

Universität Ulm
Klinik für Orthopädie
Leiter: Prof. Dr. med. H. Reichel

**Einfluss der murinen Astrozyten – Kokultur
auf das neurale Differenzierungspotential
proneural konvertierter mesenchymaler Stammzellen**

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

vorgelegt von
Lennart von Kempfski
aus Bonn
2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rolf Brenner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Otto
Tag der Promotion: 27.10.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III-IV
1) Einleitung	1-21
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1-4
1.2 Stammzellen	4-10
1.3 Wachstums – und Differenzierungsfaktoren	11-15
1.4 Kokultur	15-20
1.5 Fragestellung	20-21
2) Material und Methoden	21-34
2.1 Material	21-23
2.2 Versuchsablauf	24
2.3 Astrozyten – Proliferation	25
2.4 Astrozyten einfrieren und auftauen	26
2.5 Astrozyten – Kultur	26
2.6 Astrozyten splitten	26-27
2.7 Medium herstellen	27-28
2.8 MSC/MNSC umsetzen	28
2.9 Zellen zählen	28-29
2.10 Zellkultur von Stammzellen	29
2.11 Immunhistochemie	30-33
2.12 Statistik	34
3) Ergebnisse	35-49
3.1 Kokultur muriner Astrozyten	35-39
3.1.1 Astrozyten – Präparation	35
3.1.2 Wachstumsbedingungen	35-36
3.1.3 Astrozytenkultur verschiedener Zelldichte	36
3.1.4 Proliferationsfaktoren	36-37

3.1.5 EtOH (Ethanol) und RA (Retinoic Acid)	37-38
3.1.6 Etablierung der Kulturbedingungen	39
3.2 Auswertung	40-48
3.2.1 Nährmedien	40
3.2.2 Primärantikörper	40-48
3.3 Zusammenfassung	48-49
4) Diskussion	50-66
4.1 Fragestellung	50
4.2 Methodik	50-53
4.3 Ergebnisse	53-56
4.3.1 Astrozyten als Kokultur	53-54
4.3.2 Stammzellen	54-57
4.3.3 Wachstums – und Differenzierungsfaktoren	57-62
4.3.4 Fazit	62-66
5) Zusammenfassung	67-68
6) Literatur	69-74
7) Danksagung	75
8) Lebenslauf	76-77

Abkürzungsverzeichnis

5AzaC	5 – Azaclytidine
24 CS	Chamber slide
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid – Precursor – Protein
AQP	Aquaporine
ATP	Adenosintriphosphat
β – APP	Beta – Amyloid – Precursor – Protein
BDNF	Brain – derived Neurotrophic Factor
C4ST	Chondroitin 4 – Sulfotransferase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CNPase	2', 3' – cyclic Nucleotid 3' – Phosphodiesterase
CO ₂	Kohlendioxid
CSF – 1	Colony Stimulating Factor 1
CSPG	Chondroitin Sulfate Proteoglycans
DAPI	4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid
DAT	Dopamintransporter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EM – 1	Expansion Medium 1
ESC	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FN	Fibronectin
GAL – C	Galaktocerebrosid
GAP	Growth Associated Protein

GDNF	Glial Cell Line – derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
G – MEM	Glasgow Minimum Essential Medium
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HuN	Human Nuclei
IGF – 1	Insulin – like Growth Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LME	Leucinmethylester
MAP – 2	Mikrotubuli assoziierte Proteine
MNSC	Marrow – derived NSC – like Cells
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSC	mesenchymale Stammzellen
NGF	Nervous Growth Factor
Neu – N	Neurofilament – N
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSC	Neurale Stammzellen
OPC	Oligodendrocyte Precursor Cells
p75NRT	p75 Neurotrophin Receptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDL	Poly – D – Lysin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen – Emissions - Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly – L – Lysin
PSD	Postsynaptic Density
RA	Retinsäure/Retinoic Acid
RT – PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
SHH	Sonic Hedgehog Homolog
TH	Tyrosinhydroxylase
TrkB	Tyrosine Protein Kinase Receptor B
XT	Xylosyltransferase
ZNS	Zentrales Nervensystem

1) Einleitung

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit zellbiologischen Grundlagen einer möglichen Stammzelltherapie für neurodegenerative Erkrankungen. Ziel war es, den Einfluss bestimmter löslicher Faktoren sowie einer Kokultur mit Astrozyten auf mesenchymale Stammzellen hinsichtlich einer neuronalen Differenzierung zu überprüfen. Auf dem aktuellen Forschungsstand basierend sollten zunächst Kulturbedingungen der mesenchymalen Stammzellen, als auch die Bedingungen der Kokultur mit murinen Astrozyten, optimiert werden. Anschließend wurden die mesenchymalen Stammzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein verschiedener neuraler Proteine untersucht, um eine mögliche neurale Differenzierung festzustellen. Nachfolgend erfolgt zunächst ein allgemeiner Überblick über den aktuellen Stand der Forschung zu neurodegenerativen Erkrankungen, Stammzellen und deren Regulationsmechanismen in Hinblick auf neue zelltherapeutische Ansätze.

1.1) Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen bezeichnen eine Gruppe von Erkrankungen des Nervensystems. Sie sind durch langsamen Fortschritt charakterisiert und treten erblich oder sporadisch auf. Hauptmerkmal der neurodegenerativen Erkrankungen ist der fortschreitende Verlust von Nervenzellen, der zu verschiedenen neurologischen Symptomen führt. Hierunter fallen häufig die Demenz und der Bewegungsverlust. Diese Erkrankungen können in verschiedenen Lebensaltern auftreten und verlaufen diffus oder generalisiert.

Beispiele für neurodegenerative Erkrankungen sind Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Amyotrophe Lateralsklerose.

1.1.1) Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist ein gutes Beispiel für den pathologischen Mechanismus einer neurodegenerativen Erkrankung. Hier findet ein „einfacher“ Zellverlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra statt. Die Ätiologie für diesen Zelluntergang ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Ansätze. Eine mögliche Ursache beruht auf genetischen Faktoren. Bei 5 – 15% der Parkinsonpatienten findet man weitere Betroffene in der Familie. Es wurden bisher 11 Genloci (PARK 1-11) gefunden, wovon bei 7 Genloci bisher die verantwortlichen Gene gefunden wurden.

Der Genlocus PARK 1 codiert für das Protein Alpha – Synuclein, eine Vorstufe des „nicht – beta – Amyloid – Proteins“. Die Funktion dieses Proteins ist bisher unbekannt, es neigt jedoch zur Aggregation. Zudem ist es der Hauptbestandteil der Lewy – Körperchen, die post mortem als Einschlusskörperchen in Neuronen von Parkinsonpatienten gefunden werden. Es wird vermutet, dass dieses Protein eine toxische Wirkung auf die dopaminergen Neurone in der Substantia Nigra ausübt und so zum Zellverlust beiträgt.

Der Genlocus PARK 2 codiert für das Protein Parkin. Parkin ist eine Ubiquitin – Ligase, die zur Ubiquitinylierung im Rahmen des Ubiquitin – Proteasomen – Systems beiträgt. Über dieses System werden abzubauen Proteine markiert und im Proteasom lysiert (Proteolyse). Eine Mutation von Parkin führt wahrscheinlich zur toxischen Anhäufung des Enzyms und somit auch zum Zelltod dopaminergener Neurone. Bei einer Mutation des Genlocus PARK 2 findet man meistens keine Lewy – Körperchen (Nuytemans 2010).

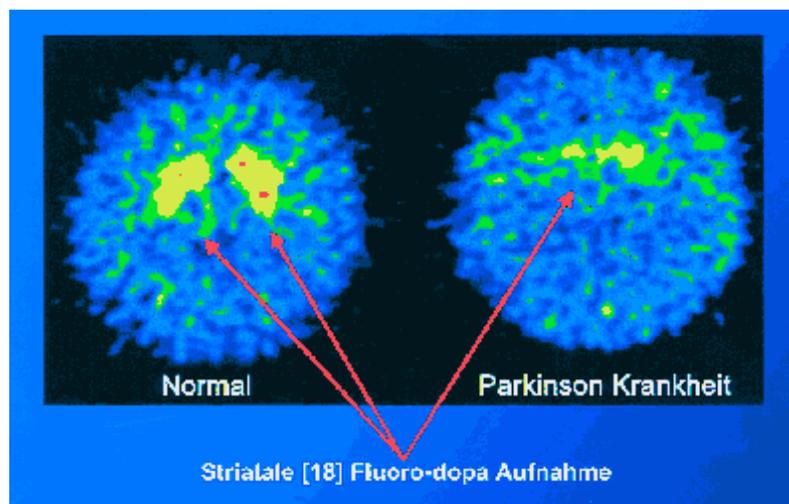


Abbildung 1: Die PET – Aufnahme (Positronen – Emissions – Tomographie) zeigt den Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra (grün/gelb) bei einem Patienten mit Morbus Parkinson (rechts) im Vergleich zu einem gesunden Patienten (links).

Quelle: <http://aerzteblatt.Insdata.de/bilder/2003/06/img107426.gif>

1.1.2) Morbus Alzheimer

Beim Morbus Alzheimer spielen ebenfalls genetische Faktoren eine Rolle. Bei der Erkrankung vor dem 65. Lebensjahr (early onset) wurden bisher 3 Genloci gefunden, die bei Mutation zum Krankheitsbild führen können. Diese Genloci codieren für die Proteine Präsenilin 1, Präsenilin 2 und APP (Amyloid – Precursor – Protein). Bei der Amyloid – Hypothese wird vermutet, dass es bei Mutation des APP zu einem fehlerhaften Abbauweg dieses Proteins mit vermehrter Bildung von β – APP (Beta – Amyloid – Precursor – Protein) kommt. Diese entstandenen Abbauprodukte wirken auf mehrfache Weise neurotoxisch und lagern sich im Neuropil des Kortex ab (Amyloid – Plaques oder senile Plaques).

Bei der Erkrankung nach dem 65. Lebensjahr (late onset) führt das Vorhandensein von ein oder zwei ApoE 4 – Allelen (Apolipoprotein E) zum Krankheitsbild. ApoE ist ein Lipid – Transportprotein, das auch im ZNS gebildet wird.

Des Weiteren findet man beim Morbus Alzheimer eine Aggregation von pathologisch hyperphosphoryliertem Mikrotubuli mit assoziiertem Tau – Protein zu intraneuronalen Neurofibrillenbündeln (Tangles oder Neurofibrillen). Ein wichtiges Korrelat zur Demenz ist die resultierende Synapsenverarmung, die vor allem durch neuritische Degeneration von Axonen, teils diffus im Cortex und teils im Bereich einer Untergruppe von Plaques („neuritische“ Plaques) entsteht.

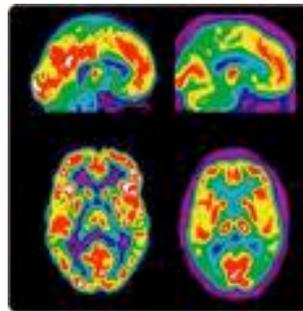


Abbildung 2: Die PET – Aufnahme (Positronen – Emissions – Tomographie) zeigt den Verlust der Gehirnaktivität (blaue und grüne Areale) durch Synapsenverarmung bei einem Patienten mit Morbus Alzheimer (rechts) im Vergleich zu einem gesunden Patienten (rote und gelbe Areale) (links).

Quelle: <http://www.elements4health.com/images/stories/conditions/PET-scans-Alzheimers.jpg>

Eine heilende Therapie für diese Erkrankungen gibt es bisher nicht. Medikamentös können bisher nur die Symptome behandelt werden, nicht jedoch die Ursache. Auch anderweitige Methoden, wie Elektrostimulation oder chirurgische Eingriffe, dienen lediglich der Behandlung der neurologischen

Symptome.

Daher ist es ein wesentliches Ziel der Forschung, eine Therapie zu entwickeln, die der Ursache dieser Erkrankungen entgegenwirkt, bzw. deren Folgen verhindert. Unter dieser Voraussetzung steht die Stammzelltherapie im Vordergrund. Durch adäquaten Ersatz der zugrunde gegangenen Zellen soll die Ursache, in diesem Fall der Zellverlust bei den neurodegenerativen Erkrankungen, therapiert werden, um somit einen kurativen Therapieansatz zu entwickeln.

1.2) Stammzellen

Stammzellen sind nicht ausdifferenzierte Körperzellen. Ihre spätere Spezifizierung (Hautzelle, Leberzelle, etc.) ist in bestimmtem Umfang noch offen. Stammzellen haben die Fähigkeit, durch symmetrische Zellteilung, einerseits Tochterzellen mit Stammzelleigenschaften zu generieren, andererseits, durch asymmetrische Zellteilung, wiederum eine Stammzelle und eine Tochterzellen mit größerem Differenzierungsgrad hervorzubringen (Morrison 1997). Diesen Vorgang nennt man differentielle Teilung. Stammzellen können sich sehr oft teilen. Entscheidend hierbei ist das biologische Milieu, in dem sich die Stammzellen befinden. Stammzellen dienen sowohl der biologischen Entwicklung eines Organismus, als auch der Regeneration von Geweben.

Unterschieden werden die Stammzellen anhand des embryonalen Keimblattes, dem sie entstammen, und anhand ihres Differenzierungspotentials.

Im Anschluss an die Auszüge zur aktuellen Studienlage einzelner Stammzelltypen werden die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten verschiedener Stammzelltypen tabellarisch zusammengefasst.

1.2.1) Therapeutische Möglichkeiten

Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der Stammzellen beschränken sich nicht nur auf die Stammzelltransplantation bei hämatologischen Erkrankungen. Auch bei Gewebeläsionen können Stammzellen mittels Stammzelltherapie eingesetzt werden. Gerade das Herz und das Gehirn verfügen nur über eine geringe Stammzellanzahl. Wird hier Gewebe zerstört, kann es nicht repariert werden. Es wird daher durch funktionsloses Narbengewebe ersetzt. Ziel ist es, dieses Gewebe durch entsprechende Zellen zu ersetzen, die durch Vermehrung und Differenzierung von Stammzellen im Labor gewonnen werden.

Transdifferenzierte Zellen sollen mittels Transplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen zum Einsatz kommen. Dabei wurde festgestellt, dass Läsionsgewebe besonders funktionsfähig ist. Gerade terminal differenzierte Zellen schließen Synapsen mit Neuronen aus der Umgebung, d.h.,

dass die Wiederherstellung der Funktion im Läsionsgebiet vom Ausmaß der Interaktion von Neuronen mit dem Gewebe abhängt. Hierbei spielt auch die Anzahl der überlebenden Zellen in der geschädigten Region eine große Rolle. Solche Mechanismen sind bei Schädigungen, die auf einem einfachen biologischen Mechanismus beruhen, am erfolgreichsten. Bestes Beispiel hierfür ist Morbus Parkinson, bei dem es zu einem Zellverlust dopaminergener Neurone in der Substantia Nigra kommt (Björklund 2000).

1.2.2) Embryonale Stammzellen

Die frühesten Stammzellen sind die ESC (embryonale Stammzellen). Sie werden aus den Zellen des Blastocystenstadiums extrahiert. Embryonale Stammzellen sind in der Lage, sich in alle 3 Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) auszudifferenzieren. Daher werden die embryonalen Stammzellen als pluripotent bezeichnet. Es gibt Hinweise, dass embryonale Stammzellen sich auch zu Zellen der Keimbahn differenzieren können. Somit können sie sich zu jedem Zelltyp des Organismus entwickeln. Insofern klassifiziert man die embryonalen Stammzellen als totipotent (Hermann A 2004).

Man kann die embryonalen Stammzellen in 2 Typen unterteilen. Zum einen gibt es die Stammzellen, die nur im Blastomerenstadium bis zur ersten Furchung existieren. Aus diesen entwickeln sich später alle Zellformen des entstehenden Lebewesens. Daher nennt man sie omnipotent bzw. totipotent.

Zum anderen gibt es Stammzellen aus dem Blastozystenstadium. Diese sind pluripotent, da sich aus ihnen nur noch Zellen des Entoderms, des Ektoderms oder des Mesoderms entwickeln, nicht mehr jedoch Teile der Plazenta.

ESC wurden intensiv hinsichtlich ihres Potentials für die Stammzelltherapie untersucht. Die Techniken für ihre Isolierung sind etabliert, sie zeigen ein gutes Wachstum und verlieren nicht ihr Differenzierungspotential (Hermann D 2006).

Kim et al. haben zum einen den Transkriptionsfaktor Nurr-1 benutzt, der wichtig für die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen ist, und zum anderen LIF (Leukemia Inhibitory Factor), der die neuronale Differenzierung durch Inhibition anderer Differenzierungsarten fördert. Unter Zusatz von FGF-8 (Fibroblastic Growth Factor 8) und SHH (Sonic Hedgehog Homolog) konnten ESC zu dopaminergen, TH-positiven (Tyrosinhydroxylase) Neuronen differenziert werden. Die Funktionsfähigkeit der Neurone wurde durch pharmakologische Stimulation ermittelt (Kim 2002).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde gezeigt, dass sich ESC zu NSC (neurale Stammzellen)

entwickeln. Mit einer Kokultur aus primären NSC wurde beobachtet, dass der Cystein – Protease – Inhibitor „Cystatin C“ dafür verantwortlich war, dass sich mehr Neurospheres (siehe unten) aus den ESC ausgebildet haben. Diese Spheres waren Nestin – positiv und die Zellen haben sich zu Neuronen bzw. glialen Zellen differenziert (Kato 2006).

1.2.3) Neurale Stammzellen

Eine NSC ist im Prinzip eine Vorläuferzelle, die sich durch Zellteilung selbst erneuern kann und oligopotenz ist. Sie kann sich in verschiedene Zelltypen des Nervensystems wie Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten differenzieren. Aufgrund dieses Differenzierungspotentials sind NSC in der Stammzelltherapie vielversprechend.

Es wurden bereits Experimente mit neuronalen Vorläuferzellen durchgeführt. Diese Vorläuferzellen findet man vor allem im Mesencephalon, im Hippocampus und in der Subventrikularzone von embryonalen und adulten Gehirnen. Durch Anwendung der Faktoren EGF (Epidermal Growth Factor) und FGF-2 und unter Verwendung von reduziertem Sauerstoff in der Kultur konnte man die Proliferation der Zellen (als sogenannte „Neurospheres“), sowie deren Differenzierung in dopaminerge Neurone fördern. Unter Verwendung einer striatalen Kokultur wurde ein Anstieg von TH-positiven Neuronen festgestellt. In einer weiteren Kultur wurden vier Merkmale von dopaminergen Neuronen entdeckt: die Zellen waren positiv für TH und DAT (Dopamintransporter), sie produzierten Dopamin und es erfolgte eine Kalium – evozierte Dopamin – Sekretion. Ein Problem mit NSC ist, dass sie nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen (Storch 2001).

Um die Vielfalt an Zellen des Nervensystems zu koordinieren, werden intrazelluläre Mechanismen benötigt, die diese Zellen zu einem dynamischen System verbinden. Diese Voraussetzung erfüllt unter anderem ATP (Adenosintriphosphat). Jede Zelle kann ATP zur intrazellulären Kommunikation synthetisieren und jede Zelle des Nervensystems hat eine Vielfalt an Membranrezeptoren für extrazelluläres ATP und seine Metaboliten, sowie für die Enzyme, die die Hydrolyse von ATP regulieren. Diese Membranrezeptoren aktivieren die Second Messenger, welche diverse Prozesse ihrerseits aktivieren. Somit ist ATP mitverantwortlich für die Interaktion zwischen Neuronen und Astrozyten, sowie zwischen anderen Zellen des Nervensystems (Fields 2006).

1.2.4) Andere postembryonale Stammzellen

Postembryonale Stammzellen sind jene Stammzellen, die nach der 12. Schwangerschaftswoche im Organismus vorkommen. Sie werden weiter in fötale, neonatale und adulte Stammzellen unterteilt.

Postembryonale Stammzellen sind multipotent, d.h. sie sind auf die Ausreifung in bestimmte Gewebe beschränkt.

Adulte Stammzellen kommen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen auch nach der Geburt im Organismus vor. Adulte Stammzellen sorgen für die Regeneration von fehlerhaften, kranken, oder abgestorbenen Zellen. Hierzu gehören vor allem die Stammzellen aus dem Knochenmark. Dort gibt es neben pluripotenten auch unipotente Stammzellen, aus denen sich nur eine ganz besondere Blutzelllinie entwickeln kann.

Ein besonderes Interesse in der Stammzelltherapie liegt in der Differenzierung von MSC (mesenchymalen Stammzellen). Mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit sich in mesenchymales Gewebe zu differenzieren. Dazu gehören Knochen, Knorpel, Herzmuskel und Fett. MSC lassen sich gut kultivieren. Sie wachsen adherent, wenn man sie in Plastikkulturflaschen kultiviert, und proliferieren sehr schnell. Aus einer Zelle kann eine kontinuierliche Population hervorgehen (Jiang 2002).

1.2.4.1) Mesenchymale Stammzellen

MSC sind morphologisch und phänotypisch heterogen, da sie sich in viele verschiedene Gewebe differenzieren können. Wichtig, im Sinne der neuronalen Differenzierung, ist der Phänotyp. Nestin – positive Zellen sind dabei als unreife Zellen zu beurteilen, da sie sowohl teilende Zellen, wandernde Zellen, als auch Zellen mit schnellem Wechsel der Morphologie beinhalten (Vogel 2003).

In einer Studie wurde herausgefunden, dass MSC auch eine Rolle bei der Wiederherstellung von Gewebe nach Verletzungen des Zentralnervensystems spielen. Mittels humoraler Signale beeinflussen sie, nach der Gewebeschädigung, die Ausdifferenzierung von Neuronen und Oligodendrozyten aus NSC (Bai 2006).

Einige Studien haben aber bereits gezeigt, dass Zellen auch die Fähigkeit haben, sich zu transdifferenzieren, d.h., dass sie durch spezifische Kultivierung einen Phänotyp annehmen, der sich von dem des Ursprungsgewebes unterscheidet. Auch Knochenmarksstammzellen haben dieses Potential, ihre Barriere zu überschreiten. Es wurde festgestellt, dass MSC Nestin exprimieren. Nestin ist ein Filamentprotein, das vorwiegend von Stammzellen des Zentralnervensystems exprimiert wird. Durch diese Expression können MSC ein Astrozyten – , oder Neuronen – ähnliches Aussehen annehmen (Wislet – Gendebien A 2005). Die Expression von Nestin wird durch das Einsetzen von Serum – freiem Medium und einer folgenden *in vitro* – Reifung der MSC erreicht. Mindestens 25 Populationsverdopplungen waren notwendig, damit 75% der MSC Nestin

exprimierten. In einem weiteren Versuch dieser Laborgruppe wurde gezeigt, dass die Nestin – Expression einerseits, und das Vorhandensein von direkten Zell – Zell – Kontakten mit der Kokultur aus murinen neuronalen Zellen andererseits, zwei wichtige Faktoren in der Differenzierung von MSC in Neuron – ähnliche Zellen sind. Diese Zellen haben zudem eine Hochregulierung einiger Gene gezeigt (z. B. Sox), die in der neuronalen Entwicklung von Zellen ein entscheidender Faktor sind. Diese Hochregulierung wurde mittels RT – PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) nachgewiesen. Zudem wurde durch das „Patch clamp“ – Verfahren das Vorhandensein von Kalium – und Natriumkanälen ermittelt, welche wichtige Charakteristika von Neuronen sind (Wislet – Gendebien B 2005).

Auch auf der Basis der Genregulation wurden Experimente zur neuronalen Transdifferenzierung durchgeführt.

Einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung hat der Transkriptionsfaktor SOX – 1. Dieser wird sehr früh in ektodermalen Zellen exprimiert und korreliert mit der Bildung der Neuralplatte. Er reagiert dementsprechend früh auf neurale Signale und fördert die neuronale Differenzierung. Am Ende der Mitose wird die Expression dieses Faktors wieder reduziert. Nachgewiesen wurde, dass er nur in Verbindung mit RA (Retinoic Acid) exprimiert wird. Somit sorgt SOX – 1 zusammen mit RA für eine effiziente neuronale Entwicklung in den Zellen (Pevny 1998).

