse von Maric et al. (2003) legen jedoch die Existenz solcher Zellen zumindest in-vitro nahe. In (Abb. 11) sind diese Überlegungen noch einmal veranschaulicht.

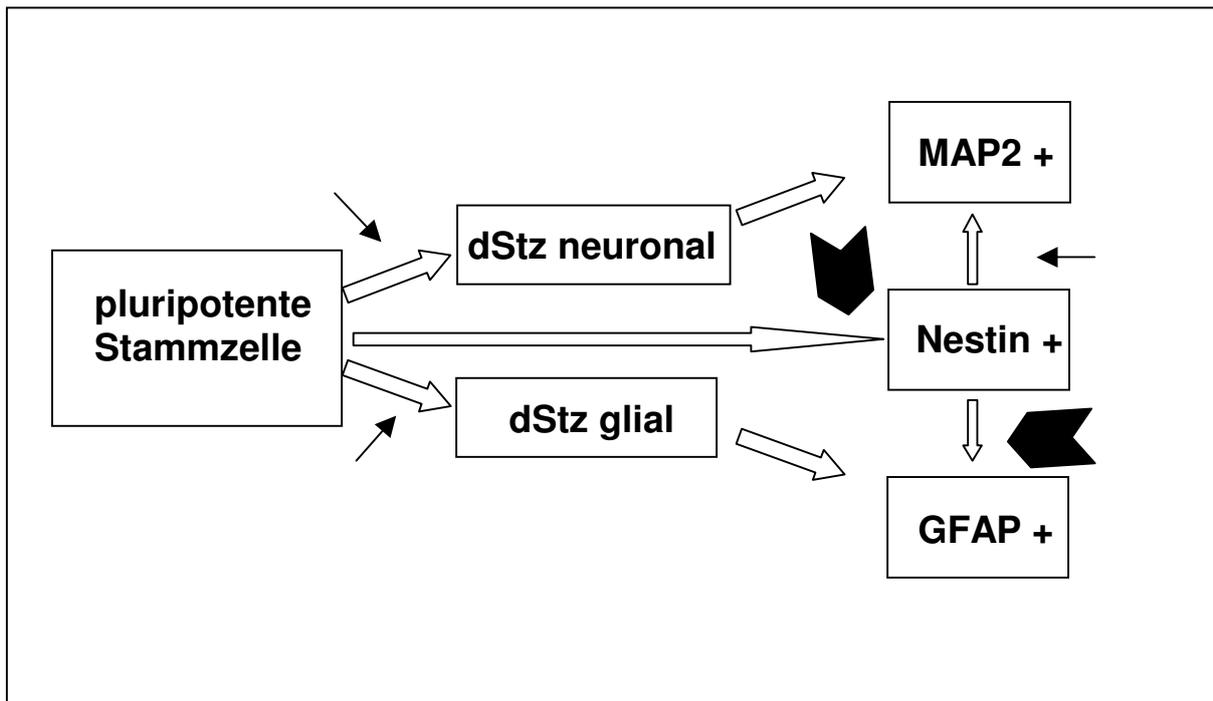


Abb. 11: Schema zur Entstehung reifer neuraler Zellen aus einer pluripotenten Stammzelle. dStz = determinierte Stammzelle. Die kleinen schwarzen Pfeile symbolisieren eine determinierende Wirkung durch kurzfristige Einwirkung des bFGF, die dicken schwarzen Pfeile eine proliferations- und differenzierungsfördernde Wirkung durch eine kontinuierliche bFGF-Einwirkung.

4.5 Einfluss des Geschlechts

Es ist bekannt, dass Steroidhormone während der Ontogenese einen Einfluss auf die sexuelle Differenzierung des Gehirns haben (*Arnold und Gorski 1984*).

Geschlechtsspezifische Unterschiede, die sich in morphologischen Befunden widerspiegeln finden sich bei *Gorski (1987)*. In seiner Arbeit beschreibt der Autor einen deutlichen Volumenunterschied des Sexually dimorphic nucleus der Area preoptica bei adulten Ratten, bei *Witelson (1992)* sind geschlechtsabhängige Größenunterschiede des Corpus callosum beim Menschen beschrieben.

Es ist möglich, dass sich solche geschlechtsspezifischen Befunde in Unterschieden der embryonalen Wachstums- und Differenzierungskinetik bei der Entstehung neuronaler und glialer Zellen wiederfinden, schließlich stellen diese differenzierten Zellen die Bausteine größerer Funktionseinheiten des Nervensystems dar.