Dezawa et al. haben per Zufall herausgefunden, dass beim Gentransfer von Notch1 in MSC Neuron – ähnliche Zellen entstanden sind. Notch1 regelt im Normalfall die Umwandlung zu Astrozyten und Schwannzellen aus neuronalen Stammzellen. Durch die Zugabe von trophischen Faktoren (BDNF = Brain – derived Neurotrophic Factor , NGF = Nerve Growth Factor) haben sich aus diesen Vorläuferzellen funktionsfähige Neurone entwickelt. Sie haben schnelle Natrium – Kanäle aufgewiesen und einen hohen Prozentanteil an MAP – 2 – positiven (Mikrotubuli assoziierte Proteine 2) Zellen. Durch weitere Zugabe von GDNF (Glial Cell Line – derived Neurotrophic Factor), welches für die Entwicklung dopaminergischer Neurone wichtig ist, konnten einige TH – positive Zellen differenziert werden. Nach Zugabe von Kalium wurde in diesen Neuronen eine Dopamin – Freisetzung beobachtet.

Diese funktionsfähigen Neurone wurden autolog transplantiert und zeigten im Gehirn eine hohe Überlebensrate (Dezawa 2006).

Um den Mechanismus der synaptischen Plastizität zu verstehen, wurde versucht Komponenten zu identifizieren, die bei der neuronalen Aktivität induziert werden. Hierbei wurde das Gen Neuritin entdeckt, dass bei der neuronalen Aktivität aktiviert wird. Reguliert wird Neuritin durch das Neurotrophin BDNF. Die mRNA (Messenger Ribonucleic Acid) von Neuritin wurde auch in den Zellschichten des sich entwickelnden Gehirns gefunden. Die Neurone bewegen sich ausgehend vom

Neuroepithel durch die Subventrikularzone, wo sie sich differenzieren. So steht die Konzentration von Neuritin in Korrelation zum Entwicklungsstatus der Neurone (Naeve 1997).

Mehrfach wurde bereits nachgewiesen, dass MSC die Möglichkeit aufweisen, sich neuronal zu differenzieren. Hierzu wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt.

Der erste Schritt war es, MSC zu MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) zu differenzieren. MNSC sind proneural konvertierte MSC, die ein hohes Potential besitzen Zelltypen des Nervensystems zu generieren. Unter Verwendung von Wachstumsfaktoren, Serum – freiem Medium und hypoxischen Kulturbedingungen haben sich Zellpopulationen in Neurosphere – ähnlicher Form gebildet. Diese zeigten nach einigen Wochen der Kultivierung einen Verlust der mesodermalen Charakteristika und ein gesteigertes Potential für neurale Differenzierung auf. Der Phänotyp ähnelte sehr dem von neuronalen Vorläuferzellen. Nach 10 – 14 Tagen neuraler Differenzierung zeigten 13+/-4% der MNSC morphologische und phänotypische Charakteristika von Astrozyten (GFAP – positiv). Weiterhin waren 15+/-2% GalC – positiv (Galactocerebroside) und deuteten damit auf Charakteristika von Oligodendrozyten hin. Ein wesentlicher Teil der Zellen exprimierte den frühen neuronalen Marker β – Tubulin 3 (42+/-6%), ein geringer Anteil MAP – 2 (6+/-2%), ein Marker reifer Neurone. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigten ca. 40% der Zellen Hinweise für Natrium – und Kaliumkanäle (Hermann A 2004).

Diese Multistep – Konvertierung wurde auch in einer weiteren Studie derselben Gruppe untersucht. Hermann et al. haben herausgefunden, dass im ersten Schritt MSC zu NSC – ähnlichen Zellen transdifferenziert werden, und im zweiten Schritt die terminale Differenzierung dieser Zellen zu NSC erfolgt. Dabei wurde entdeckt, dass undifferenzierte MSC bereits Neuronenmarker aufweisen (Nestin, β – Tubulin 3, GFAP), nicht jedoch MAP – 2, einen Marker für reife Neurone. Zudem verlieren sie schon in diesem Stadium Eigenschaften mesenchymaler Zellen. Der erste Schritt wurde durch Zugabe verschiedener Faktoren erreicht (cAMP, Cytokine, EGF, DMSO = Dimethylsulfoxid, etc.). Nach diesem Schritt konnten jedoch keine morphologischen oder physiologischen Charakteristika von Neuronen festgestellt werden. Für die terminale Differenzierung wurden die Zellen abermals mit diversen Faktoren inkubiert, mit dem Ergebnis, dass die Zellen positiv für MAP – 2, GFAP und GAL – C und Dopamin waren, nicht jedoch mehr für die frühen Marker (Nestin). Für Hermann et al. war es wichtig, den neuronalen Phänotyp von MNSC zu untersuchen. Durch die genaue Funktionsprüfung wurde deutlich, dass eine terminale Differenzierung von MSC zu MNSC und weiter zu neuronalen Zellen nur durch den Zusammenschluss beider Schritte erfolgreich ist. Jeder Schritt für sich alleine brachte keinen Erfolg (Hermann C 2006; Hermann D 2006).

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über verschiedene Primärantikörper und deren Vorkommen.

Tabelle 1: Verschiedene neurale Marker und deren Vorkommen

Neurale Marker	Vorkommen/Entwicklungsstatus
β – Tubulin 3	Unreife Neurone
GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein)	Astrogliazellen
TH (Tyrosinhydroxylase)	Dopaminerge Neurone
MAP – 2 (Mikrotubuli assoziierte Proteine)	Reife Neurone
Neuritin	Sich entwickelnde Neurone
Nestin	Unreife Zellen
Neu – N (Neurofilament N)	Neuronales Gewebe

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, das neuronale Differenzierungspotential von MNSC, wie von Hermann et al. 2004 etabliert, durch Kokultur mit murinen Astrozyten zu verbessern (Details siehe Abschnitt I.5)

Den verschiedenen Stammzellen wurde in den letzten Jahren ein besonderes Interesse in experimentellen Versuchsreihen gewidmet. Unter der Vorstellung der Differenzierung zu neuronalen Zellen wurden verschiedene Methoden, wie z.B. Genregulation und Transdifferenzierung, näher untersucht. Hier haben sich insbesondere die MSC durch ihre Verfügbarkeit und ihr neuronales Differenzierungspotential bewährt.

Tabelle 2: Übersicht über das Anwendungspotential verschiedener Stammzellen

Stammzellen	Vorteil	Nachteil
ESC (embryonale Stammzellen)	Gutes Wachstums Differenzierungspotential	Ethische Bedenken Tumoröse Entartung
NSC (neurale Stammzellen)	Differenzierungspotential	Verfügbarkeit
MSC (mesenchymale Stammzellen)	Differenzierungspotential Transdifferenzierung	(Multistep – Konvertierung)

1.3) Wachstums – und Differenzierungsfaktoren

Eine besondere Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt zum einen die Auswahl der Wachstums – und Differenzierungsfaktoren, als auch Zell – Zell – Kontakte, etwa der Einfluss einer Kokultur. Durch die Faktoren und durch eine Kokultur wird die Überlebens – und Entwicklungsrate der Stammzellen enorm beeinflusst. Daher ist es sehr wichtig die optimalen Kulturbedingungen für die Stammzellen in verschiedenen Experimenten herauszufinden.

Auch hier werden anschließend die einzelnen aufgeführten Faktoren tabellarisch zusammengefasst. Neurotrophine, z.B. BDNF, haben wichtige Funktionen im Zentralnervensystem. Tiere ohne Neurotrophine können nicht überleben. Wird die Konzentration von BDNF verringert, so werden verschiedene Verhaltensstörungen der Versuchstiere beobachtet. So kommt es zu Hyperaktivität, erhöhter Aggressivität und Hyperphagie. Des Weiteren wurden Gedächtnisstörungen und Angststörungen beobachtet. Für die Neurotrophine gibt es verschiedene Rezeptoren (TRKA/NTRK1 für NGF, TRKB/NTRK2 für BDNF und NT3, TRKC/NTRK3 für NT3 und NT4), aber auch einen gemeinsamen Rezeptor, p75/NGFR, an den alle Neurotrophine binden. Über ihre Rezeptoren regulieren Neurotrophine nicht nur verschiedene Zellfunktionen, sondern auch ihre eigene Freisetzung („negative feedback“). Neurotrophine sind für die Entwicklung des Zentralnervensystems essentiell (Chao 2003).

Die Wirkung des Faktors BDNF wird durch cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat) in reifen Neuronen reguliert.

1.3.1) BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor)

BDNF hat unter anderem einen molekularbiologischen Wirkungsmechanismus. Es wurde herausgefunden, dass einige mRNAs von polysomalen Fraktionen sensibel auf BDNF reagieren. Durch diesen extrazellulären Stimulus kommt es zu vermehrter Translation. In Prozessen, wie synaptische Aktivität und der Leitung von Axonen, erfüllt BDNF somit eine regulierende Funktion. Bei der synaptischen Aktivität wird z.B. das Protein Homer2 vermehrt produziert, welches durch die Bindung von Aktin die Aktivität an der Synapse fördert. Hierdurch wird die Dendritenbildung gefördert und die synaptischen Verbindungen aufrecht erhalten (Schratt 2004).

Der Kultur mit EGF – generierten neuronalen Vorläuferzellen wurden der Faktor IGF – 1 (Insulin – like Growth Factor 1) hinzu gegeben. Als erstes konnte eine Differenzierung der postmitotischen Vorläuferzellen beobachtet werden. Zweitens konnte durch die Verwendung von Insulin die Rekrutierung von Vorläuferzellen durch mitotische Aktivität erhöht werden. Die Anzahl der sich

daraus entwickelnden Neurone war 8 – bis 40 – fach höher, als ohne diese Faktoren. Schließlich kann die Aktivität von IGF – 1 plus Insulin durch BDNF nochmals potenziert werden und BDNF kann allein eine Population der Vorläuferzellen neuronal differenzieren. Zusammen wirken diese Faktoren additiv und können gemeinsam in einer geringeren Konzentration zur Therapie bei ALS (amyotrophe Lateralsklerose) und Chorea Huntington genutzt werden (Arsenijevic 1998).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch Zugabe von BDNF zu einer Kultur mit neuronalen Stammzellen die neuronale Differenzierung gefördert wurde. In dieser Kultur hat die Zugabe von BDNF ein besseres neuronales Wachstum der Zellen durch Ausbildung von Axonen und deren Verzweigungen bewirkt. Durch extrazelluläre Signale von BDNF wurde eine Differenzierungskaskade mittels Genaktivierung ausgelöst und so das neuronale Wachstum gefördert. Dabei wurde zudem festgestellt, dass nur eine kontinuierliche hohe Gabe von BDNF zu der neuronalen Differenzierung der Stammzellen beigetragen hat. Eine einmalige Gabe des Faktors hatte keine Auswirkung auf die Zellen. Zudem wurde gefolgert, dass BDNF alleine keine neuronale Differenzierung von Zellen bewirken kann. Nur im Zusammenwirken mit anderen Differenzierungsfaktoren kann ein entsprechendes Ergebnis erzielt werden.

Im Vergleich zu fetalen Zellen aus dem Hippocampus war die neuronale Differenzierung bei den adulten Stammzellen zwar erheblich geringer, aber dennoch konstant (Shetty 1999).

In einer anderen Studie wurde herausgefunden, dass das Zusammenwirken von BDNF und Noggin zur neuronalen Differenzierung beiträgt. Dabei hat Noggin die gliale Differenzierung inhibiert. Noggin allein erzielte zwar eine Reduktion der glialen Zelldifferenzierung, hatte aber keine Auswirkung auf die neuronale Differenzierung. Die Inhibition der glialen Zellreihen ist nicht unbedingt notwendig, um neurale Vorläuferzellen neuronal zu differenzieren, aber es unterstützt andere Differenzierungsfaktoren. Auch BDNF alleine erzielte geringere Erfolge in der Differenzierung. Somit trägt auch hier BDNF zusammen mit anderen Faktoren zur neuronalen Differenzierung bei (Chmielnicki 2004).

NO (Stickstoffmonoxid) wirkt als interzelluläres Signal, dass die synaptische Plastizität in reifen Neuronen reguliert. Durch Zugabe von BDNF wird die nNOS (Neuronal Nitric Oxide Synthase) aktiviert und so die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen gefördert, während die Proliferation gehemmt wird. Durch Inhibitoren der nNOS kann dieser Prozess zu Gunsten der Proliferation umfunktioniert werden. NO wird in reifen Neuronen produziert und kann durch einen Feedback – Mechanismus die Proliferation von Vorläuferzellen stoppen und die neuronale Differenzierung fördern. Diese These wird durch Entdeckung, dass nNOS – Aktivität in unreifen neuronalen Vorläuferzellen gefunden wurde, unterstützt. So wirken NO und BDNF synergistisch auch in der synaptischen Plastizität und im Überleben der Neurone. Zudem beeinflussen sich NO und

BDNF gegenseitig. Endogenes NO reguliert die BDNF – Produktion und BDNF beeinflusst die nNOS. In dieser Weise tragen diese beiden Faktoren zur Neurogenese bei (Cheng 2003).

Unter Nahrungskarenz wurde der Unterschied der Auswirkung mit und ohne BDNF auf das Überleben von neuralen Stammzellen untersucht. Die Nahrungskarenz hat eine hohe Konzentration von BDNF gefördert und BDNF selbst hat für die Proliferation der Vorläuferzellen und für längeres Überleben der neuralen Stammzellen gesorgt. Zudem wirkt BDNF neuroprotektiv in Kultur, indem es vor oxidativen und exzitotoxischen Schädigungen schützt. BDNF verbessert außerdem das Potential der synaptischen Transmission (Lee 2002).

In einer Studie wurden BDNF – exprimierende Adenoviren intraventrikulär injiziert. Darunter wurde die Proliferation von neuen Neuronen aus lokalen Vorläuferzellen beobachtet. Weiterhin kam es zu einer Umwandlung der Ventrikelwand in BDNF – produzierendes Parenchym, sodass ein konstant hohes Level an BDNF vorhanden war. Neurogenese konnte ebenfalls an anderen Stellen des Gehirns festgestellt werden. Hohe BDNF – Konzentrationen führen demnach zu einem verbesserten Überleben der Vorläuferzellen einerseits, und sorgen für die Migration der Zellen in einem bereits vorhandenen BDNF – reichen Umfeld andererseits. Inwieweit die Viren eine Auswirkung auf die Proliferation der Vorläuferzellen gehabt haben, konnte nicht ermittelt werden. Als erwiesen gilt jedoch, dass BDNF einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen hat (Benraiss 2001).

In einer anderen Studie wurden Zellen eines Neuroblastom – Tumors mit verschiedenen Faktoren kultiviert. Die Zellen dieses Tumors weisen gewisse Merkmale von unreifen Zellen auf und sind somit gut beeinflussbar. Nach der Kultur mit RA und BDNF konnten Eigenschaften von Zellen des sympathischen Nervensystems entdeckt werden. Sie waren daher den unreifen Zellen bzw. den Vorläuferzellen von Neuronen in gewisser Weise ähnlich, indem sie unter anderem Wachstumsfaktorrezeptoren exprimiert haben (Edsjö 2003).

Es gibt eine kleine Population (0,3%) unter den neuralen Stammzellen in der Subventrikularzone, die den Rezeptor p75NTR (p75 Neurotrophin Receptor) exprimieren. Diese Zellen überleben bis in das adulte Stadium und sind für die adulte Neurogenese verantwortlich. Die meisten dieser Zellen formen Neurospheres *in vitro* und weisen weitere Eigenschaften von neuralen Stammzellen, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz, auf. Neben Nestin waren einige Zellen auch positiv für GFAP, sodass p75NTR ein Marker für neurale Stammzellen und deren Vorläuferzellen zu sein scheint. Ein weiteres Indiz für die Fähigkeit als neuronaler Marker ist die Entdeckung, dass p75NTR – negative Zellen vermehrt glial differenzieren. Die glialen Vorläuferzellen bestehen nicht bis ins adulte Stadium, welches die Eigenschaften von p75NTR als postnataler Marker für neuronale Vorläuferzellen bekräftigt.

Durch Zugabe von BDNF zu p75NRT – positiven Vorläuferzellen konnte die Neurogenese erneut gefördert werden, während die Zugabe von BDNF zu reifen Neurospheres keinen Effekt hatte. Dies unterstützt die Hypothese, dass BDNF einen regulierenden und fördernden Einfluss auf die Neurogenese hat (Young 2007).

Anhand der oben beschriebenen Studien zeigt sich, dass der Wachstumsfaktor BDNF nicht nur die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen fördert, sondern dass er auch die neuronale Differenzierung von Stammzellen positiv beeinflusst, vor allem in Kombination mit anderen Differenzierungsfaktoren.

1.3.2) RA (Retinoic Acid)

RA ist ein Derivat von Vitamin A. Ohne RA kann es zu mehreren Fehlbildungen wie Blindheit, Anämie oder Nervendegeneration im Rückenmark kommen. Durch die Nervendegeneration kommt es zur Schädigung der Motoneurone mit folgender Koordinationsstörung oder Motoneuronenerkrankung. Im Zentralnervensystem kann das Fehlen von Vitamin A zu Hydrocephalus oder Spina bifida führen.

RA ist im Gegensatz zu Vitamin A teratogen. Es konnte beobachtet werden, dass durch RA – Gabe neurales Gewebe aus dem Mesoderm entstanden ist. Auch in Kultur haben sich aus Karzinomzellen durch die Zugabe von RA Gliazellen und Neurone differenziert. In Kultur mit neuronalen Stammzellen und RA als Differenzierungsfaktor wurde die Ausbildung von mehr und längeren Neuriten beobachtet. Hierdurch wurde bewiesen, dass RA zur neuronalen Differenzierung beiträgt. Bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen ist RA auch mitbeteiligt. Das Enzym RALDH1, welches an der Synthese von RA aus Vitamin A beteiligt ist, wird von Neuronen der Substantia Nigra exprimiert. Die Neurone im Striatum, mit denen diese über Synapsen verbunden sind, haben Dopaminrezeptoren. Die Expression dieser Rezeptoren wird durch RA kontrolliert. Eine Mutation im RALDH1 – Gen führt daher zu verminderter Konzentration von RA, zu fehlerhafter dopaminergem Signaltransduktion, und letztendlich zum Untergang der Neurone. Auf diese Weise kann Morbus Parkinson entstehen. Hierdurch ist ersichtlich, dass RA mehrere wichtige Funktionen im Zentralnervensystem kontrolliert (Maden A 2002).

Der Differenzierungsfaktor RA ist nicht nur bei der neuronalen Differenzierung sehr wichtig, sondern fördert auch bei ungenügender Konzentration die Entstehung eines Morbus Parkinson. Im Umkehrschluss wird die Notwendigkeit einer ausreichend hohen Konzentration dieses Differenzierungsfaktors zur Verhinderung dieser neurodegenerativen Erkrankung ersichtlich.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Faktoren

Faktor	Wirkung
BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor)	Reguliert synaptische Aktivität wirkt synergistisch mit anderen Faktoren
cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat)	Moduliert intrazelluläre BDNF – Signaltransduktion
EGF (Epidermal Growth Factor)	Proliferation und Differenzierung (v.a. zu dopaminergen Zellen)
FGF (Fibroblastic Growth Factor)	Proliferation und Differenzierung (v.a. zu dopaminergen Zellen)
IGF – 1 (Insulin – like Growth Factor)	Differenzierung, in Verbindung mit Insulin
NO (Stickstoffmonoxid)	Signal für Regulation reifer Neurone
Noggin	Inhibiert gliale Differenzierung
RA (Retinoic Acid)	Fördert Differenzierung
GDNF (Glial Cell Line – derived Neurotrophic Factor)	Neuronale Differenzierung (v.a. zu dopaminergen Zellen)

1.4) Kokultur

Wie schon in mehreren Studien gezeigt wurde, hat die Kokultur einen sehr positiven Einfluss auf das Überleben und auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen. Astrozyten haben sich hier sehr bewährt. Sie sorgen *in vivo* durch diffusionsfähige und membrangebundene Faktoren für die neuronale Entwicklung im Hippocampus. Zudem beschleunigen sie in Kokultur die Proliferation. Astrozyten aus dem Hippocampus scheinen die neuronale Entwicklung und Differenzierung besonders zu fördern. Hierdurch wird die Wichtigkeit der Umgebungsbedingungen in der neuronalen Proliferation und Differenzierung hervorgehoben (Song 2002).

Es wurde festgestellt, dass eine Kultur in geordneten geometrischen Mustern eher den Strukturen des Gehirns ähnelt, als nicht strukturierte Kulturen. Hierzu wurden Multielektroden mit den Reihen verknüpft, auf denen Neurone kultiviert wurden, um die Interaktionen in einem Netzwerk von Neuronen zu beobachten. Sinn hinter diesem Versuch war die Annahme, dass nicht strukturierte Netzwerke zu abnormer Funktion der Zellen führen könnten, wie sie von neurodegenerativen Erkrankungen her bekannt sind. Durch die Struktur wurden mehr Synapsen gebildet, Neurotransmitter freigesetzt und eine elektrische Aktivität entwickelt. Somit wurde die

Überlebensanzahl erhöht. Dadurch erhöhte sich auch die neuronale Dichte, inklusive glialer Zellen. Diese wiederum beschleunigten die Synaptogenese. Hier wurde also verdeutlicht, dass sowohl eine geordnete Struktur, als auch Zell – Zell – Interaktionen wesentlich zur Differenzierung beitragen (Chang 2006).

MSC sind gut beeinflussbar. Je nachdem unter welchen Kulturbedingungen sie kultiviert werden, können sie sich in mehrere Zellreihen differenzieren. Durch Astrozyten als Kokultur können aus MSC astrogliale Zellen hervorgehen (Lei 2007).

Ein weiterer Beweis für den Einfluss der Astrozyten auf die neuronale Entwicklung von Zellen wurde in einem anderen Experiment gezeigt. Hier wurden Astrozyten als Kokultur für OPC (Oligodendrocyte Precursor Cells) genutzt. Weder die Zugabe von EGF / FGF – 2, noch der Einfluss von Noggin konnten die Hypothese des neuronalen Potentials der OPC belegen. Durch die Kokultur mit Astrozyten wurden jedoch neuronale (MAP – 2 positive, Neurofilament – positive) Zellen in der OPC – Kultur entdeckt. Somit konnte das Potential der OPC für neuronale Differenzierung durch den Einfluss von Astrozyten bewiesen werden (Gaughwin 2006).

In einer anderen Studie wurden NSC auf Kollagen kultiviert. Auch hier wird auf die Wichtigkeit der Nähe von, in diesem Fall NSC, zu Astroglia bzw. mikrovaskulären endothelialen Zellen hingewiesen. Jedoch verweist hier der Autor darauf, dass Astrozyten lediglich für die Zell – Zell – Kontakte sorgen, nicht jedoch einen Einfluss auf die Differenzierung haben. Bei der Kultur auf Kollagen wurde beobachtet, dass die Rate an Nestin – positiven Zellen abnahm, die Zahl der Neurofilament – positiven Zellen hingegen zugenommen hat. Hieraus kann auf einen positiven Einfluss des Kollagens auf die neuronale Entwicklung geschlossen werden (Bentz 2006).

1.4.1) Astrozyten

Das ZNS beinhaltet mehrere Arten von Gliazellen. Dazu gehören Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten. Dabei sind die Astrozyten die größten Gliazellen. Morphologisch gesehen haben sie lange Fortsätze, die eine enge Beziehung zu den Kapillaren einerseits, und zu Nervenzellen, insbesondere zur Umgebung der Synapsen andererseits, haben. Es lassen sich mehrere morphologische Astrozytenformen unterscheiden. Zum einen gibt es Faserastrozyten (Typ 1), die lange und dünne Fortsätze aufweisen. In ihrem Zytoplasma lässt sich GFAP nachweisen und sie können mit einem Antikörper gegen Ran – 2, aber nicht gegen A2B5, LB1 (gangliosidische Antigene) oder GAP – 43 (Growth Associated Protein 43) gefärbt werden. Sie kommen überwiegend in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark vor.

Daneben gibt es noch protoplasmatische Astrozyten (Typ 2). Diese sind stärker verzweigt und

haben dickere und kürzere Fortsätze. Sie haben ein sternförmigeres Aussehen als die Astrozyten vom Typ 1. Im Gegensatz zu den Faserastrozyten exprimieren sie in Kultur A2B5 und LB1, sowie GAP – 43, aber nicht Ran – 2. Zudem stammen Typ 2 – Astrozyten von der Vorläuferzelle O – 2A ab, aus der sich auch die Oligodendrozyten entwickeln, während die Typ 1 – Astrozyten von einer anderen Vorläuferzelle abstammen (Rickwood 1995). Die protoplasmatischen Astrozyten sind hauptsächlich in der grauen Substanz des Nervensystems zu finden.

Als dritte Form gibt es noch die radiären Astrozyten. Hierbei handelt es sich um eine Frühform der Glia, die „radialen Glia“ während der Embryonalentwicklung des ZNS. Sie haben lange Fortsätze, an denen junge Nervenzellen aus ihrer Bildungszone an ihren endgültigen Platz wandern können. Sie kommen noch in Teilen des reifen Gehirn vor (z.B. Kleinhirn).

Die Funktion der Astrozyten ist vielseitig. Sie sind einerseits in der Lage die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus zu kontrollieren und damit die Transportvorgänge im ZNS zu beeinflussen. Andererseits wirken sie als Diffusionsbarriere (Blut – Hirn – Schranke), indem sie mit den Endfüßchen der Fortsätze die Kapillaren umgeben. Zudem sind sie für das Elektrolytgleichgewicht im ZNS verantwortlich. Astrozyten haben auch die Fähigkeit zur Proliferation und können so Parenchymschäden durch Narbenbildung decken. Zuerst proliferieren die Astrozyten durch Mitose und zeigen oft einen erhöhten Glykogengehalt. Außerdem weisen diese reaktiven Astrozyten einen vergrößerten Golgiapparat auf. Am Ende des reaktiven Prozesses füllen Astrozyten den Platz der Parenchymschädigung aus und bilden somit eine Narbe. Es wurde auch gezeigt, dass dieser reaktive Prozess nicht unbedingt in der näheren Umgebung der Schädigung stattfinden muss, sondern sich auch in der kontralateralen Hemisphäre ereignen kann.

In einer Studie wurde die Narben – Genexpression in Astrozyten untersucht. Hierbei wurde herausgefunden, dass es Moleküle gibt, die von Astrozyten produziert werden und einerseits die Regeneration inhibieren, andererseits den Aufbau der EZM (extrazellulären Matrix) fördern. Das sind die CSPGs (Chondroitin Sulfate Proteoglycans). Diese Moleküle weisen mehrere Seitenketten auf, die durch das Enzym XT (Xylosyltransferase) synthetisiert werden. Diese Seitenketten wiederum werden durch das Enzym C4ST (Chondroitin 4 – Sulfotransferase) sulfatiert. Daneben produzieren Astrozyten auch Moleküle, die die Regeneration nach Parenchymschädigung fördern. Dazu gehören Laminin und Fibronectin.

Es wurden verschiedene Gene entdeckt, die diese Moleküle beeinflussen. Dazu gehören TGFβ2, IL – 6, PDGF und SOX9, wobei SOX9 nur die CSPGs beeinflusst. So wurde gezeigt, dass nach einer Parenchymschädigung zuerst Laminin und Fibronectin aktiviert werden und im späteren Verlauf die CSPGs, wodurch die Astrozyten, nach einer Parenchymschädigung, durch Narbenbildung zur Regeneration beitragen (Gris 2007).

Weiterhin wurde experimentell ersichtlich, dass das Enzym Caspase, das normalerweise die Apoptose in Zellen einleitet, eine weitere Funktion hinsichtlich der Regeneration nach einer Schädigung von Neuronen zu haben scheint. So wurde nachgewiesen, dass dieses Enzym nach einer Schädigung in reaktiven Astrozyten im Nucleus bis hin zur Narbenbildung verweilt, ohne die Apoptose einzuleiten. Daraus wurde gefolgert, dass Caspase weitere Funktionen besitzt und das Remodeling des Zytoskeletts nach Parenchymschädigung fördert (Acarin 2007).

Eine Folge von Parenchymschädigungen wie Ischämie oder Trauma ist die Schwellung der Astrozyten und der Anstieg von Thrombin. Es wurde nachgewiesen, dass erhöhtes Thrombin, durch seine Protease – Aktivität, zu einer erhöhten Freisetzung von Glutamat und Taurin aus den ödematösen Astrozyten führt. Dies wiederum hat eine weitere Schädigung der Astrozyten zur Folge. Somit wäre dies ein Ansatz, im Falle von Hirntraumata oder Ischämie, eine zusätzliche Schädigung durch Blockierung dieses Weges zu verhindern (Ramos – Mandujano 2007).

Weitere Erfolge konnten hinsichtlich der Astrozytenschädigung bei hepatischer Enzephalopathie verzeichnet werden. Hierbei ist Ammoniak der verursachende Faktor der Schädigung. Bei der hepatischen Enzephalopathie wird vermehrt Ammoniak aus der Leber freigesetzt. Im Gehirn wird Ammoniak zumeist durch das endoplasmatische Retikulum in Glutamin umgesetzt, welches anschließend im Mitochondrium gespeichert wird. Zu viel Glutamin setzt die Astrozyten oxidativem Stress aus und es kommt unter anderem zur ödematösen Schwellung der Astrozyten. Die Aminosäure L – Histidin kann den schädigenden Einfluss von Ammoniak und Glutamin inhibieren. L – Histidin blockiert den Transport von Glutamin in das Mitochondrium. Somit kommt es weder zur ödematösen Schwellung, noch zu einem Verlust von ATP, noch zur Bildung von freien Radikalen in den Mitochondrien. Durch L – Histidin – Gabe kann somit einer Schädigung der Astrozyten bei hepatischer Enzephalopathie vorgebeugt werden (Pichili 2007).

In einer Studie mit ESC wurde durch Astrozyten als Kokultur ein Anstieg von TH – positiven Neuronen und von β – Tubulin beobachtet. Die Quote der TH – positiven Neurone stieg von 12% auf 67% an. Daraus wurde gefolgert, dass Astrozyten die dopaminerge Induktion fördern. Weiterhin wurde untersucht, ob es regionale Unterschiede der Astrozyten hinsichtlich ihrer Wirkung gibt. Dabei wurde festgestellt, dass Astrozyten aus dem Mittelhirn eine weitaus größere dopaminerge Induktion aufweisen, als kortikale Astrozyten (Roy 2006).

Unter der Zugabe von EGF und FGF – 2 und auf einer Kokultur von Astrozyten konnten innerhalb von 24 Stunden morphologische Veränderungen der MSC beobachtet werden (sowie die Induktion von Nestin). Die Astrozyten sollen hierbei einen positiven Einfluss auf die Phänotypisierung haben (Joannides 2003). Zudem bewirken sie eine Verlängerung der Kulturzeit, sodass auch längerfristige Versuchsreihen Bestand haben (Hermann A 2004).

Astrozyten haben zudem eine weitere Funktion. In einer Studie über Rückenmarksverletzungen wurde herausgefunden, dass Astroglia eine wichtige Komponente hinsichtlich der protektiven Wirkung von Neuronen sind, indem sie Harnsäure in ihrer neuroprotektiven Wirkung beeinflussen. Bei Rückenmarksverletzungen ist Glutamat der Transmitter, der hauptsächlich für die Schädigung der Neurone verantwortlich ist. In Experimenten mit einer Kultur aus Rückenmarkszellen konnte, unter Zugabe von Glutamat, ein Zellverlust von 40% beobachtet werden. In dieser Kultur waren sowohl Neurone (Map – 2 positiv), als auch Astroglia (GFAP – positiv, Vimentin – positiv) und Oligodendrozyten (CNPase = 2', 3' – cyclic Nucleotid 3' Phosphodiesterase – positiv). In einer Kultur mit Glutamat und Harnsäure wurde dieser Zellverlust nicht festgestellt, sodass man von einer neuroprotektiven Wirkung der Harnsäure ausgegangen ist. Nun wurde das gleiche Experiment mit reinen Kulturen durchgeführt. In einer reinen Neuronen – Kultur wurde jedoch ein Zellverlust von 80% beobachtet, sodass angenommen wurde, dass die Anwesenheit weiterer Zellen für die neuroprotektive Wirkung der Harnsäure essentiell ist. In der Kultur mit Astroglia konnte diese Annahme bestätigt werden. Hier wurde unter Zugabe von Glutamat und Harnsäure kein Zellverlust festgestellt. Diese Experimente haben demnach bewiesen, dass Astrozyten essentiell für die protektive Wirkung der Harnsäure gegenüber Neuronen sind (Du 2007).

Ein weiterer Einfluss der Astrozyten wurde hinsichtlich der Myelinisierung gefunden. Es konnte bewiesen werden, dass Oligodendrozyten auch noch zu einem späteren Entwicklungsgrad Myelin produzieren können. Dabei haben die Astrozyten eine wichtige Funktion. Durch elektrische Stimulation und der dadurch erhöhten Konzentration von ATP wurden ATP – abhängige Rezeptoren auf Astrozyten stimuliert, welche daraufhin LIF exprimierten. Durch den Einfluss von LIF kam es zu einer vermehrten Produktion von Myelin durch Oligodendrozyten. Somit könnten Astrozyten auch bei der Therapie von demyelinisierenden Erkrankungen eingesetzt werden (Ishibashi 2006). Astrozyten können auch tumorös entarten. Das Astrozytom kann im gesamten Gehirn vorkommen. Es ist ein Tumor des mittleren Lebensalters und macht ungefähr 7% aller Hirntumore aus. Je nach Ausprägung kann man das Astrozytom in 4 Schweregrade einteilen, wobei das letzte Stadium durch Zysten, Nekrosen, Blutungen und Verkalkungen gekennzeichnet ist.

Die benigne Variante dieses Tumor nennt sich pilozystisches Astrozytom. Es kommt vorwiegend im Kinder – und Jugendalter vor und befällt vorwiegend das Großhirn und das Rückenmark.

Es wurde nachgewiesen, dass AQP (Aquaporine) eine Rolle in der Entstehung von Gliomen haben. Besonders die Proteine AQP1 und AQP4 wurden in Gliomzellen gefunden. Dabei haben die beiden Proteine eine unterschiedliche Funktion. AQP1 ist mitverantwortlich für Zellwachstum und Zellmigration. Dagegen zeigen Zellen mit AQP4 keine Migration, da es die Zelladhäsion fördert. Somit ist eine mögliche Ursache der tumorösen Entartung von Astrozyten auf die unterschiedliche

Rolle der Aquaporine zurückzuführen (McCoy 2007).

Eine Kokultur als Grundlage zur Verbesserung von Stammzellkulturen hat sich schon in mehreren Studien als effizient erwiesen. Insbesondere sind hier die Astrozyten hervorzuheben. Sie haben nicht nur eine neuroprotektive Wirkung, sondern zeigten auch mehrfach ein besseres Ergebnis der neuronalen Differenzierung von Stammzellen, insbesondere zu dopaminergen Zellen. Zudem scheinen sie morphologische Veränderungen in MSC zu bewirken.

Weiterhin regulieren sie unter anderem die Myelinisierung von Schwann – Zellen und tragen durch Proliferation bei Parenchymschäden zur Narbenbildung bei.

Astrozyten können jedoch auch tumorös entarten und Teratom – ähnliche Karzinome verursachen.

1.5) Fragestellung

Die bisherigen Therapieansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen sind lediglich symptomatisch, sodass der Untersuchung einer kausalen Therapiestrategie ein besonderes Interesse gilt.

Ziel meiner Doktorarbeit war es, auf der Basis der bisher veröffentlichten Ansätze zur Stammzelltherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen, die in unserem Labor bereits etablierten Methoden mit dem Ziel einer Zellersatztherapie zu verbessern. In den bisherigen Studien (Hermann et al. 2004) wurde der Einfluss von löslichen Faktoren (Wachstums – und Differenzierungsfaktoren) auf mesenchymale Stammzellen hinsichtlich einer neuronalen Differenzierung untersucht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Doktorarbeit zusätzlich eine Kokultur aus murinen Astrozyten verwendet, um den Einfluss dieser Kokultur auf die neurale Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen mit den Ergebnissen der vorherigen Studien (ohne Kokultur) zu vergleichen.

2) Material und Methoden

2.1) Material

2.1.1) Verwendetes Material

PBS (Dulbecco's PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Triton X – 100	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Ziegenerum (Goat Serum)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Gelatine (gelatine from porcine skin)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Mouse anti – Human Nuclei (HuN), Monoclonal Antibody	Chemicon, Billerica, MA, USA
Rabbit Anti – Neuronal Class III β – Tubulin, Polyclonal Antibody	Covance, Princeton State, NJ, USA
Alexa Fluor 488 goat anti – mouse IgG	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor 568 goat anti – rabbit IgG	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Vectashield H – 1000 (Mounting Medium for Fluorescence)	Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA
Vectashield H – 2000 (Mounting Medium for Fluorescence with DAPI)	Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA
Deckgläser	Marienfeld, Lauda – Königshofen, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
PFA (Accustain)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Zellkulturflaschen T – 75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24 – well – Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen T – 75, low – attachment plastic flasks	Nunc/Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Chamber slides	Nunc/Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Poly – D – Lysin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
HBSS	Gibco/Invitrogen, Darmstadt,

	Deutschland
Trypsin/EDTA	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
DNase	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Pen/Strep	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Glucose – Lösung	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Neurobasalmedium	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
FBS	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
GlutaMax	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
B27 – Supplement	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
G – MEM	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
D – MEM	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pyruvat	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Non – essential amino acids	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
β – Mercaptoethanol	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
KO Serum replacement	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
N2 – Supplement	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Horse – Serum	Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
cAMP	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
BDNF	Promega, Madison, WI, USA
RA	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Amphotericin	Gibco/Invitrogen, Darmstadt,

TH	Deutschland rabbit and mouse: Chemicon, Billerica, USA
GFAP	rabbit: Chemicon, Billerica, MA, USA mouse: Pharmingen, Mississauga, Kanada
β – Tubulin 3	rabbit and mouse: Covance, Princeton State, NJ, USA

2.1.2) Verwendete Programme

AxioVision 3.1	Zeiss, Göttingen, Deutschland
AxioVision LE Rel. 4.2	Zeiss, Göttingen, Deutschland

II.1.3) Verwendete Geräte

Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Zeiss, Göttingen, Deutschland
Camera	AxioCam, Zeiss, Göttingen, Deutschland
Bench	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskop M6C – 10	Selectron, Montreal, Kanada
Kühlschrank -80°C	Heraeus, Osterode, Deutschland
Kühlschrank -20°C	GS 1423 Index 24B/001, Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlschrank +4°C	KTP 1730 Index 26/001, Liebherr, Biberach, Deutschland
Rüttelinkubator	GFL, 3033, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Großburgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Inkubator	Heraeus, Osterode, Deutschland

2.2) Versuchsablauf

Nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über den Versuchsablauf dieser Arbeit im Vergleich zu dem Versuchsablauf der Laborgruppe von Hermann et al. 2004, auf deren Ergebnisse diese Arbeit aufgebaut hat.

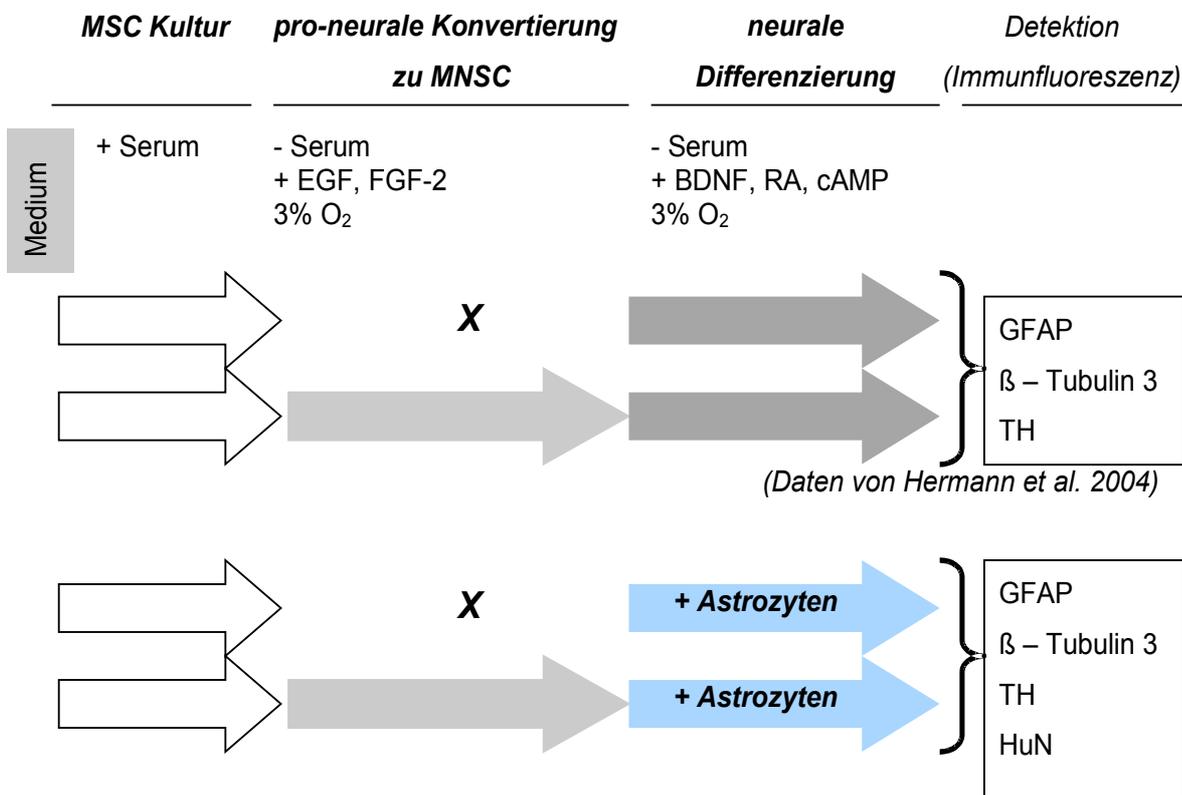


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit: Es sollte der Effekt von Astrozyten auf das neurale Differenzierungspotential von MSC (Mesenchymale Stammzellen), und v.a. von MNSC (Human Marrow – derived NSC – like Cells), untersucht werden und mit früheren Daten aus unserer Arbeitsgruppe verglichen werden. Die pro – neurale Konvertierung zu MNSC erfolgte im serumfreien Medium mit EGF (Epidermal Growth Factor) und FGF – 2 (Fibroblastic Growth Factor 2). Die in der neuronalen Differenzierung erhaltene Faktoren im serumfreien Medium waren BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor), RA (Retinoic Acid) und cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat).

Zur Unterscheidung humaner MSC / MNSC und muriner Astrozyten dienten HuN (Anti – human Nuclei) Antikörper. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit den Antikörpern GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), β – Tubulin 3 und mit TH (Tyrosinhydroxylase).

2.3) Astrozyten – Präparation

Es wurden 4 bis 6 75 cm²– Zellkulturflaschen (T – 75) mit PDL (Poly – D – Lysin) beschichtet. Dazu wurden die Flaschen ca. 30 min. bei 37°C mit PDL (2 ml) inkubiert und anschließend 1x mit H₂O bidest. und 1x mit HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) gewaschen.

Murine Astrocyten wurden aus embryonalen Gehirnen (Gestationstag E 8) isoliert. In „Dissektionslösung“ (siehe unten) wurden die Meningen mit Hilfe zweier Pinzetten vom Cortex unter dem Mikroskop entfernt. Die so präparierten Cortexstücke wurden 5 min. bei 500 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt, und das Pellet mit 1 – 2ml Gewebetrypsin (das Gewebe sollte gut bedeckt sein) 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen voneinander zu separieren und die extrazelluläre Matrix abzubauen. Nach den 30 min. wurde erneut 5 min. zentrifugiert. Als nächstes wurden die Cortexzellen 10 min. bei 37° Celsius mit DNase (Desoxyribonuklease) (-20°C) inkubiert. Hierbei wird die extrazelluläre DNA (Desoxyribonucleic Acid) toter Zellen abgebaut, damit die Zellen nicht verkleben. Um diese Reaktion zu stoppen wurde anschließend ca. 5ml Medium (siehe unten) zugefügt und erneut 5 min. zentrifugiert.

Um die Cortexzellen voneinander zu trennen wurde die Methode des Firepolishens verwendet. Dazu nimmt man eine Pasteurpipette und rundet die Öffnung wenige Sekunden über dem Bunsen – Brenner ab, um die Öffnung zu verkleinern und zu glätten, um die Zellen nicht zu beschädigen. Nun wurden die Zellen in 5ml Medium vorsichtig mehrfach durch die neu geformte Pipettenöffnung pipettiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich die Zellen voneinander gelöst haben. Zum Schluss hat man die Zellen zu dem restlichen Medium der Flasche (insgesamt 20ml pro Flasche) hinzu gegeben und die Zellen so gleichmäßig aufgeteilt. Nach 24 Stunden wurde dann das Medium gewechselt.

Dissektionslösung: HBSS
 1% Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)
 1% Glucose – Lösung
 auf Eis

Astrozyten – Medium: Neurobasalmedium
 10% FBS (Fetal Bovine Serum)
 1% Glutamax
 1% Pen/Strep

2.4) Astrozyten einfrieren und auftauen

Nach Erreichen einer genügenden Zelldichte wurde ein Teil der Astrozyten gleich für Kokulturrexperimente verwendet, ein anderer Teil eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie unter II.5 beschrieben, trypsinisiert, zentrifugiert und in 1ml Astrozytenmedium inklusive 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in Einfrierröhrchen über Nacht auf -20°C abgekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff über längere Zeit gelagert wurden. Bei Bedarf konnten diese wieder aufgetaut werden. Hierzu wurde das gleiche Medium verwendet, wie bei der Astrozyten – Präparation. Dazu hat man die eingefrorenen Astrozyten zunächst in 5ml Medium resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation hat man die Astrozyten in 20ml Medium + B27 – supplement resuspendiert und sie auf die Zellkulturflaschen (T – 75) verteilt.

2.5) Astrozyten – Kultur

Als Quelle für die Kultur von Astrozyten werden meistens murine Gehirnzellen genutzt. Von diesen Gehirnzellen überleben nur 1% den Zellzerfall und die Kulturbedingungen. Diese Primärkulturen enthalten Vorläuferzellen und Gliazellen in verschiedenen Stadien. Ausdifferenzierte Gliazellen werden von den proliferierenden Gliazellen überwachsen. Die Entwicklung der Zellkultur und die Proliferation der Zellarten ist vom Medium und den Wachstums – bzw. Differenzierungsfaktoren abhängig.

Die Astrozyten – Kultur erfolgt in einem Zeitraum von 10 – 14 Tagen. Jeden zweiten Tag musste das Astrozyten – Medium gewechselt werden. Dabei war jedoch besondere Vorsicht geboten. Um die Astrozyten nicht zu schädigen, wurde das Medium vorsichtig und langsam mit einer Pipette entnommen und das frische Medium tröpfchenweise wieder hinzu gegeben.

Zur Kontrolle der Beschaffenheit und der Konfluenz der Astrozyten hat man sich diese vor und nach dem Mediumwechsel unter dem Mikroskop angeschaut. Waren die Astrozyten gut angewachsen und hatten eine Konfluenz von ca. 50 – 70% erreicht, konnte man sie auf ein 24Cs (Chamber Slide) mit Glasplättchen oder ein 8Cs umsetzen (oder ggf. einfrieren). Die Glasplättchen wurden ebenfalls mit PDL oder Gelatine beschichtet.

2.6) Astrozyten splitten

Um die Astrozyten auf andere Kulturgefäße zu überführen, wurde der Überstand im T – 75 verworfen und die Zellen zuerst mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und anschließend

trypsinisiert. Vor dem zentrifugieren wurde die Trypsin – Reaktion wiederum mit Medium gestoppt. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde wieder verworfen und das Pellet in 10ml Astrozyten – Medium resuspendiert. Nun konnte man die Astrozyten auf neue T – 75 oder auch auf Chamber Slides aufteilen.

2.7) Medium herstellen

Bevor man die MSC bzw. MNSC zu den Astrozyten geben konnte, musste das entsprechende Medium hergestellt werden. Es wurden mehrere Medien ausgetestet. Hierzu zählen das Kawasaki – Medium und das Engele – Medium.

Kawasaki: G – MEM (Glasgow Minimum Essential Medium)

1% Pyruvat

1% Non – essential Amino Acids

1% β – Mercaptoethanol

1% Pen/Strep

plus 10% KO Serum Replacement (Tag 0 – 7)

oder N2 Supplement (Tag 8 – 14)

Engele: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose

5% FBS

5% Horse serum

0,5% Glutamin

1% Pen/Strep

Die besten Ergebnisse wurden jedoch mit Sanchez Ramos – Medium erzielt.

Sanchez Ramos: Neurobasalmedium

1% FBS

5% Horse Serum

1% Glutamax

1% Pen/Strep

1% N2

Als Wachstums – und Differenzierungsfaktoren wurden noch 100 $\mu\text{mol/L}$ cAMP (1:100), 10 ng/ml BDNF (1:100) und 0,5 $\mu\text{mol/L}$ RA (1:1000) sowie das Antimykotikum Amphotericin B (1:100) zugefügt.