In der hier vorliegenden Arbeit war der zu beobachtende Einfluss des Geschlechts der Kulturen auf den Kulturverlauf allerdings gering bzw. fraglich. In den Suspensionskulturen nimmt die Zellzahl nach der Aussaat und erneut nach dem Maximum am DIV 4 wieder ab. In dieser ungünstigen nekrobiotischen Phase, scheinen die weiblichen Zellen einen geringen Überlebensvorteil gegenüber den männlichen Zellen zu haben, die oben bereits erwähnten *Moroz et al. (2003)* finden bei ihren Gewebeschnittuntersuchungen einen schwächer ausgeprägten Nervenzelluntergang bei weiblichen Nervenzellen nach dem Setzen der lokalen Läsion.

Das globale Zellwachstum in den Adhaesionskulturen mit oder ohne bFGF zeigt wie auch in der Expansionsphase der Suspensionskultur keine Geschlechtsabhängigkeit. Das differenzielle Wachstum hingegen zeigt, bei +bFGF- mehr als bei -bFGF- Kulturen und am deutlichsten bei GFAP-, weniger bei MAP2- und am geringsten bei Nestin-exprimierenden Zellen einen Vorteil für männliche gegenüber weiblichen Kulturen. Die Varianzanalyse jedoch konnte diese Beobachtung bei keinem der Marker belegen. Allein bei den GFAP-positiven Zellen liegt der p_G -Wert mit 0,0613 nur knapp über dem Signifikanzniveau und könnte auf einen Einfluss des Geschlechts auf die Differenzierung zu Gliazellen hindeuten.

Dabei ist zu bedenken, dass es sich bei den erhobenen Befunden um eine Momentaufnahme in einem dynamischen und ontogenetischen Prozess handelt, sowohl was den Zeitpunkt der Gewebeentnahme von den ED 13 Embryonen als auch die Beobachtungszeitpunkte der in-vitro-Kultivierung anbetrifft, die zu anderen

Zeitpunkten wohlmöglich ganz andere Ergebnisse ergäbe. Nichtsdestoweniger sind die dargestellten Befunde bei den GFAP-positiven Zellen gut mit einer Ex-vivo-Arbeit von *Suárez et al. (1992)* in Einklang zu bringen. Die Autoren beschreiben in Kleinhirn-Gewebeschnitten von vier Wochen alten männlichen Hamstern eine höhere GFAP-Immunreaktivität gegenüber weiblichen Hamstern. Dieser sich bei postpartalen Tieren darstellende Unterschied könnte seinen Ursprung in Unterschieden der embryonalen GFAP-Expression nehmen. *Nordeen et al. (1998)* beschreiben in ihrer Ex-vivo-Arbeit bei Vögeln in einem sexuell dimorphen Kerngebiet eines Song control nucleus vor einem physiologischen Nervenzelluntergang um den 30. Tag nach dem Schlüpfen, eine signifikant niedrigere Anzahl von Gliazellen bei weiblichen Tieren.

Im Gegensatz dazu finden sich bezüglich der Proliferation BrdU-positiver Zellen in der hier vorliegenden Arbeit keine Geschlechtsunterschiede. Es kommt zu gleichartig ansteigenden Zellzahlen sowohl unter bFGF-Gabe, als auch bei bFGF-Entzug. Zu keinem Zeitpunkt wird bei BrdU-positiven Zellen ein Vorteil männlicher gegenüber weiblichen Kulturen sichtbar.

4.6 Anwendbarkeit der Methode zur Zellersatztherapie

Es ist fraglich, ob eine extrakorporale Kultivierung geeignet ist, um eine hohe Ausbeute an funktionsfähigen Nervenzellen zu erzielen. Problematisch ist hierbei besonders der Passageprozess aus den Zellaggregaten, der von vielen der bereits ausgereiften Zellen nicht überlebt wird.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen jedoch lassen Überlegungen über eine andere Herangehensweise an eine Zellersatztherapie zu. Es erscheint zumindest möglich, pluripotente Stammzellen in-vitro durch ein nur kurzes Einwirken des Wachstumsfaktors bFGF für eine spätere Funktion als Nerven- oder Gliazelle zu determinieren. Durch die nur kurze Einwirkdauer würde gleichzeitig eine bereits in-vitro beginnende Differenzierung mit all den daraus folgenden Problemen einer Zellpassage vermieden werden. Die so determinierten Zellen könnten dann beispielsweise über Katheter der hirnersorgenden Arterien oder direkt operativ für eine Zellersatztherapie im ZNS verwendet werden. Die für die Zellpassage unerwünschten, für die Funktion jedoch obligatorischen Differenzierungsprozesse der neuralen Zellen fänden somit erst im Gehirn und nicht bereits in der Petrischale statt.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein neues Zellkultursystem charakterisiert und im Hinblick auf seine Eignung zur Generierung von Nervenzellen untersucht. Weiterhin wurde die Rolle des Wachstumsfaktors bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) bei der Differenzierung neuraler Zellen beleuchtet und hierbei auch Einflüsse des Geschlechts berücksichtigt.