2.8) MSC/MNSC umsetzen

Humane MSC – Kulturen wurden in der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Ulm aus Knochenmarkspalten, die bei orthopädischen Operationen anfielen, mit Einverständnis der Patienten entsprechend den Richtlinien der lokalen Ethik-Kommission angelegt und in niedriger Passagezahl zur Verfügung gestellt.

Nachdem die Konfluenz der MSC überprüft wurde, konnte man sie in das entsprechende Chamber Slide umsetzen. Hierzu wurden die MSC – Flaschen zuerst mit PBS gewaschen, um das Rest – Medium zu entfernen, da dieses die Trypsinaktivität beeinflusst. Danach wurde mit Trypsin – /EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) trypsinisiert. Nach 1 min. Inkubationszeit bei 37°C wurde überprüft, ob sich die Zellen vom Untergrund gelöst haben. Falls sich noch nicht alle Zellen gelöst hatten, konnte man mittels leichten Klopfens gegen die Flasche nachhelfen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand entfernt und resuspendiert.

Der Inhalt der MNSC – Flaschen wurde ohne Waschen und Trypsinisieren in ein Falcon gegeben und sofort zentrifugiert, da diese in Suspension kultiviert werden (Hermann A 2004). Anschließend wurde das Pellet, nach Abnahme des Überstandes, in Differenzierungsmedium resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die Glasplättchen in den Wells mit PDL (später mit PLL) inkubiert, um ein besseres Wachstum der Stammzellen zu ermöglichen.

Nun konnte man die MSC und MNSC auf entsprechende Chamber Slides verteilen.

2.9) Zellen zählen

Bevor man Astrozyten oder Stammzellen verteilt hat wurden die Zellen gezählt. Waren nämlich zu viele Zellen in einem Well, haben diese sich gegenseitig an der Ausdifferenzierung behindert und sind abgestorben. Gezählt wurden die Zellen mit der Neubauer – Zählkammer. Hierzu hat man wenige Mikroliter der resuspendierten Lösung in die Kammer pipettiert und unter dem Mikroskop ein Quadrat, bestehend aus 16 Kästchen, gezählt. Zellen, die auf der Außenlinie liegen, wurden jeweils nur auf einer der gegenüberliegenden Seiten gezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen hat man mit dem Faktor 10.000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen je Milliliter zu errechnen. Für die Gesamtzellzahl hat man abermals mit dem Volumen der Zelllösung multipliziert. Nun konnte

man die resuspendierte Lösung so aufteilen, dass ungefähr 2000 Zellen pro Well verteilt wurden. Dieses Verfahren war nur mit den MSC möglich, da sich die MNSC zu Aggregaten zusammenballten und so keine genaue Zellzahl ermittelt werden konnte.

2.10) Zellkultur von Stammzellen

Die Zellkultur der Stammzellen musste mit besonderer Vorsicht und Aufmerksamkeit erfolgen, da es sonst zum Ablösen bzw. Absterben der Zellen kommen konnte.

Nach dem Umsetzen der Stammzellen wurde das erste Mal das Medium ganz erneuert. Anschließend wurde das Medium im Abstand von 2 Tagen jeweils nur zur Hälfte erneuert. Hierzu setzte man zunächst eine Lösung mit dem entsprechenden Medium an, mit oder ohne die Differenzierungsfaktoren in entsprechender Verdünnung hinzu gegeben. Auch hier musste langsam pipettiert werden, um Folgeschäden zu vermeiden. Beim ersten Mediumwechsel musste man zudem darauf achten, dass die Zellen in den Wells während des Mediumwechsels nicht austrockneten, d.h., man durfte nur bei sehr wenigen Wells gleichzeitig das Medium wechseln. Anschließend wurden die Zellen in einem Zellkulturschrank mit 37° Celsius und 5% CO₂ (Kohlendioxid) aufbewahrt. Auch hier hat man vor und nach dem Wechsel die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert, um zu überprüfen, wie die Zellen auf dem Untergrund angewachsen sind.

Die Zellkultur der Stammzellen erstreckte sich auf einen Zeitraum zwischen 10 Tagen und 2 Wochen, je nachdem wie die Zellen angewachsen sind und wie konfluent die Zellen in den Wells waren.

MSC wachsen adhärent in den Plastikkulturflaschen und können durch das Mikroskop genau analysiert werden. Hier deutet die Ausbildung von Seitenausläufern auf ein gutes Anwachsen hin und vergrößert die Überlebenswahrscheinlichkeit. Zum Teil waren benachbarte MSC konfluent bzw. haben Verbindungen zueinander aufgebaut. MSC waren dadurch einfacher zu kultivieren, da der Progress in der Kultur genauer verfolgt werden konnte. Die Beobachtungen unter dem Mikroskop haben sich meistens in der Fluoreszenzfärbung widerspiegelt.

MNSC wachsen als Spheres. Spheres sind kugelartige Ansammlungen von Zellen. Der Grund dieses Zusammenschluss der MNSC ist noch nicht bekannt. Sie wachsen meistens nicht adhärent an und sind dadurch auch nur schwer in der Kultur zu charakterisieren. Es kann nur sehr schwer unterschieden werden, ob die Spheres in der Kultur überleben oder nicht. Das Ergebnis ist zumeist erst in der Fluoreszenzfärbung zu sehen.

2.11) Immunhistochemie

Um nachzuweisen, ob sich die Stammzellen neuronal differenziert hatten, wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Bei dieser Methode binden spezifische Antikörper an bestimmte Proteine in den Zellen, die anschließend mit einem sekundären Fluoreszenz – markierten Antikörper detektiert werden können.

Um die indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen, waren mehrere Schritte erforderlich, die insgesamt 3 aufeinander folgende Tage beanspruchten. Wichtig war auch immer eine Negativkontrolle anzufertigen, d.h., dass man ein Well ohne primären Antikörper mitgefärbt hat, um zu überprüfen, ob die Färbung aussagekräftig war.

2.11.1) Zellen fixieren

Zunächst wurde der Überstand in den Wells entfernt und die Wells 2 mal mit PBS gewaschen. Dann fixierte man die Zellen 15 min. mit 4%igem PFA (Paraformaldehyd) bei 4°C. Hierbei war es wichtig die Zeitangabe genau einzuhalten. Danach hat man die Zellen erneut 2 Mal mit PBS gewaschen und sie mit PBS (3. Mal) bei 4°C über Nacht gelagert.

2.11.2) Zellen blockieren

Am nächsten Tag hat man das PBS entnommen und die zu färbenden Wells 1 Stunde auf dem Schüttler in 0,2% Triton/PBS und 3% Ziegen – Serum inkubiert. Das Serum, reich an allen möglichen Proteinen, verhindert hierdurch eine unspezifische Bindung der Primärantikörper.

2.11.3) Primärantikörper

Während des Blockierens der Zellen wurde die Lösung mit dem 1. Antikörper vorbereitet. Als Primärantikörper wurden GFAP, β – Tubulin 3, TH und HuN verwendet. Hierzu hat man 0,5% Triton/PBS mit 1% Ziegen – Serum, und die entsprechenden Verdünnung des jeweiligen Antikörpers (GFAP 1:1000, β – Tubulin 3 1:2000, TH 1:200, HuN 1:200), pipettiert.

Nach dem Blockieren der Zellen hat man den Überstand der Wells verworfen und in jedes dieser Wells 150 μ l der Antikörperlösung gegeben.

Nun hat man den 1. Antikörper bei 4°C über Nacht inkubieren lassen.

2.11.4) Sekundärantikörper

Am 3. Tag der Färbung hat man zunächst die Wells 3 mal 3 min. mit PBS gewaschen.

Währenddessen hat man den 2. Antikörper vorbereitet. Dazu hat man eine Lösung, bestehend aus 0,2% Triton/PBS, 1% Ziegen – Serum und jeweils den Sekundärantikörpern Goat anti – mouse IgG – Antikörper – Alexa 488 (ein Antikörper gekoppelt an einen grün fluoreszierenden Farbstoff) und Goat anti – rabbit IgG – Antikörper – Alexa 568 (rot), in einer Verdünnung von je 1:500 hergestellt. Nach dem Waschvorgang hat man die Wells mit jeweils 75µl jeden Antikörpers 1 Stunde im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert, da der 2. Antikörper lichtempfindlich ist. Zum Verdunkeln hat man Alufolie verwendet.

Nach einer Stunde hat man die Wells erneut 3 Mal 3 min. mit PBS gewaschen.

2.11.5) Mounting

Um den Zellkern von den gefärbten Proteinen zu unterscheiden hat man einen eigenen Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dafür wurde das PBS zunächst sorgfältig abgenommen. Beim 8Cs wurden nun die Ränder und der Rest des Klebstoffs entfernt. Jetzt hat man wenige Mikroliter des Mounting – Mediums inklusive DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) auf jedes Well pipettiert. Zum Schluss hat man das Objektträgerglas noch mit einem Deckglas bedeckt und die restliche Luft darunter vorsichtig ausgestrichen. Nun wurde das Deckglas noch an den Rändern mit Nagellack befestigt.

Beim 24Cs musste man ganz vorsichtig die kleinen Plättchen aus den Wells entfernen. Dazu hat man am besten das PBS in den Wells gelassen, damit die Zellen nicht austrocknen. Als Werkzeug hat sich eine spitze Pinzette empfohlen. Nun konnten jeweils 4 – 5 Plättchen, mit einem Tropfen Dapi – Lösung drauf, umgekehrt auf ein Objektträgerglas gelegt werden. Auch diese wurden dann mit Nagellack angeklebt.

Für den Abschluss der Färbung musste der 2. Antikörper und das DAPI mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubieren.

2.11.6) Auswertung

Um zu überprüfen, ob sich die Stammzellen neuronal differenziert hatten, untersuchte man die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei ist das Gesamtbild einer Färbung aus drei Einzelaufnahmen entstanden. Zunächst wurde eine geeignete Stelle auf dem Objektträger gesucht,

auf der alle drei Färbungen gut zu differenzieren waren. Danach hat man mit drei verschiedenen Wellenlängenfiltern am Mikroskop jede Antikörperfärbung für sich (DAPI, HuN (Human Nuclei), Antikörper) fotografiert. Im Computer konnte man nun aus diesen Bildern ein Gesamtbild erstellen, oder jedes Antikörperbild einzeln untersuchen. Zunächst untersuchte man die Färbung mit DAPI, um die Gesamtzahl an gefärbten Kernen bzw. Zellen im Mikroskopausschnitt zu zählen.

Anschließend kombinierte man dieses Bild mit dem Bild der Färbung des Antikörpers, damit man die Anzahl der insgesamt Antikörper – positiven Zellen ermitteln konnte. Danach zählte man die Anzahl an gefärbten Kernen der MSC/MNSC mittels der HuN – Färbung, ein Antikörper, der spezifisch an ein Protein bindet, dass nur im Zellkern menschlicher Zellen exprimiert wird und damit eine Unterscheidung von murinen Astrozyten (DAPI – positiv, HuN – negativ) und humanen MSC/MNSC (DAPI – positiv, HuN – positiv) ermöglicht.

Die Zellzählungen wurden schließlich statistisch ausgewertet.

Als positiv wurden jene Zellen gewertet, die sowohl DAPI – positiv, als auch HuN – positiv, als auch positiv für den verwendeten Antikörper (β – Tubulin 3, GFAP, TH) waren.

Es wurden auch Negativkontrollen, d.h. Färbungen ohne Primärantikörper durchgeführt, um eine mögliche Expression der nachzuweisenden Antigene ohne Primärantikörper auszuschließen. Dies hätte die Auswertung und somit das Ergebnis beeinflusst (Bild nicht gezeigt).

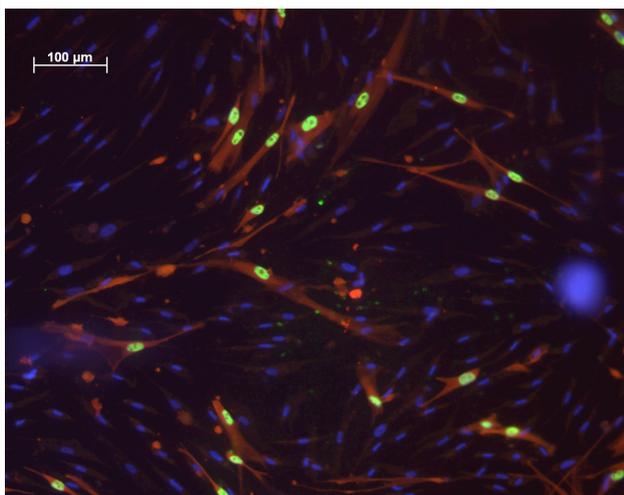


Abbildung 4:
Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von MSC (mesenchymale Stammzellen): Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau), Kernfärbung der MSC mit HuN (Human Nuclei) (grün), Färbung von astroglialen Proteinen mit GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (rot).



Abbildung 5:
Einzelaufnahme der Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

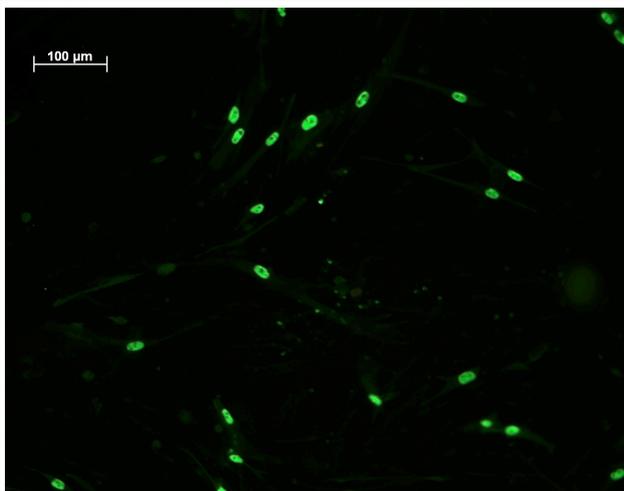


Abbildung 6:
Einzelaufnahme der Kernfärbung von MSC (mesenchymale Stammzellen) mit HuN (Human Nuclei) (grün).

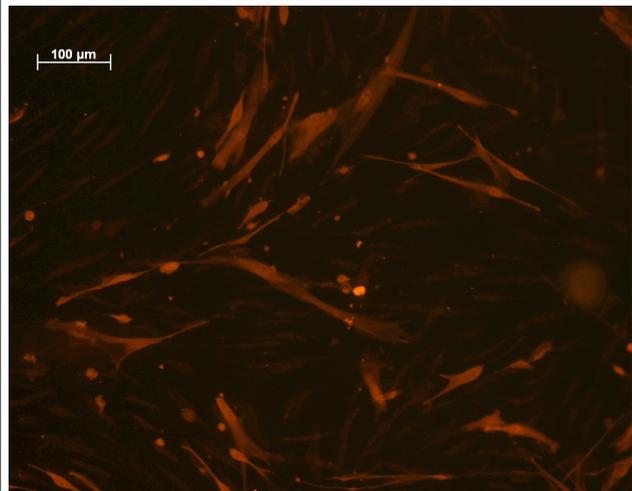


Abbildung 7:
Einzelaufnahme der Färbung von astroglialen Proteinen mit GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (rot).

2.12) Statistik

Aus den einzelnen Versuchsreihen wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Mittels Student's T – Test wurde berechnet, ob die Differenzen in den Versuchsreihen signifikant sind ($P < 0,05$), d.h., dass der Unterschied über der Zufallswahrscheinlichkeit liegt. Beträgt $P > 0,05$ ist der Unterschied nicht signifikant, d.h., er liegt im Bereich der Zufallswahrscheinlichkeit und ist nicht aussagekräftig.

Die statistische Auswertung erfolgte nur für die Antikörper β – Tubulin 3 und GFAP, da eine Auswertung der Versuchsreihen für den Antikörper TH aufgrund der ungenügenden Ergebnisse nicht erfolgen konnte. (Details siehe Ergebnisse)

3) Ergebnisse

Diese Arbeit hat zwei Themen umfasst. Das erste Thema war die Etablierung der Kultivierung von murinen Astrozyten in unserem Labor. Die Astrozyten wurden später als Kokultur für die humanen Stammzellen verwendet. Der zweite Teil hat sich mit der neuronalen Differenzierung von MSC (mesenchymalen Stammzellen) und MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) nach Kokultur mit diesen Astrozyten befasst.

3.1) Kultur muriner Astrozyten

3.1.1) Astrozyten – Präparation

Die Kultur der murinen Astrozyten erfolgte in mehreren Phasen. Zunächst mussten die Astrozyten aus murinen Gehirnen präpariert werden, bevor sie kultiviert werden konnten. Die Präparation hatte auch den Zweck, die restlichen Zellen der Meningen, vor allem die Fibroblasten, möglichst komplett zu entfernen. Um das Wachstum der Mikroglia zu verhindern, wurde den Zellkulturen 10mM LME (Leucinmethylester) in den ersten 24 Stunden nach der Präparation zugegeben. Dies führt, infolge lysosomaler Zersetzung, zum Zelltod von Monozyten, inklusive der Mikroglia. Dieser Effekt ist bei LME, im Gegensatz zu anderen Aminosäuren und – estern, irreversibel (Thiele 1985). Kulturen ohne und mit LME enthielten jedoch gleich viel Mikroglia, eine wesentliche Veränderung ergab sich daher nicht. Nach diesem Schritt hat man die Astrozyten in Plastikkulturflaschen, die mit PDL (Poly – D – Lysin) beschichtet waren, weiter gezüchtet. PDL sorgt für ein besseres Anwachsen der Zellen auf dem Boden der Kulturflaschen und ist zudem nicht zelltoxisch. Zudem proliferieren die Zellen auf einer PDL – Beschichtung langsamer und ihre Morphologie ist damit besser zu erkennen. Außerdem kann diese Beschichtung das Fibroblastenwachstum verringern.

3.1.2) Wachstumsbedingungen

Für die Kultur von Mikrogliazellen mussten einige Aspekte berücksichtigt werden. Mikroglia – Vorläuferzellen brauchen CSF – 1 (Colony Stimulating Factor) für ihr Wachstum. Dieser Faktor wird von Astrogliazellen produziert. Ein häufiger Mediumwechsel ist daher von Vorteil, da es (durch Entfernung von CSF – 1) das Mikroglia – Wachstum verringert und so zu einer reineren

Astrozytenkultur führt.

Eine dichte Zellaussaat (ca. 50000 Zellen/cm²) fördert zudem das Astroglia – Wachstum durch Inhibition des Fibroblastenwachstums.

Generell sollte auf den Gebrauch von Trypsin verzichtet werden, da es, vor allem in Astrozytenkulturen, zelltoxische Eigenschaften hat. In dieser Arbeit wurde jedoch Trypsin für das Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen benötigt. Seine Wirkung wurde mittels Zugabe von Medium jedoch bereits nach 2 Minuten wieder aufgehoben, sodass es vermutlich lediglich das Lösen der Zellen bewirkte, die Zellen selbst aber kaum schädigte.

Um die optimalen Kulturbedingungen für die Astrozyten herauszufinden wurden verschiedene Nährmedien verwendet. Wir verwendeten das von uns so bezeichnete Nährmedium EM – 1 (Expansion Medium 1). In diesem Medium haben die Zellen zwar ein Astroglia – ähnliches Aussehen entwickelt, proliferierten aber nur sehr langsam.

3.1.3) Astrozytenkultur verschiedener Zelldichte

Eine Astroglia – ähnliche Morphologie entwickelten Astrozyten nur bei einer geringen Zelldichte (ca. 1000 Zellen/cm²) und wuchsen ab der 1. Passage nur noch sehr schlecht auf den mit PDL – beschichteten Kulturflaschen an. Dies führte jedoch zur Anreicherung von Mikrogliazellen. Eine Zelldichte von 50000 Zellen/cm² erschwerte jedoch die morphologische Charakterisierung. Es wurden verschiedene Zelldichten ausgetestet (100 – 20000 Zellen/cm²), um die optimalen Bedingungen für die Kokultur herauszufinden. Dabei haben sich 10000 Zellen/Well einer 24 CS – Platte (Chamber Slide) (ca. 5000 Zellen/cm²) als beste Dichte erwiesen. Unter diesen Bedingungen zeichnete sich eine klare Astrozytenmorphologie ab und die Zellen waren ca. 70% bis 90% konfluent. Die meisten Zellen hatten jedoch ein eher Fibroblasten – ähnliches Aussehen, welches an der unzureichenden Entfernung der Meningen bei der Präparation gelegen haben könnte. Der Nachweis von astroglialen Zellen mittels dem Nachweis von GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) war nicht nur durch die inkomplette Entfernung der Meningen erschwert, sondern auch dadurch, dass murine Astrozyten nicht immer GFAP exprimieren. Dies ist vornehmlich bei aktivierten bzw. reaktiven Astrozyten der Fall.

3.1.4) Proliferationsfaktoren

Neben essentiellen Aminosäuren benötigen proliferierende Gliazellen auch die Zugabe von Glutamin in hohen Mengen, da es das Wachstum fördert. Im Gegensatz dazu benötigen Neurone

dies kaum, da sie kaum proliferieren. Deswegen wurde GlutaMAX dem Nährmedium beigelegt. GlutaMAX ist ein Dipeptid aus Alanin und Glutamin, das leicht in die Zellen gelangt und vor allem viel stabiler ist als Glutamin. Es ist sehr wasserlöslich und hitzebeständig. Daher zerfällt es nicht spontan, wie es bei Glutamin, laut Herstellerangaben, oft der Fall ist.

Ursprünglich wurde zudem B27 – supplement verwendet. Es ist eine komplexe Mischung verschiedener Faktoren, das für Serum – freie neurale Zellkulturen optimiert wurde (Brewer 1993). B27 – supplement fördert zwar die neuronale Differenzierung, verringert aber das Gliawachstum, zumindest in Serum – freien Medium. Es gibt zwei Formen von B27 – supplement. In der einen Form ist Retinsäure enthalten, welches für die Differenzierung verwendet wird. Die zweite Form beinhaltet keine Retinsäure und fördert daher nicht die Differenzierung.

Es wurden noch weitere Faktoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Astrozytenproliferation untersucht. BDNF (Brain – derived Neurotrophic Growth Factor) und Ethanol, das Lösungsmittel für Retinsäure, hatten keinen Effekt auf die Proliferation, während cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat) die Proliferation verlangsamte und die Differenzierung förderte.

Retinsäure zeigte einen reversiblen Effekt auf die Proliferation, d.h. nach Mediumwechsel (ohne Retinsäure) begannen die Zellen wieder zu proliferieren. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Retinsäure getestet (0,5 μ M bis 20 μ M).

3.1.5) EtOH (Ethanol) und RA (Retinoic Acid)

Da RA als Differenzierungsfaktor für MSC/MNSC verwendet wurde, sollte die Auswirkung von RA auf die Kokultur muriner Astrozyten überprüft werden.

Um diese Wirkung auf die Zellzahl der Astrozyten im zeitlichen Verlauf einer Kultur zu beurteilen, wurden verschiedene Konzentrationen von RA verwendet. Bei dieser Austestung hat sich die Konzentration von 0,5 μ M RA hinsichtlich der Wachstumsrate am besten geeignet. Die Wachstumsrate war bei allen Konzentrationen schwankend, hatte jedoch bei 0,5 μ M RA letztendlich den positivsten Effekt. Der Effekt war dadurch zwar geringer, aber trotzdem relevant, da die Anzahl der Astrozyten während der Kultur kontinuierlich abnahm. Das Fehlen von Serum im Medium führte zu einer raschen Abnahme der Astrozytenzahl. Aber auch dieser Effekt war reversibel.

Das folgende Diagramm zeigt die zeitliche Auswirkung von verschiedenen RA – Konzentrationen auf die Zelldichte in der Kultur, im Vergleich zur Kontrolle (1% EtOH), in Form einer Punktekurve.

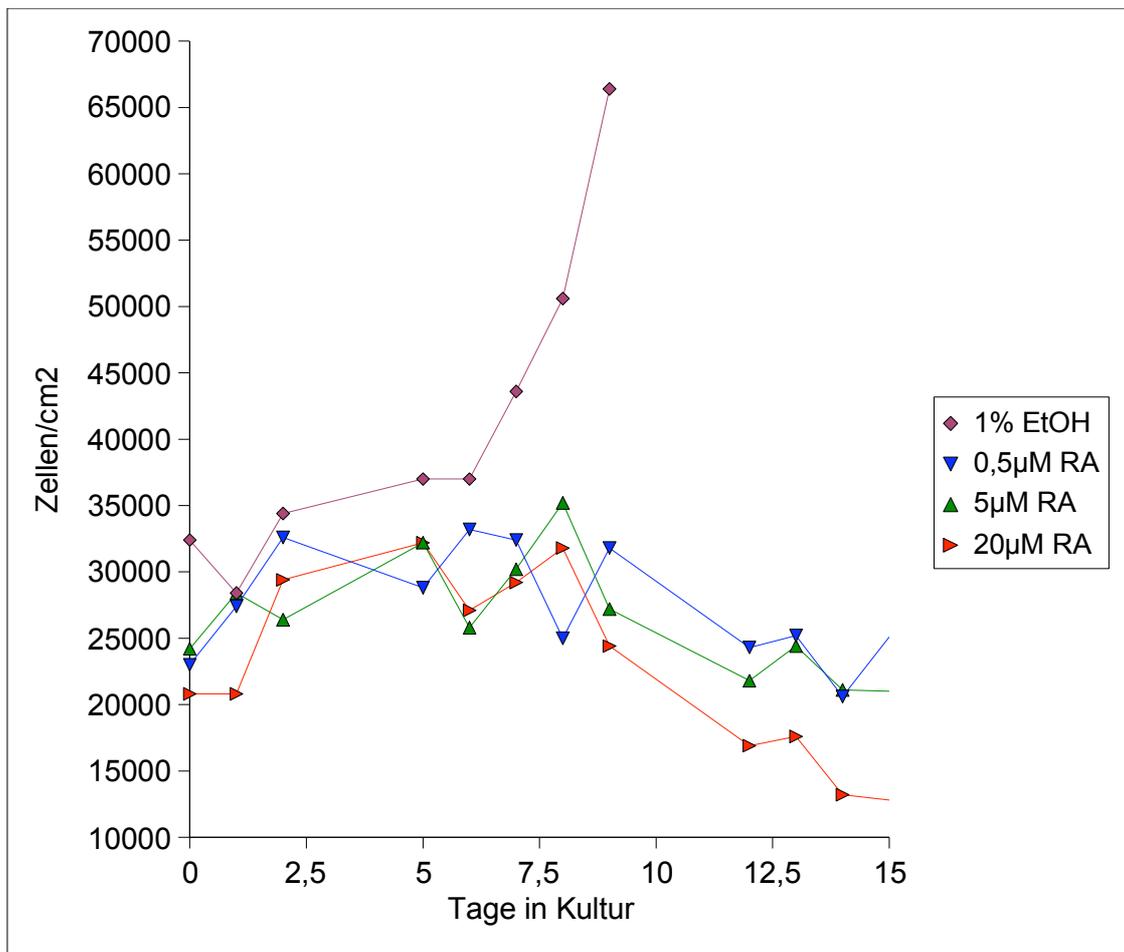


Abbildung 8: Auswirkung von verschiedenen Konzentrationen von RA (Retinoic Acid) auf die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (1% EtOH: Ethanol).

Aus diesem Diagramm wird ersichtlich, dass es in Abwesenheit von RA zu einer kontinuierlichen Zunahme der Zellzahl kam. Ethanol selbst, als Lösungsmittel für RA, hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Proliferation der Zellen (vergleichbare Wachstumsraten wie Kulturen ohne EtOH; hier nicht gezeigt).

Bei den verschiedenen Konzentrationen von RA bleibt die Zellzahl im Verlauf der Kulturzeit mehr oder weniger konstant. Nur bei der höchsten Konzentration von 20µM RA reduzierte sich diese zum Ende hin. Die Zellzahl war unter 0,5µM RA am konstantesten.

3.1.6) Etablierung der Kulturbedingungen

Aus oben erwähnten Ergebnissen haben wir folgende Kulturbedingungen etabliert, die hier noch einmal kurz zusammengefasst werden.

Diese Etablierung der optimalen Astrozytenkulturbedingungen war von verschiedenen Faktoren abhängig. Zunächst wurden die Plastikkulturflaschen mit PDL beschichtet, damit die Zellen anwachsen konnten.

Weiterhin mussten die Proliferationsbedingungen für die Astrozyten optimiert werden. Ein wesentliches Ziel hierbei beinhaltete die Gewinnung einer reinen Astrozytenkultur. Im ersten Schritt erfolgte die Präparation der Astrozyten aus den murinen Gehirnen. Eine komplette Entfernung der Mikroglia war jedoch aufgrund der schwierigen Präparationsbedingungen unmöglich. Die Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop zeigte ein eher Fibroblasten – ähnliches Aussehen. Auch die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung der HuN – negativen und GFAP – positiven Zellen (53+/-12%) deutet zudem auf eine Kontamination der Astrozytenkultur mit anderen Zellen, z.B. Fibroblasten, hin. Bei einer reinen Astrozytenkultur wären theoretisch 100% dieser Zellen GFAP – positiv. Zudem exprimieren vornehmlich aktivierte Astrozyten GFAP.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die Astrozytenkultur

Einflussfaktoren	Effekt	Verwendung
B27 – supplement	Fördert neuronale Differenzierung, verringert Gliawachstum (im Serum – freien Medium); 2 Formen (mit/ohne Retinoic acid)	-
EtOH (Ethanol)	Kein Effekt auf Zelldichte	-
Zelldichte	5000 Zellen/cm ² optimal	+/-
LME (Leucinmethylester)	Kaum Inhibition des Mikrogliawachstums	+
GlutaMax	Fördert Wachstum; stabil, hitzebeständig	+
Häufiger Mediumwechsel	Verringertes Mikrogliawachstum	+
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	Antibiotische Wirkung	+
RA – Konzentration (Retinoic Acid)	Bei 0,5µM: Verringerung Proliferation der Astrozyten; Zelldichte am konstantesten	+

3.2) Auswertung der neuralen Konvertierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

3.2.1) Nährmedien

Es wurde eine Versuchsreihe bezüglich eines geeigneten Nährmediums für die Kultur mit den mesenchymalen Stammzellen unter Kokultur mit murinen Astrozyten getestet. Hierbei wurden 3 verschiedene Medien verwendet. In Engele – Medium sind die meisten Zellen abgestorben, da sie nicht auf dem Boden der Plastikkulturflasche angewachsen sind. In Kawasaki – Medium war die Überlebensrate der Zellen besser. Sie sind teilweise auf dem Boden der Kulturflasche angewachsen. Die Versuchsreihe mit dem Medium von Sanchez – Ramos führte zum größten Erfolg. Mit diesem Medium zeigten sich viele vitalen Zellen, die gut auf dem Nährboden angewachsen sind. Aufgrund dieser Feststellung wurde in den weiteren Versuchsreihen das Medium nach Sanchez – Ramos verwendet.

3.2.2) Primärantikörper

Die MSC und MNSC wurden hinsichtlich ihrer neuralen Differenzierung nach Kokultur mit murinen Astrozyten untersucht. Dafür wurden verschiedene Antikörper verwendet. Als beständiger Primärantikörper wurde HuN (Human Nuclei) verwendet. Dieser Antikörper bindet ein Antigen, das nur in humanen Zellen, und zwar im Zellkern, vorkommt. So konnte man den Anteil der humanen Zellen in der jeweiligen Kultur feststellen und dadurch die MSC bzw. MNSC eindeutig identifizieren.

In Kombination mit HuN wurden jeweils andere Antikörper verwendet, um den Phänotyp der Zellen zu charakterisieren.

3.2.2.1) GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein)

Der erste Antikörper war ein anti – GFAP – Antikörper. Das Protein, das dieser Antikörper erkennt, kommt in astroglialen Zellen vor. Dadurch konnte der Anteil der astroglialen Zellen in der Kultur festgestellt werden. Der Anteil astroglialer Zellen an HuN – positiven Zellen betrug bei den MSC 55+/-11%, während er bei den MNSC 45+/-8% betrug.

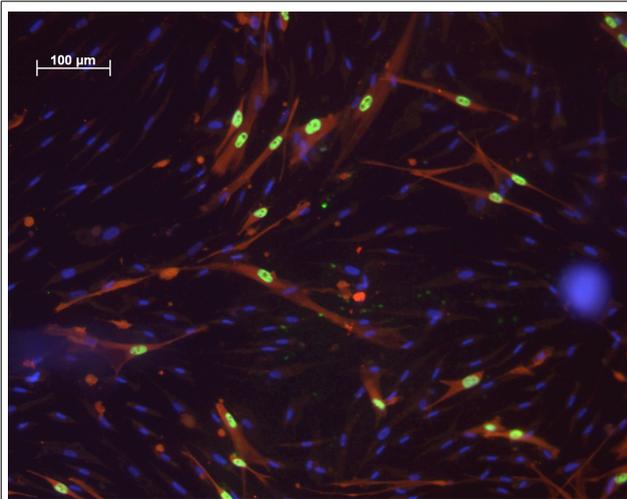


Abbildung 9:
MSC (mesenchymale Stammzellen) gefärbt mit GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün). Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

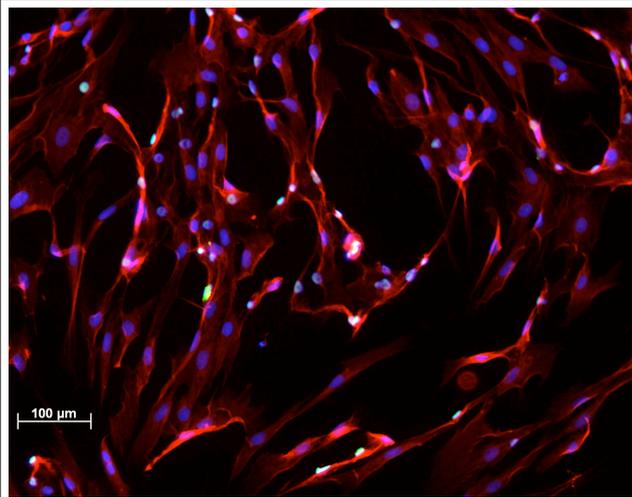


Abbildung 10:
MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) gefärbt mit GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün). Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

Etwa die Hälfte der Zellen waren positiv für GFAP. Dies bedeutet, dass ca. 50% der MSC/MNSC sich unter der Kokultur mit murinen Astrozyten zu astroglialen Zellen differenziert haben. Im Vergleich zu den Daten von Hermann et al (MNSC 13+/-4% GFAP – positiv, HuN – positiv) zeigt sich eine deutliche Zunahme der astroglialen Zellen in der Kultur unter dem Einfluss der Kokultur mit murinen Astrozyten.

3.2.2.2) β – Tubulin 3

Der zweite Antikörper war gegen β – Tubulin 3 gerichtet. Dieser Antikörper erkennt das Zytoskelettprotein Tubulin (Isotyp β – 3), das vor allem in unreifen Neuronen exprimiert wird, und zwar im gesamten Zytoplasmaraum. In Verbindung mit HuN konnte man so den Anteil an positiven β – Tubulin 3 – Zellen unter den Stammzellen bestimmen. Bei der Kultur mit MSC betrug dieser Anteil 63+/-12% und bei den MNSC 52+/-11%.

Abbildung 11 und 12 zeigen die Expression von β – Tubulin 3 in MSC bzw. MNSC. Auffallend ist, dass auch HuN – negative Zellen β – Tubulin 3 exprimieren. Offensichtlich sind auch noch einige murine Neurone in den Astrozytenkulturen enthalten.

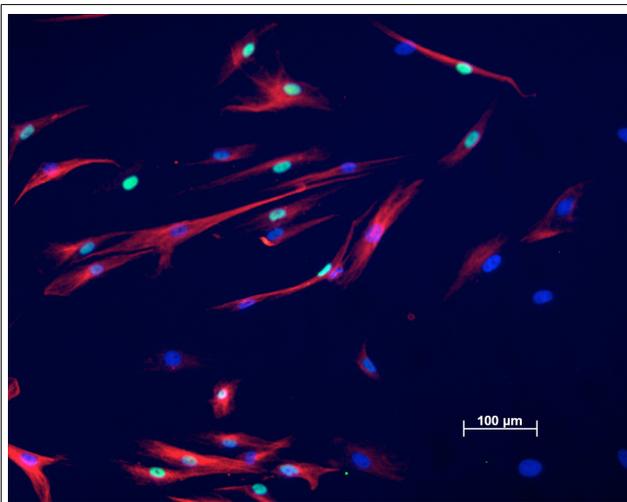


Abbildung 11:
MSC (mesenchymale Stammzellen) gefärbt mit β – Tubulin 3 (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün).
Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

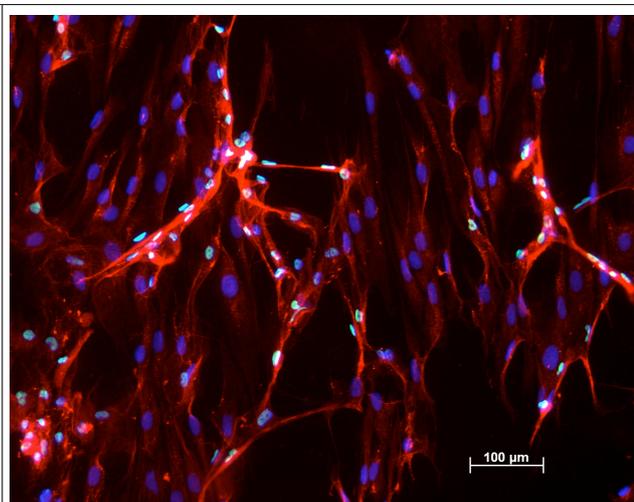


Abbildung 12:
MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) gefärbt mit β – Tubulin 3 (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün).
Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

In den vorherigen Versuchen (Hermann et al 2004) betrug die Rate an β – Tubulin 3 – positiven Zellen unter den MNSC 42+/-6%. Unter der Kokultur mit murinen Astrozyten ist die Rate an unreifen Neuronen somit vergleichsweise höher.

Dass auch einige murine, HuN – negative, Zellen β – Tubulin 3 aufweisen (vor allem in der Kultur mit MNSC) impliziert die neuronale Differenzierung aus murinen Progenitorzellen bzw. das Vorhandensein muriner Neurone in der Astrozytenkultur.

Nachfolgendes Diagramm zeigt die Übersicht über die prozentuale Verteilung GFAP – und β – Tubulin 3 – positiver MSC und MNSC nach neuraler Differenzierung in Kokultur mit Astrozyten.

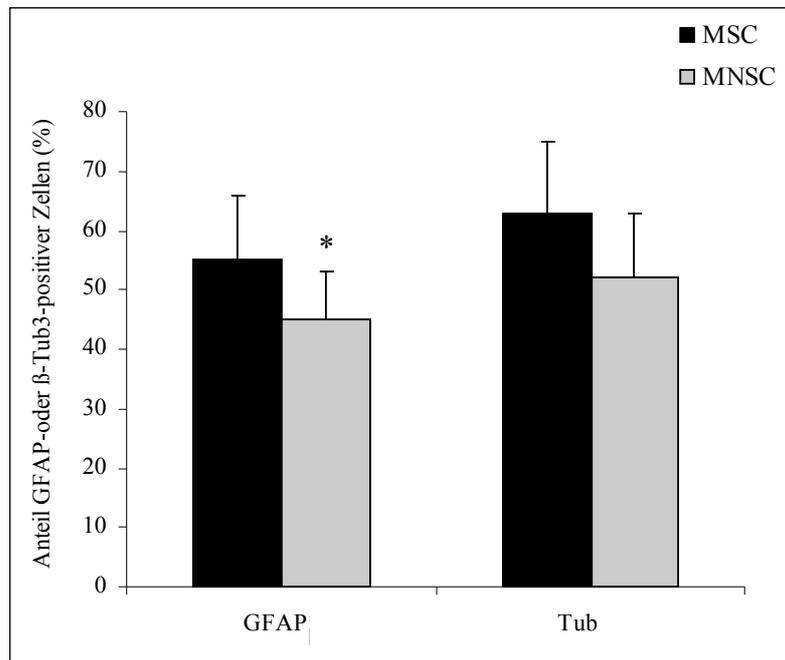


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) und β – Tubulin 3 - positiven MSC (mesenchymale Stammzellen) und MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) nach Kokultur mit murinen Astrozyten. (n=3-6; * P<0,05: signifikanter Unterschied)

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Hermann et al 2004 (MNSC β – Tubulin – 3 positiv: 42+/-6%, MNSC GFAP – positiv: 13+/-4%) zeigt sich durch den Einfluss der Kokultur mit murinen Astrozyten eine höhere Rate an β – Tubulin 3 – positiven Zellen und GFAP – positiven Zellen bei den MNSC. Dies bedeutet, dass unter dem Einfluss der Kokultur mehr humane Stammzellen zu unreifen Neuronen differenziert haben, als im Vergleich zur Kultur ohne die Kokultur. Die wesentlich höhere Rate an GFAP – positiven Zellen unter dem Einfluss der Kokultur deutet auf eine vermehrte Differenzierung zu astroglialen Zellen hin. Die Laborgruppe von Hermann et al (2004) hat bei den MSC keine Ergebnisse für den Antikörper β – Tubulin 3, da dieser nicht verwendet wurde. GFAP konnte in der Kultur mit MSC nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigt diese Abbildung, dass sowohl die Rate an GFAP – positiven Zellen, als auch die Anzahl der β – Tubulin 3 – positiven Zellen in der Kultur mit MSC höher ist, als in der Kultur mit MNSC. Der Unterschied liegt bei beiden Antikörpern ungefähr konstant bei 10%. Dies lässt auf ein höheres neurales Differenzierungspotential der MSC unter Kokultur mit Astrozyten schließen.

Die folgende Tabelle zeigt die statistische Auswertung der Antikörper GFAP und β – Tubulin 3 in den Zellreihen MSC und MNSC mittels Student's T – Test.

Tabelle 5: Statistik der Antikörper GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) und β – Tubulin 3 in den Zellreihen MSC (mesenchamle Stammzellen) und MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) mittels Student's T – Test

$P < 0,05$: Der Unterschied ist signifikant. Damit liegt dieser zwischen MSC und MNSC bezüglich der Verteilung in HuN – positiven Zellen über der Zufallswahrscheinlichkeit.

$P > 0,05$: Der Unterschied zwischen MSC und MNSC ist nicht signifikant.

GFAP			
Versuch	MSC	MNSC	
1	52,00%	46,00%	
2	71,00%	48,00%	
3	61,00%	39,00%	
4	46,00%		
5	55,00%		
6	50,00%		
Mittelwert	55,83%	44,33%	
Standardabweichung	9,00%	4,70%	
P		0,04 Signifikant	($P < 0,05$)
TUB			
Versuch	MSC	MNSC	
1	72,00%	42,00%	
2	67,00%	43,00%	
3	55,00%	57,00%	
4	57,00%		
5	51,00%		
Mittelwert	60,40%	47,33%	
Standardabweichung	8,80%	8,40%	
P		0,10 Nicht signifikant	($P > 0,05$)

3.2.2.3) TH (Tyrosinhydroxylase)

Als dritter Antikörper wurden noch anti – TH (Tyrosinhydroxylase) – Antikörper verwendet, um eine etwaige dopaminerge Differenzierung der Zellen zu untersuchen. Da TH in einer Zelle gleichmäßig verteilt ist, färbt der Antikörper ebenfalls die ganze Zelle an. In der Kultur mit MSC konnte lediglich ein durchschnittlicher Anteil von 5% positiv getestet werden, während der Anteil bei den MNSC sogar nur bei 3% lag. Dieser Anteil war jedoch so gering, dass eine genaue Auswertung der Fallzahlen nicht erfolgen konnte.

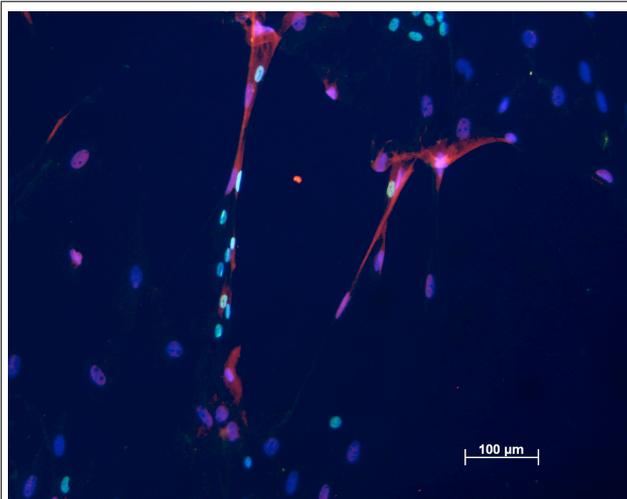


Abbildung 14:
MSC (Mesenchymale Stammzellen) gefärbt mit TH (Tyrosinhydroxylase) (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün). Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

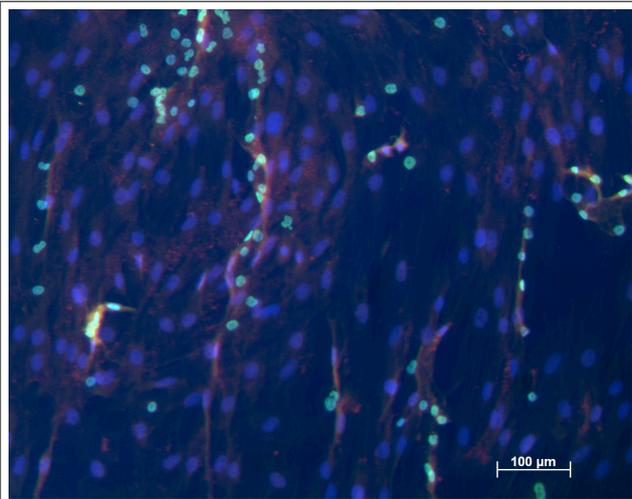


Abbildung 15:
MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) gefärbt mit TH (Tyrosinhydroxylase) (rot) und HuN (Human Nuclei) (grün). Kernfärbung mit DAPI (4', 6 – Diamin – 2' – Phenylinol – Dihydrochlorid) (blau).

Hermann et al (2004) konnten in der Zellkultur mit MNSC 11+/-7% TH – positive Zellen detektieren. Vergleichsweise hat demnach hat die Kokultur mit murinen Astrozyten die Differenzierung von humanen Stammzellen zu dopaminergen Neuronen nicht gefördert, sondern reduziert.

3.2.2.4) Prozentuale Verteilung der Primärantikörper

Nachfolgende Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Primärantikörper in der Kultur der MNSC (unter Kokultur mit murinen Astrozyten) im Vergleich zu der Kultur mit MNSC von Hermann et al (2004) (ohne Kokultur).

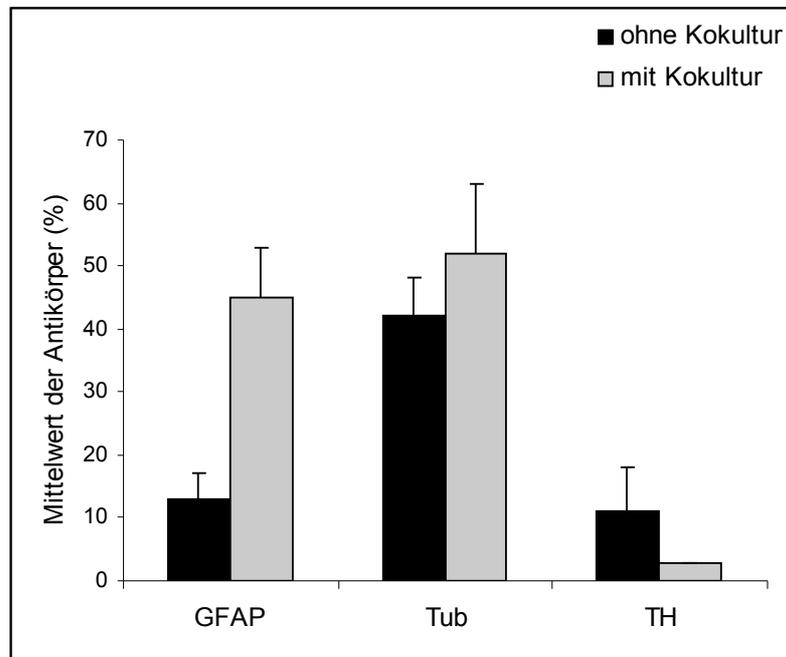


Abbildung 16: Vergleich der Expression von GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), Tub (β – Tubulin 3) und TH (Tyrosinhydroxylase) in MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) mit den Daten aus Hermann et al (2004), (n=1-6).