bFGF hat sowohl einen die Proliferation als auch die Differenzierung fördernden Effekt. Unter anderem spielt hierbei die Einwirkungsdauer eine modulierende Rolle. Durch ein einmaliges, kurzes Einwirken von bFGF auf eine pluripotente Stammzelle wird die Differenzierung zu Neuro- und Glioblasten getriggert. Für eine weitere Entwicklung zu reifen Neuronen oder Gliazellen ist weder ein weiteres Einwirken von bFGF noch eine Expressierung von Nestin notwendig. Im Gegensatz dazu bewirkt kontinuierliches Einwirken von bFGF auf eine solche pluripotente Stammzelle die Differenzierung zur Nestin-positiven Vorläuferzelle, die sich teilen und unter weiterer stetiger bFGF-Wirkung zur Gliazelle, bei Mangel von bFGF zur Nervenzelle entwickeln kann. Nestin-positive Vorläuferzellen könnten außer ihrer Reservoirfunktion wichtig zur Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten sein. Die Bildung von reifen neuralen Zellen aus Nestin-negativen Vorläuferzellen scheint zumindest in-vitro möglich zu sein. Die Existenz solcher Zellen in-vivo zu bestätigen sowie eine genauere Charakterisierung steht aus.

Die festgestellten Unterschiede bei der Expression von Differenzierungsmarkern zwischen männlichen und weiblichen Zellen sind gering und zweifelhaft. Allein bei den GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)-positiven Zellen deutet sich ein solcher Unterschied an. Die Deutung dieser Befunde ist völlig offen.

Durch die Kultivierung in Suspensionskultur lässt sich eine gute Zellproliferation erzielen. Als problematisch stellt sich jedoch die weitere Verwendung der propagierten Zellen dar, da die in strukturierten Zellaggregaten heranwachsenden reifen und differenzierten neuralen Zellen den Passageprozess nicht zu überleben scheinen. Zur Generierung von Nervenzellen im Rahmen einer Zellersatztherapie ist die Methode somit ungeeignet. Es finden sich aber Hinweise die dafür sprechen, dass es möglich sein könnte, Stammzellen nur durch kurzzeitige extracorporale Stimulierung mit Wachstumsfaktoren zu determinieren und dann ohne weitere in-vitro-Schritte zu transplantieren.

6. Literaturverzeichnis

01. Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J. M.: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22: 629-634 (2002)
02. Arnold A.P., Gorski R.A.: Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7: 413-442 (1984)
03. Bayer S.A., Altman J.: Neocortical development. 1. Aufl., Raven Press, New York, S. 237-247 (1991)
04. Bernard O., Li M., Reid H.H.: Expression of two different forms of fibroblast growth factor receptor 1 in different mouse tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7625-7629 (1991)
05. Chang M.Y., Park C.H., Lee S.Y., Lee S.H.: Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Brain Res Dev Brain Res* 153: 89-96 (2004)
06. Dotti C.G., Banker G.A., Binder L.I.: The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23: 121-130 (1987)
07. Ellwart J., Dörmer P.: Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with a monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/Hoechst quenching effect. *Cytometry* 6: 513-520 (1985)
08. Frisén J., Johansson C.B., Török C., Risling M., Lendahl U.: Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131: 453-464 (1995)
09. Gensburger C., Labourdette G., Sensenbrenner M.: Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett* 217: 1-5 (1987)
10. Gremo F., Presta M.: Role of fibroblast growth factor-2 in human brain: a focus on development. *Int J Dev Neurosci* 18: 271-279 (1999)
11. Gorski R.A.: Sex differences in the rodent brain: their nature and origin. In: Reinisch J.M., Rosenblum L.A., Sanders S.A. (Hrsg.) *Masculinity/feminity: basic perspectives*. 1. Aufl., Oxford Univ Press, New York, S. 37-67 (1987)
12. Johnson D.E., Williams L.T.: Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60: 1-41 (1993)
13. Lendahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D.: CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595 (1990)
14. Maric D., Maric I., Chang Y.H., Barker J.L.: Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation. *J Neurosci* 23: 240-251 (2003)
15. Meltzer H., Hatton J.D., Sang U.H.: Cell type-specific development of rodent central nervous system progenitor cells in culture. *J Neurosurg* 88: 93-98 (1998)
16. Moroz I.A., Rajabi H., Rodaros D., Stewart J.: Effects of sex and hormonal status on astrocyte basic fibroblast growth factor-2 and tyrosine hydroxylase immunoreactivity after medial forebrain bundle 6-hydroxydopamine lesions of the midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 118: 463-476 (2003)