Wie bereits oben für jeden Primärantikörper einzeln erwähnt zeigt sich unter der Kokultur mit murinen Astrozyten eine Zunahme der astroglialen und neuronalen Zellen. Insbesondere haben sich aus den MNSC deutlich mehr astrogliale Zellen differenziert (GFAP – positiv). Die Differenzierung zu unreifen Neuronen (β – Tubulin 3 – positiv) konnte durch die Kokultur ebenfalls gesteigert werden, wenn auch nicht in diesem Ausmaß.

Im Gegensatz dazu hat sich die Anzahl an dopaminergen Neuronen (TH – positiv) unter der Kokultur verringert.

Im nachfolgenden Diagramm ist noch der prozentuale Anteil der Antikörper in den neuronalen, HuN – negativen Zellen (nach Kokultur mit MSC und MNSC) angegeben.

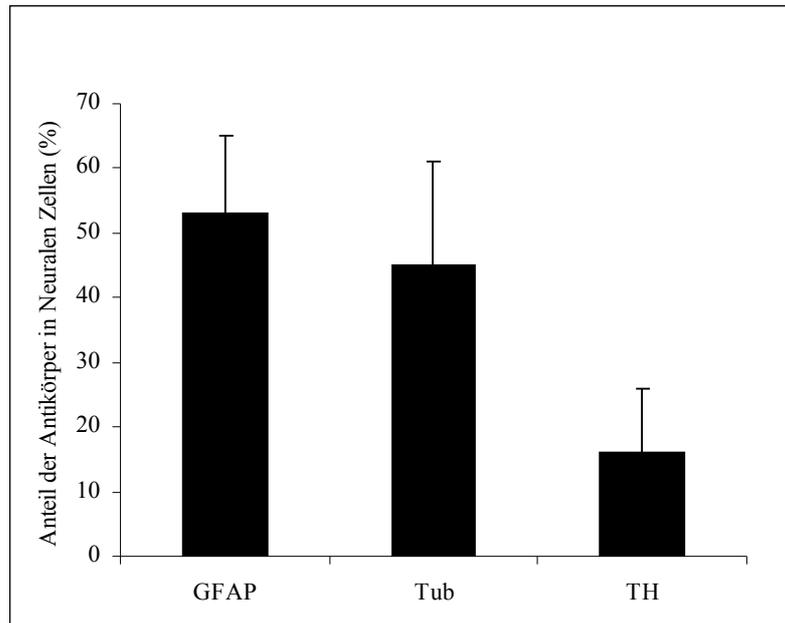


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung GFAP – (Glial Fibrillary Acid Protein), β – Tubulin 3 – und TH – positiver (Tyrosinhydroxylase) neuraler Zellen (schwarz), (n=3-8).

Der Anteil an GFAP – positiven Zellen ist bei den neuronalen Zellen am höchsten. Da bei einer reinen Astrozytenkultur theoretisch 100% GFAP – positive Zellen zu erwarten wären, zeigen die Ergebnisse, dass die Astrozytenkultur aus einer suboptimalen Präparation aus den murinen Gehirnen erfolgte. Dass aber auch die anderen Antigene exprimiert wurden, zeigt, dass in der Astrozytenkultur auch noch Neurone enthalten sind. Interessant ist hierbei auch, dass der prozentuale Anteil an TH – positiven Zellen höher ist, als bei den humanen Stammzellen.

Ein Ergebnis dieser Versuchsreihe ist, dass der Unterschied zwischen MSC und MNSC hinsichtlich der neuronalen Differenzierung bei jedem Antikörper zwar gering, aber dennoch beständig ist. Dabei war lediglich der Unterschied zwischen MSC und MNSC bei dem Antikörper GFAP signifikant ($P < 0,05$).

Bei dem Antikörper β – Tubulin 3 war der Unterschied nicht signifikant ($P > 0,05$). Damit kann man hier nicht von einem relevanten Unterschied zwischen MSC und MNSC ausgehen.

Bei dem dritten Antikörper, TH, war die Anzahl der HuN – positiven Zellen so gering, dass diese Versuchsreihen nicht weiter ausgewertet werden konnten. Ergebnisrelevante Fallzahlen für die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen konnten nicht erreicht werden.

Weiterhin lassen sich aus der ungefähr gleichen mittleren Rate an positiven Zellen bei MSC und MNSC keine Rückschlüsse auf besondere Eigenschaften von MSC ziehen.

Ein weiteres Ergebnis lässt sich durch den Vergleich der Daten mit denen von Hermann et al (2004) erschließen. Unter dem Einfluss der Kokultur zeigte sich eine vermehrte neurale Differenzierung, vor allem zu astroglialen Zellen. Insofern haben die humanen mesenchymalen Stammzellen in Kokultur mit Astrozyten ihr neurales Differenzierungspotential bewiesen.

3.3) Zusammenfassung

In der Zusammenschau wurden folgende Ergebnisse erzielt.

Die Kulturbedingungen für die Astrozytenkultur nach der Präparation wurden durch Zugabe der Faktoren GlutaMax, PDL, LME, sowie durch den häufigen Mediumwechsel etabliert, sodass eine kontinuierliche und überlebensfähige Kultur entstanden ist. Die so kultivierten murinen Astrozyten konnten anschließend für die Kokultur bzw. neurale Differenzierung von MSC und MNSC verwendet werden. B27 – supplement zeigte in Experimenten keinen relevanten Effekt, sodass es nicht verwendet wurde. Da sich RA bereits in vorherigen Studien bewährt hatte, die neurale Differenzierung zu fördern, wurde in einer Versuchsreihe die optimale Konzentration ermittelt. Bei einer Konzentration von 0,5µM RA wurde die Proliferation von Astrozyten effektiv unterdrückt, ohne jedoch zelltoxische Effekte auszuüben.

Aufgrund der hohen Zelldichte nach der Präparation (ca. 50000 Zellen/cm²) zeigten die Zellen anfänglich eine schlechte Überlebensrate. Diese wurde in weiteren Experimenten optimiert. Bei einer Zelldichte von ca. 5000 Zellen/cm² wuchsen die Astrozyten am besten an und zeigten eine astrozytenähnliche Morphologie.

Die neurale Differenzierung (von humanen MSC und MNSC), in Kokultur mit murinen Astrozyten, wurde durch die indirekte Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Dabei zeigten sich kontinuierliche, jedoch nur sehr geringe, Unterschiede zwischen MSC und MNSC. In den Experimenten war die Anzahl positiv gefärbter Zellen bei den MSC konstant höher, als bei den MNSC.

In der Astrozytenkultur, die durch eine inkomplette Präparation entstanden ist, ist die Rate an GFAP – positiven Zellen aber niedriger als erwartet (theoretisch 100%).

Tabelle 6: Die Tabelle gibt einen Gesamtüberblick über die Resultate dieser Arbeit. HuN⁺ (Human Nuclei) bezeichnet *humane* MSC (mesenchymale Stammzellen) oder MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) (in Kokultur mit murinen Astrozyten), HuN⁻ *murine* Astrozyten (in Kokultur mit MSC oder MNSC). Der jeweilige Mittelwert+/- Standardabweichung für die verwendeten Antikörper GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), β – Tubulin 3 und TH (Tyrosinhydroxylase). ⁽¹⁾ Daten von Hermann et al 2004

	Mit Kokultur			Ohne Kokultur ⁽¹⁾	
	HuN ⁻	MSC	MNSC	MNSC	MSC
GFAP	53+/-12%	55+/-11%	45+/-8%	13+/-4%	Negativ
Tub	45+/-16%	63+/-12%	52+/-11%	42+/-6%	Negativ
TH	16+/-10%	5%	3%	11+/-7%	Negativ

Die Rate der GFAP – positiven, HuN – positiven Zellen (MSC 55%, MNSC 45%) deutete auf die teilweise erfolgreiche Etablierung der Astrozytenkulturbedingungen hin.

Unreife Neurone konnten durch den Marker β – Tubulin 3 nachgewiesen werden. Die Auswertung dieser Zellen zeigte höhere positive Raten an, als bei GFAP, und zwar bei MSC und bei MNSC (MSC 63%, MNSC 52%).

Dopaminerge Neurone (TH – positiv) konnten in nur sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden. Die Anzahl an TH – positiven Zellen war jedoch zu gering, als dass eine adäquate Auswertung (Berechnung der Standardabweichung) hätte erfolgen können. Der höhere Anteil an TH – positiven Zellen unter der murinen Kokultur (HuN – negativ) spricht für eine unreine Astrozytenkultur. Es ist anzunehmen, dass in dieser Kokultur noch murine Neurone enthalten waren.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Hermann et al (2004), zeigt sich unter dem Einfluss der Kokultur mit murinen Astrozyten ein besseres Differenzierungspotential der humanen Stammzellen. Insbesondere die astrogliale Differenzierung konnte durch die Kokultur gefördert werden (GFAP – positiv). Die neuronale Differenzierung konnte durch den Anstieg an β – Tubulin 3 – positiven Neuronen ebenfalls gefördert werden. Die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen hat sich dagegen unter dem Einfluss der Kokultur verringert.

Zusammenfassend haben sich Astrozyten als Kokultur von humanen Stammzellen hinsichtlich eines neuronalen Differenzierungspotentials bewährt. Durch den Einfluss der Kokultur konnte hauptsächlich ein Anstieg astroglial differenzierter Zellen nachgewiesen werden, aber auch die Anzahl unreifer Neurone hat sich unter deren Einfluss erhöht.

4) Diskussion

4.1) Fragestellung

In dieser Doktorarbeit wurden zellbiologische Aspekte als Grundlage einer möglichen Stammzelltherapie betrachtet. Hintergrund der Überlegungen war es, einen Therapieansatz für neurodegenerative Erkrankungen durch adäquaten Zellersatz zu finden. Die bisherige Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen ist lediglich symptomorientiert. Einen kurativen Ansatz, der die Ursache dieser Erkrankungen therapiert, gibt es bisher nicht. Deswegen gilt der Fragestellung, ob es einen solchen Therapieansatz geben könnte, ein besonderes Interesse und ist Mittelpunkt der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet. Da bei dieser Erkrankungsgruppe jeweils bestimmte Zellen (z.B. dopaminerge Neurone bei Morbus Parkinson) zerstört werden, sollte eine Methode untersucht werden, um diesen Zellverlust durch neue, gleichartige Zellen zu ersetzen. Dieser Zellersatz sollte durch Transdifferenzierung von MSC (mesenchymalen Stammzellen) bzw. Differenzierung von MNSC (Marrow – derived NSC – like Cells) erfolgen. Erste Daten hierzu wurden bereits 2004 publiziert (Hermann et al. 2004) und dienten als Grundlage für diese Arbeit. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Kokultur mit murinen Astrozyten auf humanen Stammzellen (MSC und MNSC) untersucht.

4.2) Methodik

Die Methode der Wahl dieser Arbeit war die indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Durch diese Methode können verschiedene Proteine in Zellen nachgewiesen werden, und so eine mögliche Differenzierung von Zellen erkannt werden.

Für die Kokultur wurden Astrozyten verwendet. Sie sollten dabei für ein entsprechendes Milieu der Stammzellen sorgen, denn Astrozyten tragen zur Proliferation und neuronalen Differenzierung bei. Sie bieten eine Nische für die neuronale Entwicklung von Stammzellen (Song 2002). Insbesondere fördern Astrozyten die Entwicklung von Neuronen, vor allem zu dopaminergen Neuronen, welches ein nutzbarer Vorteil hinsichtlich einer möglichen Therapie des Morbus Parkinson wäre (Roy 2006). Die MSC und MNSC wurden zunächst 14 Tage kultiviert bis eine entsprechende Dichte erreicht wurde. Parallel wurden die Astrozyten kultiviert. Anschließend wurden Astrozyten und MSC bzw. MNSC gemeinsam, unter regelmäßigen Mediumwechsel, kultiviert. Die Kultur erfolgte in 8 Chamber Slides bzw. in 24 Chamber Slides. Auf dem Boden der einzelnen Wells wurde ein Glasplättchen gelegt, welches mit PDL (Poly – D – Lysin) beschichtet wurde. Der Vorteil von PDL

ist, dass es nicht zelltoxisch ist. In späteren Versuchen wurde jedoch nachgewiesen, dass PLL (Poly-L-Lysin) dennoch besser für die Astrozyten ist, da sie dadurch besser angewachsen sind und eine ausgeprägtere astrogliale Morphologie gezeigt haben. Der Nachteil an PLL ist aber, dass es zelltoxischer ist als PDL, und deswegen die Zellkulturflaschen öfters gewaschen werden mussten. Anschließend erfolgte die Färbung in mehreren Einzelschritten.

Am ersten Tag wurden die Zellen mittels PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Dieses ist wichtig, um die Antigene davor zu schützen, von ihrer ursprünglichen Stelle entfernt zu werden, sie zu konservieren und um die Zellstruktur (Morphologie) zu erhalten. Nur durch die Fixierung werden die Antigene überhaupt dem immunhistochemischen Nachweis zugänglich gemacht.

Am zweiten Tag wurden die Zellen zunächst eine Stunde lang mit Triton/PBS und Ziegen – Serum blockiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die spezifischen Bindungsplätze der zu färbenden Zellen freizulegen. Des Weiteren wird dadurch eine Anfärbung des Hintergrundes im Präparatausschnitt verhindert, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Nach der Blockierung wurden die Zellen mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser bindet an jeweils spezifische Proteine der Zellen, die es nachzuweisen galt. Es gibt eine Vielzahl an Primärantikörpern, die jeweils an verschiedene Strukturen binden bzw. an Proteine, die in verschiedenen Stadien der Neuronentwicklung exprimiert werden (Details siehe Abschnitt I.2.4.1).

Verwendet wurden hier vier verschiedene Antikörper. GFAP ist ein Marker für astrogliale Zellen und sollte den Anteil dieser Zellen, sowohl den der murinen Astrozyten als auch den der astroglial differenzierten MSC und MNSC in der Kokultur anzeigen. Dagegen ist β – Tubulin 3 ein Marker für unreife Neurone und diente somit dem Nachweis neuronal differenzierter Stammzellen. Als dritter Antikörper wurde TH verwendet. TH ist ein Marker für dopaminerge Neurone. Der vierte Antikörper ist HuN, ein Protein, das nur im menschlichen Zellkern exprimiert wird und somit die Unterscheidung zwischen murinen Astrozyten und menschlichen MSC/MNSC in der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte. Die Antikörper GFAP, β – Tubulin 3 und TH sind nicht speziesspezifisch, d.h. sie färben sowohl murine Zellen als auch humane Zellen an (die Speziesspezifität wurde mittels Westernblot durch die Hersteller überprüft). Somit wäre die Annahme, dass die angefärbten Zellen (humane und murine Zellen) nicht zu unterscheiden waren gerechtfertigt. In dieser Arbeit wurde jedoch als beständiger Primärantikörper HuN verwendet. Dieser Antikörper färbt spezifisch nur den Zellkern humaner Zellen an. Dadurch konnten in der Auswertung der Färbung eindeutig humane von murinen Zellen unterschieden werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen Proteinen ist laut Herstellerangabe sehr gering.

Am dritten Tag wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper

ist fluoreszenzmarkiert und bindet an den Primärantikörper. Als Sekundärantikörper wurden goat anti – rabbit IgG – Alexa 568 und goat anti – mouse IgG – Alexa 488 benutzt. Da die Sekundärantikörper sehr lichtempfindlich sind, musste die Inkubation zügig im Dunklen erfolgen. Zum Schluss wurden die Zellkerne noch mittels DAPI – Lösung, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet, angefärbt. Diese Färbung zeigte alle vorhandenen Zellen im Präparatausschnitt, unabhängig vom Zelltyp. Hierzu wurden wenige Tropfen der Mountinglösung direkt auf die Zellen pipettiert.

Nun konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Durch den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper konnte man diesen in der entsprechenden Einstellung beobachten. Da dieser an den Primärantikörper gebunden ist, korreliert die Anzahl der durch den Sekundärantikörper gefärbten Zellen mit der Anzahl der gefärbten Zellen des Primärantikörpers. So konnten die verschiedenen Proteine der Zellen im Präparatausschnitt nachgewiesen und ausgewertet werden. Als positiv wurden jene Zellen beschrieben, die sowohl positiv für HuN, als auch positiv für einen der Primärantikörper waren und zudem zelltypische morphologische Charakteristika zeigten.

Die Wahl der Methodik hat Potential zum Nachweis einer neuronalen Differenzierung von Stammzellen. Jedoch sprechen die Ergebnisse für eine notwendige Weiterentwicklung bzw. Anwendung zusätzlicher Untersuchungen, wie z.B. Genexpressionsanalyse mittels PCR. Durch diese Untersuchungen würde man zusätzliche und weiterführende Details der Zellcharakteristika erhalten. Die Methode hat gezeigt, dass eine genaue Auswertung, ob und wie viele Zellen sich differenziert haben nicht möglich ist. Dadurch, dass jeder Zelltyp bereits verschiedene Proteine von Neuronen aufweist, konnte keine exakte Zuordnung erfolgen. Eine genauere quantitative Auswertung ist, z.B. durch Messung der Farbintensität, möglich. Dies ist jedoch sehr zeitintensiv und würde nichts wesentliches am Resultat ändern. Es ist daher wichtig diese Methode durch Verwendung zusätzlicher Untersuchungen bzw. durch Verwendung zusätzlich Marker zu erweitern. Eine zusätzliche indirekte Fluoreszenzfärbung der humanen Stammzellen vor der Kultur mit der murinen Kokultur würde, im Vergleich zu der Färbung nach der Kulturzeit mit der Astrozytenkokultur, eine genauere Analyse der Wirkung dieser Methode ermöglichen.

Die Schwierigkeit dieser Methode ist zudem die Abhängigkeit von vorhandenen Faktoren (Antikörper, Zellzusätze) und die eingeschränkten Charakterisierungsbedingungen am Computer. Zudem ist die Auswertung der Färbung rein subjektiv. Der Beobachter legt fest, welche Zellen er als positiv und welche als negativ charakterisiert. Eine zusätzliche Beurteilung durch eine zweite Person wäre daher von Vorteil. Wichtig dabei ist, dass die Auswertung sofort im Anschluss der Färbung und stets durch die gleiche Person bzw. Personen erfolgen sollte.

Weiterhin ist diese Methode unter den jetzigen Kriterien nicht praktikabel, da murine Astrozyten als Kokultur verwendet wurden. Humane Astrozyten stehen jedoch nicht in dem entsprechenden und notwendigen Ausmaß zur Verfügung. Insofern ist eine Übertragung von Zellen *in vivo* mit der hier verwendeten Methode nicht möglich. Diese diente in dieser Arbeit lediglich der Etablierung dieser Methode an sich. Um zukünftig neuronal differenzierte Stammzellen transplantieren zu können, müssten, nach Weiterentwicklung dieser Methode, entsprechende Versuchsreihen zunächst mit Tierversuchen erfolgen, bevor eine Transplantation *in vivo* möglich wäre.

4.3) Ergebnisse

4.3.1) Astrozyten als Kokultur

Astrozyten sind die größten Gliazellen im Nervensystem. Sie haben diverse Aufgaben auf unterschiedlichen Gebieten. Zum einen sind sie für die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus verantwortlich, indem sie Transportvorgänge beeinflussen. Sie bilden zudem eine Diffusionsbarriere (Blut – Hirn – Schranke) und regeln das Elektrolytgleichgewicht. Durch Proliferation können Astrozyten Parenchymschäden durch Narbenbildung decken.

Astrozyten selbst sind über Gap junctions verbunden. Dies sind Zell – Zell – Kanäle, über die benachbarte Astrozyten direkt miteinander verbunden sind.

Es wurde gezeigt, dass Astrozyten die Synaptogenese beeinflussen. Die Bildung von Synapsen ist ein wichtiges Zeichen für die Reife von Neuronen. In einem Experiment wurde beobachtet, dass eine vermehrte Bildung von Synapsen mit der Entwicklung der Astrozyten in der Kultur korrespondiert. Somit wurde angenommen, dass Astrozyten diese Synaptogenese in positiver Weise beeinflussen. Einen Anstieg in der Synapsenaktivität bzw. der Aktionspotentiale konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, sodass die Astrozyten lediglich an der Bildung der Synapsen beteiligt sind (Johnson 2007).

Außerdem sind Astrozyten zellprotektiv, etwa in dem sie Neurone vor der zelltoxischen Harnsäure bei Gewebeschädigungen schützen und unterstützen die Oligodendrozyten bei der Myelinisierung nach Neuronenschädigung. Des Weiteren wurde ein Anstieg von TH – positiven Neuronen beobachtet, sodass Astrozyten auch zur neuronalen Differenzierung beitragen, insbesondere zu dopaminergen Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass sich MSC, durch eine Kokultur mit Astrozyten, neural differenzieren können. Bereits vor der Kultur haben MSC gewisse Eigenschaften von neuronalen Zellen aufgewiesen (GFAP – positiv, β - Tubulin – positiv, Nestin – positiv). Nach zwei Wochen in Kokultur mit Astrozyten konnten erste morphologische Veränderungen beobachtet

werden. Nach einem Monat wurde mittels RT – PCR nachgewiesen, dass die MSC auch positiv für MAP – 2 waren, welches ein weiterer Hinweis für eine neuronale Differenzierung ist. So konnte davon ausgegangen werden, dass Astrozyten als Kokultur einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung von MSC haben (Bossolasco 2005).

Die Etablierung der Kulturbedingungen für die Astrozytenkultur wurde durch Experimente hinsichtlich der Auswirkung von EtOH auf die Zelldichte, der Auswirkung von B27 – supplement, die geeignete Zelldichte und die geeignetste Konzentration von RA ermittelt. So entstand ein Nährmedium (EM – 1), welches über die notwendigen Faktoren für die Astrozytenkultur verfügte. Dieses Medium muss aber sicherlich noch durch weitere Zusätze optimiert werden. Ein wesentlicher Faktor hierbei ist die Gewinnung einer reineren Astrozytenkultur nach der Präparation.

4.3.1.1) Auswertung der murinen Astrozytenkultur

Bei einer reinen Astrozytenkultur wären theoretisch 100% GFAP – positive Zellen zu erwarten. Unsere Ergebnisse zeigten nur 53+/-12% GFAP – positive, HuN – negative Zellen. Dies spricht für eine unreine Astrozytenkultur. Außerdem exprimieren hauptsächlich aktivierte Astrozyten GFAP. Die Präparation aus murinen Gehirnen ist eine schwierige Methode. Die Inhibition des Wachstums von Mikroglia durch LME zeigte zudem keinen Effekt. Trotz einer relativ hohen Zelldichte nach der Präparation kam es vermutlich zu einer Kontamination mit Fibroblasten in der Astrozytenkultur. Zudem enthielt die Kultur murine Neurone. Es konnten 45+/-16% β – Tubulin 3 – positive, HuN – negative Zellen detektiert werden. Erstaunlicherweise beinhaltet die Kultur zudem 16+/-10% TH – positive, HuN – negative Zellen. Vermutlich ist dies durch die hohe Anzahl an Progenitorzellen in den fetalen murinen Gehirnen zu erklären.

4.3.2) Stammzellen

Aufbauend auf den beschriebenen Versuchsreihen von Hermann et al. wurden in unseren Versuchsreihen MSC, als auch proneural konvertierte MNSC verwendet. Die Differenzierung von MSC in Kokultur mit Astrozyten wurde ja bereits parallel zur Entstehung der vorliegenden Arbeit von anderen Arbeitsgruppen untersucht (Bossolasco 2005). Hier sollte v.a. der Effekt der Astrozytenkokultur auf MNSC untersucht werden. MSC haben die Fähigkeit sich zu transdifferenzieren und können somit einen Phänotyp annehmen, der sich von dem ihres Ursprungsgewebes unterscheidet.

NSC wurden aufgrund der schlechten Verfügbarkeit hinsichtlich regenerativer Therapiestrategien

nicht untersucht. Brewer et al. identifizierten für die Gewinnung von Zellen aus dem Gehirn vier Probleme: Erstens müssen die Zellen aus dem lokalen Netzwerk gelöst werden. Hierzu hat sich nach mehreren Untersuchungen Papain am besten bewährt. Papain benötigt jedoch Cystein für seine Aktivität, welches wiederum toxisch ist. Deshalb sollte eine möglichst kurze Inkubationszeit mit Cystein angestrebt werden. Zweitens müssen die Wachstumsinhibitoren entfernt werden. Drittens müssen die verschiedenen Zelltypen aus dem Gehirn voneinander getrennt werden. Dafür ist, nach Brewer et al., die Dichtegradientenzentrifugation am besten geeignet. Dadurch können insbesondere Zelltrümmer entfernt werden, wodurch das Wachstum der lebenden Zellen verstärkt gefördert wird. Als letztes müssen noch die geeigneten Kulturbedingungen getestet werden. Glutamat etwa hat einen negativen Einfluss auf das Überleben. Der Medienzusatz B27 – supplement erwies sich als proliferationsfördernd. Um das Wachstum weiter zu stimulieren, sollte man öfter das Medium wechseln, um tote Zellen zu entfernen. Ein weiterer Faktor, der das Überleben der Zellen, nicht aber das Wachstum, sehr positiv beeinflusst, ist FGF – 2. Allerdings hat sich dieser Einfluss nur auf Neurofilament – positive Zellen (Neurone) ausgewirkt, nicht jedoch auf Astroglia oder Mikroglia (Brewer 1996).

Der Weg der Transdifferenzierung von MSC in neuronale Zellen, nach dem von uns angewandten Protokoll, erfolgt in zwei Schritten. Zuerst werden die MSC durch Kultur in Serum – freiem, Wachstumsfaktoren – enthaltendem Medium, bei 3% Sauerstoff zu MNSC „konvertiert“ und anschließend durch Zugabe verschiedener Differenzierungsfaktoren zu neuronalen Zellen differenziert (Hermann C 2006, Hermann B 2006).

Es wurden in anderen Studien auch Versuche mit embryonalen Stammzellen (ESC) durchgeführt. ESC eignen sich jedoch nicht für den Einsatz in der Stammzelltherapie aufgrund logistischer, ethischer und wissenschaftlicher Probleme. Zudem zeigen sie ein Potential zu unkontrollierter Proliferation mit tumoröser Entartung (Hermann B 2004).

Durch gute Kulturbedingungen dienen MSC als kontinuierliche Quelle für Vorläuferzellen für mesenchymales Gewebe und zeigen dadurch ein hohes Potential für die Stammzelltherapie (Prockop 1997).

Nach Differenzierung der Zellen *in vitro* müssen die Zellen in die Region des geschädigten Gehirns gelangen. Neben der Transplantation gibt es auch die Möglichkeit die Zellen intravenös zu applizieren. Wie erste Versuche zeigten, war ein Teil der Zellen im Gehirn lokalisiert und zeigte einen neuralen Phänotyp (Brazelton 2000).

Wie bereits schon erwähnt wurde, haben MSC die Eigenschaft zu transdifferenzieren. Nun wurde überprüft, ob die MSC bei Rückenmarksverletzungen als Quelle für die Produktion von Differenzierungsfaktoren dienen können. Gentechnisch veränderte MSC, die mit dem Gen für

BDNF transfiziert wurden, wurden in das verletzte Gewebe eingepflanzt. Dabei konnte eine Stimulation des axonalen Wachstums festgestellt werden. Im Vergleich zu MSC ohne BDNF – Produktion war dieser Effekt im geschädigten Gewebe deutlich höher. Eine Heilung des Gewebes konnte damit aber alleine nicht erreicht werden. Hierzu sind sicher eine Reihe weiterer Faktoren notwendig (Lu 2005).

BDNF wurde auch im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzung und Nabelschnurblutzellen untersucht. In diesem Experiment wurden diese Blutzellen in das geschädigte Gewebe transplantiert und extern BDNF kontinuierlich hinzu gegeben. Hierdurch wurde eine bessere Remyelinisierung und Regeneration von geschädigten Axonen beobachtet. Acht Wochen nach der Transplantation konnte immunhistochemisch auch eine neurale Differenzierung der Blutzellen festgestellt werden. Durch diese Effekte konnte die motorische Funktion verbessert werden. Somit konnte ein regenerierender Effekt von BDNF bei Rückenmarksverletzungen bewiesen werden (Kuh 2005). Die Schwierigkeit ist es, nach der Transplantation, die ursprünglich transplantierten Zellen, wie z.B. Knochenmarkszellen, wieder zu dedektieren. Der Weg, den diese Zellen einschlagen, ist nicht eindeutig bewiesen (Mezey 2002).

4.3.2.1) Neurale Differenzierung unter Astrozytenkokultur

In vorherigen Studien wurde Astrozyten ein Beitrag zur neuronalen Differenzierung, vor allem TH – positiver Neurone, von Stammzellen zugesprochen. Nach Auswertung der Ergebnisse unserer Versuchsreihen konnte dieser Einfluss teilweise bestätigt werden. Der Anteil β – Tubulin 3 – positiver Zellen war konstant zwischen 55% und 65%. Als Marker für unreife Neurone hat er die Anzahl neuronal differenzierter Stammzellen widerspiegelt. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass MSC (Bossolasco 2005) bereits Marker für Neurone aufweisen. Eine genaue Zuordnung der positiv gefärbten Zellen erfolgte durch HuN. Weiterhin fiel auf, dass auch HuN – negative Zellen β – Tubulin 3 exprimierten. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Isolation der Astrozyten aus fetalen murinen Gehirnen erfolgte, welches vergleichsweise reich an neuronalen Progenitorzellen ist, die wiederum ebenfalls neuronal differenzieren können.

Im Vergleich zu früheren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe (Hermann A 2004), in denen keine Astrozytenkokultur verwendet wurde, zeigte sich unter dem Einfluss der Kokultur eine höhere Rate an β – Tubulin 3 – positiven Zellen (MSC 63%, MNSC 52% im Vergleich zu MNSC 42% ohne Astrozyten – Kokultur). Die neuronale Differenzierung der humanen Stammzellen wurde demnach durch den Einfluss der Astrozytenkokultur gefördert.

Der Anteil an GFAP – positiven Zellen war deutlich höher (MSC 55%, MNSC 45% im Vergleich zu

MNSC 13% ohne Astrozyten – Kokultur). Daraus lässt sich folgern, dass die Astrozyten als Kokultur vorwiegend zum astroglialen Differenzierungsverhalten der Stammzellen beigetragen haben. Die Ergebnisse aus vorherigen Studien, in denen ebenfalls Astrozyten als Kokultur eingesetzt wurden und die neurale Differenzierung von humanen Stammzellen beeinflussten, lassen sich demnach bestätigen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Beeinflussung der Synapsenbildung, welche essentiell für reife Neurone ist (Johnson 2007). Eine andere Erklärung für diese positive Wirkung ist der fördernde Einfluss der Astrozyten auf den Aufbau der EZM der Zellen (Acarin 2007).

Eine spezifische Förderung der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen konnte in unseren Versuchsreihen nicht nachgewiesen werden. Der Anteil an TH – positiven Zellen war sehr gering (zwischen 0% und 5%). Die Ergebnisse aus anderen Studien, in denen Astrozyten ein besonderes Differenzierungspotential zu dopaminergen Neuronen zugesprochen wurde (Bossolasco 2005), konnte durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden. Mögliche Gründe hierfür existieren nicht. Die Kulturbedingungen waren annähernd vergleichbar (mit Hermann et al. 2004) und der Einfluss der Kokultur sollte, wie oben beschrieben, nach dem aktuellen Forschungsstand eher fördernd sein. Unter der Fragestellung der Zellersatztherapie speziell bei Morbus Parkinson kann, aus sich dieser Arbeit, der fördernde Einfluss der Astrozyten in den vorherigen Studien nicht bestätigt werden. Aus unserer Datenlage können die Astrozyten in Kokultur nicht gewinnbringend bei dieser neurodegenerativen Erkrankung eingesetzt werden.

4.3.3) Wachstums – und Differenzierungsfaktoren

Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage wurden dementsprechende Faktoren für die Proliferation und die Differenzierung verwendet. Hierzu gehörten als Wachstumsfaktor BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor) und als Differenzierungsfaktoren RA (Retinoid Acid) und cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat).

Sanchez – Ramos et al. (2000) haben diverse Wachstums- und Differenzierungsfaktoren benutzt. Dazu gehören RA, verschiedene Wachstumsfaktoren, Antioxidantien, demethylierende Faktoren, cAMP und Noggin. In dieser Versuchsreihe wurde herausgefunden, dass die Umgebung des Gehirns und dessen Signale für die Differenzierung sehr wichtig sind. Für die Proliferation von MSC wurde EGF benutzt. Hierunter konnte man einen Rückgang der Fibronectin – positiven Zellen (ein Marker für mesenchymale Zellen) beobachten. Nach Zugabe von BDNF und RA ist die Anzahl der Nestin – positiven Zellen, einem Marker für unreife Vorläuferzellen, gesunken. BDNF und RA führten somit zur Differenzierung dieser Progenitorzellen.

Unter Verwendung einer Kokultur aus Maus – Gehirnzellen wurde ein Anstieg der Marker für neuronales Gewebe (Neu – N) und für gliales Gewebe (GFAP) bei MSC beobachtet. Hieraus konnte man schließen, dass die Zell – Zell – Kontakte für die Differenzierung sehr wichtig sind. Ein signifikanter Anstieg der späten Marker für reife Neurone (MAP – 2) wurde aufgrund der kurzen Inkubationszeit nicht erreicht. Sanchez – Ramos hat auch die Funktionsfähigkeit geprüft, in dem er Neuron – typische Physiologika nachgewiesen hat. So wurde eine Kalium – Kanal – Expression, sowie ein Kalziumanstieg nach Acetylcholingabe beobachtet.

Dieser Vorgang der neuronalen Differenzierung von MSC benennt Sanchez – Ramos Metadifferenzierung. Dies entspricht der Konversion mesodermaler Zellen in Zellen mit ektodermalem Ursprung. Die Metadifferenzierung erfolgt in 2 Schritten, wobei der erste Schritt der entscheidende ist. Im ersten Schritt erfolgt die Transdifferenzierung durch Reprogrammierung der Genexpression von differenzierten Zellen zu pluripotenten Zellen. Im zweiten Schritt erfolgt die Proliferation und Differenzierung der pluripotenten Zellen. Inwieweit spontane Zellfusionen hierbei eine Rolle gespielt haben, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Sanchez – Ramos 2002).

4.3.3.1) BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor)

BDNF fördert ebenfalls die Differenzierung von Stammzellen, jedoch nur in Anwesenheit anderer Differenzierungsfaktoren. In deren Anwesenheit kann BDNF das Differenzierungspotential der anderen Faktoren erhöhen. Diese wurden beim jeweiligen Mediumwechsel in den entsprechenden Verdünnungen ebenfalls zugegeben.

BDNF ist ein Neurotrophin. Neurotrophine sind für die Entwicklung des ZNS essentiell. Fehlen Neurotrophine, so kann es zu Hyperaktivität, vermehrter Aggressivität, Hyperphagie und Gedächtnisstörungen kommen. Ohne Neurotrophine ist ein Tier nicht überlebensfähig.

Um den Wirkungsmechanismus von BDNF herauszufinden, wurden verschiedene Faktoren unter dem Einfluss von BDNF untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass BDNF den Transkriptionsfaktor FKHRL1, welcher unter anderem für die Apoptose von Zellen mitverantwortlich ist, durch Phosphorylierung inhibiert und somit das Überleben der Zellen sichert (Mai 2002).

Ein weiterer Mechanismus wurde hinsichtlich des Rezeptors von BDNF gefunden. Der TrkB (Tyrosine Protein Kinase Receptor B) wird durch synaptische Aktivität in die prä – und/oder postsynaptische Membranen eingebaut. Durch die Sekretion von BDNF infolge der synaptischen Aktivität wird dieser Prozess noch weiter getriggert. So kann BDNF seine neurotrophischen Eigenschaften entfalten (Napaggan 2005).

Des Weiteren trägt BDNF zur neuronalen Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen bei. In

Verbindung mit anderen Faktoren, wie IGF – 1 plus Insulin, wurde eine neuronale Differenzierung dieser Zellen beobachtet.

BDNF wurde auch in Verbindung mit 5AzaC (5 – Azacytidine), einem Hemmstoff der DNA – Methylierung, untersucht. In der Kultur mit EGF – generierten neuralen Stammzellen wurden die beiden Faktoren alleine und zusammen untersucht. Die Kultur mit BDNF ergab mehr β – Tubulin – positive Neurone, während in der Kultur mit 5AzaC komplexere Neurone mit längeren Axonen und ausgebildeterem Soma zu beobachten waren. Beide Faktoren zusammen führten zu einer neuronalen Entwicklung, welches durch die Morphologie und den Anstieg von MAP – 2 bewiesen wurde. Beide Faktoren alleine führten nicht zu dem gleichen Ergebnis, wie in der Kultur mit beiden Faktoren zusammen. Das unterstützt die Hypothese, dass BDNF nur zusammen mit anderen Faktoren die neuronale Differenzierung fördert (Schinstine 1997).

Zudem führt die Zugabe von extrazellulärem BDNF zu einer Genaktivierung, welche eine Differenzierungskaskade nach sich zieht. Es wurde weiterhin beobachtet, dass nur die kontinuierliche hohe Gabe von BDNF zur Differenzierung beiträgt. Auch durch Regulation des Gens Neurtin, welches bei neuronaler Aktivität aktiviert wird, kommt BDNF eine differenzierende Wirkung zu. Eine einmalige Dosis hatte keinen Effekt auf die neuronale Differenzierung. Dieses Neurotrophin erhöht auch das Potential der synaptischen Transmission. BDNF führt auch zum Wachstum von neuronalen Zellen durch Ausbildung von Axonen und deren Verzweigungen. So trägt BDNF auch zum verbesserten Potential der synaptischen Transmission bei. BDNF bietet außerdem einen Schutz gegenüber oxidativen und endotoxischen Schädigungen. Auch bei Gewebeschädigungen konnten diverse Effekte von BDNF festgestellt werden. Hier stimuliert BDNF das axonale Wachstum und trägt zur Remyelinisierung bei.

Auch auf die Neurogenese hat BDNF einen Einfluss. Durch exogene Zufuhr von BDNF wurde im Gehirn Neurogenese auch an Orten außerhalb der Subventrikularzone und des Hippocampus festgestellt. Zu diesen Orten gehören unter anderem das Striatum, der Thalamus und der Hypothalamus. Daraus wurde gefolgert, dass BDNF sowohl die Zellproliferation im adulten Gehirn, als auch das Überleben von Vorläuferzellen und deren Tochterzellen fördert. Es konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, durch welchen Mechanismus BDNF die Zellen beeinflusst. Weiter wurde herausgefunden, dass BDNF bei neurodegenerativen Erkrankungen stark reduziert ist, welches eine mögliche Erklärung für den Zelluntergang in den entsprechenden Bereichen des Gehirns ist, da die protektive Wirkung von BDNF fehlt (Pencea 2001).

Einer Kultur von Neuroblastomzellen wurden die Faktoren BDNF und RA zugefügt. Dabei entstanden komplett differenzierte Neurone. Diese Zellen wiesen diverse Eigenschaften von Neuronen auf, wie die Abhängigkeit des Überlebens von neurotrophen Faktoren. Zudem waren sie

für Neuron – spezifische Marker wie MAP – 2 positiv. In diesem Zusammenhang wird die Wichtigkeit dieser beiden Faktoren deutlich. Sie sorgen für ein besseres Überleben der Zellen und für eine neuronale Differenzierung. Zudem zeigen sie die Abhängigkeit der Neurone von Neurotrophinen (Encinas 2000).

Zusammenfassend fördert BDNF eine Vielzahl von Mechanismen. Es fördert erstens das axonale Wachstum, und zweitens trägt es durch diverse Prozesse zum Überleben der Zellen und zur neuronalen Differenzierung bei. Durch Inhibition des Transkriptionsfaktors FKHL1, welcher unter anderem zur Apoptose beiträgt, wird das Überleben der Zellen gesichert. Wichtig ist, dass BDNF nur im Zusammenwirken mit anderen Faktoren eine Wirkung erzielt und nur durch die kontinuierliche Gabe dieses Neurotrophin seine volle Wirkung entfalten kann. Es kann andere Faktoren unterstützen bzw. aktivieren, oder durch andere Faktoren selbst aktiviert werden. Durch den Anstieg der Marker β – Tubulin 3 und MAP – 2 konnte der Effekt von BDNF auf die neuronale Differenzierung bewiesen werden. Auch im geschädigten Gewebe konnte ein positiver Effekt durch BDNF erzielt werden. Es hat zur Regeneration des Gewebes und zur Remyelinisierung beigetragen. Einen weiteren Effekt hat BDNF auf die Neurogenese. Es fördert nicht nur die Proliferation von neuralen Vorläuferzellen, sondern es wurde auch eine Neurogenese außerhalb der Subventrikularzone und des Hippocampus beobachtet. Diese fand unter anderem auch in Teilen des adulten Frontalhirns statt. Aufgrund der Vielzahl an Studien, die BDNF als direkten Proliferationsfaktor und indirekten Differenzierungsfaktor integriert haben, wurde BDNF auch in unseren Versuchsreihen eingesetzt.

4.3.3.2) cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)

Der Differenzierungsfaktor cAMP hat eine wesentliche Aufgabe. Die Funktion von BDNF wird durch cAMP reguliert, wobei cAMP selbst die Funktion des Neurotrophins nicht übernehmen kann. Durch zwei Mechanismen moduliert cAMP die Rezeptorsignalkaskade von BDNF. Erstens versperren es die durch BDNF induzierte Phosphorylierung des TrkB – Rezeptors. Hierbei werden drei Charakteristika gezeigt: die Phosphorylierung von TrkB wird verstärkt durch Inhibitoren von cAMP, sie wird abgeschwächt durch Analoga von cAMP und die Aktivierung der cAMP – Kaskade selbst hat keinen Effekt. Zweitens erleichtert cAMP die Expression bzw. die Lokalisation von TrkB in der PSD (Postsynaptic Density) in den Dendriten der Neurone.

Der Effekt von BDNF wird demnach durch cAMP moduliert. Dies geschieht jedoch nur in reifen Neuronen des Hippocampus. So wird die synaptische Aktivität, die durch BDNF beeinflusst wird von cAMP reguliert. Durch welchen Mechanismus die Rekrutierung von TrkB zu PSD geschieht, ist

noch nicht bekannt (Ji 2005).

Im allgemeinen fördert cAMP durch Aktivierung von Proteinkinase A die Zelldifferenzierung. Der Faktor cAMP wurde in vorherigen Studien bisher nicht oft eingesetzt. Aufgrund der nachgewiesenen Regulation von BDNF wurde er dennoch in unsere Experimenten mit einbezogen. Als Regulationsfaktor für BDNF unterstützt er dessen Funktion, welche bereits mehrfach bewiesen wurde.

4.3.3.3) RA (Retinoic Acid)

RA ist ein Derivat von Vitamin A. Ohne dieses Molekül kommt es zu diversen Fehlbildungen wie Blindheit, Anämie oder Nervendegeneration. RA ist demnach essentiell für die normale körperliche Entwicklung, vor allem während der Embryogenese, in Überdosierung ist RA jedoch teratogen. Es fördert die Reifung von Zellen, indem es die Ausbildung von Axonen der Motorneurone mitreguliert. Auch bei der neuronalen Differenzierung von neuronalen Stammzellen wurden positive Effekte von RA beobachtet. Durch die vermehrte Ausbildung von Neuriten und deren Verzweigungen trägt RA zur neuronalen Differenzierung bei. Zudem reguliert RA die dopaminerge Differenzierung von Nervenzellen durch RALDH1. Ein Fehlen von RA kann somit ein Erkrankungsbild, ähnlich eines Morbus Parkinson, verursachen.

Im embryonalen Stadium der Entwicklung des ZNS (zentrales Nervensystem) sorgt RA für das Wachstum der Motoraxone, für die neurale Differenzierung und für die Bildung neuraler Verknüpfungen. Auch im adulten Stadium übernimmt RA mehrere Funktionen. Neben dem weiteren Wachstum der Axone, sorgt es auch für die Regeneration von Neuronen und für die Verbesserung der neuronalen Differenzierung. Eine Unterbrechung der RA – Signalkaskade kann zu Motoneuronenerkrankungen, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson führen.

Zudem trägt RA zur Regeneration von Gewebeschädigungen bei. Neben dem parakrinen Effekt, durch den RA die entzündliche Komponente durch die Makrophagen mindert, erfolgt auch noch ein autokriner Effekt. Hier bewirkt RA die Expression von anderen Faktoren, die das Überleben der Zellen verstärken.

In Kultur mit neuronalen Stammzellen hat RA die Differenzierung zu Neuronen verdreifacht, im Gegensatz zu der Kultur ohne Zugabe von RA.

Aus diesen Erkenntnissen wird ersichtlich, dass RA diverse Aufgaben und Funktionen im ZNS übernimmt bzw. kontrolliert. RA sorgt nicht nur für die Differenzierung von Neuronen, sondern ist auch an der partiellen Regeneration nach neurologischen Traumata beteiligt (Maden B 2007).

Der Effekt von RA auf Stammzellen wurde mehrfach gezeigt. Als Differenzierungsfaktor verstärkte

er die Neuritenausbildung und wirkt protektiv vor neurodegenerativen Erkrankungen. Dieser Effekt ist jedoch nicht nachweislich auf den Faktor RA selbst zurückzuführen. Dazu ist die Datenlage zu gering.

Aufgrund der Förderung der dopaminergen Differenzierung durch RALDH1 wurde RA als Differenzierungsfaktor von uns verwendet. Nach Encinas et al. 2000 entstanden aus einer Zellkultur zusammen mit BDNF reife Neurone. Außerdem wurde festgestellt, dass RA die Expression anderer Faktoren fördert. RA wurde unter anderem aus diesen Gründen als Differenzierungsfaktor in der Zellkultur verwendet.

Die negativen Ergebnisse unserer Immunfluoreszenzfärbung mit TH lässt jedoch an dem Einfluss von RA auf die dopaminerge Differenzierung von MSC bzw. MNSC zweifeln. Beachtet werden muss hierbei jedoch die Kulturzeit der Stammzellen. Der Marker β – Tubulin 3 war teilweise positiv, d.h. es befanden sich einige unreife Neurone in der Zellkultur. Unreife Neurone produzieren nur zum Teil TH. Eine längere Kulturzeit der Stammzellen könnte so, bei fortgeschrittener Reife der Neurone, vermutlich zu einem höheren Prozentsatz an TH – positiven Neuronen führen. Die Reife der Neurone könnte nach einer längeren Kulturzeit durch den Marker MAP- 2, ein Marker, der in reifen Neuronen exprimiert wird, nachgewiesen werden.

Die hier verwendeten Faktoren BDNF, cAMP und RA sind nur eine geringe Auswahl an Wachstums – und Differenzierungsfaktoren, die eine Stammzellkultur beeinflussen können (Details siehe Abschnitt I.3.2).

BDNF steigert das Differenzierungspotential anderer Faktoren und sollte stets zusammen mit anderen Faktoren Verwendung finden. Allen voran hat sich cAMP in niedriger Dosierung bewährt. RA fördert die Funktion und Expression anderer Faktoren, als auch die neuronale Differenzierung. Um noch bessere Ergebnisse zu erzielen wären weitere Versuche, unter gleichen Bedingungen, mit anderen Faktoren, z.B. EGF, erforderlich, um somit die Kulturbedingungen zu optimieren und die neuronale Differenzierung noch mehr zu fördern.

4.3.4) Fazit

Die Fragestellung nach einer geeigneten kurativen Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen ist derzeit Mittelpunkt vieler Forschungen. Da die bisherigen Therapieansätze nur die Symptome behandeln, nicht jedoch die Ursache, wird hier auf einem weitreichenden Gebiet geforscht. Von Genregulation und genetischer Manipulation über neue pharmazeutische Wirkstoffe bis hin zu Transplantation wird jeder mögliche Ansatz überprüft. Einen Hauptbestandteil bildet die Stammzelltherapie. Mit dieser Methode soll die Ursache einer neurodegenerativen Erkrankung

behandelt werden. Dies geschieht durch den Ersatz der bei den Erkrankungen zugrunde gegangenen Zellen. Beim Morbus Parkinson z.B. wären dies die dopaminergen Zellen in der Substantia Nigra. Da der Verlust dieser Zellen die Symptomatik dieses Erkrankungsbildes auslöst, soll diese durch adäquaten Ersatz der Zellen verhindert werden. Als Kokultur wurden in dieser Arbeit Astrozyten verwendet. Astrozyten haben sich in diversen Studien durch verschiedene Effekte auf humane Stammzellen ausgezeichnet. Durch die Förderung der dopaminergen Induktion sind die Astrozyten in den Vordergrund der Kokulturforschung gerückt. Als jene Zellen, die den Hauptanteil an Zelltypen des ZNS stellen, sind sie ein ideales Modell, um das Differenzierungsverhalten von Stammzellen in neuralem Kontext zu untersuchen. Geeignete Bedingungen zur *in vitro* Züchtung von Astrozyten wurden durch die Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Zelldichten und verschiedener Konzentrationen von RA (und dessen Lösungsmittel Ethanol) auf die Zellproliferation gefunden. Zudem hat sich GlutaMax durch seine Stabilität bewährt. Im Vergleich zu Hermann A 2004 war die Rate an β – Tubulin 3 – positiven Zellen höher, sodass dieses Ergebnis unter anderem dem Astrozyten – Einfluss zugesprochen werden muss.