17. Morrow T., Song M.R., Ghosh A.: Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128: 3585-3594 (2001)
18. Nordeen E.J., Voelkel, L., Nordeen K.W.: Fibroblast growth factor-2 stimulates cell proliferation and decreases sexually dimorphic cell death in an avian song control nucleus. *J Neurobiol* 37: 573-581 (1998)
19. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Segal M., McKay R.D.: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59: 89-102 (1996)
20. Ostenfeld T., Svendsen C.N.: Requirement for neurogenesis to proceed through the division of neuronal progenitors following differentiation of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2-responsive neural stem cells. *Stem Cells* 22: 798-811 (2004)
21. Poek K., Hacke W.: *Neurologie*. 11. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 539-547 (2001)
22. Price D.L.: Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. In: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (Hrsg.) *Principles of neural sciences*. 4. Aufl. McGraw-Hill, New York, S. 1149-1161 (2000)
23. Qian X., Davis A.A., Goderie S.K., Temple S.: FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18: 81-93 (1997)
24. Rakic P.: Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22: 614-618 (2002)
25. Ray J., Baird A., Gage F.H.: A 10-amino acid sequence of fibroblast growth factor 2 is sufficient for its mitogenic activity on neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7047-7052 (1997)
26. Reeves S.A., Helman L.J., Allison A., Israel M.A.: Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5178-5182 (1989)
27. Reimers D., López-Toledano M.A., Mason I., Cuevas P., Redondo C., Herranz A.S., Lobo M.V., Bazán E.: Developmental expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors in neural stem cell progeny. Modulation of neuronal and glial lineages by basic FGF treatment. *Neurol Res* 23: 612-621 (2001)
28. Reisert I.: (2003 persönliche Mitteilung)
29. Robertson E.J.: Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson E.J. (Hrsg.) *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. 1. Aufl., IRL Press, Oxford, Washington DC, S. 71-112 (1987)
30. Sadler T.W.: *Medizinische Embryologie*. 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, S. 387-428 (1998)
31. Suárez I., Bodega G., Rubio M., Fernández B.: Sexual dimorphism in the hamster cerebellum demonstrated by glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin immunoreactivity. *Glia* 5: 10-16 (1992)
32. Sultana S., Sernett S. W., Bellin R.M., Robson R.M., Skalli O.: Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a subset of astrocytes during development. *Glia* 30: 143-153 (2000)
33. Vicario-Abejón C., Johe K.K., Hazel T.G., Collazo D., McKay R.D.: Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15: 105-114 (1995)

34. Weise B., Janet T., Grothe C.: Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J Neurosci Res* 34: 442-453 (1993)
35. Witelson S.F.: Cognitive neuroanatomy: a new era. *Neurology* 42: 709-713 (1992)

Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit immer und immer wieder unterstützt haben. Unterstützung erfahren habe ich von unterschiedlichen Menschen auf unterschiedliche Weise. An erster Stelle möchte ich meinen Vater erwähnen, ohne den die Erstellung der Arbeit in der jetzt vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre! Meiner Mutter gilt mein besonderer Dank dafür, dass sie mich immer aufgebaut und mir Kraft und Selbstvertrauen gegeben hat, wenn ich ein ums andere Mal an mir zweifelte und mit der Welt haderte. Auch meinen Geschwistern und Freunden möchte ich danken. Danken sowohl für konstruktive Kritik an der Sache, als auch für gewährten Zuspruch und ganz besonders auch für offene kritische Gespräche die mir die Möglichkeit gaben, mein eigenes Denken und Handeln zu überprüfen. Meiner Doktormutter, Frau Professor Reisert, danke ich für ihr großes persönliches Engagement, mit dem sie stets die Anfertigung dieser Arbeit unterstützte. Schließlich möchte ich noch den Mitarbeitern der Abteilung Anatomie und Zellbiologie danken, die mir, besonders am Anfang der Laboratoriumsarbeit, stets mit Rat und Tat zur Seite standen.