Die Frage nach den Ressourcen der Zellen ist ebenso vielfältig, wie die Frage nach der Methode zur Differenzierung der Zellen. Da sich ESC (embryonale Stammzellen) gut differenzieren lassen, war dies anfangs Hauptquelle für die Stammzelltherapieforschung. Aufgrund ethischer Bedenken und der Gefahr der tumorösen Entartung sind die ESC wieder in den Hintergrund gerückt. Weitere Möglichkeiten der Stammzelltherapie bieten NSC und MSC, wobei die MSC ein breiteres Potential in der Beeinflussung und in ihrer differenziellen Wirkung aufweisen. NSC sind aufgrund ihrer begrenzten Verfügbarkeit ungeeignet. MSC haben die Fähigkeit zu transdifferenzieren und so einen anderen Phänotyp als ihr Ursprungsgewebe anzunehmen. Durch spezielle Kulturbedingungen können MSC zu MNSC konvertiert werden. Diese sind den neuronalen Vorläuferzellen ähnlich und sollen somit eine bessere Beeinflussbarkeit hinsichtlich einer neuronalen Differenzierung aufweisen.

In dieser Doktorarbeit wurden sowohl MSC als auch MNSC in Hinblick auf ihr neurales Differenzierungspotential untersucht. Um die Stammzellen auf eine mögliche neurale Differenzierung zu überprüfen, müssen diese erst kultiviert werden. Dies geschah in Plastikkulturflaschen und erforderte den Einsatz von einem Medium inklusive der Wachstums – und Differenzierungsfaktoren. Als Medium wurde das Sanchez – Ramos – Medium verwendet. Dieses hat im Vergleich zu den anderen verwendeten Medien (Engel – Medium und Kawasaki – Medium) die höchste Überlebensrate an Zellen geboten. Somit war dieses Medium in seiner Zusammensetzung am besten für die Kultur von MSC und MNSC geeignet. In dem Medium sind die notwendigen Nährstoffe für die Zellen enthalten, die diese zum Überleben benötigen (z.B.

GlutaMax).

Als Wachstumsfaktor wurde BDNF verwendet. Dieser Faktor kann durch diverse Mechanismen sowohl das neuronale Wachstum fördern, als auch zur neuronalen Differenzierung beitragen.

Außerdem verfügt er über das Potential, andere Wachstums – und Differenzierungsfaktoren zu beeinflussen oder diese in ihrer Wirkung zu verstärken. Durch seine neuroprotektive Wirkung schützt er zudem die Zellen in der Kultur vor oxidativer und exzitotoxischer Schädigung.

Für die Potenzierung der neuronalen Differenzierung wurde zum einen cAMP verwendet. Dieses reguliert durch verschiedene Mechanismen die Wirkung von BDNF und fördert somit die neuronale Differenzierung. Der andere Differenzierungsfaktor war RA. Dieser reguliert die dopaminerge Signalkaskade und fördert damit auch die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen. Die geeignete Konzentration von RA wurde experimentell ermittelt und ergab die besten Ergebnisse für die Konzentration von 0,5µM RA.

Nach erfolgreicher Einzelkultur der Astrozyten und der Stammzellen, wurden diese zusammengefügt. Dabei wurde auf die optimale Zelldichte beider Kulturen geachtet, um ein Überleben möglichst vieler Zellen zu sichern. Bei zu vielen Astrozyten und zu wenigen Stammzellen war die Überlebensrate der Stammzellen sehr gering. Waren zu viele Stammzellen in der Kultur, so haben sich diese gegenseitig am Überleben gehindert und sind ebenfalls abgestorben. Unter einem Mikroskop wurde das Wachstum und die Ausreifung der MSC und MNSC verfolgt. Bei den MNSC, die in der Kultur zu Spheres zusammengefügt sind, kam es darauf an, dass sich einzelne Zellen aus diesem Zellverband lösen und auf den Astrozyten anwachsen. Die MSC liegen in der Kultur in Einzelzellen vor und können somit besser auf der Kokultur anwachsen.

Die Auswahl der Methode zum Nachweis der Differenzierung bietet viele Möglichkeiten. Die Methode, die hier verwendet wurde, ist die indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Mit dieser Methode gelingt es einzelne Proteine in Zellen nachzuweisen. Somit können die Zellen in ihren verschiedenen Stadien der Entwicklung erfasst und zugeordnet werden. Um eine neurale Differenzierung nachzuweisen, wurden verschiedene Primärantikörper verwendet. Der Anteil der Astrozyten bzw. glial differenzierter MSC und MNSC in der Kultur wurde mittels GFAP nachgewiesen. Der Primärantikörper β – Tubulin 3 ist ein Marker für die frühen und unreifen Neurone. Er hat den Anteil der sich differenzierenden MSC bzw. MNSC in neuronale Zellen, sowie die restlichen in der Kultur verbliebenen murinen Neuronen widerspiegelt. Zusätzlich wurde noch der Anteil der dopaminergen Neurone in der Kultur untersucht. Dieser wurde durch den Primärantikörper TH angefärbt.

Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass der Unterschied zwischen MSC und MNSC unter Kokultur mit Astrozyten sehr gering ist. Der Anteil positiver Zellen war bei MSC mit jedem

Antikörper sogar höher. Dieser Unterschied war bei jedem Antikörper ungefähr gleich, sodass man von einem kontinuierlichen Unterschied sprechen kann. Da dieser jedoch ziemlich gering war, ist es kein signifikanter Unterschied, weist jedoch dennoch auf ein besseres neurales Differenzierungspotential der MSC hin.

Der Prozentsatz an differenzierten Neuronen aus den MSC bzw. den MNSC liegt unterschiedlich hoch. Bei GFAP und β – Tubulin 3 war der Prozentsatz jeweils zwischen 50% und 60%, wobei β – Tubulin 3 in den jeweiligen Kulturen höher war wie GFAP. Daraus lässt sich schließen, dass in den untersuchten Kulturen geringfügig mehr unreife neuronale Zellen waren, als astrogliale Zellen. Der Anteil der angefärbten Zellen reicht zwar nicht aus, um eine vollständige Wirkung dieser Methode im Sinne einer neuronalen Transdifferenzierung der Stammzellen zu beweisen, belegt jedoch seine Berechtigung in den aktuellen Forschungsreihen.

Der Anteil an TH – positiven Zellen in der Kultur war kontinuierlich sehr gering mit Werten zwischen 0% und 5%. Dies bedeutet, dass sich aus dieser Methode, unter den jetzigen Bedingungen, keine Hinweise auf die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen ergeben. Obwohl in vorherigen Studien gerade die Förderung der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen durch eine Astrozytenkokultur und die Zugabe des Differenzierungsfaktors RA beschrieben wurde, konnten in dieser Arbeit äquivalente Ergebnisse nicht erzielt werden. Eine mögliche Ursache ist die zu kurze Kulturzeit von 10 – 14 Tagen. Da bei längeren Kulturzeiten die zunehmende Zelldichte der Stammzellen zu einer gegenseitigen Wachstumsinhibition führt, wären Versuchsreihen mit längerer Kulturzeit bei initial niedrigerer Zelldichte zu erwägen. Der Zusatz eines weiteren Faktors neben einer Verlängerung der Kulturzeit könnte zudem zu mehr dopaminergen Neuronen führen. Hier würde sich GDNF anbieten, welches die Differenzierung, speziell zu dopaminergen Neuronen, fördert (Glavaski – Joksimovic 2010).

Der Vergleich zu den Ergebnissen ohne die Astrozytenkokultur (Hermann et al 2004) zeigt dennoch das neurale Differenzierungspotential der Astrozyten. Es wurden sowohl mehr GFAP – positive Zellen, als auch mehr β – Tubulin 3 – positive Zellen detektiert. Der Anteil an astroglialen Zellen in der Kultur der humanen Stammzellen war besonders erhöht. Im Vergleich haben sich die humanen Stammzellen unter dem Einfluss der Kokultur mit murinen Astrozyten deutlich mehr neural differenziert. Vermutlich führten die durch Astrozyten geförderten Zell – Zell – Kontakte zu der vermehrten Differenzierung zu neuronalen Zellen. Hierdurch wurden die Stammzellen in dem Milieu der Astrozyten entsprechend stimuliert. Im Überstand der Astrozyten sind jedoch auch lösliche Faktoren enthalten. Diese sind wiederum auch in der Kokultur als auch in der *in vivo* – Situation (im humanen Gehirn) vorhanden.

In diesen Versuchsreihen wurden Zellen anderer und verschiedener Spender verwendet, als bei den

Versuchen der Laborgruppe von Hermann et al. 2004. Bei signifikanten Ergebnissen waren diese bei jedem Spender zu erkennen, sodass die Zellen verschiedener Spender keine Fehlerquelle darstellen. Weiterhin wurden die gleichen Antikörper wie bei Hermann et al. 2004 verwendet. Es gibt jedoch noch weitere Primärantikörper, die verwendet werden können. Neuritin etwa könnte sich entwickelnde Neurone anzeigen und MAP – 2 würde einen Hinweis auf ausdifferenzierte Neurone geben. Die Verwendung dieser Faktoren wäre jedoch nur bei einer längeren Kulturzeit sinnvoll.

Diese Methode ist nur eine aus Vielen, die zur Verfügung stehen. Angesichts der Ergebnisse stellt die Wahl der Methode doch Diskussionspotential dar. Als Basisuntersuchung ist sie sicherlich als erster Hinweis auf eine mögliche neuronale Differenzierung von Stammzellen zu verstehen, liefert aber letztendlich nicht genügend Details, um diese Frage zu klären. Zusätzliche Untersuchungen, wie z.B. Genexpressionsanalyse (SOX – 1) mittels RT – PCR, würden weitere Details hinsichtlich einer neuronalen Differenzierung bieten. SOX – 1 wird jedoch nur in Anwesenheit von RA exprimiert, sodass RA als weiterer Bestandteil der Kulturbedingungen erhalten werden muss. RT – PCR hat jedoch den Nachteil, dass aufgrund der starken Sequenz – Homologie zwischen humanen und murinen Genen oft nicht zwischen diesen unterschieden werden kann, was jedoch eine Vorbedingung für Kokulturrexperimente wäre. Zudem könnte ein Patch – Clamp – Verfahren durch den Nachweis von Natrium – oder Kaliumkanälen genauere Hinweise auf das Vorhandensein von Neuronen bieten. Die Konzentration von Neuritin würde den Entwicklungsstatus der Neurone anzeigen und könnte so im Verlauf die ansteigende Konzentration sich entwickelnder Neurone darstellen. Neuritin wird durch BDNF reguliert (Naeve 1997), sodass auch dieser Faktor weiter ein Bestandteil der Kultur bleiben sollte.

Die Fortführung dieser Versuchsbedingungen, unter zusätzlicher Analyse mit oben beschriebenen Verfahren kann detailliertere und aussagekräftigere Informationen einer neuronalen Differenzierung aus Stammzellen liefern. Die Ergebnisse sind nur eingeschränkt auf die *in vivo* – Situation übertragbar. Durch die Kokultur mit murinen Astrozyten ist zudem eine Transplantation zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Im humanen Gehirn sind noch andere Zellen enthalten (Oligodendrozyten, Plexusepithelzellen, Ependymzellen), die einen Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen ausüben könnten. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen (siehe oben) wären zunächst Tierversuche mit Modellen neurodegenerativer Erkrankungen zu erwägen. Erst bei sicheren Ergebnissen in diesen Tierversuchen könnte man sich dann weitergehend mit der Transplantation der Zellen *in vivo* beschäftigen.

5) Zusammenfassung

Der Fragestellung nach einem kurativen Therapieansatz bei neurodegenerativen Erkrankungen (wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer) gilt in der aktuellen Forschung ein besonderes Interesse, da bisher nur symptomorientierte Therapien dieser Erkrankungen existieren. Ein Schwerpunkt dabei ist die Stammzelltherapie. Aufbauend auf den Ergebnissen aus dem Labor von Prof. Alexander Storch, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer murinen Astrozyten – Kokultur auf das neurale Differenzierungspotential von MSC (mesenchymale Stammzellen) untersucht und mit den ursprünglichen Ergebnissen verglichen. Eine wesentliche Neuerung bei den Transdifferenzierungsversuchen im Labor von Prof. Storch war die anfängliche proneurale Konvertierung von MSC, die in ähnlicher Weise wie NSC (neurale Stammzellen), in Serum-freiem Medium, in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF (Epidermal Growth Factor) und FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) und in Suspension kultiviert wurden. Diese so genannten proneural-konvertierten MSC (MNSC: Marrow – derived NSC – like Cells) wurden anschließend in einem zweiten Schritt neural ausdifferenziert.

In dieser Arbeit wurde die Methodik der indirekten Immunhistochemie verwendet, um eine mögliche neurale Differenzierung von nativen MSC, als auch von MNSC, in Gegenwart der murinen Astrozyten – Kokultur zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zuerst Astrozyten aus murinen Hippocampi isoliert, und nach einigen Wochen in Kultur zusammen mit MSC und MNSC differenziert. Eine geeignete Zelldichte hierfür waren 5.000 Astrozyten/cm². Als Differenzierungsfaktoren wurden BDNF (Brain – derived Neurotrophic Factor), cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) sowie RA (Retinsäure) verwendet. Letztere wurde noch in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, wobei sich eine Konzentration von 0,5 µM als optimal erwiesen hat. Das häufig in Neuronenkulturen verwendete B27 supplement als Mediumzusatz brachte hingegen keinen Vorteil. Trotz mehreren sorgfältigen Präparationen aus murinen Gehirnen fiel auf, dass diese Kulturen dennoch zahlreiche murine Neurone enthielten.

Die immunhistochemische Auswertung (Anzahl positiver Zellen, d.h. die Zellen, die ein Protein exprimieren, im Vergleich zur Gesamtzellzahl) ergab, dass sich sowohl MSC, als auch MNSC, transdifferenzieren lassen und somit das Potential besitzen, ihre Barriere der mesenchymalen Differenzierung zu überwinden. Dabei haben sich MSC als differenzierungsfähiger erwiesen, obwohl den MNSC im Vorfeld durch ihre proneurale Konvertierung ein höheres neuronales Differenzierungspotential zugesprochen wurde: 63 ± 12% der MSC bzw. 52 ± 11% der MNSC waren nach Kokultur mit Astrozyten positiv für das neuronale Markerprotein β – Tubulin 3.

Außerdem exprimierten 55 ± 11 % der MSC und 45 ± 8 % der MNSC GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein). Diese Rate an positiven Zellen war in beiden Fällen höher als in Reinkultur von MSC bzw. MNSC. Das dopaminerge Markerprotein TH (Tyrosinhydroxylase) wurde nur von einem sehr geringen Prozentsatz der Zellen exprimiert.

Um die vollen Differenzierungseigenschaften dieser Stammzellen ausnutzen zu können, bedarf es noch an weiterer Forschung auf diesem Gebiet. Eine längere Kulturzeit und eine anschließende Kontrolle der Expression von reifen Neuronen (MAP – 2: Mikrotubuli assoziiertes Protein 2) wäre hier zu erwägen.

Die Auswahl von murinen Astrozyten führt zu dem Problem, dass trotz einer eventuellen neuronalen Differenzierung die Stammzellen nicht transplantiert werden könnten. Da humane Astrozyten andererseits ein Verfügbarkeitsproblem darstellen, dient die Kombination aus murinen Astrozyten und humanen Stammzellen nur zur Etablierung dieser Methodik, und dazu, die zugrunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen. So könnten etwa, im Rahmen weiterer Untersuchungen, Faktoren identifiziert werden, die von Astrozyten gebildet werden und das neurale Differenzierungspotential von MSC bzw. MNSC positiv beeinflussen. Diese Faktoren wiederum könnten angewandt werden, um MCS neural zu differenzieren, bevor sie im Rahmen einer autologen Transplantation zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen herangezogen werden. Durch weitere Verbesserung der Kulturbedingungen und unter Berücksichtigung der aufgeführten Optimierungsvorschläge könnte eine Methode zum kurativen Therapieansatz bei neurodegenerativen Erkrankungen etabliert werden.

6) Literatur

1. Acarin, Laia: Caspase – 3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation; *Glia*. 2007;55:954 – 65
2. Arsenijevic, Ivan: Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell – derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor; *J Neurosci*. 1998;18:2118 – 28
3. Bai, Lianhua: Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate; *Neurochem Res*. 2007;32:353 – 62
4. Benraiss, Abdellatif: Adenoviral brain – derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain; *J Neurosci*. 2001;21:6718 – 31
5. Bentz, Kristine: Neural differentiation of embryonic stem cells is induced by signalling from non – neural niche cells; *Cell Physiol Biochem*. 2006;18:275 – 86
6. Björklund, Anders: Cell replacement therapies for central nervous system disorders; *Nat Neurosci*. 2000;3:537 – 44
7. Bossolasco, P.: Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro; *Exp Neurol*. 2005;193:312 – 25
8. Brazelton, Timothy: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice; *Science*. 2000;290:1775 – 9
9. Brewer, Gregory: Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons; *J Neurosci Methods*. 1997;71:143 – 55
10. Chang, John: Neuronal network structuring induces greater neuronal activity through enhanced astroglial development; *J Neural Eng*. 2006;3:217 – 26

11. Chao, Moses: Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways; *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:299 – 309
12. Cheng, Aiwu: Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain; *Dev Biol.* 2003;258:319 – 33
13. Chmielnicki, Eva: Adenovirally expressed noggin and brain – derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone; *J Neurosci.* 2004;24:2133 – 42
14. Dezawa, M: Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells; *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2764 – 72
15. Du, Yangzhou: Astroglia – mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity; *Glia.* 2007;55:463 – 72
16. Edsjö, Anders: Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment; *Lab Invest.* 2003;83:813 – 23
17. Encinas, Mario: Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain – derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor – dependent, human neuron – like cells; *J Neurochem.* 2000;75:991 – 1003
18. Fields, R. Douglas: Purinergic signalling in neuron – glia interactions; *Nature Reviews Neuroscience* 7, 423 – 436 (June 2006) doi: 10.1038/nrn1928
19. Gaughwin, P. M.: Astrocytes promote neurogenesis from oligodendrocyte precursor cells; *Eur J Neurosci.* 2006;23:945 – 56
20. Glavaski – Joksimovic, Aleksandra: Glial cell line – derived neurotrophic factor – secreting genetically modified human bone marrow – derived mesenchymal stem cells promote recovery in a rat model of Parkinson's disease; *J Neurosci Res.* 2010;88:2669 – 81

21. Gris, Paul: Transcriptional Regulation of Scar Gene Expression in Primary Astrocytes; *Glia*. 2007;55:1145 – 55
22. Hermann, Andreas; A: Efficient generation of neural stem cell – like cells from adult human bone marrow stromal cells; *J Cell Sci*. 2004;117:4411 – 22
23. Hermann, Andreas; B 2004: Neurorestoration in Parkinson’s disease by cell replacement and endogenous regeneration; *Expert Opin Biol Ther*.;4:131 – 43
24. Hermann, Andreas; C: Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols; *J Neurosci Res*. 2006;83:1502 – 14
25. Hermann, Andreas; D: Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders; *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6:653 – 70
26. Ishibashi, Tomoko: Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses; *Neuron*. 2006;49:823 – 32
27. Ji, Yuanyuan: Cyclic AMP controls BDNF – induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons; *Nat Neurosci*. 2005;8:164 – 72
28. Jiang, Yuehua: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow; *Nature*. 2002;418:41 – 9
29. Joannides, Alexis: Postnatal astrocytes promote neural induction from adult human bone marrow – derived stem cells; *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12:681 – 8
30. Johnson, M. Austin: Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture; *J Neurosci*. 2007;27:3069 – 77
31. Kato, Takeo: A neurosphere – derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6019 – 24

32. Kim, Jong – Hoon: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease; *Nature*. 2002;418:50 – 6
33. Kuh, Su.: Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain – derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat; *Acta Neurochir (Wien)*. 2005;147:985 – 92
34. Lee, Jaewon: Evidence that brain – derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice; *J Neurochem*. 2002;82:1367 – 75
35. Lei, Zhao: Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro; *Cell Biol Int*. 2007
36. Lu, P.: BDNF – expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury; *Exp Neurol*. 2005;191:344 – 60
37. Maden, Malcolm A: Retinoid signalling in the development of the central nervous system; *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:843 – 53
38. Maden, Malcolm B: Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system; *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:755 – 65
39. Mai, Lian: BDNF – mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents; *J Neurochem*. 2002;82:75 – 83
40. McCoy, Eric: Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes; *Glia*. 2007;55:1034 – 43
41. Mezey, Eva: Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1364 – 9
42. Morrison, Shah 1997: Regulatory mechanism in stem cell biology. *Cell* 88: 287 – 298

43. Naeve, Gregory: Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis; Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:2648 – 53
44. Nagappan, Guhan: Activity – dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications; Trends Neurosci. 2005;28:464 – 71
45. Nuytemans, Karen: Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update; Hum Mutat. 2010;31:763 – 80.
46. Pencea, Viorica: Infusion of brain – derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus; J Neurosci. 2001;21:6706 – 17
47. Pevny, Larysa: A role for SOX1 in neural determination; Development. 1998;125:1967 – 78
48. Pichili, V.: Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity; Glia. 2007;55:801 – 9
49. Prockop, Darwin 1997: Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues; Science; 276:71 – 4
50. Ramos – Mandujano, Gerardo: Thrombin potently enhances swelling – sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes; Glia. 2007;55:917 – 25
51. Rickwood, D.: Neural Cell Culture – a practical approach; Oxford University Press 1995
52. Roy, Neeta: Functional engraftment of human ES cell – derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes; Nat Med. 2006;12:1259 – 68
53. Sanchez – Ramos, Juan: Neural Cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood; Neurosci Res. 2002;69:880 – 93

54. Schinstine, Malcolm: 5 – Azacytidine and BDNF enhance the maturation of neurons derived from EGF – generated neural stem cells; *Exp Neurol.* 1997;144:315 – 25
55. Schrott, Gerhard: BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3 – kinase – dependent pathway during neuronal development; *J Neurosci.* 2004;24:7366 – 77
56. Shetty, Ashok: Neurite outgrowth from progeny of epidermal growth factor – responsive hippocampal stem cells is significantly less robust than from fetal hippocampal cells following grafting onto organotypic hippocampal slice cultures: effect of brain – derived neurotrophic factor; *J Neurobiol.* 1999;38:391 – 413
57. Song, Hongjun: Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells; *Nature.* 2002;417:39 – 44
58. Storch, Alexander: Long – term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells; *Exp Neurol.* 2001;170:317 – 25
59. Thiele, DL: Modulation of human natural killer cell function by L – leucine methyl ester: monocyte – dependent depletion from human peripheral blood mononuclear cells; *J Immunol.* 1985;134:786 – 93.
60. Vogel, Wichard: Heterogeneity among human bone marrow – derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells; *Haematologica.* 2003;88:126 – 33
61. Wislet – Gendebien, Sabine A: Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin; *Brain Res Bull.* 2005;68(1 – 2):95 – 102
62. Wislet – Gendebien, Sabine B: Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin – positive to excitable neuron – like phenotype; *Stem Cells.* 2005;23:392 – 402
63. Young, Kaylene: p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF – responsive neurogenic precursor cells; *J Neurosci.* 2007;27:5146 – 55

7) Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Brenner für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Vor allem möchte ich mich jedoch bei Herrn Dr. rer. nat. Hans – Jörg Habisch für die langjährige und ausdauernde Unterstützung und Betreuung in allen Belangen bedanken. Weiterhin gilt mein Dank den technischen Assistenten Nancy Meier, Martina Meisel und Thomas Lenk. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei den Stammzellspendern von der Universität Ulm, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluss bedanke ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern für die kontinuierliche Motivation und die positiven Anregungen während der letzten Jahre.

8) Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten.