

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Orthopädie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. M. Reichel

**Einfluss neurotropher und kleinmolekularer Substanzen auf das
Wachstum transgerminal konvertierter mesenchymaler Stammzellen**

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

von
Raphael Spittler
aus Speyer

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

2. Berichterstatter: PD Dr. Stefan Liebau

Tag der Promotion: 16.11.2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen | 1 |
| 1.2 Transplantationsversuche mit Stammzellen beim Morbus Parkinson..... | 1 |
| 1.3 Stammzellen | 2 |
| 1.4 Transdifferenzierung und Konvertierung | 5 |
| 1.5 Messung des Zellzyklus | 7 |
| 1.6 Messung von Nekrose und Apoptose | 7 |
| 1.7 CUB domain-containing protein 1 (CDCP1)/CD318..... | 8 |
| 1.8 Neurotrophe und kleinmolekulare Substanzen | 8 |
| 1.9 Ziel der vorliegenden Dr. Arbeit | 10 |
| 2. Material und Methoden | 12 |
| 2.1 Materialliste | 12 |
| 2.2 Methoden | 15 |
| 2.2.1 Medien, Gewinnung und Anlage der Zellkultur | 15 |
| 2.2.2 Trypsinierung und Konvertierung der MSC | 16 |
| 2.2.3 PLL/FBS Beschichtung für die adhärenen Zellen | 16 |
| 2.2.4 Zellzählung der adhärent wachsenden Zellen unter dem Mikroskop..... | 17 |
| 2.2.5 Proliferationsmessung mit BrdU Färbung | 17 |
| 2.2.6 Zellzyklus Färbung..... | 21 |
| 2.2.7 Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und mitogener Substanzen auf Zellzyklus bzw. Proliferation – Screeningversuch | 25 |
| 2.2.8 Apoptose/Zelltod Messung mit Annexin V-FITC Detection KIT (ab14085) und Messung der CD318 Expression | 27 |
| 2.2.9 Statistische Auswertung..... | 29 |
| 3. Ergebnisse | 30 |
| 3.1 Messung der Proliferation von MSC und mNSC mittels Durchflusszytometrie..... | 30 |
| 3.2 Messung der Proliferation von MSC und mNSC mittels BrdU-Inkorporation..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Proliferation und Zellzyklusmessung in Anwesenheit der getesteten Additive | 33 |
| 3.3.1 Neurotrophe Wachstumsfaktoren | 33 |
| 3.3.2 Kleinmolekulare Substanzen | 44 |
| 3.4 Quantifizierung der Apoptose bzw. Nekrose während der proneuralen Konvertierung mittels Annexin/PI Färbung | 55 |
| 3.4.1 Zellen unter Standard Konvertierung mit EGF und FGF2 | 55 |
| 3.4.2 Einfluss von TSA auf die Apoptose bzw. Nekrose | 57 |
| 3.4.3 Einfluss von BDNF auf die Apoptose bzw. Nekrose | 59 |
| 3.4.4 Einfluss von LIF auf die Apoptose bzw. Nekrose | 60 |
| 3.5 Messung der Expression von CD318 mittels Durchflusszytometrie | 63 |
| 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse | 65 |
| 4. Diskussion | 67 |
| 4.1 Veränderung des Konvertierungsprotokolls | 67 |
| 4.2 Proliferation oder Transdifferenzierung | 67 |
| 4.3 Messung der Proliferation und Apoptose | 68 |
| 4.4 Inhomogenität der Zellen | 69 |
| 4.5 Anoikis | 71 |
| 4.6 Alter der Patienten, Zellspender, Zellkultur und Fallzahl | 71 |
| 4.7 Einfluss der Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen | 72 |
| 4.8 Substratrigidität als Einfluss auf die Differenzierung von MSC | 76 |
| 4.9 Schlussfolgerung und Aussicht | 76 |
| 5. Zusammenfassung | 79 |
| 6. Literaturverzeichnis | 81 |
| Anhang | 91 |

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|-------|---|
| 5-AC | 5-Azacytidin |
| ADAS | Adipose Derived Stromal Cells |
| AK | Antikörper |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| APP | Amyloid Precursor Protein |
| BDNF | Bone derived neurotrophic factor |
| BHA | Butylhydroxyanisol |
| BMMNC | Bone Marrow Monocular Cell |
| BMP | Bone Morphogenic Protein |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDCP1 | CUB domain-containing Protein 1 |
| CUB | Complement C1r/C1s, Uegf, BMP1 |
| DAPI | 4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| dppa | Developmental pluripotency associated genes |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ERK | Extracellular-signal Regulated Kinase |
| ESC | Embryonale Stammzellen |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| FGF2 | Fibroblast Growth Factor 2 |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HCL | Salzsäure |
| HDAC | Histon Deacetylase |

| | |
|--------|--|
| HSC | Hämatopoetische Stammzelle |
| Ig | Immunglobulin |
| ISCT | International Society for Cellular Therapy |
| iPS | Induzierte pluripotente Stammzelle |
| Klf4 | Krüppel-like factor 4 |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LIF | Leukaemia inhibitory factor |
| MAP 1b | Microtubule associated protein 1b |
| MAPC | Multipotent Adult Progenitor Cell |
| MPC | Mesenchymal Progenitor Cell |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| mNSC | MSC-derived NSC-like cells |
| MSC | Mesenchymale Stammzellen |
| NPC | Neurale Progenitor Zelle |
| NSC | Neurale Stammzellen |
| NT-3 | Neurotrophin-3 |
| Oct4 | Octamer binding transcription factor 4 |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| PLL | Poly-L-Lysin |
| RA | Retinsäure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SOD | Superoxid Dismutase |
| Src | Akronym aus cellular und sarcoma |
| SSEA | Stage Specific Embryonic Antigen |
| TSA | Trichostatin A |
| Trask | Transmembrane and associated with src kinases |
| Trk | Tyrosin-Kinase |

VPA

ZZ

Valproinsäure

Zellzyklus

1. Einleitung

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Mit zunehmender Seneszenz des menschlichen Organismus nimmt die Zellalterung und der Zelluntergang im Gewebe mehr und mehr zu. Dabei überwiegt der Zellverlust, aber es findet auch eine ungenügende Regeneration und ein Ersatz der verlorenen Zellen statt. Am Ende steht ein Nettozellverlust und eine insuffiziente physiologische Funktion der gealterten Zellen. Die Leistungsfähigkeit des Gewebes bzw. Organs nimmt ab (Chen 2007; Pekovic 2008). Dieser Alterungsprozess findet auch im Nervensystem statt. Diesen Nettozellverlust und den damit verbundenen Funktionsverlust im Nervensystem bezeichnet man als Neurodegeneration. Klassische Vertreter neurodegenerativer Erkrankungen wie Demenz, Morbus Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) haben in unserer älter werdenden Gesellschaft eine zunehmende Prävalenz (Elbaz 2008; Qiu 2007). Zur Zeit stehen für diese Erkrankungen wenige und auch nur symptomatische Therapien zur Verfügung. Die mit fortschreitender Krankheit einsetzende Resistenz gegenüber derzeitigen Therapiemöglichkeiten führt zu einem wachsenden Bedarf an neuen alternativen bzw. kurativen Therapien (Chase 2000).

1.2. Transplantationsversuche mit Stammzellen beim Morbus Parkinson

Bei der Parkinson Erkrankung kommt es zu einem Zellverlust in der A9 Region der Substantia Nigra pars compacta. Dieser Verlust an dopaminergen Zellen führt zur klassischen Parkinson Trias: Akinese, Rigor, Tremor. Durch diesen klar umschriebenen Bereich und sehr spezifischen Zelltyp eignet sich diese Erkrankung für die Erforschung einer Transplantationstherapie in besonderem Maße. Eine Therapiehypothese geht davon aus, den Neuronenverlust zu kompensieren, indem man die degenerierten Zellen ersetzt und deren physiologische Funktion wieder herstellt. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie diese Transplantation durchgeführt werden könnte. Zum einen mit Gewebe mesenzephaler Herkunft (Freed 2001) oder mit Stammzellen verschiedener Provenienz (Hermann 2004).

Forscherguppen weltweit haben diverse Transplantationsversuche an Menschen mit Parkinson Erkrankungen und an Parkinson Modellmäusen durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Zelltypen und Verfahren zum Einsatz. Die ersten Versuche am Menschen wurden mit fetalem humanen dopaminergen Gewebe durchgeführt. Dabei konnte eine signifikante Verbesserung der Symptome bei jüngeren Patienten (jünger als 60 Jahre), d.h. bei Transplantierten vs. Nicht-Transplantierten gezeigt werden. (Clarkson 2001; Freed 2001). In Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und post mortem Untersuchungen nach Transplantation konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen im Striatum anreichern (Olanow 2009).

Es gibt jedoch zahlreiche Bedenken gegenüber dem Einsatz solchen fetalen Gewebes. Beispiele sind ethische Bedenken bei der Gewinnung der dopaminergen Zellen aus Spendern, Abstoßungsreaktionen und die Gefahr der Übertragung von Krankheiten (Boer 1994; Hoffer 91).

Als Alternative wird am Einsatz von adulten Stammzellen für die Transplantationstherapie geforscht. Dabei können die Zellen über unterschiedliche Mechanismen einen Benefit auf die pathologischen Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen bewirken. Zum einen durch Ersatz der untergegangenen Zellen *in toto* oder disseminiert. Eine weitere Möglichkeit ist die Produktion von Zytokinen durch die applizierten Zellen, die dann die noch verbliebenen Zellen schützen könnten (Phinney 2005).

1.3. Stammzellen

Der Begriff Stammzelle wird verwendet für eine Zelle die 2 Eigenschaften aufweist: 1) die Fähigkeit, sich über einen langen Zeitraum selbst zu erneuern bzw. zu proliferieren und 2) die Möglichkeit in verschiedene Zelltypen auszureifen (Differenzierung) (McKay 1997; Scheffler 1999). Diese Differenzierung spiegelt sich in der Zellmorphologie, dem Genexpressionsprofil, der Funktion u.v.a. Eigenschaften wieder (Tosh 2002).

Die Stammzellen unterscheiden sich hinsichtlich des Potenzials, in verschiedene Zelltypen auszureifen. Je weiter die Entwicklung innerhalb des Organismus voranschreitet, umso mehr verlieren Stammzellen ihr Differenzierungspotential.

1.3.1. Embryonale Stammzellen

Totipotente Stammzellen können sich in alle der im Organismus vorkommenden Zellen differenzieren. Dies trifft aber nur auf die befruchtete Eizelle zu. Diese Totipotenz bleibt bis zum 8-Zell-(Blastomeren-)Stadium erhalten. Zur Gewinnung von totipotenten embryonalen Stammzellen (ESC) werden bis zu diesem Stadium, das ungefähr am 3. Tag postconceptionem endet, aus dem heranreifenden Embryo Zellen entnommen. Diese besitzen noch die Fähigkeit, einen vollständigen Organismus zu bilden (Cowan 2004).

Zellen nach dem 8-Zellstadium haben noch die Fähigkeit, jeden Zelltyp der drei embryonalen Keimblätter zu bilden, beginnen sich aber schon voneinander zu unterscheiden. Meist werden ESC jedoch aus der inneren Zellmasse der Blastula, einem späteren Stadium, gewonnen. Sie können sich ebenfalls in jeden Zelltyp aller drei Keimblätter differenzieren, können aber keinen vollständigen Organismus mehr bilden (ihnen fehlt das Vermögen zur Bildung von Trophoblasten); sie sind pluripotent. (Nagy 1993; Mountford 1998). Ein großes Problem bei der Verwendung von ESC zur Behandlung von Neurodegeneration ist neben ethischen und rechtlichen Einschränkungen die Gefahr der erhöhten Bildung von Teratomen (Thomson 1998).

1.3.2. Embryonale Keimbahnzellen

Die Vorläuferzellen der Ei- und Samenzellen in der Embryonalentwicklung werden als primordiale Keimbahnzellen bezeichnet. Man kann nach induziertem Abort aus Feten diese Zellen extrahieren und so embryonale Keimbahnzellen gewinnen (Kerr 2006).

1.3.3. Fetale Stammzellen

Fetale Stammzellen werden als Stammzellen im Stadium zwischen embryonalen und adulten Stammzellen betrachtet. Ihre Plastizität und Differenzierungspotenz ist geringer als die von ESC. Sie können aus fetalem Blut, der fetalen Leber, Niere, Lunge, dem fetalen Gehirn oder aus dem Amnionwasser gewonnen werden (Guillot 2006).

1.3.4. Adulte Stammzellen

Auch im adulten Organismus kommen in den meisten Geweben Stamm- und Progenitorzellen vor, um den Verlust an somatischen Zellen infolge intrinsischer oder extrinsischer Ursachen zu kompensieren, beispielsweise die lebenslange Hämatopoese. Adulte Stammzellen besitzen eine stark restringierte Potenz zur Genese verschiedener Zelltypen, die sich auf Zellen ihres eigenen Keimblatts beschränkt; sie sind multipotent. Als Progenitorzellen, die wiederum aus Stammzellen hervorgehen, bezeichnet man jene Zellen, die zwar noch proliferieren können (in vielen Fällen sogar viel stärker als Stammzellen selbst), sich aber nur mehr zu einem Zelltyp differenzieren können. Beispiele sind: Astroblasten oder Erythroblasten (Pekovic 2008).

Zwei in Hinblick auf diese Doktorarbeit besonders interessante adulte Stammzelltypen sind die mesenchymalen und die neuralen Stammzellen.

1.3.4.1. Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können unter anderem aus Knochenmark (Prockop 1997), peripherem Blut (Kuznetsov 2001), Muskeln (Lee 2000), Gefäßen (Brighton 1992), Haut (Mizuno 1996) und Fettgewebe (Zuk 2001) gewonnen werden. Friedenstein zeigte als Erster die Fähigkeit von aus Knochenmark gewonnen Zellen auf, osteogen differenzieren zu können (Friedenstein 1961) und bewies damit ihre Stammzelleneigenschaften.

Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) hat 3 Kriterien vorgeschlagen, um MSC zu charakterisieren. Erstens müssen sie adhärent an Plastik wachsen, wenn sie in Kultur angezüchtet werden. Dies ermöglicht gleichzeitig auf einfachem Wege, die Zellen von in Suspension wachsenden hämatopoetischen Stammzellen zu trennen. Zweitens müssen die MSC-Populationen positiv auf multiple Marker wie CD105, CD73 und CD90 sein und dürfen nicht hämatopoetische Antigene wie CD45, CD34 bzw. Marker für Monocyten/Makrophagen und B-Zellen exprimieren. Drittens müssen die Zellen in der Lage sein, *in vitro* unter Standard-Differenzierungsbedingungen Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten zu bilden. Die Zellen sind damit eine Subgruppe von Knochenmarksstammzellen und keinesfalls homogen. Es gibt bis dato keinen eindeutigen Marker, um MSC zuverlässig zu identifizieren (Dominici 2006; Docheva 2007).

1.3.4.2. Neurale Stammzellen

Die Entdeckung der Neurogenese und des Vorhandenseins von Neuralen Stammzellen (NSC) im Bereich des Gyrus dentatus hippocampi und der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels im adulten Gehirn (Altmann 1965 und 1969; Goul 1999; Eriksson 1998) führte zur Idee, diese Zellen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankung zu verwenden (Hermann 2004). Neurale Stammzellen werden definiert durch die Fähigkeit, in die 3 Haupttypen neuraler Zellen zu differenzieren: Astrocyten, Neurone, Oligodendrocyten. Es gibt keinen spezifischen Marker für neurale Stammzellen. Verschiedene Studien haben vielmehr eine Reihe von Proteinen (Oberflächenantigene, Zytoskelettproteine und Transkriptionsfaktoren) gefunden, anhand derer sie NSC identifizieren (Gage 2000; Sawamoto 2001; Uchida 2000).

Ein großes Problem ist die Gewinnung von NSC. So bräuchte man für eine allogene Transplantation mehrere fetale Gehirne, um eine ausreichende Menge an Zellen zu extrahieren, was eine autologe Transplantation von vornherein ausschließt.

Es finden sich Hinweise, dass adulte gewebespezifische Stammzellen nicht auf ihr Keimblatt restringiert sind, sondern sich unter gewissen Umständen in Zelltypen anderer Gewebe bzw. Keimblätter differenzieren können (Hermann 2004). Da MSC leicht zu isolieren sind und sich gut in Kultur züchten lassen, entstand die Idee, aus MSC NSC zu gewinnen. Erste Versuche in diese Richtung wurden von Woodbury und Sanchez-Ramos 2000 durchgeführt. Unter dem Einfluss verschiedener chemischer Agenzien und Wachstumsbedingungen wurde eine neurale Differenzierung der MSC induziert, die daraufhin neuronale und gliale Marker exprimierten (Sanchez-Ramos 2000; Woodbury 2000).

1.4. Transdifferenzierung und Konvertierung

Zellen können verschiedene Umwandlungsprozesse durchlaufen. Zur genaueren Unterscheidung bietet sich folgende Nomenklatur an (Hermann 2006; Tosh 2002; Habisch 2008):

Metaplasie ist die Umwandlung eines Zelltyps in einen anderen. Der Begriff umfasst Dedifferenzierung, Transdifferenzierung und die Umwandlung zwischen undifferenzierten

Stammzellen verschiedenen Gewebes. Oft führt die Metaplasie zu atypischen oder dysplastischen Zelltypen.

Dedifferenzierung beschreibt den Prozess, durch den eine Zelle in einen weniger differenzierten Zustand umgewandelt wird. Differenzierung ist nicht immer ein ‚one way‘ Prozess. So können auch völlig ausdifferenzierte Zellen, etwa infolge von Mutationen, dedifferenzieren bzw. entarten, und führen unter Umständen zur Tumorgenese.

Transdifferenzierung ist definiert als die Umwandlung eines differenzierten Zelltyps in einen anderen differenzierten Zelltyp sowohl mit als auch ohne zusätzlich zwischengeschalteter Zellteilung. Ein spezieller Fall der Transdifferenzierung ist die Umwandlung von Zellen oder Stammzellen einer bestimmten Keimblatt-Herkunft in Zellen eines anderen Keimblatttyps, die als transgerminale Umwandlung bezeichnet wird, zum Beispiel die Umwandlung von MSC mesodermalen Ursprungs in NSC-ähnliche Zellen ektodermalen Ursprungs (Hermann 2004; Lee 2003). Dahingegen wird die Umwandlung multipotenter Stammzellen einer bestimmten Entwicklungslinie innerhalb des gleichen Keimblatts als translineare Umwandlung (translinear conversation) bezeichnet.

Der Begriff „Konvertierung“ bzw. „transgerminale Konvertierung“ bezeichnet die unter genau definierten Bedingungen durchgeführte Umwandlung von Stammzellen in einen Zelltyp, den man aufgrund der Limitation auf bestimmte Markerproteine und anderer Eigenschaften (im Falle der MSC-Konvertierung etwa der Synthese einiger Neurotransmitter, sowie der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen) in Bezug auf das Ausmaß der transgerminalen Umwandlung nicht genau bestimmen kann.

Zur Konvertierung wurden und werden verschiedene Protokolle verwendet. Eine Übersicht bietet Hermann (Hermann 2006). Das von Hermann entwickelte und von uns weiterhin angewandte Protokoll verwendet ein serumfreies Medium (das angereichert ist mit einer Reihe von Vitaminen, Hormonen u.a. Zusatzstoffen, die für eine serumfreie Kultur optimiert sind), hypoxische Kulturbedingungen sowie die Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF2). Das Protokoll wird zu den 2-Schritt Protokollen gezählt. Dieses zeigte in vergleichenden Experimenten signifikantere morphologische Veränderungen und eine Expression einer Reihe von neuronalen Markergenen (Hermann 2006). Unter Anwendung dieses Protokolls zeigen sich Veränderungen von MSC in Richtung eines NSC-ähnlichen Zelltyps (mNSC = „MSC-derived NSC-like cells“) (Hermann 2004).

1.5. Messung der Proliferation mittels Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Eine gute Messmethode für Zellproliferation und Apoptose stellt die Bestimmung der Zellzyklusverteilung mittels fluorescence activated cell sorting (FACS) dar. Der Zellzyklus kann in 4 Phasen eingeteilt werden. In der S-Phase wird die chromosomale DNA repliziert. In der M-Phase (=Mitose) werden die Chromosomensätze getrennt. Zwischen der S- und M-Phase gibt es eine Pause, die G₂ Phase. Vor der S-Phase die G₁ bzw. G₀ Phase (entspricht einer langen G₁ Phase und findet sich in Gewebe mit wenig Teilung) (Schmidt, Unsicker 2003). Zellen die proliferieren, finden sich dabei in der S und G₂/M-Phase, apoptotische Zellen in der Sub-G₁-Phase. Durch durchflusszytometrische Messung nach Fixierung der Zellen und Färbung mittels Propidiumiodid können die einzelnen Phasen des Zellzyklus einer Zellpopulation quantitativ erfasst werden (Hanon 1996). Für ein Beispiel einer Zellzyklusmessung siehe Abbildung 3 auf Seite 24. Eine weitere Möglichkeit den Anteil proliferierender Zellen zu messen ist die Inkubation der Zellen mit Bromdesoxyuridin (BrdU). Dieses Nukleosid-Analogon wird während der S-Phase in die DNA eingebaut. Dieses kann anschließend mittels spezifischer Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden (Habisch 2010; Hao 2004).

1.6. Messung von Nekrose und Apoptose

Apoptose ist ein mehrstufiger Prozess mit reversiblen wie auch irreversiblen Schritten. In einem frühen Stadium kommt es aufgrund der zunehmenden Inaktivität der sog. Floppasen, Enzyme, die für eine ständige Anreicherung von Phosphatidylserin u.a. Phospholipide in der Zellmembraninnenseite sorgen, zur relativen Anreicherung von Phosphatidylserine (PS) an der Membranaußenseite. Annexin V ist ein Protein, das als solches (die noch intakte) Zellmembran nicht passieren kann und nun an der Zellaußenseite an PS bindet. Verbindet man nun den Nachweis von PS mittels Fluorescein (FITC)-gekoppeltem Annexin V mit einer Propidiumiodid-Färbung (letzteres kann als recht großes geladenes Molekül die Zellmembran erst nach deutlicher Schädigung derselben passieren), kann man mit dem FACS den Anteil früh- und spätapoptischer bzw. nekrotischer Zellen messen.

1.7. CUB domain –containing protein1 (CDCP1)/CD318

CDCP1 auch bekannt als CD318 oder Trask (Transmembrane and associated with src kinases) wird auf MSC und Neuralen Progenitor Zellen (NPC) exprimiert. Es findet sich desweiteren auf hämatopoetischen Stammzellen (HSC/CD 34⁺). Gleichzeitig wird CDCP1 auch als Marker für verschiedene Krebszellen und Krebsvorläufer betrachtet. Bühring postuliert, dass CDCP1 als genereller Stammzellen Marker betrachtet werden kann (Conze 2003; Bühring 2004).

1.8. Neurotrophe und kleinmolekulare Substanzen

Neurotrophe Wachstumsfaktoren sind Stoffe, die während der Neurogenese und im adulten Gehirn Wachstum und Differenzierung neuraler Stammzellen steuern und die Funktion neuronaler Zellen modulieren.

Außerdem werden sie für verschiedene Konvertierungsprotokolle eingesetzt, wie auch in der vorliegenden Arbeit. In Tabelle 1 findet sich die Auswahl der verschiedenen verwendeten Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen sowie deren speziellen physiologischen und zellulären Wirkungen.

Tabelle 1.: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen sowie deren speziellen physiologischen und zellulären Wirkungen. MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzelle; trk: Tyrosin-Kinase ; Oct-4: Octamer binding transcription factor4 ; Klf4: Krueppel-like factor 4 ; Dppa: Developmental pluripotency associated genes ; L-Dopa: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin.

| Faktor | Name; Funktion |
|--------|--|
| FGF 2 | Fibroblast Growth Factor 2 spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung. Es unterstützt Differenzierung, Proliferation und Migration. Für FGF2 gibt es verschiedene Rezeptoren, als nahezu einziger der FGF Familie gibt es auch einen vom neuralen Typ (Ornitz 2001; Ortega 1998). Neurale Progenitorzellen können aus NSC generiert werden, FGF2 ist der wichtigste Überlebensfaktor von NSC in Kultur (Hsu 2007). Knochenmarks-MSC konnten in Gegenwart von FGF2 in NSC-ähnliche Zellen konvertiert werden (Herrmann 2004; Lee 2003; |

| | |
|------------|--|
| | Sanchez-Ramos 1998 und 2002). |
| EGF | Epidermal Growth Factor ist ein sehr potentes Mitogen. Es wird zur Aufrechterhaltung der Proliferation im Konvertierungs- bzw. Transdifferenzierungsmedium verwendet (Hermann 2004; Lee 2003; Sanchez Ramos 1998). |
| LIF | Leukaemia inhibitory factor übt pleiotrophe Effekte auf verschiedene Zelltypen aus. Es aktiviert Zielgene, die mit Überleben, Proliferation, Differenzierung und Differenzierungshemmung zusammenhängen (Hsu 2007). LIF führt zur partiellen Differenzierung primitiver NSC, desweiteren zur Differenzierung glialer Progenitorzellen (Astroblasten) in Astrocyten (Hsu 2007) und <i>in vivo</i> zur Expansion von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Curfs 1997). |
| TSA | Trichostatin A modifiziert Chromatin, indem es die Histon-Deacetylasen hemmt. Dies führt zur Hoch – und Runterregullierung sehr vieler Gene. Es induziert unter anderem verschiedene Stammzellgene und mit Pluripotenz assoziierte Gene (Ruau 2008). Alexanian benutzt es für sein Konvertierungsprotokoll (Alexanian 2008). |
| VPA | Das Antiepileptikum Valproinsäure beeinflusst das kortikale neuronale Wachstum und die Neurogenese (Hao 2003). Es ist Teil des Induktionsprotokolls von Safford (Safford 2002), durch das MSC in Zellen mit neuronentypiger Morphologie konvertiert werden. Wichtig außerdem (deshalb hier verwendet): Es hemmt die DNA-Methylierung und ermöglicht dadurch u.U. eine Dedifferenzierung. |
| Retinsäure | Vitamin A-Metabolit, der an zahlreichen Differenzierungsvorgängen während der Embryonalentwicklung beteiligt ist. So fördert er etwa die Differenzierung von ESC zu Neuronen (Schuldiner 2001). Zur Konvertierungsinduktion wird sie bei Bellichi (Bellichi 2004) und Sanchez-Ramos (Sanchez-Ramos 2000) eingesetzt. |
| BDNF | Bone derived neurotrophic factor bewirkt axonale Zweigbildung, Dendritenwachstum, und hat neuroproliferative Eigenschaften durch |

| | |
|--------------|---|
| | Wirkung auf TrkB-Rezeptoren (Lu 2005). Es ist Teil des Differenzierungsprotokolls von Sanchez-Ramoz (Sanchez-Ramoz 2000). |
| SHH | Sonic Hedgehog fördert die Proliferation von NSC im adulten Enzephalon (Palma 2005). Fördert die Entwicklung von multipotenten Neuralleisten-Progenitorzellen mit dem Potential, mesenchymale und neurale Zellreihen zu bilden (Calloni 2007). |
| FGF 8 | Fibroblast Growth Factor 8 reguliert Wachstum und Polarität während der Mesenzephalon Entwicklung (Lee 1997). Lee verwendet es in seinem Multi – Step Differenzierungsprotokoll bei Gesamtknochenmarkszellen (Lee 2003). |
| 5-Azacytidin | Gehört, wie auch Trichostatin A, zu den Chromatin-modifizierenden Stoffen, wodurch Pluripotenz assoziierte Gene wie Oct4, Nanog, Klf4 und Dppa 2,3,4,5 reaktiviert werden sollen (Ruau 2008). Verwendet von Alexanian als epigenetischer Modifier zur „Neuronalen Induktion“ von MSC aus Knochenmark (Alexanian 2008). |
| Dopamin | Wird u.a. in den Neuronen der Substantia nigra pars compacta durch die Dopamindecarboxylase aus der Vorstufe L-Dopa umgewandelt. Wichtig für die Bewegungssteuerung innerhalb des Nigro-striatalen Systems. Moduliert die Neurogenese; stark proliferierende Neuronen Vorläufer exprimieren Dopamin Rezeptoren und wachsen in Kultur durch Aktivierung der Dopamin Rezeptoren schneller (Hoglinger 2004). |

1.9. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit

Um Zellen therapeutisch nutzbar zu machen, müssen sie unter den Bedingungen der Konvertierung eine gute Proliferation aufweisen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die Zellen schnell und gut anreichern zu können. Proliferation ist ein guter Marker für die Vitalität von Zellen. Eine schon geschädigte Zelle kann kaum einen therapeutischen Effekt bewirken. Die Zellen sollen nach Transplantation in den Organismus längerfristig überleben und daher schon vorher gute Proliferationsraten aufweisen. Höhere Proliferationsraten könnten zudem eine Dedifferenzierung begünstigen.

Auf der anderen Seite bedeuten gerade die Bedingungen der Konvertierung mit Serumentzug, die fehlende Möglichkeit für die Zellen adhärenz zu wachsen und die Reduktion von Sauerstoff einen hohen Stress für die Zellen. Daher sollte das Konvertierungsprotokoll auf die Verwendung weiterer Wachstumsfaktoren ausgeweitet werden. Verbesserte Kulturbedingungen (evaluiert durch Messung der Proliferations- bzw. Apoptoserate) sollten eine effizientere Umwandlung von MSC zu NSC bewirken.

In einem ersten Schritt wurde die Zellzyklusmessung für die Zellen unter den spezifischen Bedingungen der pro-neuralen Konvertierung etabliert. Zum Vergleich wurde mit immunhistochemischen Färbungen die Proliferation gemessen.

In einem nächsten Schritt wurden in einer Art Screening die verschiedenen Wachstumsfaktoren daraufhin getestet, ob sich Veränderungen im Zellzyklus zeigen.

Für ein Set ausgewählter Wachstumsfaktoren, die uns von besonderem Interesse erschienen, wurde deren Einfluss auf die Apoptose der Zellen während der Konvertierung mittels Annexin V-Färbung genauer quantifiziert und die CDCP1 (CD318) Aktivität als Hinweis für allgemeine Stammzelleigenschaft gemessen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Erhöht sich die Proliferation durch die Konvertierung?
- 2) Wie hoch ist die Proliferations- bzw. Apoptoserate bei Zellen, die adhärenz, im Vergleich zu solchen, die in Suspension konvertiert wurden, da gerade der Adhärenzverlust bei vielen Zellen zum Absterben führt?
- 3) Verändert sich die Zellzyklus-Verteilung in Anwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren? Bzw. findet sich ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation erhöht oder Apoptose verringert und dadurch Ziel weiterer Untersuchungen sein könnte?
- 4) Kann man dann das Protokoll auf weitere Faktoren ausweiten ohne einen hohen Zellverlust zu erhalten?
- 5) Verändert sich die Morphologie unter dem Einfluss weiterer Substanzen?
- 6) Exprimieren mesenchymale Stammzellen unter Zugabe von den Faktoren TSA, BDNF oder LIF während der Konvertierung vermehrt CD318?

2. Material und Methoden

2.1. Materialliste

Substanzen und Material

1M Salzsäure (HCl)
5-Acacytidin (5-AC)
AK – Mouse Anti BrdU
Alexa 488 AK
Alexa Orange
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit
(ab 14085)
Aqua B. Braun, Ecotainer (1000ml)
Aqua dest. (H₂O)
Axiovert 25 Mikroskop
Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)
Bench Hera Safe
Boratpuffer, pH 8,4
Bromdesoxyuridin (BrdU)
CD 318 anti-human Mouse IgG1-FITC
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(DPBS)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium
(DMEM) (+4,5g Glucose, +Glutamax,
+Pyruvat)
Duranflaschen, 100ml, 250ml, 500ml
Epidermal Growth Factor (EGF)
Ethanol/Eisessig (95/5% v/v)
Falcon Röhrchen 15ml Blue Max jr.

Hersteller

Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Roche Diagnostics, München
Molecular Probes (Invitrogen)
Molecular Probes (Invitrogen)
Abcam, USA

B. Braun, Meslungen
Milipore, Schwalbach
Carl Zeiss, Jena
Reliatech, Wolfenbüttel
Heraeus, Hanau
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Biolegend, Santa-Cruz, USA
Sigma-Aldrich, Steinheim
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

GIBCO Invitrogen, Darmstadt

Schott, Mitterteich
Reliatech, Wolfenbüttel
Sigma-Aldrich, Steinheim
Becton - Dickinson GmbH,
Heidelberg

| | |
|---|---|
| Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur | Becton - Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) | Reliatech, Wolfenbüttel |
| Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Glasline Kühlschrank | Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen |
| Goat Serum | Dako, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Kühlschrank Premium | Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen |
| Kulturflasche Nunclon 25cm ² | Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold |
| Kulturflasche Nunclon 75cm ² | Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold |
| Kulturflaschen 75cm ² | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Medium BRFF-P4-8F | Athena Environmental Science, Baltimore, USA |
| Minifuge RF (Sepatech) | Heraeus, Hanau |
| Mounting Medium (ohne 4,6-Diamidin-2- Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)) | Vector Labs, Burlingame, CA, USA |
| Pipetboy Plus | Integra Bioscience, Fernwald |
| Penicillin / Streptomycin | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Pipetman 20µl / 100µl / 1000µl | Gilson International B.V., Limburg- Offenheim |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Retinsäure (RA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Reference 10µl / 100µl / 200µl / 1000µl | Eppendorf, Hamburg |
| RNase (10mg/ml + Dubelco's PBS) | Roche Diagnostic, München |
| Röhrchen 2ml | Eppendorf, Hamburg |
| Triton TX | Sigma-Aldrich, Steinheim |

| | |
|--|-------------------------------------|
| Trypsin - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Trichostatin A (TSA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tube 50ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Unvergälder Alkohol 100% Riedel-de-Haen (1000ml) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Vortex Genie ½ | Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz |
| Valproinsäure (VPA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |

1.2. Methoden

2.2.1. Medien, Gewinnung und Anlage der Zellkultur

- Nährmedium für native MSC: 10ml auf 25cm² DMEM (+4,5g Glucose, +Glutamax, +Pyruvat), + 10% FBS, + 1% Penicillin/Streptomycin
- Konvertierungsmedium: Medium 10ml auf 25cm² BRFF-P4-8F, + 10ng/ml EGF, +10ng/ml FGF2, + 0,1% Heparin, +1% Penicillin/Streptomycin
- Beschichtung der Kulturflaschen für adhärenente Zellen: PLL / FBS Beschichtung (2.2.3)

Die Zellen werden uns von der Abteilung Orthopädie des Universitätsklinikums Ulm (Prof. Dr. Rolf Brenner) zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden aus der Zellsuspension durch adhärenentes Anwachsen an den Plastikzellkulturflaschen angereichert und ihre Identität durch Messung spezifischer Oberflächenmarker (positiv auf Marker wie CD105, CD73 und CD90; keine hämatopoetische Antigene wie CD45, CD34 bzw. Marker für Monocyten/Makrophagen und B-Zellen) verifiziert (Fiedler 2002; Fickert 2003; Fickert 2004).

Nach Anzucht über 2-3 Passagen werden die Zellen in DMEM +20% FBS +10% DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. DMSO vermindert die Kristallisation des Mediums. Das Auftauen der Zellen erfolgt im Wasserbad gefolgt von einer Zentrifugierung mit 1500 U/min. Nach Abnahme des DMSO haltigen Überstandes wird das Pellet in Nährmedium resuspendiert und dann in 75cm² Kulturflaschen (für adhärenente Kultur) überführt.

Die Zellen wachsen dann im Inkubator unter 37°C und 10% CO₂.

Es kamen mehrere MSC Kulturen zum Einsatz. Diese stammten von 5 Zellspendern, denen im Rahmen von Eingriffen am Knochen in Übereinstimmung mit der Ethikkommission der Universität Ulm und nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten im Rahmen von orthopädischen Eingriffen (hauptsächlich Tripple Osteotomien) Knochenmark entnommen wurde. Die Zellspender waren alle weiblichen Geschlechts. Eine Spenderin war 33 Jahre alt, eine 27 Jahre alt, zwei 19-jährig und eine 14-jährig.

2.2.2. Trypsinierung und Konvertierung der MSC

Für die Konvertierung kommt das Protokoll von Hermann (Hermann et al. 2004) zum Einsatz. Folgenden Bedingungen finden sich für die Zellkultur: 10ng/ml EGF und FGF2, 3% O₂ und serumfreies P4-8F Medium. Außerdem gibt es für die hier durchgeführten Versuche eine Modifikation : Einmal werden die Zellen in Suspension (wie ursprünglich von Hermann publiziert) und einmal unter adhärenenten Bedingungen gezüchtet. Die Konvertierung im Protokoll ist der Zeitpunkt, an dem die Zellen umgesetzt und im Konvertierungsmedium weitergezüchtet werden. Konvertierung in Suspension bedeutet, dass die Zellen aufgrund der Verwendung spezieller Zellkulturflaschen und in Abwesenheit von Serum nicht am Boden anwachsen können. Zum Umsetzen wird das Nährmedium mit Hilfe der Pipette verworfen.

Danach folgt die Trypsinierung. Zuerst werden die Zellen in den Flaschen mit PBS gespült (2-3ml auf kleine 25cm², 4-6ml auf größere 75cm² Flaschen), um den Rest Medium und v.a. das darin enthaltene FBS auszuwaschen. Nach Entnahme des PBS kommt der wichtigste Schritt: Zugabe von Trypsin (2ml auf kleine, 3ml auf große Flaschen); nach 1-3min bei Raumtemperatur kontrolliert man, ob die Zellen sich schon gelöst haben. In diesem Fall wird der Verdau durch Zugabe von 10% FBS gestoppt. Es folgt die Zentrifugierung mit 1500U/min für 5min.

Anschließend werden die Zellen entsprechend in Kulturflaschen oder Wells mit Konvertierungsmedium überführt und unter 3% O₂ und 5% CO₂ bei 37°C inkubiert.

2.2.3. PLL / FBS Beschichtung für die adhärenenten Zellen

- 10 % PLL (Poly-L-Lysin) in PBS

Der erste Schritt für die Beschichtung beginnt mit der Zugabe von 3ml PLL auf 75cm² Flaschen, 1,5ml PLL auf 25cm² Kulturflaschen. Danach folgt die Inkubation für 10min bei 37°C. Nach der Inkubation werden die Flaschen 2 mal mit sterilem H₂O (2ml auf 25er; 5ml auf 75er), dann 2 mal mit HBSS (2ml auf 25er; 5ml auf 75er) gewaschen; es folgt FBS (1,5ml auf 25er; 3ml auf 75er); wieder werden die Flaschen für 10min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wird die Flüssigkeit entnommen und die Flasche einmal mit PBS

gewaschen. Insgesamt führt diese Beschichtung, wie in Vorversuchen ermittelt wurde, zu einem restlosen Anhaften der Zellen auch unter serumfreien Bedingungen.

1.2.4. Zellzählung der adhären wachsenden Zellen unter dem Mikroskop

Es wurden unter dem Mikroskop blind und zufällig 5 Stellen ausgesucht und dann mit Hilfe eines Rasters im Okular die Zellen in 1mm^2 gezählt und hochgerechnet nach folgendem Rechenschema: x mal 100 mal 25 (für 25cm^2 Flasche) und x mal 100 mal 75 (für 75cm^2 Flasche). x ist die Anzahl Zellen im 1mm^2 Feld.

1.2.5. Proliferationsmessung mit BrdU-Färbung

1.2.5.1. Vorbereitung

Es wurden ungefähr 10.000 Zellen pro Well pro Versuch verwendet. Um die Zellzahl abzuschätzen wurde die Flasche unter dem Mikroskop untersucht und mit Rasterzählung die Gesamtzahl der Zellen hochgerechnet. Die BrdU Proliferationsmessungen sind als Kontrolle gedacht, um zu eruieren, ob die Zellzyklusmessungen vergleichbare Ergebnisse bringen. 90% einer Zellkohorte werden für die Messung mittels FACS verwendet, die restlichen 10% zur Messung der BrdU-Inkorporation. Die Zellen der Flaschen werden umgesetzt und konvertiert. Dabei werden die Zellen wieder unterschiedlich verteilt: 1/3 wachsen adhären, 2/3 in Suspension. Fünf Tage nach der Konvertierung werden $100\mu\text{M}$ BrdU zugegeben. 7 Tage nach Konvertierung bzw. 2 Tage nach Zugabe von BrdU beginnt die Vorbereitung der Zellen für die Messung mit dem FACS und die Immunzytologische Färbung. Die adhären Zellen werden erst trypsiniert und dann zentrifugiert. Die suspendierten Zellen werden zentrifugiert, dann mit Trypsin behandelt und wieder zentrifugiert. Die zwischengeschaltete Trypsin Behandlung soll Zellaggregate lösen.

Die Pellets werden mit $550\mu\text{l}$ PBS resuspendiert und aufgeteilt zum einen für eine Zellzyklusanalyse (90%, $500\mu\text{l}$) und zum anderen für das 8 Chamber (10%, $50\mu\text{l}$). Die Zellen für die Zellzyklusfärbung werden anschließend fixiert (siehe Zellzyklusprotokoll). Die für das 8 Chamber bestimmten Zellen werden auf 2ml mit P4-8F Medium und 10%

FBS expandiert. Danach werden die 2ml auf jeweils 500µl pro Well verteilt. Das ergibt 4 Wells für die adhärennten Zellen und 4 Wells für die suspendierten Zellen.

1.2.5.2. Das BrdU Färbe Protokoll

Das BrdU Färbeprotokoll ist auf 2 einander folgende Tage verteilt. BrdU wird in die DNA eingebaut wenn eine Zelle die DNA repliziert (S-Phase), in geringem Ausmaß aber auch, wenn sie stirbt (Apoptose). Verwendet wird eine Doppelantikörperfärbung.

- 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS
- Ethanol-Eisessig: 95% unvergältes EtOH + 5% Eisessig bei -20°C
- Blockierungsmedium: 3% goat Serum + 0,2% Triton in PBS
- Färbung:
 - primärer Antikörper: Mouse anti-BrdU Antikörper (1:80) in 1% goat-Serum/PBS
 - sekundärer Antikörper: Goat anti-mouse Antikörper, gekoppelt an Alexa-488 (1:500) in 1% goat-Serum/PBS
 - Farbstoff Alexa Orange (1:2000) in PBS

1. Tag

Als erstes erfolgt die Fixierung durch PFA, das Proteine reversibel vernetzt, und EtOH/Eisessig.

Das Medium wird aus den Wells abgenommen. Dann werden die Wells 2 mal mit PBS (500µl/Well) gewaschen. Danach für 20-30 min bei 4°C mit 4% PFA gefüllt. Es folgt weiter eine Waschung 2 mal mit PBS. Dann werden die Zellen für 5 min bei 4°C gehalten. Die Wells werden mit Eisessig gefüllt, sodass der Boden gut bedeckt ist. Die Zellen müssen jetzt schnell auf -20°C für 10 min gekühlt werden. Danach werden die Zellen 2 mal mit 2 normaler Salzsäure gewaschen und anschließend für 45-60 min in 2 normaler Salzsäure bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Salzsäure sorgt vor allem nach Behandlung mit PFA dafür, dass die DNA denaturiert und für Antikörper zugänglich wird. Um die Salzsäure zu neutralisieren werden die Wells 2 mal für 5 min mit Boratpuffer (pH 8,4)

behandelt. Es folgt eine weitere Waschung 3 mal für 3 min mit PBS. Die Zellen werden 1h bei Raumtemperatur mit Blockierungsmedium behandelt.

Nach dieser Stunde kommt der anti-BrdU Antikörper zu den Zellen. Das Well kommt über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank.

2. Tag (nächster Tag)

Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellgrenzen später unter dem Fluoreszenzmikroskop besser zu erkennen, kommt noch der Farbstoff Alexa Orange (1:2000) zu den Zellen für 2 min dazu. Dann werden die Zellen wieder mit PBS (3 mal für 5 min) gewaschen. Jetzt folgt der 2. Antikörper (goat anti-mouse IgG Alexa-488); die Zellen werden für 1h bei Raumtemperatur belassen, danach 3 mal für 5 min. mit PBS gewaschen, es folgt das Mounting ohne DAPI.

Das PBS wird abpipetiert. Das Gitter des Chamber slides wird abgenommen. Auf jedes Well wird 1 Tropfen Mounting Medium zugegeben. Der Rand des Chamber slide wird mit Nagellackentferner versehen. Dieser wirkt als Kleber. Die Deckplatte wird aufgelegt und an den Seiten mit Nagellackentferner behandelt um die Festigkeit zu erhöhen.

Die Zellen können nun unter dem Fluoreszenz Mikroskop betrachtet werden. BrdU positive Zellen werden als in Proliferation (also S/G₂/M Phase) befindliche Zellen gewertet. Gezählt wurden die BrdU positiven, sowie die Gesamtzellzahl (gefärbt mit Alexa Orange). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Computerprogramm Medical Pointer. Abbildung 2 auf Seite 21 zeigt eine nach diesem Protokoll entstandene und untersuchte BrdU und Alexa Orange Färbung von mNSC 7 Tage nach Konvertierung. Zur besseren Übersicht findet sich auf Seite 20 eine Abbildung mit Flowchart über die Verteilung der Zellen auf die unter 2.2.5. beschriebenen BrdU/Alexa Orange Färbung und die unter 2.2.6. beschriebenen Zellzyklusfärbung. Die Ergebnisse und der Vergleichs der beiden Methoden findet sich auf Seite 33.

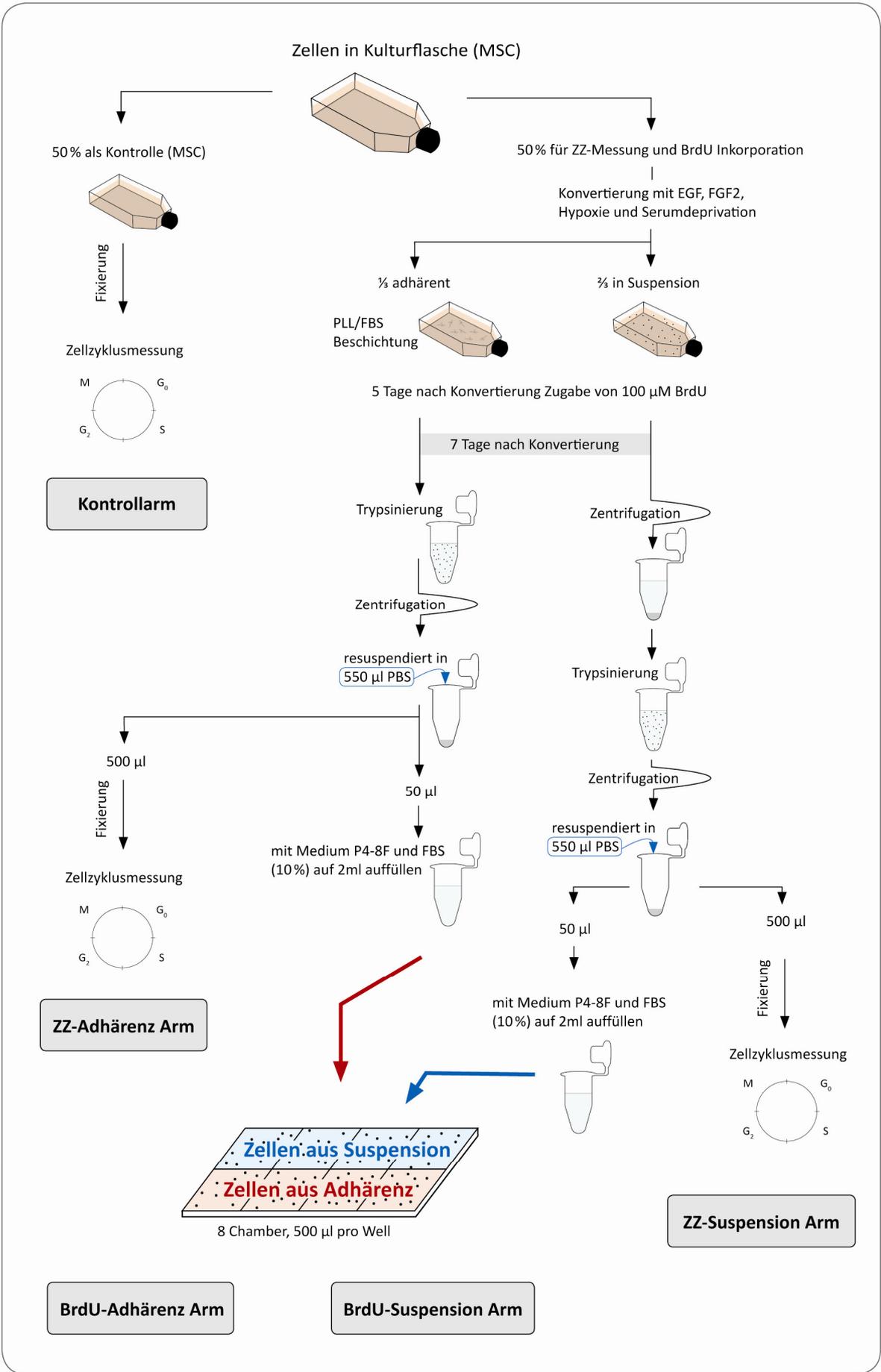


Abbildung 1: Text zur Abbildung auf Seite 20: Flowchart über die Aufteilung auf die verschiedenen Versuchsarme beim Vergleich der Proliferation von Zellzyklusmessung und Bromodesoxyuridin (BrdU) Färbung. ZZ: Zellzyklus; EGF: Epidermal Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; FBS: Fetal Bovine Serum; PBS: Phosphate Buffered Saline; MSC: Mesenchymale Stammzelle; PLL: Poly-L-Lysine. Konvertierung: EGF+FGF2 plus Hypoxie und Serumentzug (Medium P4-8F). Zuerst wurden die Zellen auf zwei Linien aufgeteilt: Ein Kontrollarm (keine Konvertierung) und ein Versuchsarm mit Konvertierung. Der Versuchsarm wurde in eine Linie von adhären wachsenden und eine Linie für in Suspension wachsende Zellen geteilt; jede Linie wiederum in eine ZZ Messung und eine BrdU Messung. So ergeben sich insgesamt 5 Versuchsarme.

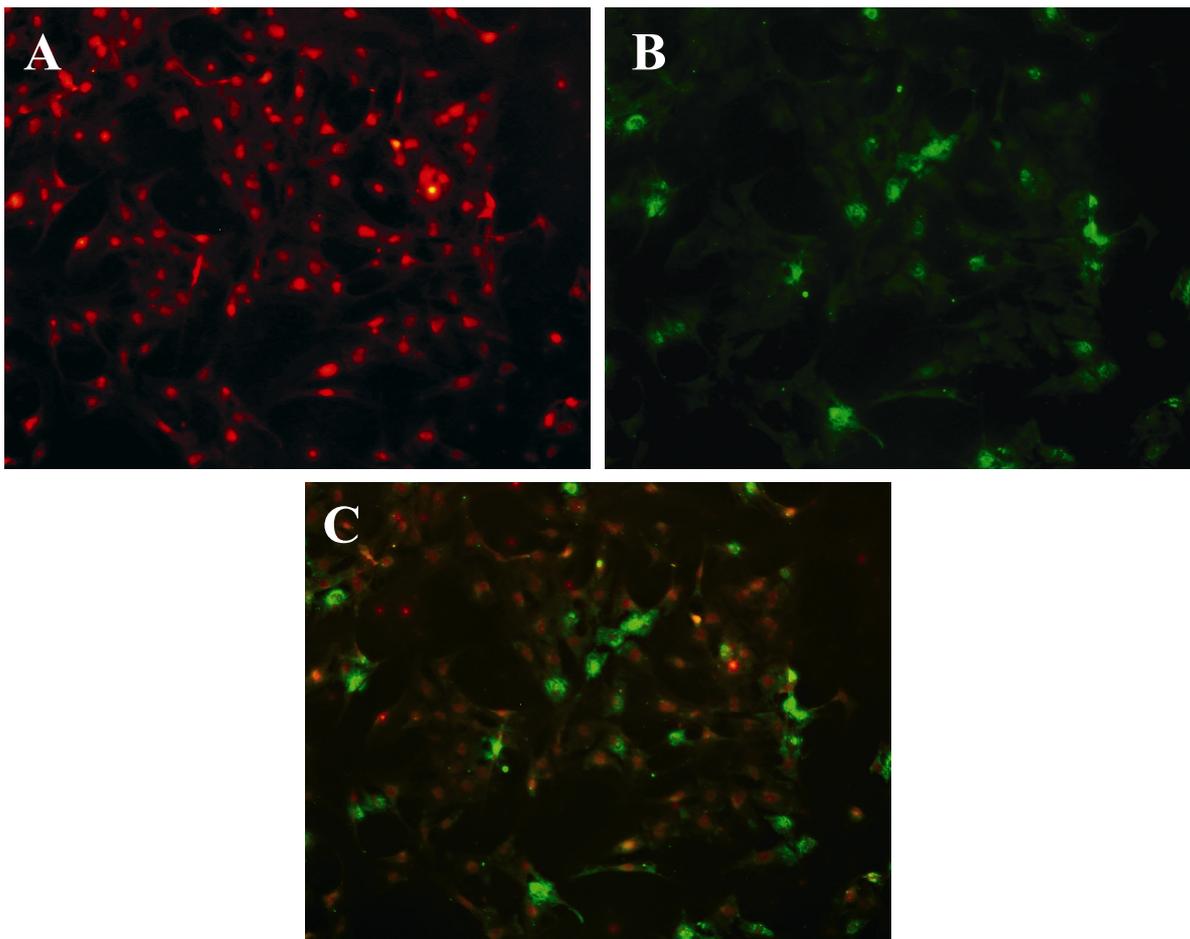


Abbildung 2: mNSC 7 Tage nach Konvertierung unter adhären wachstumsbedingungen. MSC: Mesenchymale Stammzelle; NSC: Neurale Stammzelle; mNSC: MSC derived NSC like cell. Sehr gut sichtbar die Färbung des Zellplasmas mit Alexa Orange (rc^+) und die mit Bromodesoxyuridin (BrdU) angefärbten grün leuchtenden Kerne. Die Zellen wurden mit EGF (Epidermal Growth Factor), FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) sowie unter Hypoxie und Serumentzug (Medium P4-8F) konvertiert. Die Bilder zeigen eine 100-fache Vergrößerung aufgenommen mit einem Axiovert 25 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) und dargestellt mit dem Programm AxioVision Rel. 4.7. (A) Kanal für rote Fluoreszenz für die Alexa Orange Färbung. (B) Kanal für grüne Fluoreszenz für die BrdU Färbung. (C) Doppelbildüberlagerung der roten und grünen Fluoreszenz.

1.2.6. Zellzyklus Färbung

Verwendete Lösungen:

- RNase 10 mg/ml in PBS
- PI 1 mg/ml in PBS
- 80% EtOH in PBS -20°C

1.2.6.1. Propidiumiodid und Durchflusszytometrie

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der mit der DNA intercaliert. Die Exzitationswellenlänge beträgt 488nm, emittiert wird im Bereich von 600nm. Um zu verhindern, dass auch RNA gemessen wird, gibt man RNase zu. Im Durchflusszytometer erkennt man unterschiedliche Intensitäten von PI. Das hängt mit der stöchiometrischen Bindung von PI an die doppelsträngige DNA zusammen. Eine Zelle die ihren DNA-Gehalt verdoppelt, muss dann auch etwa die doppelte Intensität von PI im FACS zeigen. Dadurch kann auf die Menge an Zellen in den Einzelnen Phasen des Zellzyklus geschlossen werden.

Die Durchflusszytometrie kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn große Menge Zellen nach Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Färbung untersucht werden sollen. Gerade die Möglichkeit nach verschiedenen Intensitäten unterscheiden zu können, ist ein großer Vorteil im Gegensatz zum menschlichen Auge, das unter einem Fluoreszenzmikroskop nur schwer verschiedene Nuancen unterscheiden kann. Zur Analyse passieren die einzelnen Zellen einen Laserstrahl. Das durch die Zellen gestreute Licht wird von zwei Linsen eingefangen, eine direkt in Laserrichtung (=„Forward Scatter“), eine im rechten Winkel zum Laserstrahl (=„Side Scatter“). Um gefärbte Zellen zu erkennen, kommen weitere Laser mit verschiedenen Wellenlängen und Detektoren zum Einsatz. Der an die Zellen gebundene Farbstoff wird bei bestimmten Wellenlängen angeregt und emittiert bei einer charakteristischen Wellenlänge, bei der dann die Intensität des emittierten Lichts gemessen wird.

1.2.6.2. Fixierung der Zellen

Die 500µl Zellsuspension, die man aus dem BrdU Staining Protokoll gewonnen hat (s. Abbildung 1), werden in 15ml Falcons überführt.

Anschließend wird langsam, tropfenweise 80%iges Ethanol zugegeben, bis man 5ml erreicht (500µl PBS+Zellen und 4,5ml Alkohol). Während der ganzen Prozedur ist das Röhrchen auf dem Vortex. Die so fixierten Zellen kommen für mindestens 30min in den Kühlschrank, wo sie bei -20°C bis zu 3 Monaten haltbar sind. Wieder aus dem Kühlschrank, werden die Zellen für 10 min. auf Eis gelegt.

1.2.6.3. Rehydrierung der Zellen, Färbung und FACS Analyse

Die Zellen werden zentrifugiert, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Temperatur mindestens 0°C beträgt. Während der Zentrifugation kann die Färbelösung hergestellt werden. Pro Röhrchen braucht man etwas über 0,5ml. Diese setzen sich wie folgt zusammen: 0,5ml PBS, 12,5µl PI, 12µl RNase. Jetzt wird das Pellet mit PBS gewaschen, noch einmal zentrifugiert, in 0,5ml Färbelösung übernommen und in FACS Röhrchen überführt. Die gefärbten Zellen kommen für 20-30 min bei 37°C in den Inkubator. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers von Becton Dickinson Typ Calibur analysiert. Es wurden idR. 7000 - 10000 Zellen gemessen. Es hat sich folgende Einstellung als sinnvoll erwiesen:

Tabelle 2: Einstellung des FACS für die Zellzyklusmessungen. FSC: forward scatter; SSC: sideward scatter; FL1-3: Fluoreszenzintensität bei ~500nm, ~550nm, ~600nm; Lin: Linear.

| Messgröße | Spannung | Verstärkung | Modus |
|-----------|----------|-------------|-------|
| FSC | E1 | 8.19 | Lin |
| SSC | 381 | 1.32 | Lin |
| FL1 | 678 | 1.32 | Lin |
| FL2 | 551 | 1.00 | Lin |
| FL3 | 443 | 1.00 | Lin |

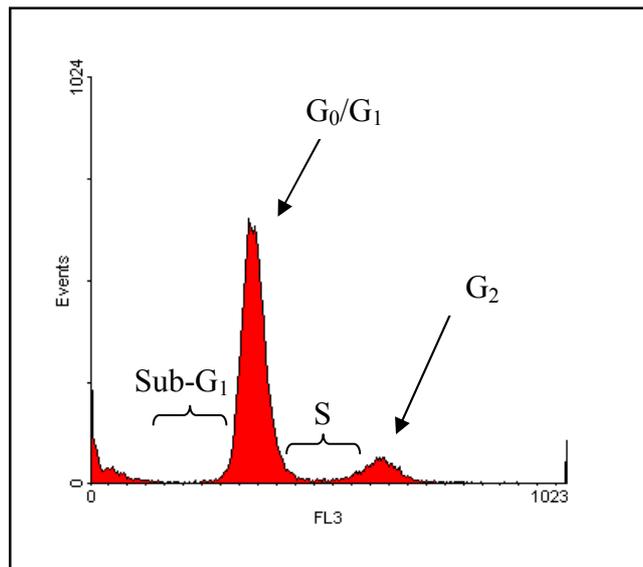


Abbildung 1: Charakteristische Zellzyklusmessung durch Propidiumiodid (PI) Intensitätsverteilung. Der erste Peak stellt die G₀/G₁ Phase (ruhende Zellen) und der zweite Peak die G₂ Phase (mitotische Zellen) dar. Dazwischen liegt die S-Phase (DNA Synthese Phase). Vor der G₁ Phase findet sich die Sub-G₁ Population (apoptotische Zellen). Auf der X-Achse findet sich die Fluoreszenzintensität FL3 für ~600nm. Dies ist der Bereich für die Intensitätsmessung von PI. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Ereignisse abgebildet. Die Achsen sind linear aufgetragen.

Die Daten werden mit dem frei verfügbaren Computerprogramm WinMDI¹ 2.8 weiterverarbeitet. Die damit erhaltenen Histogrammdata des Zellzyklus mit dem Programm Cylchred² ausgewertet. Der Algorithmus, auf dem Cylchred basiert, geht zurück auf Watson und Omerod (Watson 1987; Omerod 1987).

¹Download und Erklärung unter: <http://facs.scripps.edu/software.html>

² Download unter: <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/Downloads.jsp>

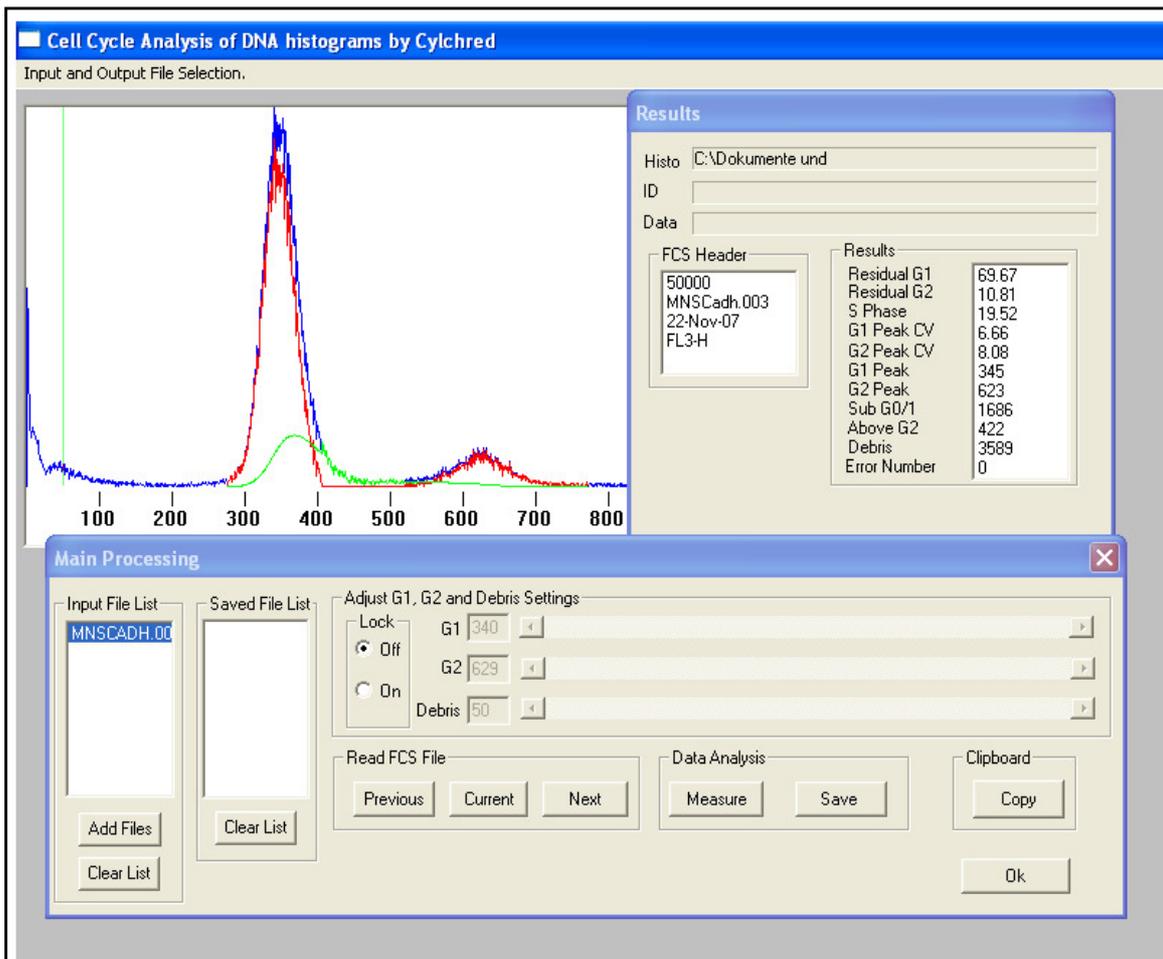


Abbildung 2: Das Programm Cylchred zur Auswertung der Zellzyklusmessung. Die Daten werden in WinMDI gelesen und dann in Cylchred ausgelesen. Der Algorithmus stellt farblich die einzelnen Bereiche dar. Im rechten Fenster können die einzelnen Phasen (Sub-G₁, G₁-, S- und G₂-Phase sowie Zelltrümmer) abgelesen werden. Die Ausgangsparameter (Peakmaxima) müssen ungefähr vorgegeben werden.

1.2.7. Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und mitogener Substanzen auf Zellzyklus bzw. Proliferation - Screeningversuch

Je eine Substanz wird bei der Konvertierung zusätzlich zu FGF2, EGF, Heparin hinzugegeben. Diese Faktorkonzentrationen ergaben sich aus der Literatur (siehe Einleitung).

Tabelle 3: Konzentrationen der zugegebenen Substanzen. ng=Nanogramm

| Substanz | Konzentration |
|--|---------------|
| LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) | 10ng/ml |
| BDNF (Brain derived Neurotrophic Factor) | 10ng/ml |
| FGF8 (Fibroblast Growth Factor 8) | 100ng/ml |
| SHH (Sonic Hedgehog) | 250ng/ml |
| 5AC (5-Azacytidin) | 10µM |
| VPA (Valproinsäure) | 1mM |
| Retinsäure | 5µM |
| TSA (Trichostatin A) | 0,1µM |
| L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) | 10µM |

Die Konvertierung wird in leicht abgeänderter Weise (vgl. Punkt 2.2.2) durchgeführt. Dazu werden die Zellen in gewohnter Weise trypsiniert. Danach noch einmal mit PBS gewaschen um eine Verunreinigung mit FBS zu vermeiden, da dies dazu führen kann, dass die Zellen nicht in Suspension bleiben sondern anwachsen. Nachdem die Zellen zentrifugiert sind, wird der Überstand abgenommen und die Zellen im Konvertierungsmedium resuspendiert. Dann werden die Zellen gleichmäßig auf die Kulturflaschen verteilt. Für jede Substanzkombination wird je ein Suspensions- und ein Adhärenzversuch angesetzt.

Im Gegensatz zu Versuch 2.2.1 beinhaltet das Konvertierungsmedium zusätzlich einen Wachstumsfaktor oder eine kleinmolekulare Substanz. 4 Tage nach Konvertierung werden die Zellen mit EGF, FGF2, Heparin und dem entsprechendem Wachstumsfaktor in gleicher Konzentration wie bei der Konvertierung behandelt. Insgesamt findet die Gabe der Faktoren also 2 mal statt. Die Zellen sind dann 7 Tage diesen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Nach diesen 7 Tagen werden die Zellen für die FACS Zellzyklus Messung vorbereitet.

Um die 500µl für die Fixierung, wie unter 2.2.6.2. beschrieben, zu gewinnen, geht man folgendermaßen vor:

1. Adhärente Zellen: Abnehmen des Mediums, Trypsinierung (wie 2.2.2.), danach Zentrifugierung, Überstand abnehmen und Resuspension in 500µl PBS

2. Zellen in Suspension, umschütten der Kulturflaschen in 15ml Falcons, Zentrifugierung, Überstand abnehmen und Resuspension in 500µl PBS

Dann folgt das gewohnte Programm der Fixierung wie unter 2.2.6.2. und die Rehydrierung wie unter 2.2.6.3. beschrieben.

1.2.8. Apoptose/Zelltod Messung mit Annexin V-FITC Detection KIT (ab14085) und Messung der CD318 Expression

Die Vorbereitung der Annexin Messung wird zeitgleich mit der CD318 Messung durchgeführt. Dazu werden MSC in gewohnter Weise konvertiert, mit den zu untersuchenden Zusatzfaktoren behandelt und nach 3-4 Tagen werden die Faktoren erneut hinzugegeben. Nach 7 Tagen werden die nun zu mNSC konvertierten Zellen zur Messung weiterverarbeitet.

1.2.8.1. Apoptose Messung mit Annexin V-FITC Detection KIT

Die Annexin und CD318 Messung konzentrierte sich auf die Messung von MSC in Suspension unter Einfluss von EGF, FGF2, Heparin sowie jeweils ein zusätzlicher Faktor, entweder LIF, BDNF oder TSA.

Nach Umschütten der Hälfte des Kulturflascheninhalts in ein 15ml Falcon und anschließender Zentrifugierung wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 500µl Annexin Binding Buffer resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 5µl Annexin V-FITC und 5µl Propidiumiodid. Danach werden die Zellen für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgt wiederum mit der FACS Durchflusszytometrie.

Dabei hat sich folgende Einstellung bewährt:

Tabelle 4: FACS Einstellungen bei der Messung mit Annexin. FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, FSC: forward scatter, SSC: sideward scatter, FL1-3: Fluoreszenzintensität bei ~500nm, ~550nm, ~600nm, Lin: Linear, Log: Logarithmus.

| Messgröße | Spannung | Verstärkung | Modus |
|-----------|----------|-------------|-------|
| FSC | E-1 | 8.19 | Lin |
| SSC | 381 | 1.32 | Lin |
| Fl 1 | 427 | entfällt | Log |
| Fl 2 | 427 | entfällt | Log |
| Fl 3 | 443 | entfällt | Log |

1.2.8.2. Messung der CD318 Expression auf MSC und konvertierten mNSC

- CD318 Puffer: PBS + 4% FBS
- CD318 anti-human Mouse IgG1-FITC (Biolegend, Santa-Cruz, USA)

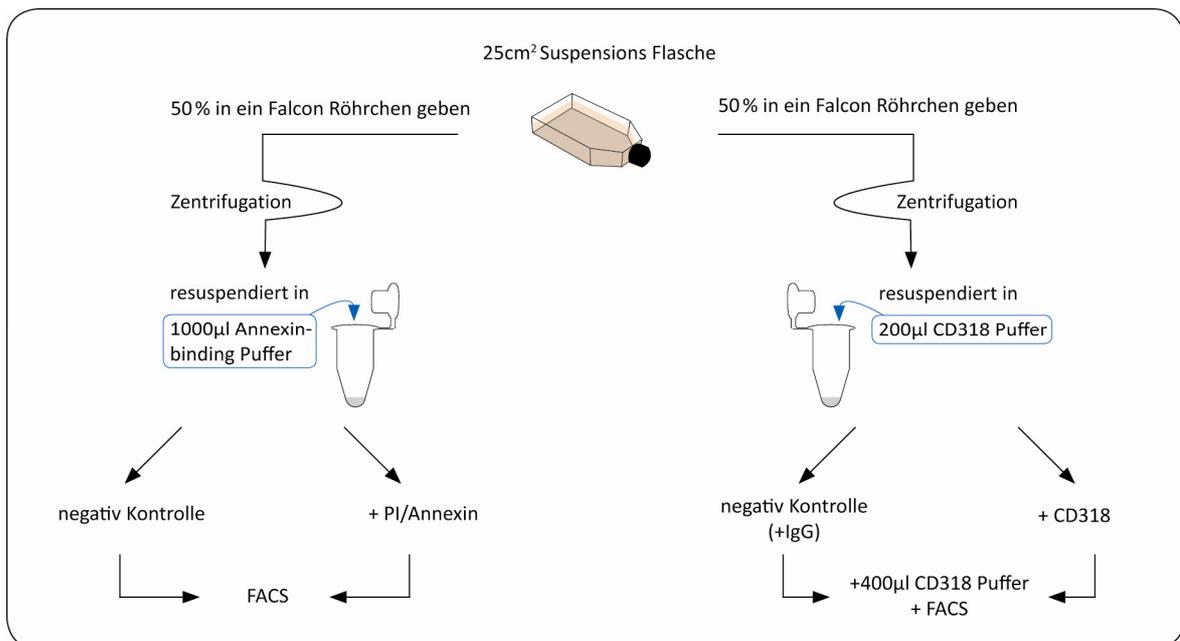


Abbildung 3: Vorgehen und Aufteilung vor der FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) Messung mit Annexin/PI bzw. CD318 Antikörper. CD: Cluster of Differentiation; PI: Propidiumiodid; IgG: Immunglobulin Gamma. Vor der FACS Messung werden die Zellen aufgeteilt in 4 Versuchsarme. Der PI/Annexin und der CD318 Versuchsarm. In jedem Arm gibt es eine Kontrolle.

Es werden 50 % der Suspensions-Kulturflasche mit konvertierten MSC in ein 15ml Falcon Röhrenchen umgeschüttet. Nach Zentrifugierung und Abnahme des Überstandes wird das

Pellet in 200µl CD318 Puffer suspendiert. Die 200µl werden wieder auf zwei FACS Röhren aufgeteilt. In das Röhren für die Negativkontrolle kommen 20µl eines fluoreszierenden unspezifischen IgG Antikörpers. In die Positivkontrolle 20µl des CD318 Antikörpers. Beide Röhren werden für 30min. bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Danach werden die Röhren mit 400µl CD318 Puffer auf 500µl aufgefüllt und dann mit Hilfe des FACS analysiert.

Hierbei wurde folgende Einstellung verwendet:

Tab.5: FACS Einstellungen bei der Messung mit CD318. FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, FSC: forward scatter, SSC: sideward scatter, FL1-3: Fluoreszenzintensität bei ~500nm, ~550nm, ~600nm, Lin: Linear, Log: Logarithmus

| Messgröße | Spannung | Verstärkung | Modus |
|-----------|----------|-------------|-------|
| FSC | E-1 | 8.19 | Lin |
| SSC | 381 | 1.32 | Lin |
| Fl 1 | 396 | entfällt | Log |
| Fl 2 | 427 | entfällt | Log |
| Fl 3 | 443 | entfällt | Log |

1.2.9. Statistische Auswertung

Alle Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Die Anzahl der Versuche n beläuft sich auf 2-4. Bei den Versuchen mit zusätzlichem Faktor ist bei der Kontrolle n=6. Zum Einsatz kamen Zellen unterschiedlicher Spender Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test bei $n \geq 3$ berechnet. Als signifikant unterschiedlich wurden zwei Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrachtet. Die Auswertung der Daten und Erstellung der Schaubilder erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel Vista.

2. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proliferations- und Apoptosemessung bei der proneuralen Konvertierung der MSC unter verschiedenen Bedingungen dargelegt. Die Darstellung gleicht der Reihenfolge im Methodenteil. Zuerst werden BrdU Färbung und Zellzyklusmessung verglichen, um die gefundenen Ergebnisse durch zwei unabhängige Verfahren zu betrachten. Es folgen die Zellzyklusmessungen in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (LIF, SHH, EGF100, BDNF, FGF8) und kleinmolekularen Substanzen (TSA, VPA, RA, L-DOPA). Abschließend wurde bei ausgewählten Faktoren (BDNF, TSA, LIF) noch eine Apoptosemessung mittels PI/Annexin und eine CD318 Bestimmung durchgeführt, ein Oberflächenprotein, das vor allem auf Stammzellen aber auch auf neoplastischen Zellen vermehrt exprimiert wird.

3.1. Messung der Proliferation von MSC und mNSC mittels Durchflusszytometrie

Initial wurde die Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Anteil der proliferierenden Zellen wurde hierfür die Summe an Zellen in S- und G₂/M-Phase herangezogen. Untersucht wurden MSC sowie mNSC, die entweder adhären oder in Suspension konvertiert wurden.

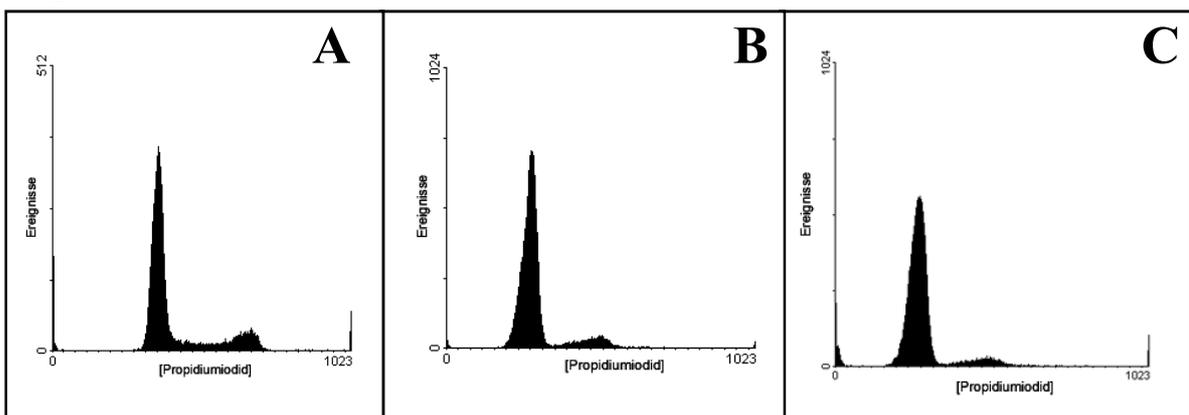


Abbildung 4: Zellzyklusmessung durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) nach Inkubation mit Propidiumiodid (PI). (A) Mesenchymale Stammzellen in Kultur mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (B) mNSC 7 Tage nach Konvertierung mit Serumentzug/Hypoxie und Epidermal Growth Factor (EGF) + Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) unter adhärenen Wachstumsbedingungen (C) mNSC 7 Tage nach Konvertierung mit Serumentzug/Hypoxie und EGF+FGF2 in Suspension wachsend. mNSC: MSC derived NSC like cells; MSC: Mesenchymale Stammzelle; NSC: Neurale Stammzelle

Für die MSC ergab sich bei der Zellzyklusmessung im Mittel (\pm Standardabweichung) eine Rate für die Proliferation von $26,2 \pm 3,2\%$.

Es zeigte sich bei der ZZ- Messung im Mittel bei den adhären wachsenden Zellen eine Proliferation von $12,7 \pm 3,6\%$ und bei den Zellen in Suspension von $8,0 \pm 1,4\%$ (ZZ_adh gegen ZZ_susp $p=0.05$, $n=3$).

2.2. Messung der Proliferation von MSC und mNSC mittels BrdU-Inkorporation

Zum Vergleich wurde die Proliferation mit Hilfe einer BrdU Färbung von mNSC, die adhären oder suspendiert konvertiert wurden, ebenfalls gemessen, um einen Vergleich mit den FACS-Daten zu haben.

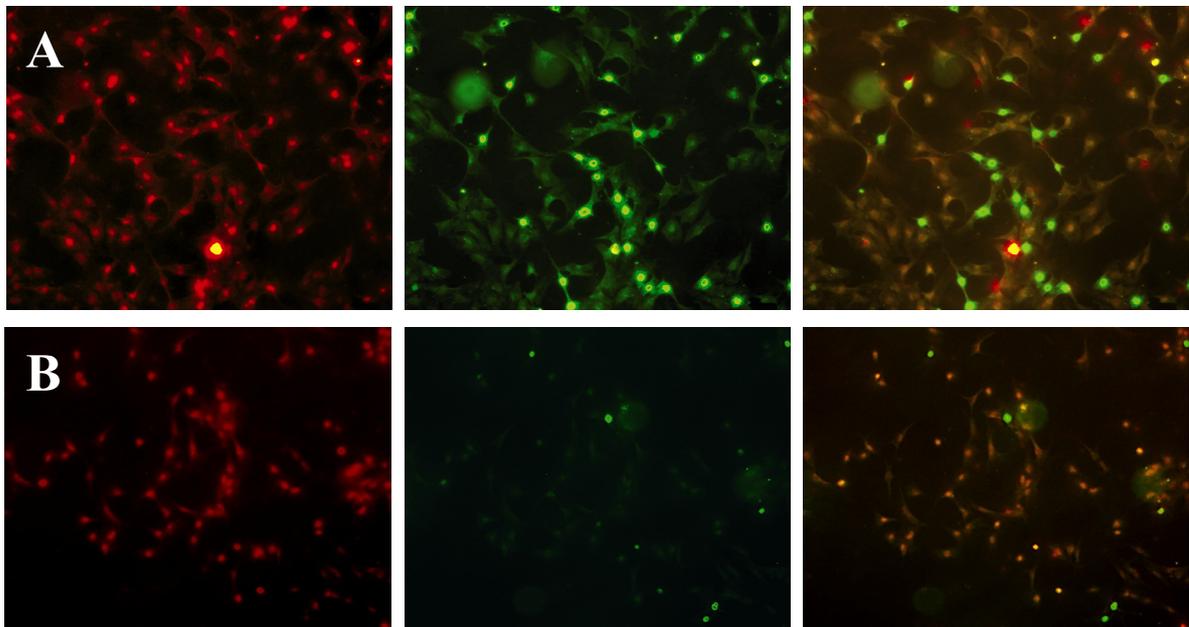


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt mNSC, die mittels Immunhistochemischer Färbung mit Bromodesoxyuridin (BrdU) und Alexa Orange gefärbt wurden. Die Zellen wurden 1 Woche konvertiert und fünf Tage nach der Konvertierung mit $100\mu\text{M}$ BrdU inkubiert. Zwei Tage nach der Zugabe von BrdU wurden die Zellen auf 8 Chambers umgesetzt und mit BrdU Antikörper und Alex Orange gefärbt und unter dem Axiovert 25 Mikroskop betrachtet. In der Bilderreihe von links nach rechts finden sich: links - Kanal für Färbung mit Alexa Orange, Mitte-Kanal für Färbung mit BrdU, Rechts-Überlagerung beider Kanäle (A) mNSC die unter Adhärenz gewachsen sind. (B) Zellen die in Suspension gewachsen sind. mNSC: MSC derived NSC like cells; MSC: Mesenchymale Stammzelle; NSC: Neurale Stammzelle. 100-Fache Vergrößerung mit Kanälen für grüne und rote Fluoreszenz aufgenommen mit Axiovert 25 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) und dargestellt mit dem Programm AxioVision Rel. 4.7.

Die Auswertung ergab einen Anteil an BrdU positiven bzw. proliferierenden Zellen unter Adhärenz im Mittel von $15,1 \pm 3,7\%$ und unter Suspension von $6,0 \pm 2,0\%$. (BrdU Methode adh. vs. susp., $p=0.012$, $n=3$).

Vergleich der Messung der Proliferation mit Durchflusszytometrie und BrdU-Inkorporation

Die Zellzyklusmessung zeigte eine Verschlechterung der Proliferation unter den Konvertierungsbedingungen ($p < 0.05$). Diese war unter Suspensionsbedingungen stärker ausgeprägt als unter adhären Bedingungen (BrdU Methode adh. vs. susp., $p = 0.012$, $n = 3$). Bei beiden Methoden zeigte sich der Trend, dass adhären-konvertierte mNSC schneller proliferieren als die Zellen, die in Suspension waren.

Abbildung 10 zeigt einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Proliferationsmessung mit der Zellzyklus Methode und der BrdU Färbung ($n = 3$).

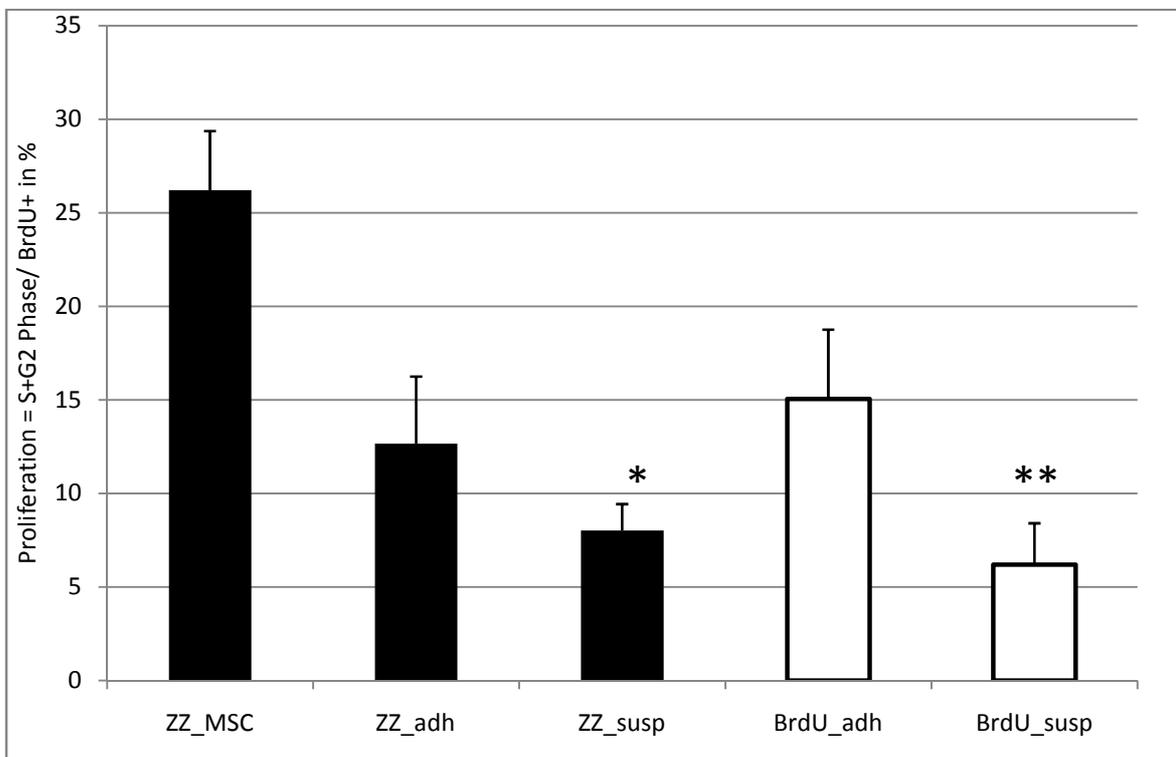


Abbildung 6: Vergleich der Proliferationsmessung der beiden Verfahren. Messung des Zellzyklus (ZZ) im Vergleich zu Bromodesoxyuridin (BrdU). Prozentangaben im Vergleich zur Gesamtpopulation der Zellen. MSC: mesenchymale Stammzellen (unter Standardbedingungen kultiviert), adh.: konvertierte Zellen die unter adhären Bedingungen gewachsen sind. Susp: konvertierte Zellen die unter Suspension gewachsen sind. BrdU+: BrdU positive, gezählt unter dem Fluoreszenz Mikroskop. * $p = 0,05$ vs. ZZ_adh. ** $p < 0,05$ versus BrdU_adhären. Die Abbildung zeigt, dass beide Verfahren fast gleiche Werte liefern ($n = 3$).

2.3. Proliferation und Zellzyklusmessung in Anwesenheit der getesteten Additive

In den folgenden Abschnitten werden für jeden Wachstumsfaktor einzeln die Ergebnisse der Zellzyklusmessung aufgezeigt. Dabei wurden 2 Gruppen gebildet: der Sub-G₁ Anteil als Maßzahl für die Apoptose und der proliferierende Teil der Zellpopulation, welcher aus dem Anteil der G₂/M Phase und der S-Phase bestanden hat. Dies wurde betrachtet für die adhärent wachsenden und für die in Suspension wachsenden Zellen. Dem gegenübergestellt finden sich die entsprechenden Werte der Kontrolle (Zellen kultiviert ohne Additiv). Die Schaubilder wurden jeweils für Sub-G₁ und die Proliferation auf identische Werte skaliert, um einen Vergleich zu ermöglichen. Darunter finden sich die Wachstumskurven der adhärent wachsenden Zellen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch aufgetragen. Durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen.

3.3.1. Neurotrophe Wachstumsfaktoren

In diesem Abschnitt finden sich die Ergebnisse der Zellzyklusmessungen und Wachstumskurven der Konvertierungsversuche unter den neurotrophen Wachstumsfaktoren LIF, BDNF, FGF8 und SHH. Die verwendeten Konzentrationen wurden der Literatur entnommen (Einleitung Punkt 1.8).

3.3.1.1. LIF (Leukemia inhibitory factor)

LIF wurde in einer Konzentration von 10ng/ml verwendet.

Zellzyklusmessung

LIF zeigte keinen statistisch signifikanten Vorteil gegenüber der Kontrolle im Sub-G₁ Peak. Auffällig war die wesentlich größere Sub-G₁ Population in Suspension bei der Kontrolle und mit LIF ($5,0 \pm 3,0\%$ und $4,5 \pm 1,7\%$) als bei adhärent wachsenden Zellen

($1,2 \pm 0,5\%$ und $1,3 \pm 0,6\%$). Die Proliferation war im Mittel gegenüber der Kontrolle für die adhärenen ($9,7 \pm 3,0\%$ gegen LIF $12,8 \pm 1,5\%$) und die in Suspension wachsenden Zellen höher ($10,2 \pm 4,4\%$ gegen LIF $12,4 \pm 4,5\%$), allerdings war dies nicht signifikant aufgrund der großen Standardabweichung.

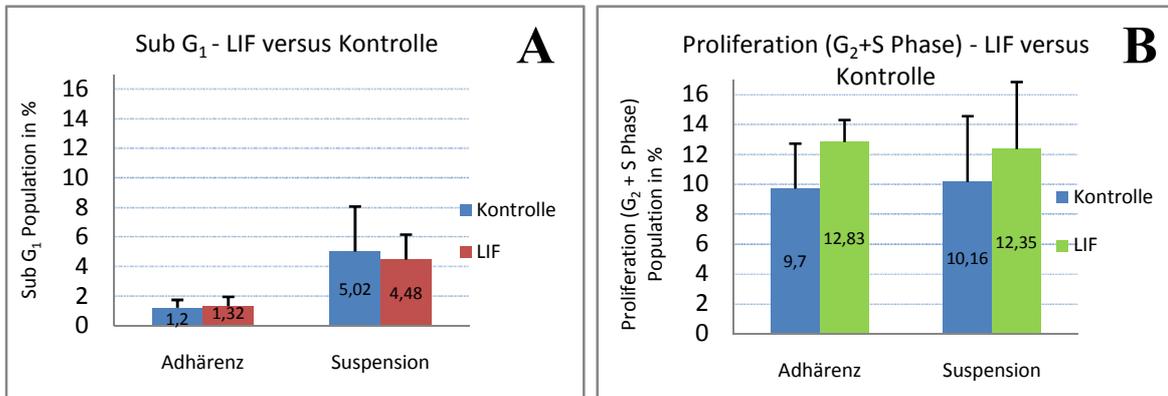


Abbildung 7: : Zellyklusmessung unter Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit LIF aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M-Phase) ohne (Kontrolle) und mit LIF aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n = 3 , Adhärenz n = 4 und die Kontrolle n = 6 (Population ohne LIF). 7 Tage nach Konvertierung plus 10ng/ml LIF. Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurve durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhären wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhären wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Im Vergleich der 4 Wachstumskurven für den zusätzlichen Faktor LIF zeigte sich ein identisches Wachstumsverhalten im Vergleich mit der Kontrolle, die Wachstumsrate betrug im Mittel $0,1 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$ unter LIF versus Kontrolle $0,1 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$ (ohne den Ausreißer in Versuch 4: $0,16 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ unter LIF versus Kontrolle $0,15 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$).

Zusammengenommen hat LIF die Proliferation unverändert gelassen. Auch auf die Sub-G₁ Phase (apoptotische Zellen) hatte LIF keinen Einfluss. Allerdings war der Anteil von Zellen in der subG₁-Phase bei adhärenen Zellen generell niedriger.

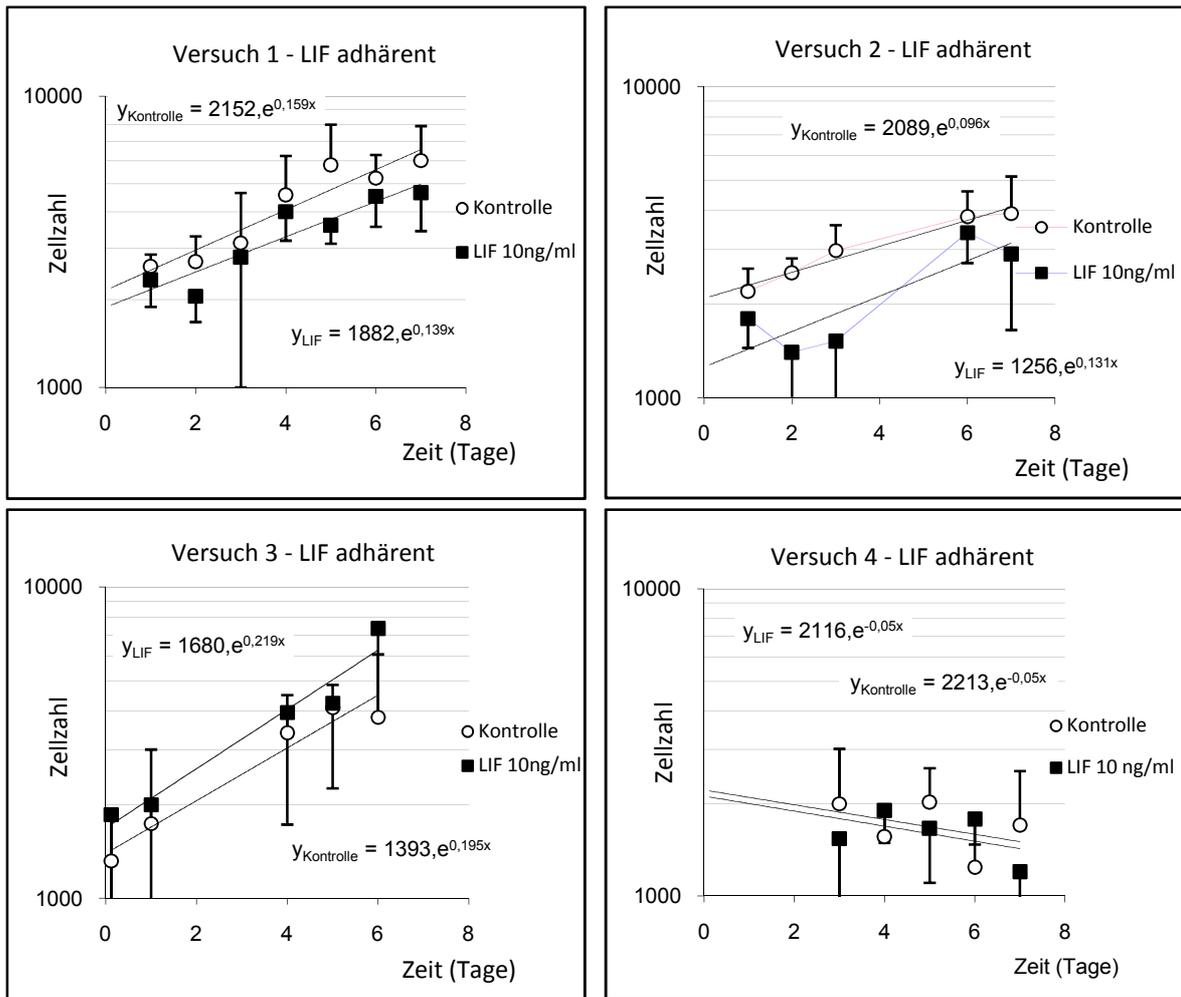


Abbildung 8: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhären wachsenden Zellen in Anwesenheit von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) im Vergleich zur Kontrolle ohne LIF. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 war der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.1.2. BDNF (Brain derived neurotrophic factor)

BDNF wurde in einer Konzentration von 10ng/ml verwendet.

Zellzyklusmessung

Für BDNF zeigte sich für die adhärenenten Zellen im Sub-G₁ kein Unterschied zur Kontrolle ($1,2 \pm 0,6\%$ gegen $1,2 \pm 0,5\%$). Für die Zellen in Suspension war der Sub-G₁ Wert um 21,5% kleiner. Dies war aber durch die große Standardabweichung nicht signifikant, um eine endgültige Aussage über eine Verringerung der Apoptose treffen zu können, und wurde daher noch mit einer Annexin und PI Färbung überprüft (siehe Abschnitt 3.3.2.). Für die Proliferation ergaben sich im Mittel geringfügig kleinere Werte mit hoher Standardabweichung (für Zellen unter Adhärenz ($9,7 \pm 3,0\%$ gegen BDNF $8,2 \pm 2,0\%$) und unter Suspension ($10,2 \pm 4,4\%$ gegen BDNF $9,6 \pm 2,0\%$). Daher war davon auszugehen, dass die Proliferation aus Sicht der Zellzyklusmessung nicht verändert wurde.

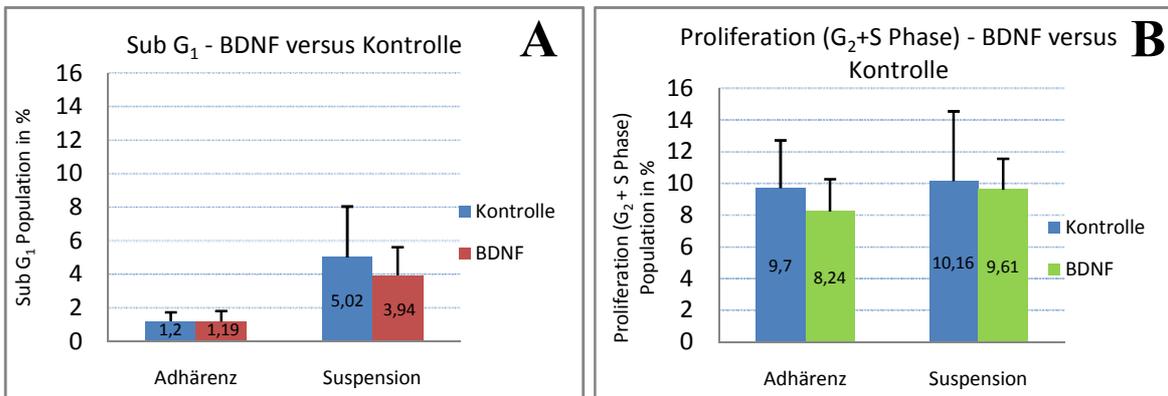


Abbildung 9: Zellzyklusmessung unter Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF). (A) Prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit BDNF aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M- Phase) ohne (Kontrolle) und mit BDNF aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n = 4, Adhärenz n = 4 und die Kontrolle n = 6 (Population ohne BDNF). 7 Tage nach Konvertierung plus 10ng/ml BDNF. Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärent wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärent wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Im Vergleich der 4 Wachstumskurven für den Wachstumsfaktor BDNF zeigte sich in 3 von 4 Fällen eine flacher verlaufende Wachstumskurve, in einem Fall eine etwas stärker verlaufende Wachstumskurve. Die Wachstumsrate betrug im Mittel $0,098 \pm 0,065 \text{ d}^{-1}$ unter BDNF versus Kontrolle $0,1 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$ (ohne den Ausreißer in Versuch 4: $0,131 \pm 0,004 \text{ d}^{-1}$ unter BDNF versus Kontrolle $0,15 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$). Aus den Zellzyklusdaten und dem

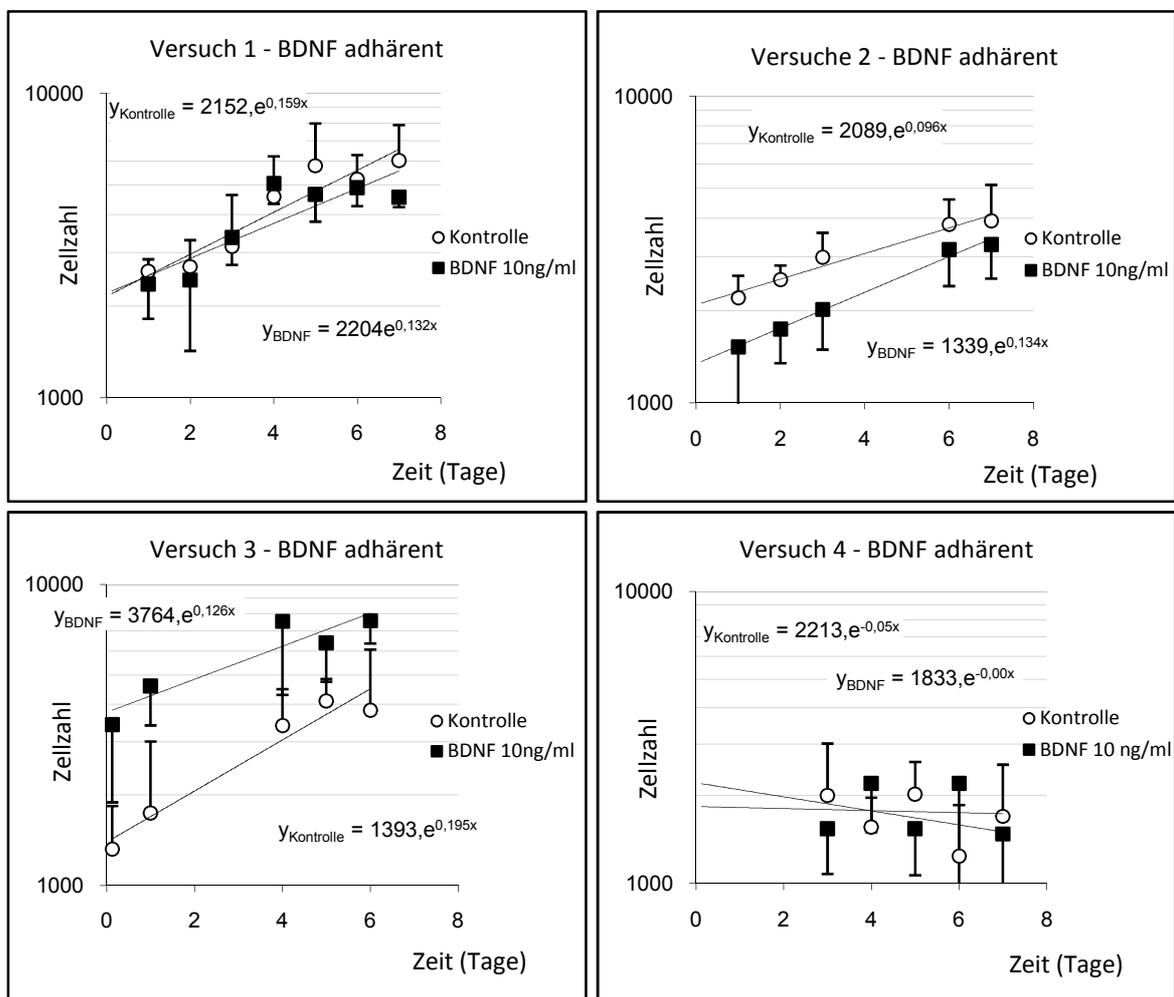


Abbildung 10: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) im Vergleich zur Kontrolle ohne BDNF. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

Wachstumsverlauf zeigte sich kein Vorteil von BDNF im Sinne einer Steigerung der Proliferation. Auffällig war auch hier die wesentlich höhere Apoptoserate von Zellen, die in Suspension wachsen, im Gegensatz zu den adhären wachsenden Zellen.

3.3.1.3. FGF8 (Fibroblast growth factor 8)

FGF 8 wurde in einer Konzentration von 100ng/ml verwendet.

Zellzyklusmessung

Für FGF8 zeigte sich im Mittel für den Sub-G₁ eine leichte Zunahme für die adhären Zellen (1,2 ± 0,5% gegen FGF8 1,6 ± 0,1%) und eine Verringerung um 30% für die Zellen in Suspension (5,0 ± 3,0% gegen FGF8 3,5 ± 1,9%). Aufgrund der großen Schwankungsbreite war diese aber nicht signifikant, um einen eindeutigen Apoptoseschutz von FGF8 annehmen zu können. Die Proliferation war für die adhären Zellen im Mittel um 36% geringer (9,7 ± 3,0% gegen FGF8 6,3 ± 2,6%) und für die in Suspension wachsenden Zellen im Vergleich mit der Kontrolle unverändert (10,2 ± 4,4% gegen FGF8 11,4 ± 2,6%).

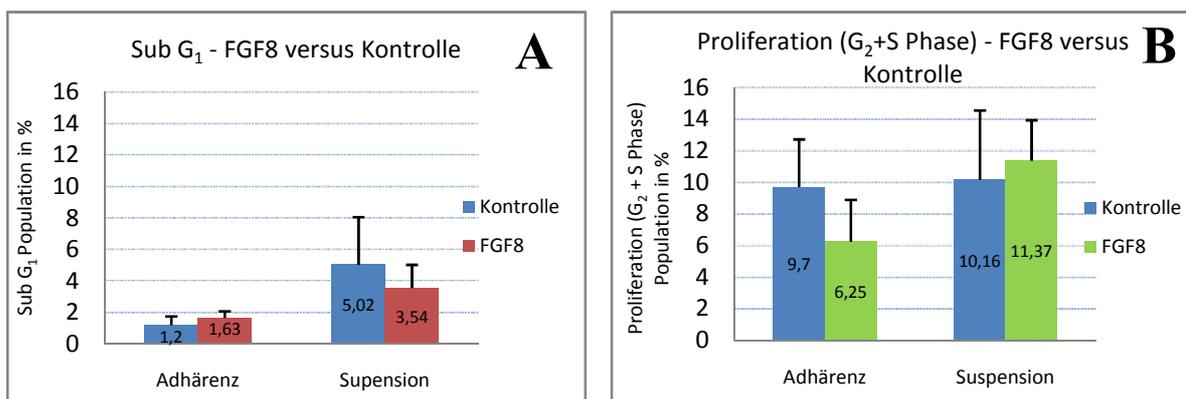


Abbildung 11: Zellzyklusmessung unter Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit FGF8 aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M- Phase) ohne (Kontrolle) und mit FGF8 aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n=4, Adhärenz n=2 und die Kontrolle n=6 (Population ohne FGF8). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurve durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhären wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhären wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Für die 3 Wachstumskurven zeigte sich ein geringeres Wachstum unter FGF8 für die adhären Zellen. Die Wachstumsrate war im Mittel $0,13 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ unter FGF8 versus Kontrolle $0,15 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$. Dies deckte sich mit den schon in der Zellzyklus gefundenen Annahme, dass die adhären Zellen einen leicht höheren Anteil an Sub-G₁ Zellen und eine geringere Proliferation haben, sodass das Gesamtwachstum verschlechtert wird.

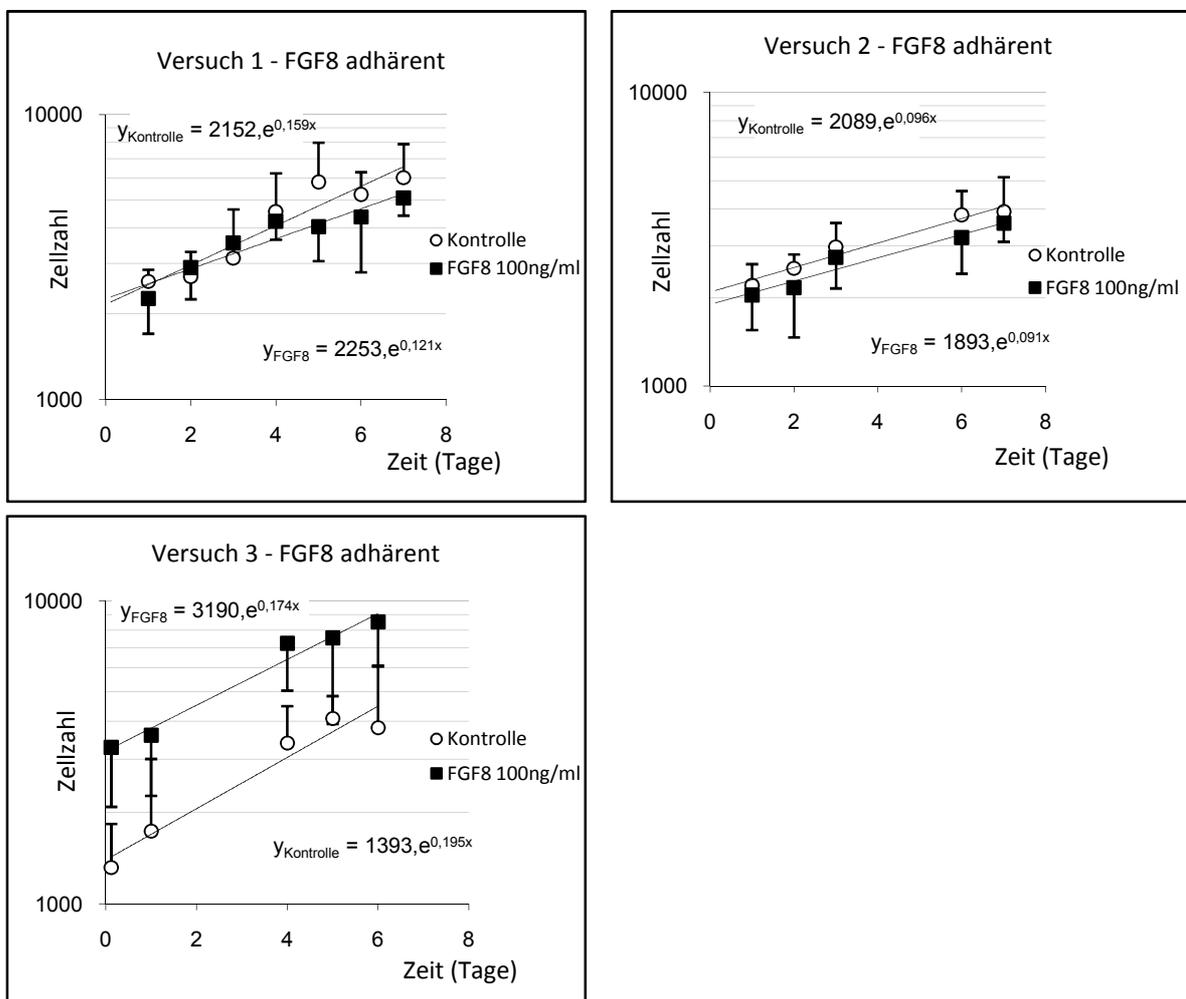


Abbildung 12: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhären wachsenden Zellen in Anwesenheit von Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) im Vergleich zur Kontrolle ohne FGF8. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{r \cdot t}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.1.4. SHH (Sonic Hedgehog)

SHH wurde in einer Konzentration von 250ng/ml verwendet.

Zellzyklusmessung

Die Sub-G₁ Phase für adhärenz wachsende Zellen ($1,2 \pm 0,5\%$ gegen SHH $1,1 \pm 0,02\%$) sowie in Suspension wachsende Zellen ($5,0 \pm 3,0\%$ gegen SHH $5,7 \pm 3,9\%$) war gleich wie die Kontrolle.

Bei der Proliferation zeigte sich der Trend einer Reduktion der Proliferation im Mittel um 24% bei den Zellen in Adhärenz ($9,7 \pm 3,0\%$ gegen SHH $7,3 \pm 2,2\%$) bei den Zellen in Suspension gab es keine wirklichen Unterschiede ($10,2 \pm 4,4\%$ gegen SHH $10,6 \pm 2,7\%$), was sich auch in der Zellzählung zeigte (siehe unten).

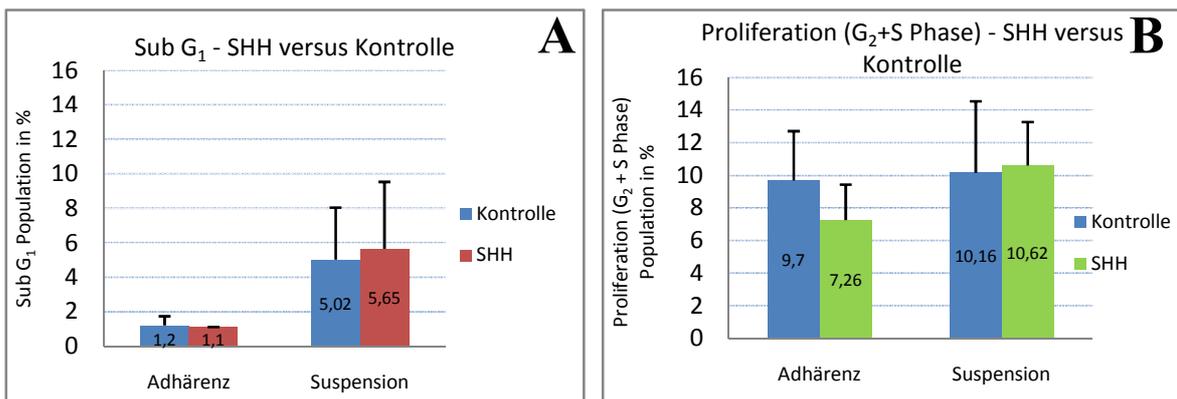


Abbildung 13: Zellzyklusmessung unter Sonic Hedgehog (SHH). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit SHH aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M- Phase) ohne (Kontrolle) und mit SHH aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n = 4, Adhärenz n = 3 und die Kontrolle n = 6 (Population ohne SHH). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurve durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärenz wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärenz wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Für die 3 Wachstumskurven zeigte sich ein nahezu unverändertes Wachstum unter SHH für die adhärenen Zellen. Die Wachstumsrate ergab im Mittel $0,135 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ unter SHH versus Kontrolle $0,147 \pm 0,046 \text{ d}^{-1}$. Dies deckte sich mit den schon in der Zellzyklus gefundenen Tendenz, dass im Mittel die Proliferation in geringem Maß schwächer war als in der Kontrolle.

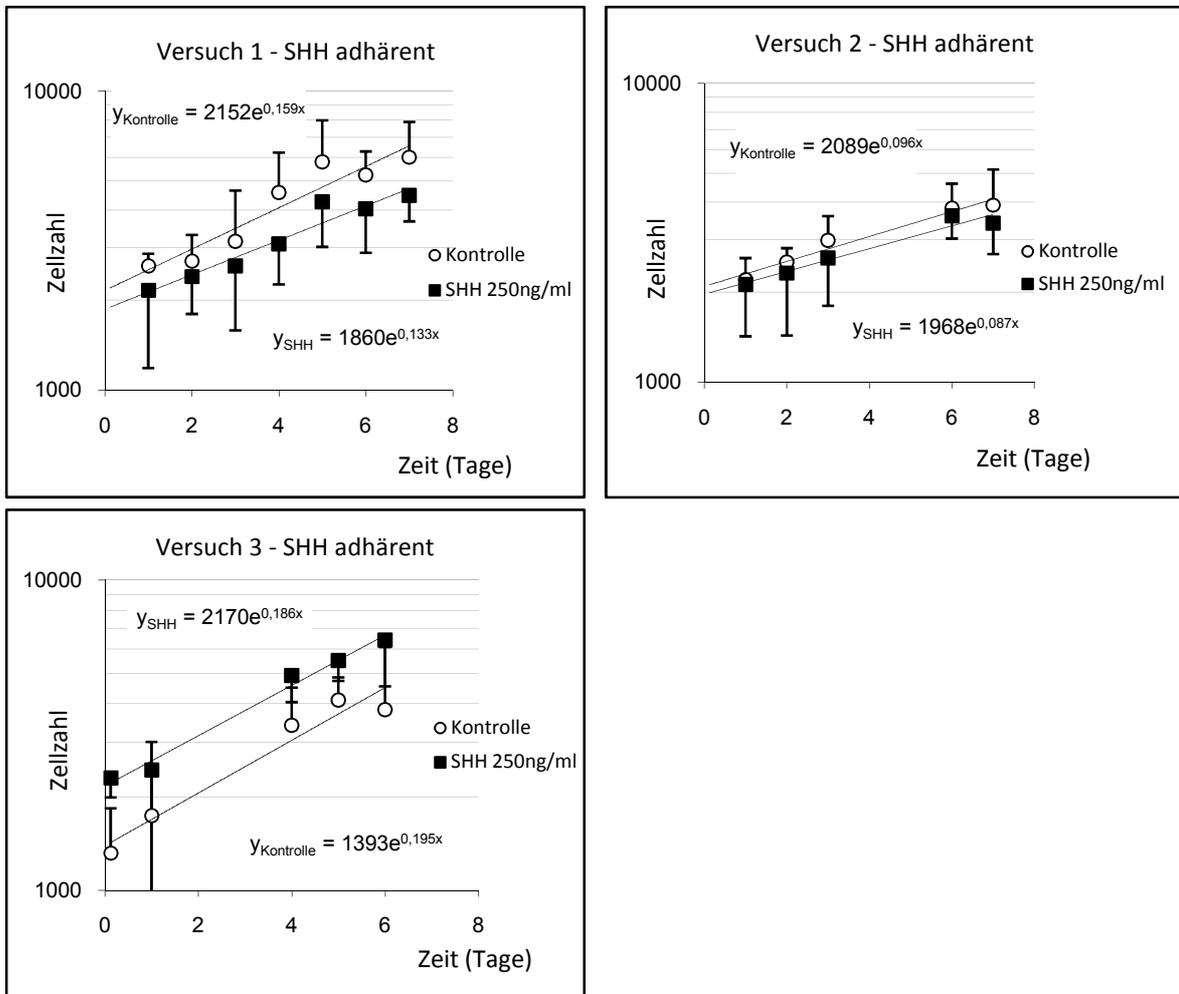


Abbildung 14: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärenent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Sonic Hedgehog (SHH) im Vergleich zur Kontrolle ohne SHH. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{-rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.1.5. EGF in höherer Konzentration (Epidermal Growth Factor)

EGF100 wurde in einer Konzentration von 100 μ l/ml verwendet.

Zellzyklusmessung

EGF100 verringerte im Mittel den Anteil der Zellen in der Sub-G₁ Phase in Suspension um 61% (5,0 \pm 3,0 % gegen EGF100 2,0 \pm 1,0%, p=0.06). Für die Sub-G₁ Phase unter adhärennten Bedingungen zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung (1,2 \pm 0,5% gegen EGF100 1,6 \pm 0,8%). Die Proliferationsraten waren sowohl unter adhärennten (9,7 \pm 3,0% gegen EGF100 7,1 \pm 2,3%) als auch unter Suspensionsbedingungen (10,2 \pm 4,4% gegen EGF100 7,9 \pm 2,0%) im Mittel geringer als bei der Kontrolle.

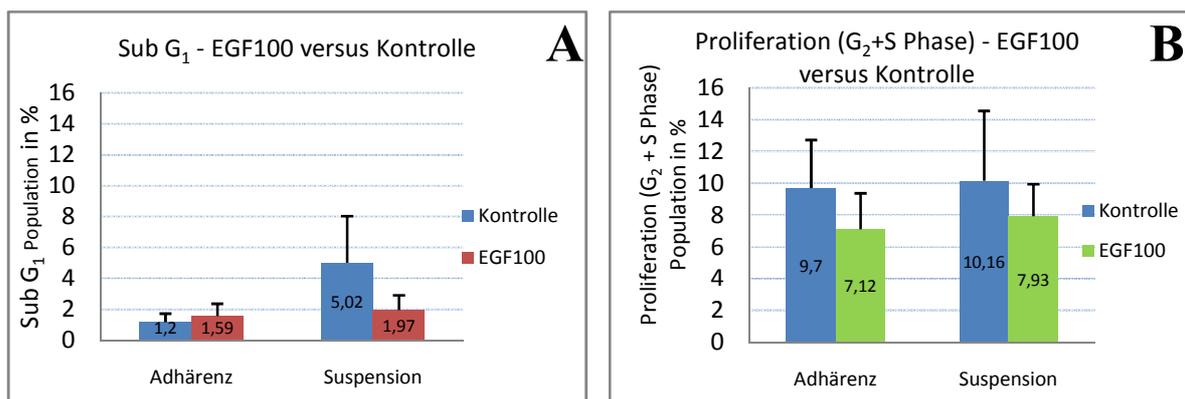


Abbildung 15: Zellzyklusmessung unter Epidermal Growth Factor mit 100 μ l/ml (EGF100). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit EGF100 aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M- Phase) ohne (Kontrolle) und mit EGF100 aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n=3, Adhärenz n=4 und die Kontrolle n=6 (Population ohne EGF100). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärennt wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärennt wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Wenn man die 4 Wachstumskurven betrachtet, zeigt sich insgesamt ein eher schlechteres Wachstum unter EGF100 für die Zellen in Adhärenz. Die Wachstumsrate ergab im Mittel $0,082 \pm 0,101 \text{ d}^{-1}$ unter EGF100 versus Kontrolle $0,127 \pm 0,131 \text{ d}^{-1}$. Ohne den Ausreißer aus Versuch 2, bei dem beide Versuche einen Zellrückgang zeigten, ergab sich für die Wachstumsrate $0,120 \pm 0,084 \text{ d}^{-1}$ unter EGF100 versus Kontrolle $0,185 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$.

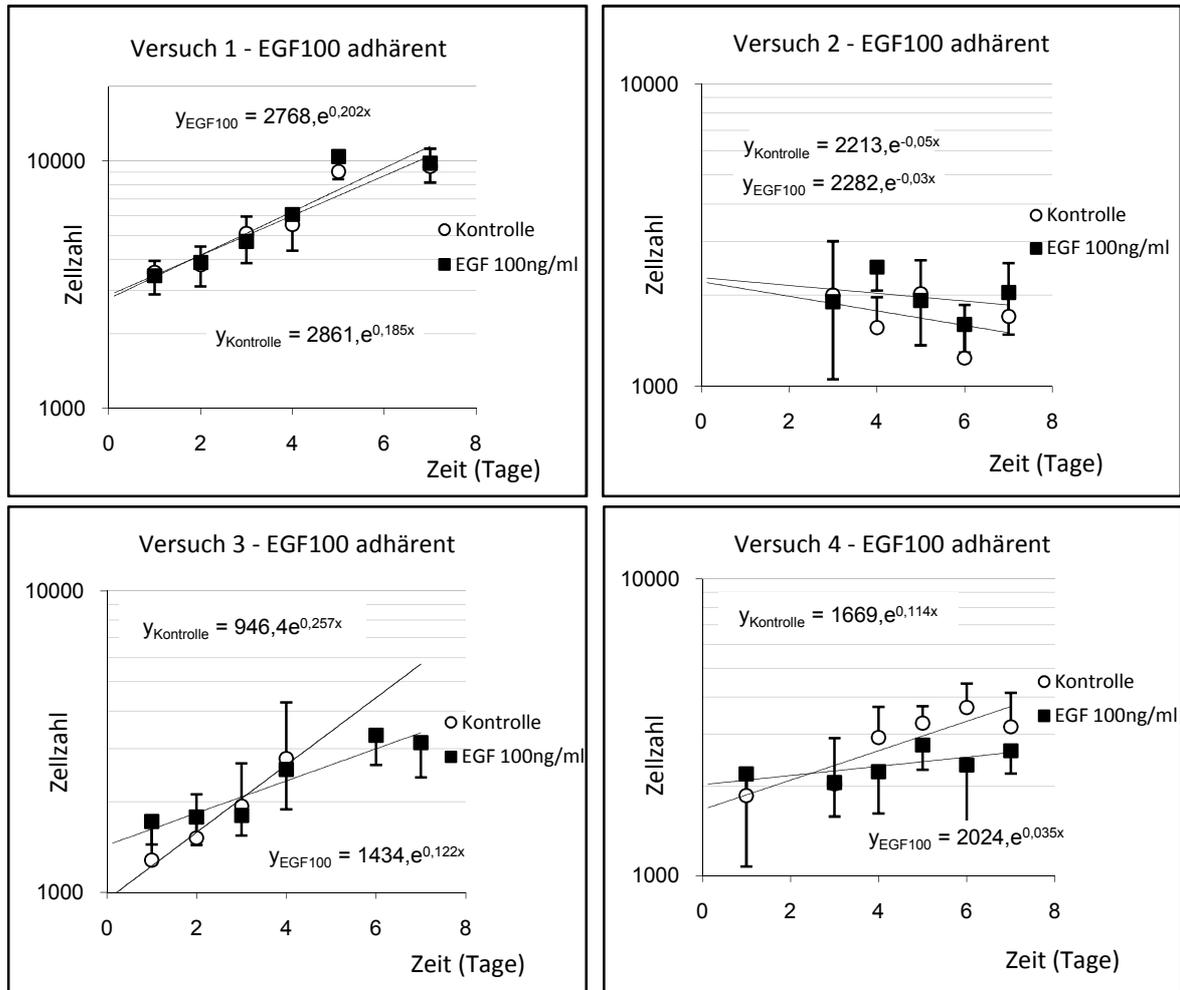


Abbildung 16: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärenz wachsenden Zellen in Anwesenheit von Epidermal Growth Factor mit 100 $\mu\text{l/ml}$ (EGF100) im Vergleich zur Kontrolle ohne EGF 100. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{r \cdot t}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.2. Kleinmolekulare Substanzen

In diesem Abschnitt finden sich die Ergebnisse der Zellzyklusmessungen und Wachstumskurven aus der Zellzählung unter dem Einfluss des erweiterten Konvertierungsprotokolls mit den kleinmolekularen Substanzen L-Dopa, TSA, 5AC und VPA.

3.3.2.1. L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)

L-DOPA wurde in einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

Zellzyklusmessung

Für L-DOPA zeigte sich eine Verringerung der Sub-G₁ Population für Zellen, die in Suspension wuchsen ($5,0 \pm 3,0\%$ gegen L-DOPA $2,4 \pm 0,1\%$, $p=0.2$). Für die adhärenen Zellen war auch eine leichte, nicht signifikante Abnahme des Sub-G₁ Mittelwertes erkennbar ($1,2 \pm 0,5\%$ gegen L-DOPA $0,9 \pm 0,1\%$). Die Proliferationsraten zeigten in der Zellzyklusmessung keine signifikante Änderung. Für adhären wachsende Zellen fand sich hier ($9,7 \pm 3,0\%$ gegen L-DOPA $8,8 \pm 2,3\%$) und für die Zellen in Suspension ($10,2 \pm 4,4\%$ gegen L-DOPA $10,6 \pm 1,3\%$).

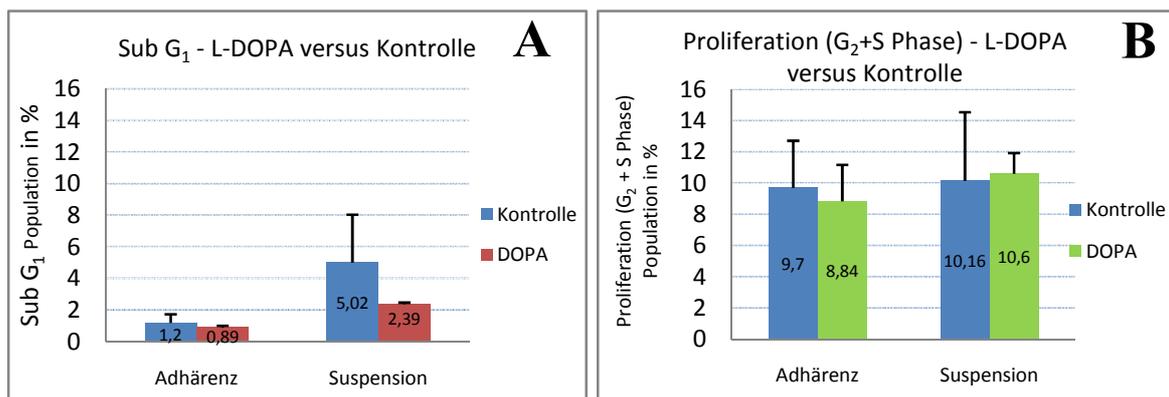


Abbildung 17: Zellzyklusmessung unter L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit L-DOPA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M-Phase) ohne (Kontrolle) und mit L-DOPA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension $n=3$, Adhärenz $n=3$ und die Kontrolle $n=6$ (Population ohne L-DOPA). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärent wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärent wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Die 4 Wachstumskurven zeigten ein gemischtes Bild. In 2 von 4 Fällen war die Wachstumskurve fast identisch mit der Kontrolle. In einem Fall hatte man ein geringeres in einem anderen Fall eine stärkeres Wachstum.

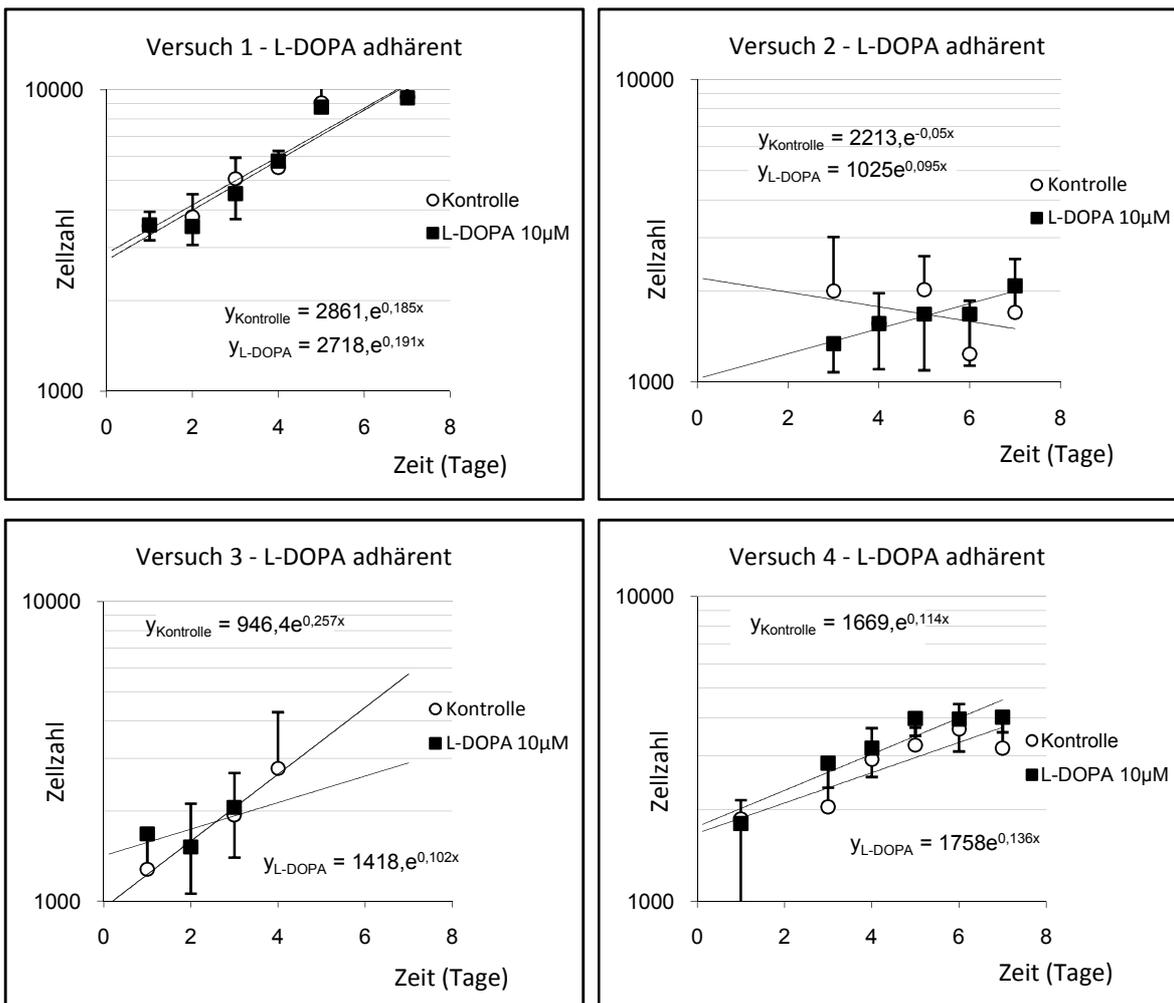


Abbildung 18: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) im Vergleich zur Kontrolle ohne L-DOPA. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

Die Wachstumsrate betrug im Mittel $0,131 \pm 0,044 \text{ d}^{-1}$ unter L-DOPA versus Kontrolle

$0,129 \pm 0,133 \text{ d}^{-1}$; Kontrolle ohne Ausreißer in Versuch 2: $0,189 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$. Daher war davon auszugehen, dass L-DOPA für die adhärenen Zellen keinen Unterschied im Wachstum brachte.

3.3.2.2 TSA (Trichostatin A)

TSA wurde in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ verwendet.

Zellzyklusmessung

TSA erhöhte bei den adhärenen Zellen den Anteil der Sub- G_1 Phase im Mittel um 98% ($1,2 \pm 0,5\%$ gegen $2,3 \pm 1,1\%$). Das war für TSA, eine apoptose-induzierende Substanz, auch zu erwarten. Interessanterweise verringerte sich der Anteil bei den Zellen in Suspension in der Sub- G_1 Phase um 35% ($5,0 \pm 3,0\%$ gegen $3,3 \pm 1,0\%$). Beides war mit einer hohen Standardabweichung behaftet, so dass dies für $n=4$ nicht signifikant war. Die Proliferation wurde bei adhärenen und Zellen in Suspension im Mittel stark erhöht. Für adhärenen Zellen im Mittel um 81% ($9,7 \pm 3,0\%$ gegen TSA $17,6 \pm 6,2\%$, $p=0.05$) und für Zellen in Suspension um 60% ($10,2 \pm 4,4\%$ gegen TSA $16,2 \pm 3,9\%$, $p=0.04$).

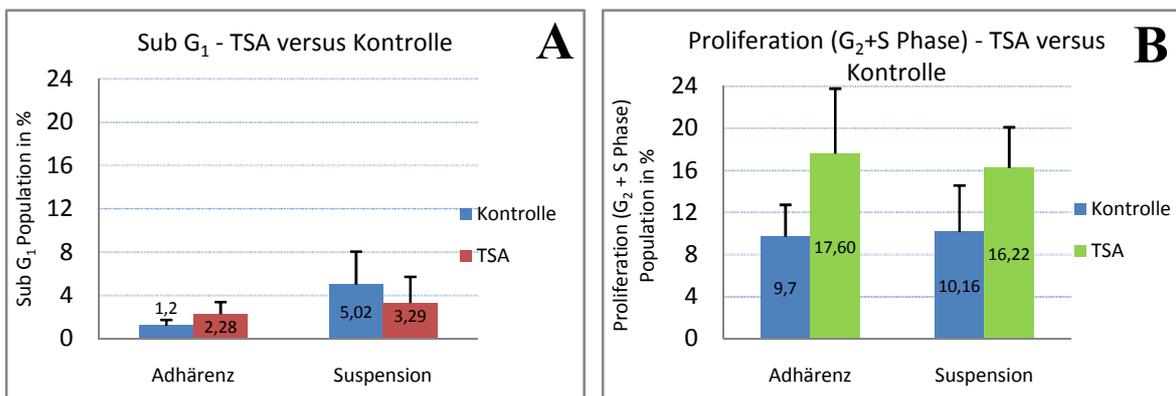


Abbildung 19: Zellzyklusmessung unter Trichostatin A (TSA). (A) prozentualer Anteil der Sub- G_1 Population ohne (Kontrolle) und mit TSA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G_2/M -Phase) ohne (Kontrolle) und mit TSA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension $n=4$, Adhärenz $n=4$ und die Kontrolle $n=6$ (Population ohne TSA). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärent wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärent wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Die 4 Wachstumskurven der adhärent wachsenden Zellen zeigten 3 mal ein schwächeres Wachstum, einmal ein leicht größeres Wachstum. Die Wachstumsrate beträgt im Mittel $0,012 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ unter TSA versus Kontrolle $0,127 \pm 0,131 \text{ d}^{-1}$; Kontrolle ohne Ausreißer in Versuch 2: $0,185 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$. Insgesamt ergab sich die Tendenz, dass die adhärennten Zellen unter TSA schlechter wuchsen, obwohl die G_2/M Phase sehr hoch war.

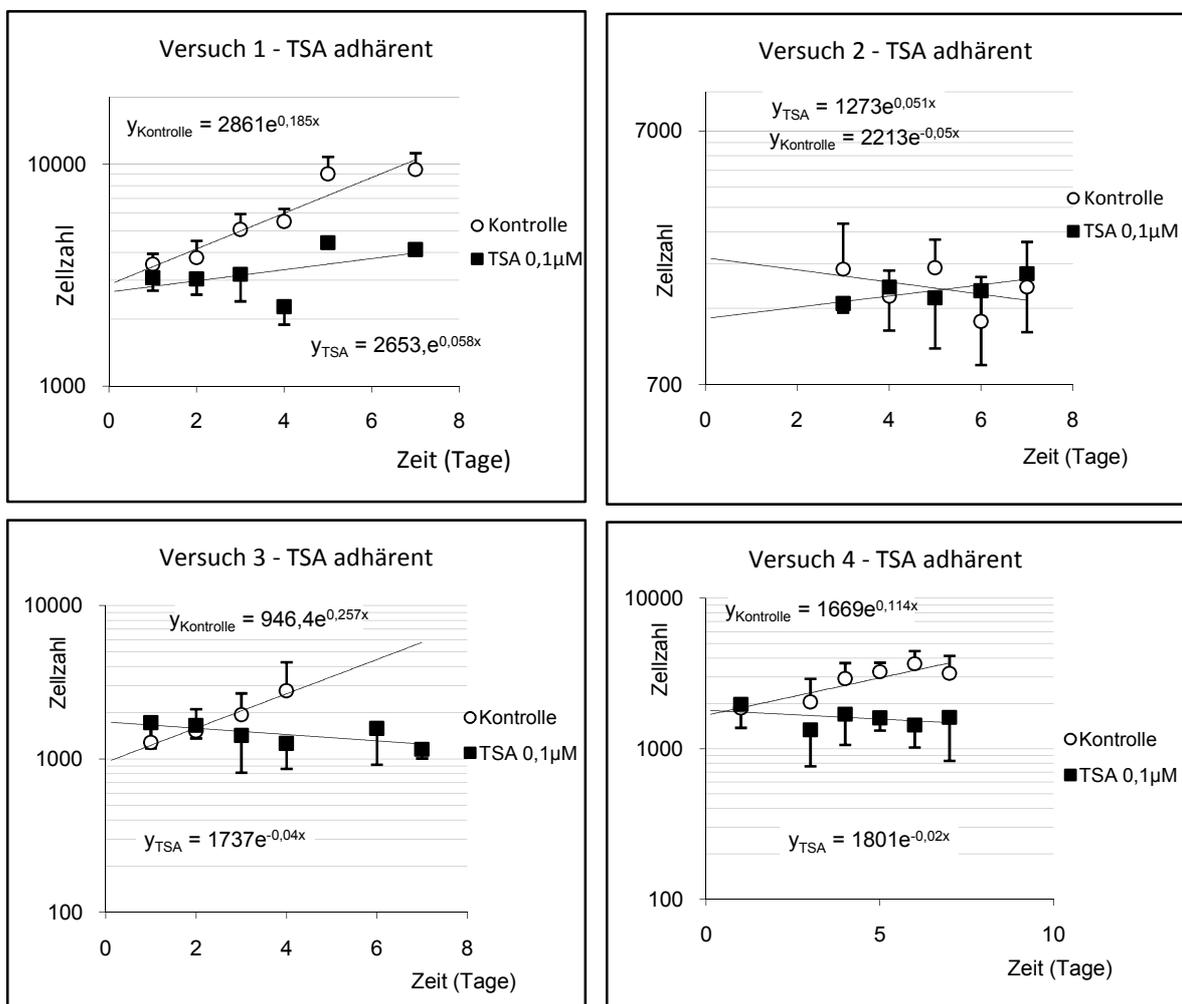


Abbildung 20: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärennt wachsenden Zellen in Anwesenheit von Trichostatin A (TSA) im Vergleich zur Kontrolle ohne TSA. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{r \cdot t}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.2.3 5AC (5-Azacytidin)

5AC wurde in einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

Zellzyklusmessung

Für 5AC zeigte sich für den Anteil Zellen in Sub-G₁ für adhären wachsende Zellen kein wesentlicher Unterschied zur Kontrolle (1,2 \pm 0,5% gegen 5AC 1,0 \pm 0,4%) und für die in Suspension wachsenden Zellen eine Abnahme um 43% (5,0 \pm 3,0% gegen 5AC 2,9 \pm 1,5%). 5AC verringerte die Proliferation sowohl bei den adhären, als auch bei den in Suspension wachsenden Zellen. Bei den adhären Zellen um 33% (9,7 \pm 3,0% gegen 5AC 6,9 \pm 1,0%) und bei den Zellen in Suspension um 15% (10,2 \pm 4,4% gegen 5AC 8,7 \pm 3,5%). Hier muss man von einer Tendenz sprechen, da die Standardabweichungen hoch sind.

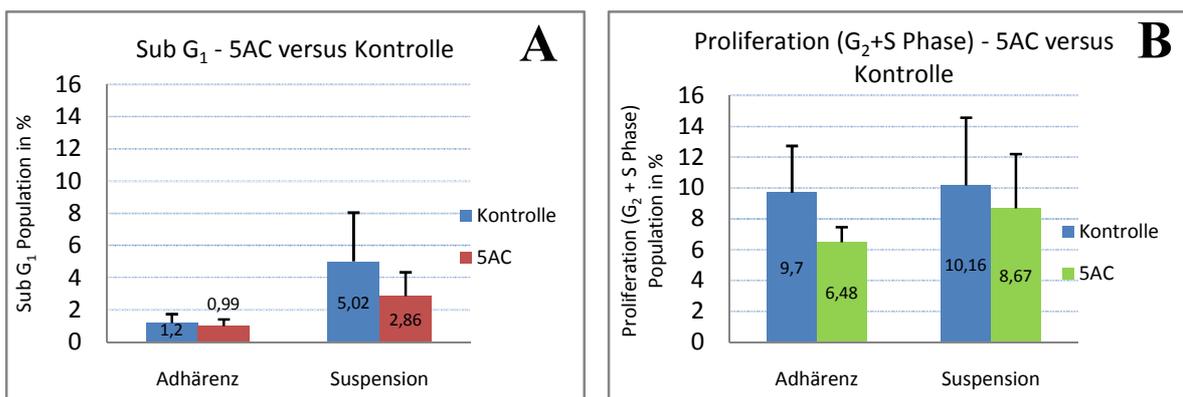


Abbildung 21: Zellzyklusmessung unter 5-Azacytidin (5AC). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit 5AC aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S- und G₂/M-Phase) ohne (Kontrolle) und mit 5AC aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n=4, Adhärenz n=3 und die Kontrolle n=6 (Population ohne 5AC). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhären wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhären wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Bei den einzelnen Wachstumskurven für die adhären­ten Zellen zeigten sich unterschiedliche Bilder. Zum einen sah man bei zwei Versuchen eine ähnliche Wachstumskurve wie die der Kontrolle, bei einer war das Wachstum wesentlich geringer im Gegensatz zur Kontrolle, und bei einer war das Wachstum höher als bei der Kontrolle. Die Wachstumsrate beträgt im Mittel $0,143 \pm 0,063 \text{ d}^{-1}$ unter 5AC versus Kontrolle $0,127 \pm 0,131 \text{ d}^{-1}$; Kontrolle ohne Ausreißer in Versuch 2: $0,185 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$. Insgesamt kann man festhalten, wenn man die Zellzählungen und die Zellzyklusmessungen zusammenfasst, dass 5AC wohl eher keinen Vorteil für die Proliferation der konvertierten mesenchymalen Stammzellen darstellte, allerdings einen leichten Apoptoseschutz der in Suspension befindlichen Zellen.

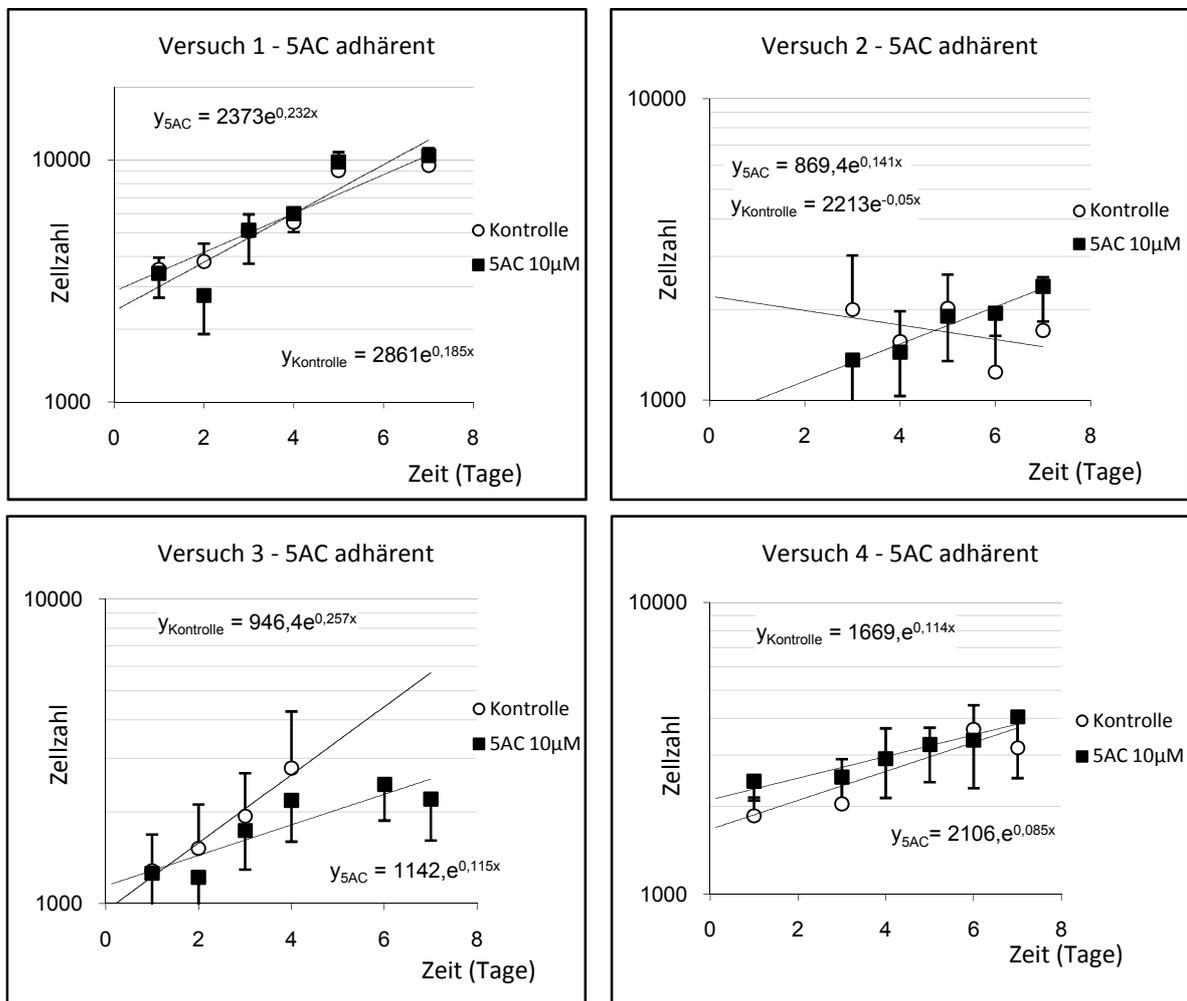


Abbildung 22: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhären­te wachsenden Zellen in Anwesenheit von 5-Azacytidin (5AC) im Vergleich zur Kontrolle ohne 5AC. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{r \cdot t}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

3.3.2.4 VPA (Valproinsäure)

VPA wurde in einer Konzentration von 1mM verwendet.

Zellzyklusmessungen

Für den Sub-G₁ Anteil zeigte sich die Tendenz einer Zunahme bei den adhärennten (1,2±0,5% gegen VPA 1,8±0,5%) und den Zellen in Suspension (5,0±3,0% gegen VPA 6,2±6,5%).

Für die Proliferation fand sich für die adhärennten Zellen (9,7±3,0% gegen VPA 9,1±1,4%) und für die Zellen in Suspension (10,2±4,4% gegen VPA 11,9±2,2%) kein nennenswerter Unterschied zur Kontrolle.

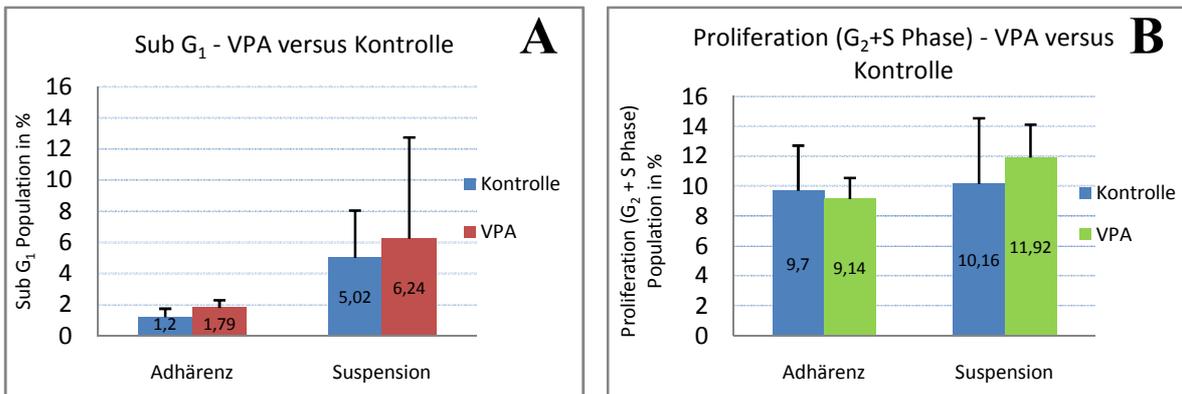


Abbildung 23: Zellzyklusmessung unter Valproinsäure (VPA). (A) prozentualer Anteil der Sub-G₁ Population ohne (Kontrolle) und mit VPA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. (B) Prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen (S und G₂/M Phase) ohne (Kontrolle) und mit VPA aufgeschlüsselt nach Wachstum unter Adhärenz sowie unter Suspension. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Berechnet für Suspension n=3, Adhärenz n=3 und die Kontrolle n=6 (Population ohne VPA). Prozentangaben bezogen auf die Gesamtpopulation an MSC derived NSC like cells (mNSC). MSC: Mesenchymale Stammzellen; NSC: Neurale Stammzellen.

Wachstumskurve durch Zellzählung

Als Vergleich zur Zellzyklusmessung wurden die adhärennt wachsenden Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhärennt wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Für die Zellzahlmessungen der VPA behandelten Zellen fand sich bei der Adhärenz insgesamt in allen vier Versuchen kein Vorteile für die Proliferation gegenüber der Kontrolle. Insgesamt sorgte VPA für geringe Proliferationsraten. Die Wachstumsrate ergab im Mittel $-0,006 \pm 0,057 \text{ d}^{-1}$ unter VPA versus Kontrolle $0,129 \pm 0,133 \text{ d}^{-1}$; ohne Ausreißer in Versuch 2 für VPA $0,023 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$ und für die Kontrolle $0,185 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Zellzyklusmessungen, bei denen im Vergleich eine Zunahme des Sub-G1 Anteils bei ähnlicher Proliferation gefunden wurde. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass eine Inkubation von MSC mit VPA während der Konvertierung weder Apoptose noch Proliferation positiv beeinflusst – aber auch nicht negativ, d.h. toxisch ist.

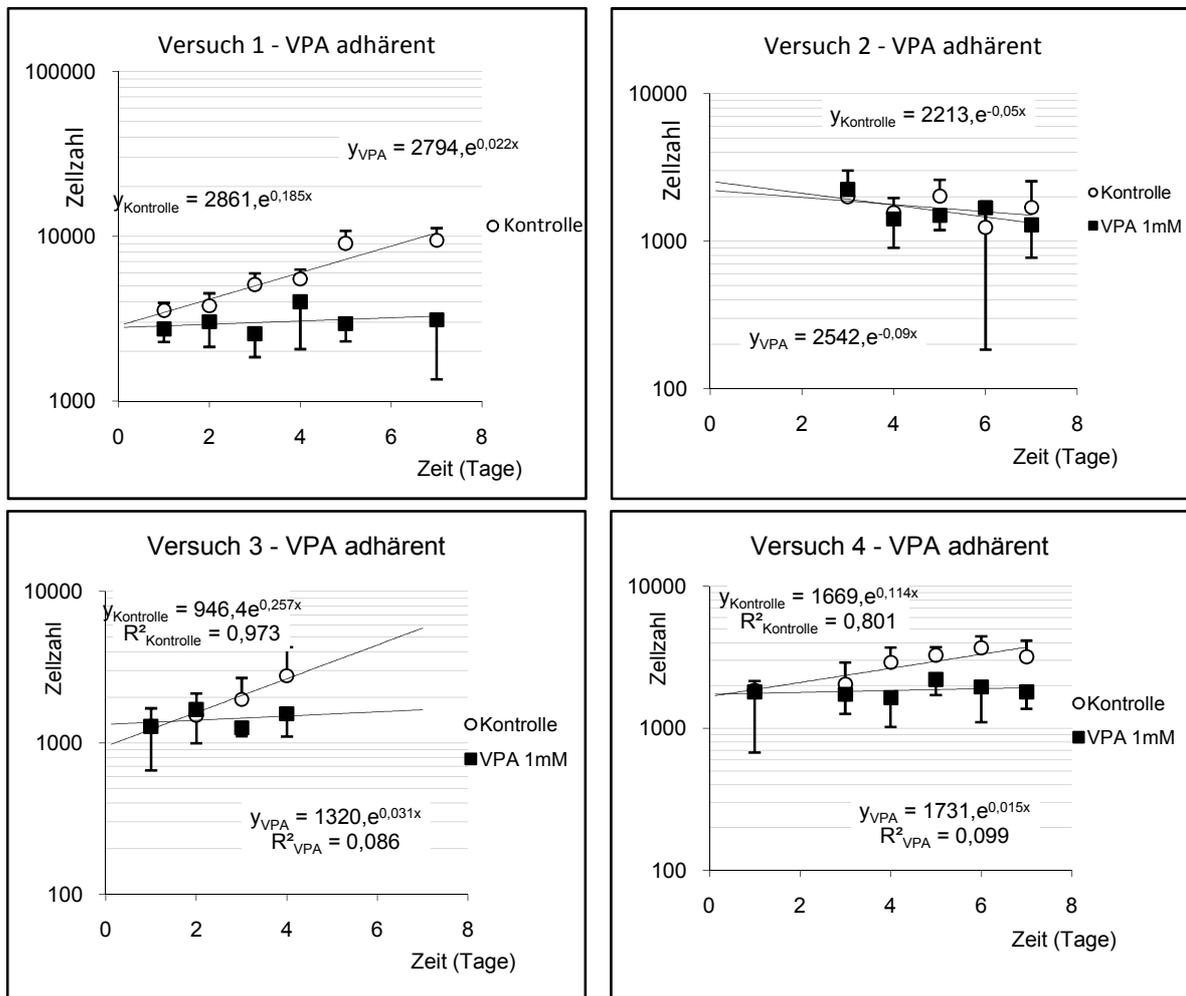


Abbildung 24: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhären wachsenden Zellen in Anwesenheit von Valproinsäure (VPA) im Vergleich zur Kontrolle ohne VPA. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung.

Morphologieveränderungen unter VPA

Es konnte beobachtet werden, dass die adhären wachsenden Zellen, die zusätzlich zu den normalen Konvertierungsbedingungen mit VPA behandelt wurden, ihre Morphologie, im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen, veränderten.

Der Zellkörper wurde flacher und etwas größer, die Zellausläufer zahlreicher und deutlich länger. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Genexpression in den Zellen deutlich ändert.

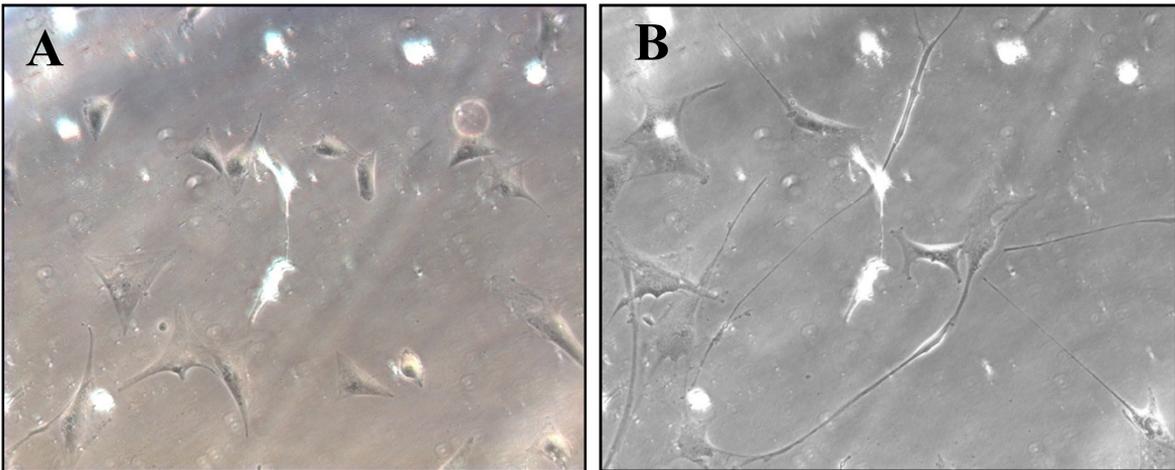


Abbildung 25: Zellmorphologie unter Valproinsäure (VPA). (A) Kontrolle (MSC-derived NSC-like cells (mNSC) 4 Tage nach Konvertierung aus Mesenchymalen Stammzellen (MSC) mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor2 (FGF2) sowie Hypoxie und Serumentzug. (B) Zellen, die zusätzlich mit Valproinsäure (VPA) inkubiert wurden. Man sieht eine deutliche Veränderung der Morphologie unter dem zusätzlichen Einfluss von VPA: Der Zellkörper wurde flacher und etwas größer, die Zellausläufer zahlreicher und deutlich länger im Vergleich zur Kontrolle. NSC: Neurale Stammzelle.

3.3.2.5 RA (Retinsäure)

Die FACS-Daten zeigten einen Anstieg des Anteils toter Zellen in den 7 Tagen nach Konvertierung mit 5 μ M RA. Dies erschwerte eine exakte Auswertung der Zellzyklusphasen erheblich (siehe Abb. 24). Man fand in einer zweidimensionalen Darstellung von Zellgröße und PI-Fluoreszenzintensität (Abb. 24) eine deutliche Verdichtung von kleinen und leicht PI-positiven Partikeln im Vergleich zur Kontrolle. Dies war ein Hinweis auf Zelltrümmer, DNA und andere kleine Zellbestandteile wie Organellen. Auch in der Zellzahlmessung der adhären wachsenden Zellen zeigte sich eine enorme Abnahme der Zellzahlen. Insgesamt bewirkte RA unter den gegebenen

Kulturbedingungen (serumfrei, adhären/suspendiert, Hypoxie) und in der verwendeten Konzentration offenbar eine massive Apoptose bzw. Nekrose der Zellen.

Wachstumskurven durch Zellzählung für Retinsäure

Die adhären wachsenden Zellen wurden mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzählung der adhären wachsenden Zellen zeigte folgende Resultate:

Hier zeigte sich eine massive Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Die Wachstumsrate ergab im Mittel $-0,218 \pm 0,258 \text{ d}^{-1}$ unter Retinsäure versus Kontrolle $0,179 \pm 0,072 \text{ d}^{-1}$.

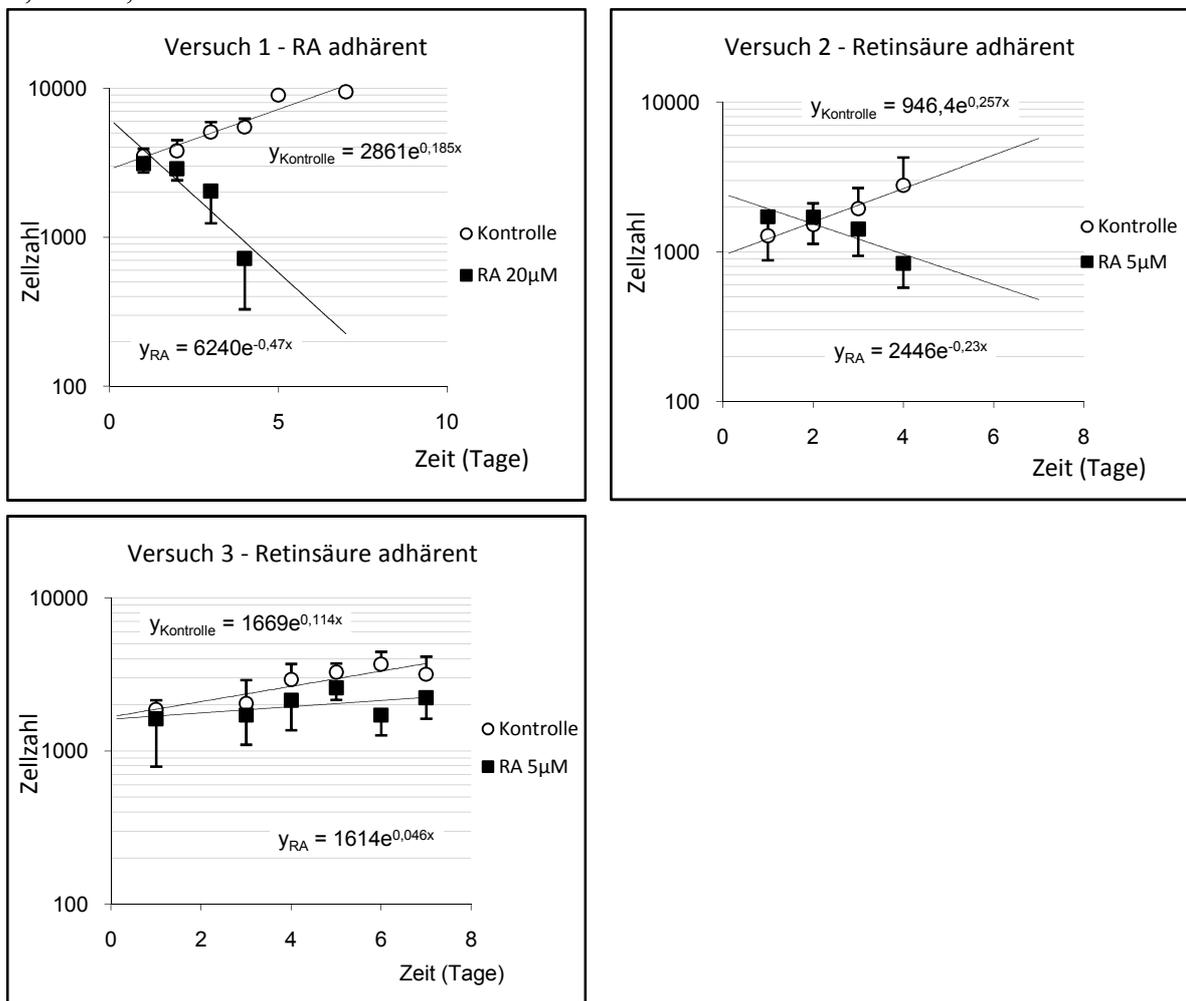


Abbildung 26: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhären wachsenden Zellen in Anwesenheit von Retinsäure (RA) im Vergleich zur Kontrolle ohne RA. Messung durch mikroskopische Zellzählung. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gezählten Zellen von jeweils 5 zufällig ausgewählten Flächen berechnet und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die Zellzahl (y) ist jeweils logarithmisch skaliert, durch die Werte wurde die Exponentialfunktion $y = y_0 \cdot e^{rt}$ approximiert (mit y_0 = initiale Zellzahl, r = Proliferationsrate und t = Zeit (in Tagen)). Der Kehrwert von r entspricht der Verdopplungszeit der Zellen. Tag 0 ist der Zeitpunkt der Konvertierung. Insgesamt auffällig ist das sehr schlechte Wachstum und die starke Zellabnahme unter Retinsäure.

Histogramm des Zellzyklus und Verteilung der Zellen im PI-FSC Diagramm

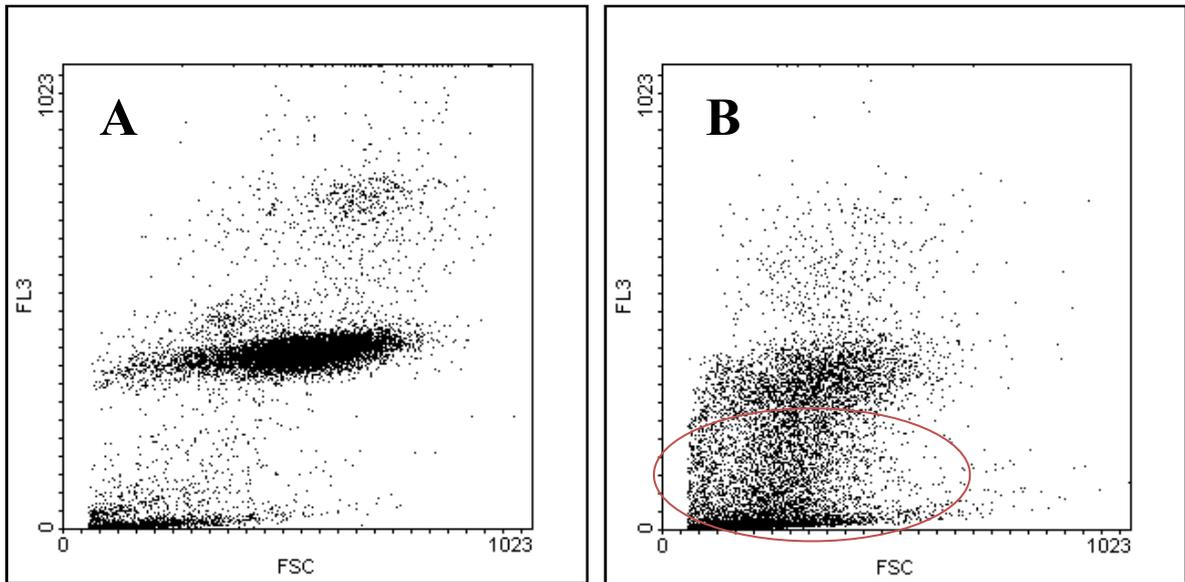


Abbildung 27: Zellzyklusmessung der Zellen in Suspension unter Retinsäure 1 Woche nach Konvertierung.

(A) Kontrolle mit den 2 Verdichtungen für Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. (B) Zellen unter Retinsäure. Es zeigte sich eine massive Ansammlung von Zelltrümmern die leicht mit PI gefärbt waren (siehe roter Kreis). FL3 = PI Intensität. FSC = Forward Scatter: korreliert mit der Zellgröße; PI: Propidiumiodid.

Morphologieveränderungen unter dem Einfluss von Retinsäure

Neben dem starken Rückgang der Zellzahl unter dem Einfluss von Retinsäure zeigte sich auch eine Veränderung der Zellgestalt und der Wachstumsanordnung, sodass davon auszugehen ist, dass Retinsäure unter den Konvertierungsbedingungen einen erheblichen Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben musste. Ob dieser Einfluss damit zusammenhängt, dass die Zellen zur Differenzierung induziert wurden, oder ob direkt Apoptoseprogramme aktiviert wurden, bleibt offen.

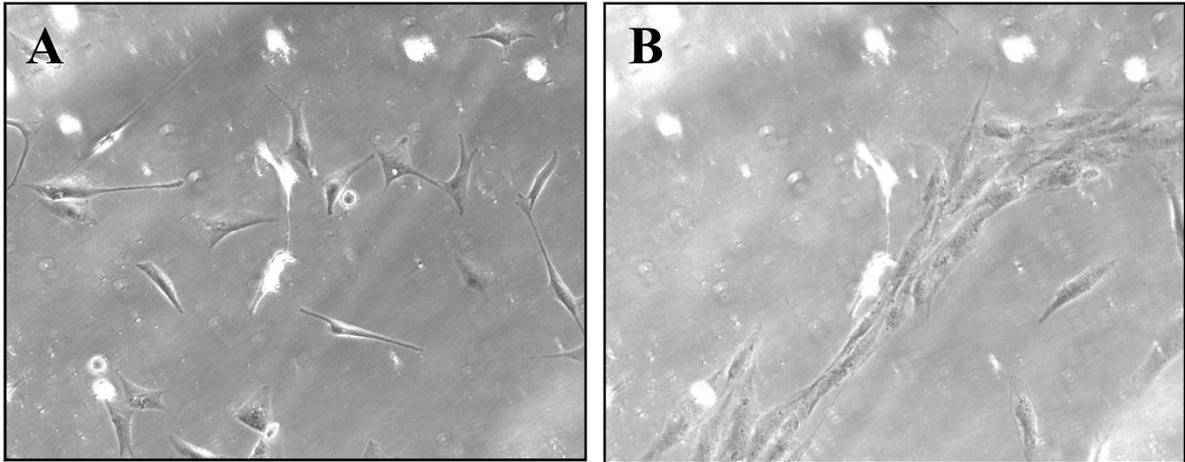


Abbildung 28: Zellmorphologie unter Retinsäure. (A) Kontrolle mNSC 4 Tage nach Konvertierung aus MSC mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) sowie Hypoxie und Serumentzug). Die Zellen sind unter adhärennten Bedingungen gewachsen. (B) Zellen, die zusätzlich mit Retinsäure inkubiert wurden. Man sieht eine massive Granulierung sowie eine Gruppenbildung der Zellen. MSC: Mesenchymale Stammzelle; NSC: neurale Stammzelle; mNSC: MSC-derived NSC-like cells.

2.4. Quantifizierung der Apoptose bzw. Nekrose während der proneuralen Konvertierung mittels Annexin/PI Färbung

Im folgenden sind die Ergebnisse der Messung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (in Konzentration von 5 μ l) bzw. Annexin (in Konzentration von 5 μ l) gezeigt.

Untersucht wurde der Einfluss der Faktoren BDNF, LIF und TSA. BDNF und LIF schienen am aussichtsreichsten während der Versuchsreihe, und TSA interessierte aufgrund der erhöhten S- und G₂/M- Werte.

3.4.1. Zellen unter Standard Konvertierung mit EGF und FGF2

Zellen, die nur PI-positiv waren, nicht aber Annexin-positiv, waren nekrotisch. Nur Annexin-positiv Zellen waren in einer frühen reversiblen Phase der Apoptose, Annexin- und PI-positiv Zellen definiert als spät-apoptotische Zellen.

Die Annexin und PI Färbung der unter Standardbedingungen konvertierten mNSC zeigte eine prozentuale Verteilung der Zellen in folgender Weise (n=3): 5,5 \pm 2,6% PI⁺ (nekrotisch), 5,3 \pm 3,7% Annexin⁺ (früh-apoptotisch) und 9,8 \pm 5,8% Annexin⁺/PI⁺ (spät-

apoptotisch), wie in Abb. 33 zu sehen. Der Anteil an Zellen, die weder PI- noch Annexin-positiv waren, betrug $79,3 \pm 9,5\%$. Dies repräsentiert den Anteil an intakten Zellen.

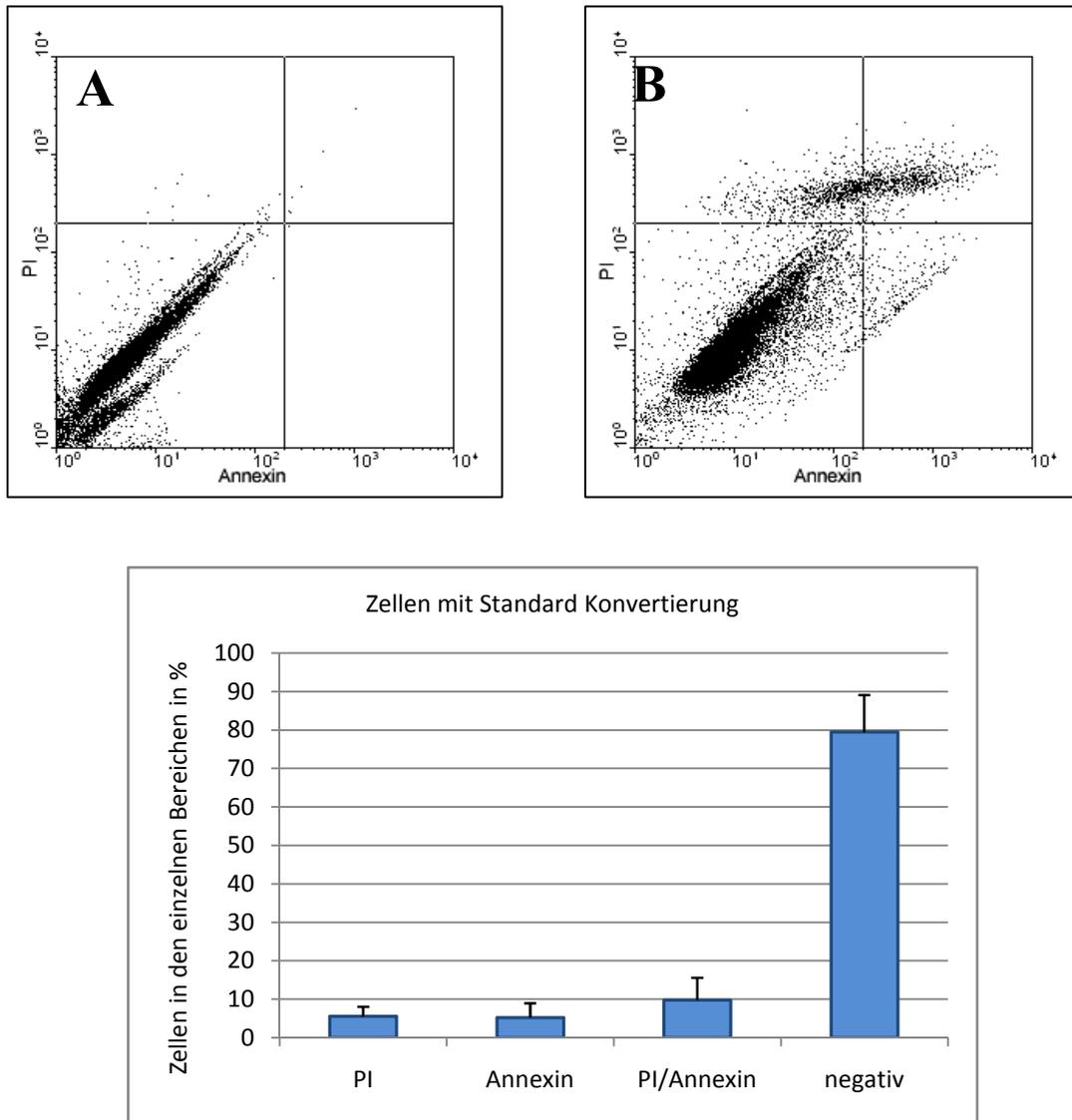


Abbildung 29: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter Standard Konvertierungsbedingungen.

(A) stellt die Kontrolle (Zellen, die nicht mit PI und Annexin gefärbt wurden) dar. (B) zeigt Zellen, die unter Standard Konvertierungsbedingungen (Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), sowie Hypoxie und Serumentzug) 7 Tage nach Konvertierung und anschließender Färbung mit Annexin und PI mit dem Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Verfahren untersucht wurden.

Die Abszisse stellt die Fluoreszenzintensität von Annexin (FL1, grün) dar, die Ordinate die PI-Fluoreszenzintensität (FL3, rot). Der cut-off Wert wurde jeweils bei 200 gesetzt, die Parameter am Zytometer so gewählt, dass die gesamte Verteilung möglichst über den ganzen Bereich von 1 bis 10^4 reicht. Im linken unteren Bereich werden Annexin- und PI-negative Zellen detektiert, im linken oberen Bereich PI-positive und Annexin-negative. Rechts oben findet man die Annexin- und PI-positiven, rechts unten die Annexin-positiven und PI-negativen Zellen.

(C) Auswertung der Zellverteilung der Zellen mit Standard Konvertierung mit Färbung durch PI und Annexin. Anteil nekrotischer ($(PI)^+$), früh- ($(Annexin)^+$) und spät-apoptotischer ($(PI)^+/Annexin^+$) Zellen. Zum Vergleich sind die Prozentwerte ungefärbter Zellen gezeigt ($n=3$).

3.4.2. Einfluss von TSA auf die Apoptose bzw. Nekrose während der Konvertierung

Die Annexin und PI Färbung der unter TSA konvertierten mNSC zeigte eine prozentuale Verteilung der Zellen in folgender Weise (n=3): $4,8 \pm 3,2\%$ PI⁺ (nekrotisch), $8,4 \pm 3,0\%$ Annexin⁺ (früh-apoptotisch) und $15 \pm 5,42\%$ Annexin⁺/PI⁺ (spät-apoptotisch). Der Anteil an Zellen, die weder PI- noch Annexin-positiv waren, betrug $71,8 \pm 9,9\%$. Dies repräsentiert den Anteil an intakten Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle fand sich eine signifikante Verschiebung des Mittelwertes auf der X-Achse ($p=0.05$, ohne Ausreißer) in Richtung höherer Annexin Werte, was einer Mehranreicherung von Annexin entsprach. Sichtbar im Vergleich der Abbildungen A (Kontrolle) zu Abbildung B (mit TSA). Genau dieser Effekt wurde von TSA, einer proapoptotisch wirkenden Substanz, auch erwartet. Dies bestätigte die Anwendbarkeit der Methode zur Detektion apoptotischer Zellen in Kultur.

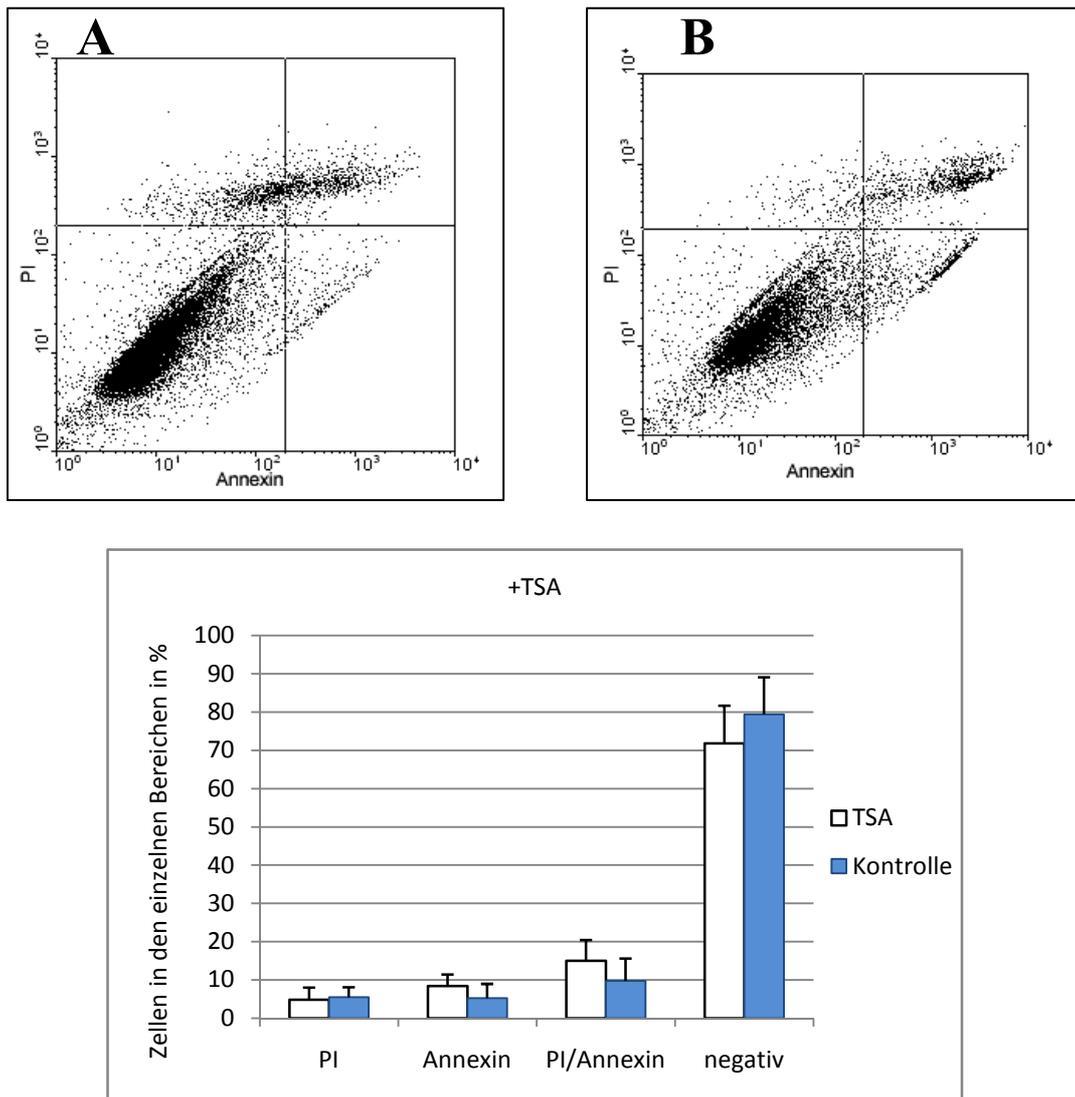


Abbildung 30: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Trichostatin A (TSA). (A) stellt die Kontrolle (Zellen, die nicht mit TSA behandelt wurden, aber auch mit PI/Annexin gefärbt worden sind.) dar. (B) zeigt Zellen, die zusätzlich zur Konvertierung (Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) sowie Hypoxie und Serumentzug) mit TSA behandelt wurden. Beide Versuche wurden mit dem Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Methode 7 Tage nach Konvertierung und Färbung mit Annexin und PI untersucht. Die Abszisse stellt die Fluoreszenzintensität von Annexin (FL1, grün) dar, die Ordinate die PI-Fluoreszenzintensität (FL3, rot). Der cut-off Wert wurde jeweils bei 200 gesetzt, die Parameter am Zytometer so gewählt, dass die gesamte Verteilung möglichst über den ganzen Bereich von 1 bis 10^4 reicht. Im linken unteren Bereich werden Annexin- und PI-negative Zellen detektiert, im linken oberen Bereich PI-positive und Annexin-negative. Rechts oben findet man die Annexin- und PI-positiven, rechts unten die Annexin-positiven und PI-negativen Zellen. (C) Auswertung der Zellverteilung der Zellen unter Standard Konvertierung + TSA mit Färbung durch PI und Annexin. Anteil nekrotischer ((PI)⁺), früh- (Annexin⁺) und spät-apoptotischer (PI⁺/Annexin⁺) Zellen. Zum Vergleich sind die Prozentwerte ungefärbter Zellen gezeigt (n=3) (PI/Annexin: p=0.06).

3.4.3 Einfluss von BDNF auf die Apoptose bzw. Nekrose während der Konvertierung

Die Annexin und PI Färbung der unter BDNF konvertierten mNSC zeigte eine prozentuale Verteilung der Zellen in folgender Weise (n=3): $4,2 \pm 2,1\%$ PI⁺ (nekrotisch), $7,0 \pm 2,2\%$ Annexin⁺ (früh-apoptotisch) und $10,7 \pm 4,3\%$ Annexin⁺/PI⁺ (spät-apoptotisch). Der Anteil an Zellen, die weder PI- noch Annexin-positiv waren, betrug $78,0 \pm 8,1\%$. Dies repräsentiert den Anteil an intakten Zellen. Weder der Mittelwert des Y-Peaks sowie des X-Peaks zeigten eine signifikante Verschiebung (Abbildung A und B) noch die prozentuale Verteilung der einzelnen Bereiche eine signifikante Veränderung. BDNF scheint daher, wie schon in der Zellzyklussmessung gefunden, die Apoptose im Vergleich zur Kontrolle nicht zu verringern.

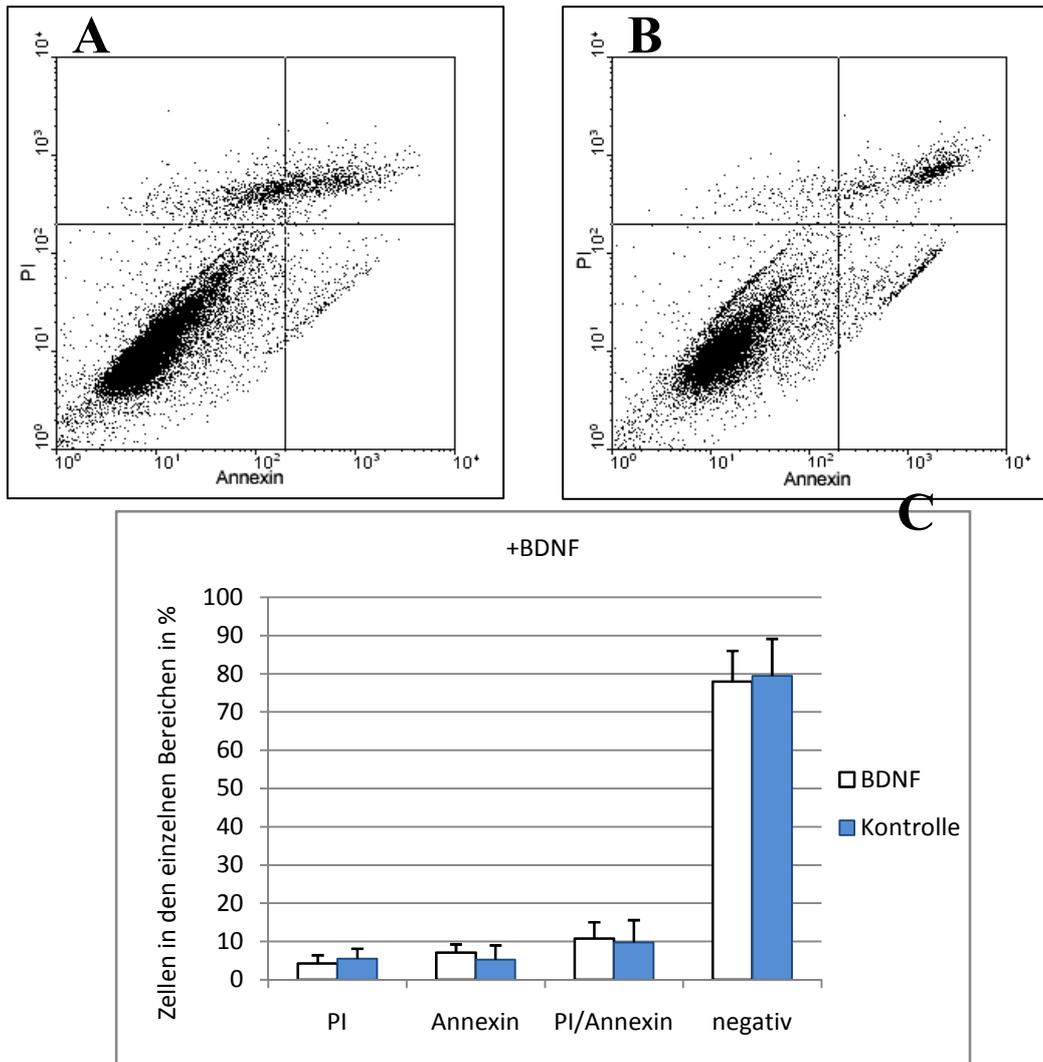


Abbildung 31: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).

(A) stellt die Kontrolle (Zellen, die nicht mit BDNF behandelt wurden, aber auch mit PI/Annexin gefärbt worden sind.) dar. (B) zeigt Zellen, die zusätzlich zur Konvertierung (Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) sowie Hypoxie und Serumentzug) mit BDNF behandelt wurden. Beide Versuche wurden mit dem Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Methode 7 Tage nach Konvertierung und Färbung mit Annexin und PI untersucht.

Die Abszisse stellt die Fluoreszenzintensität von Annexin (FL1, grün) dar, die Ordinate die PI-Fluoreszenzintensität (FL3, rot). Der cut-off Wert wurde jeweils bei 200 gesetzt, die Parameter am Zytometer so gewählt, dass die gesamte Verteilung möglichst über den ganzen Bereich von 1 bis 10⁴ reicht. Im linken unteren Bereich werden Annexin- und PI-negative Zellen detektiert, im linken oberen Bereich PI-positive und Annexin-negative. Rechts oben findet man die Annexin- und PI-positiven, rechts unten die Annexin-positiven und PI-negativen Zellen.

(C) Auswertung der Zellverteilung der Zellen mit Standard Konvertierung +BDNF mit Färbung durch PI und Annexin. Anteil nekrotischer ((PI)⁺), früh- (Annexin⁺) und spät-apoptotischer (PI⁺/Annexin⁺) Zellen. Zum Vergleich sind die Prozentwerte ungefärbter Zellen gezeigt (n=3). (p>0.16 für alle 3 Quadranten)

3.4.4 Einfluss von LIF auf die Apoptose bzw. Nekrose während der Konvertierung

Die Annexin und PI Färbung der unter LIF konvertierten mNSC zeigte eine prozentuale Verteilung der Zellen in folgender Weise (n=3): $3,0 \pm 1,7\%$ PI⁺ (nekrotisch), $10,2 \pm 6,1\%$ Annexin⁺ (früh-apoptotisch) und $14,6 \pm 3,0\%$ Annexin⁺/PI⁺ (spät-apoptotisch). Der Anteil an Zellen, die weder PI- noch Annexin-positiv waren, betrug $72,1 \pm 8,7\%$. Dies repräsentiert den Anteil an intakten Zellen. Wie schon bei TSA, fand sich auch für LIF eine signifikante Verschiebung des Mittelwertes des Peaks in der X-Achse (Sichtbar in den oberen beiden Abbildungen A und B) und damit in Richtung höherer Annexin Werte (p=0.02). Im Vergleich der Prozentualen Verteilung (Schaubild C) der einzelnen Bereiche findet sich eine signifikante Erhöhung des PI+ Anteils (p=0.04).

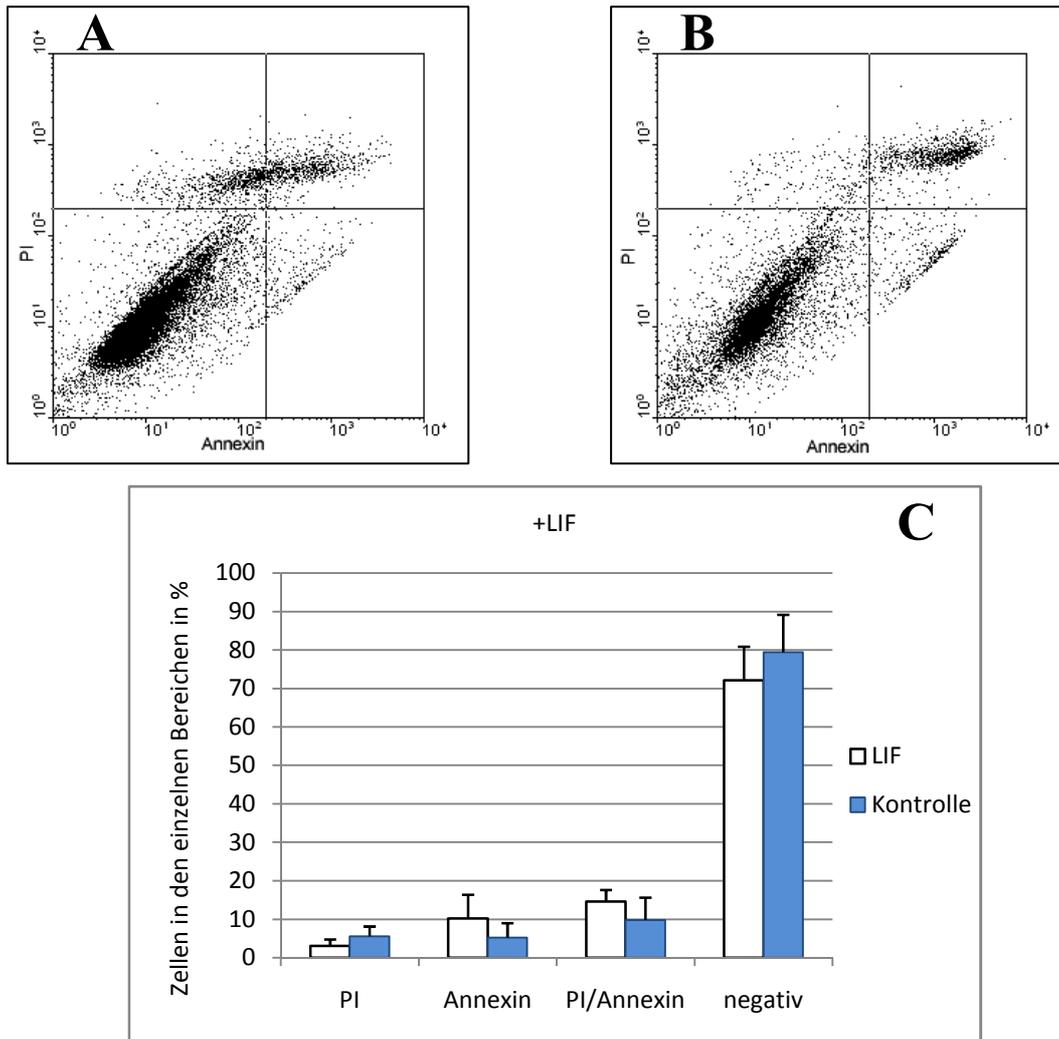


Abbildung 32: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF).

(A) stellt die Kontrolle (Zellen, die nicht mit LIF behandelt wurden, aber auch mit PI/Annexin gefärbt worden sind.) dar. (B) zeigt Zellen, die zusätzlich zur Konvertierung (Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) sowie Hypoxie und Serumentzug) mit LIF behandelt wurden. Beide Versuche wurden mit der Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Methode 7 Tage nach Konvertierung und Färbung mit Annexin und PI untersucht.

Die Abszisse stellt die Fluoreszenzintensität von Annexin (FL1, grün) dar, die Ordinate die PI-Fluoreszenzintensität (FL3, rot). Der cut-off Wert wurde jeweils bei 200 gesetzt, die Parameter am Zytometer so gewählt, dass die gesamte Verteilung möglichst über den ganzen Bereich von 1 bis 10^4 reicht. Im linken unteren Bereich werden Annexin- und PI-negative Zellen detektiert, im linken oberen Bereich PI-positive und Annexin-negative. Rechts oben findet man die Annexin- und PI-positiven, rechts unten die Annexin-positiven und PI-negativen Zellen.

(C) Auswertung der Zellverteilung der Zellen unter Standard Konvertierung + LIF mit Färbung durch PI und Annexin. Anteil nekrotischer ((PI)⁺), früh- (Annexin⁺) und spät-apoptotischer (PI⁺/Annexin⁺) Zellen. Zum Vergleich sind die Prozentwerte ungefärbter Zellen gezeigt (n=3) (PI: p=0.04; Annexin: p=0.07).

2.5. Messung der Expression von CD318 mittels Durchflusszytometrie

Es wurde der Effekt von BDNF, TSA und LIF, im Vergleich zur Kontrolle, auf die Expression von CD318 bei mNSC gemessen. In der folgenden Abbildungen sind die Intensitätsverteilungen dargestellt, die sich nach Markierung der Zellen mit fluoreszierendem CD318 Antikörper ergab; in der Darstellung rot abgebildet. Im Vergleich zu der CD318 AK Verteilung findet sich in schwarz die Kontrolle. Diese wurde mit einem fluoreszierenden unspezifischen IgG Antikörper behandelt. Verglichen wurden nun die Peaks dieser beiden Populationen. Die Marker (der horizontale Strich mit Markierung M1) wurden so gewählt, dass der Beginn der Markierung an der Kreuzungsstelle zwischen Kontrollkurve und Kurve der behandelten Zellen liegt. Ab dieser Intensität wurden die Zellen als CD318⁺ gewertet. Die Fläche unter dem Peak im Bereich des Markers wurde mit dem Programm Winmdi berechnet.

Alle drei Substanzen bewirkten einen Anstieg der Expression von CD318: Kontrolle: $49,8 \pm 9,4\%$ CD318⁺ Zellen, mit BDNF $56,1 \pm 12,5\%$ CD318⁺ Zellen ($p=0.11$ vs. Kontrolle), mit TSA $57,0 \pm 14,0\%$ CD318⁺ Zellen ($p=0.07$ vs. Kontrolle), mit LIF $66,5 \pm 16,1\%$ CD318⁺ Zellen ($p=0.05$ vs. Kontrolle).

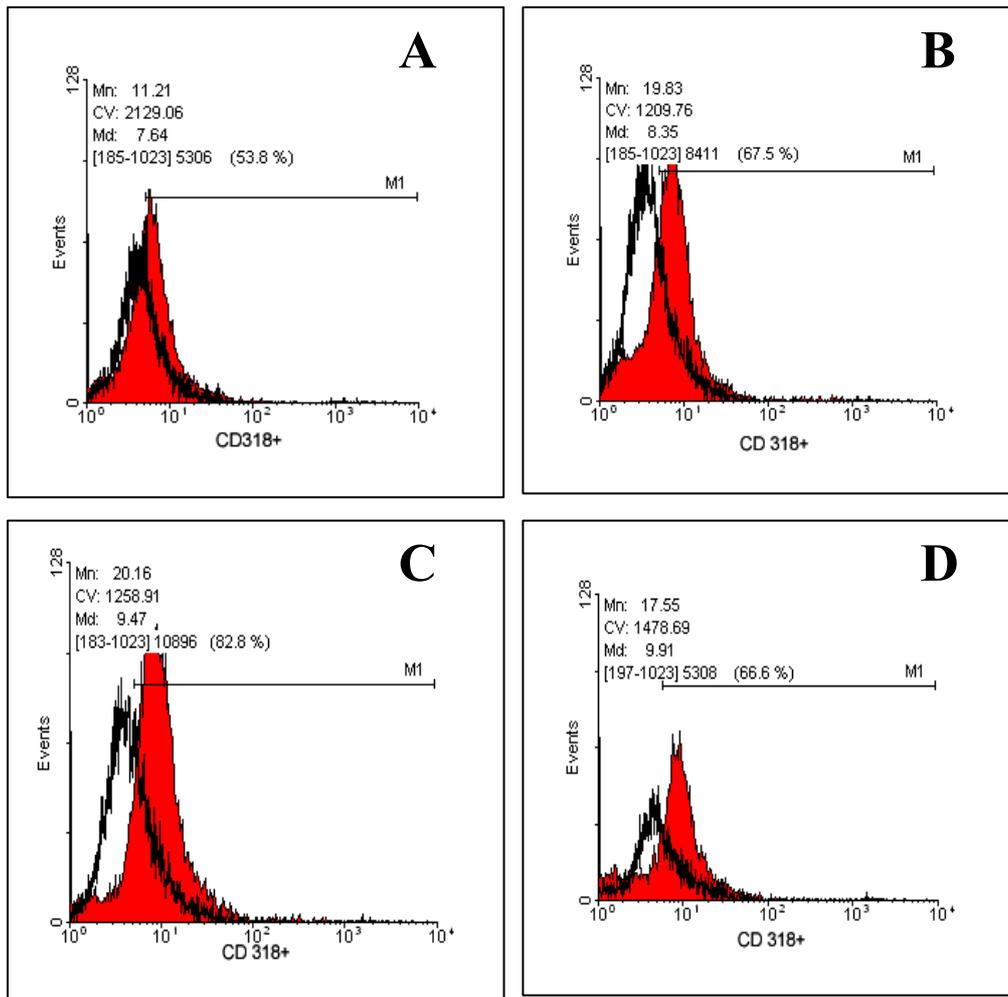


Abbildung 33: Anteil an CD318-positiven Zellen unter dem Einfluss verschiedener Substanzen. In Schwarz ist jeweils die Kontrolle ohne CD318 Antikörper (AK) gezeigt. Die rote Kurve stellt die Intensitätsverteilung für CD318 dar. Dargestellt ist der Prozentanteil der CD318⁺ Zellen. Die Marker (der horizontale Strich mit Markierung M1) wurden so gewählt, dass der Beginn der Markierung an der Kreuzungsstelle zwischen Kontrollkurve und Kurve der behandelten Zellen liegt. Die Fläche unter dem Peak im Bereich des Markers wurde mit dem Programm Winmdi berechnet. Die Zellen wurden 7 Tage nach Konvertierung und anschließender Behandlung mit CD318 AK mit dem Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Verfahren untersucht. Mn: Mittelwert ; CV: Variationskoeffizient; Md: Median; Events: Anzahl gemessener Ereignisse.

(A) Zellen die unter Standard Bedingungen konvertiert wurden (Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), sowie Hypoxie und Serumentzug). **(B)** Zellen, die zusätzlich mit Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) behandelt wurden. **(C)** Zellen, die zusätzlich mit Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) behandelt wurden. **(D)** Zellen die zusätzlich mit Trichostatin A (TSA) behandelt wurden. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität (FL3, rot) aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der gemessenen Ereignisse.

2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Abschließend werden die Ergebnisse aus BrdU-Färbung, FACS, Annexin/PI, und CD318 nochmals in Tabelle 5 zusammengefasst, um einen besseren Überblick über die Ergebnisse zu ermöglichen.

In der Tabelle findet sich eine qualitative Übersicht über die Ergebnisse der Versuche. Qualitativ als Vergleich, ob es eine Zu- oder Abnahme der einzelnen Zellzyklusphasen unter dem Einfluss zusätzlicher Substanzen gab. In den Spalten 2-4 sind die Zellen, die unter adhärennten Bedingungen gewachsen sind, aufgetragen. In Spalte 5 und 6 die Zellen die unter Suspensionsbedingungen gewachsen sind. Diese wurden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle betrachtet. In den Spalten 7 und 8 findet sich der qualitative Vergleich zwischen den unter Adhärenz und in Suspension gewachsenen Zellen.

Eine Zunahme ist durch das Symbol „+“ eine Abnahme durch das Symbol „-“ gekennzeichnet. Wenn sich keine Veränderung ergab, ist dies durch das Symbol „+/-“ dargestellt. Symbole in Klammern zeigen eine nicht signifikante Veränderung. So heisst „(-)“ übersetzt: Abnahme des Mittelwertes, jedoch im Students t-Test nicht signifikant.

In der Spalte „Vergleich adh. gegen susp.“ verbirgt sich hinter einem „-“ zum Beispiel in der SubG₁ Spalte die Aussage: Die Sub-G₁ Werte unter adhärennten Bedingungen sind signifikant kleiner als bei Zellen in Suspension.

In der letzten Spalte sind weitere Merkmale beschrieben, die in den Versuchen gemacht wurden. Veränderungen in der CD318 oder Annexin/PI Anreicherung sowie der Morphologie finden sich dort.

Insgesamt auffällig war das wesentlich bessere Wachstumsverhalten der Zellen, die adhärennt wuchsen, gegenüber den Zellen in Suspension. Die neurotrophen Faktoren waren insgesamt wachstumsneutral. Die kleinmolekularen Substanzen waren schlecht für das Wachstum der Zellen. Im Falle von TSA, VPA und Retinsäure sah man sogar Hinweise darauf, dass die Substanzen auf die strukturelle Integrität der Zellen einen Einfluss haben. Dies zeigt sich durch Morphologieveränderung und CD318 Verschiebung.

Tab. 6: Übersicht über die Versuche über den Einfluss von neurotrophen und kleinemolekularen Substanzen auf das Wachstum von transgerminal konvertierten adulten mesenchymalen Stammzellen. Qualitative Angabe sowie Auflistung von besonderen Merkmalen, die während der Versuche festgestellt wurden. + bedeutet Zunahme, - Abnahme. +/- keine Veränderung. BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor, LIF: Leukaemia Inhibitory Factor, SHH: Sonic Hedgehog, FGF8: Fibroblast Growth Factor 8, EGF: Epidermal Growth Factor, VPA: Valproinsäure, 5AC: 5-Azacytidin, TSA: Trichostatin A, PI: Propidiumiodid, Sub G₁: apoptotische Zellen im Zellzyklushistogramm unterhalb des G₁ Peaks. G₂+M: Im Zellzyklushistogramm Phasen oberhalb des G₁ Peaks entsprechen der Proliferation. Adh.: Zellen die adhären gewachsen sind. Susp: Zellen die in Suspension gewachsen sind. Werte in Klammern sind nicht signifikant.

| Testsubstanz | adhärente Zellen | | | Zellen in Suspension | | Vergleich adh. gegen susp. | | Weitere Merkmale |
|--------------|--------------------|-----------------------|-------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| | Sub-G ₁ | S + G ₂ /M | Zellzählung | Sub G ₁ | S + G ₂ /M | Sub-G ₁ | S + G ₂ /M | |
| LIF | +/- | (+) | +/- | (-) | (+) | - | +/- | Zunahme der Annexin positiven Zellen, bzw. Mehranreicherung von Annexin, sowie Zunahme von PI positiven Zellen. |
| BDNF | +/- | (+) | +/- | (-) | (-) | - | +/- | |
| FGF8 | (+) | (-) | +/- | (-) | (+) | - | (-) | |
| SHH | +/- | (-) | +/- | (+) | +/- | - | (-) | |
| EGF100 | (+) | (-) | +/- | (-) | (-) | +/- | +/- | |
| TSA | (+) | + | - | (-) | + | +/- | +/- | Erhöhung S+G ₂ /M bei gleichzeitiger Zellzahlabnahme, Erhöhung der CD 318 Expression, Zunahme der Annexin positiven Zellen, bzw. Mehranreicherung von Annexin |
| VPA | (+) | +/- | - | +/- | (+) | - | +/- | Morphologie: spindelförmige Zellen mit langen Zellausläufern |
| 5 AC | +/- | (-) | - | (-) | (-) | - | +/- | |
| L-DOPA | (-) | (-) | +/- | (-) | +/- | - | +/- | |
| Retinsäure | + | - | - | Zu hoher Zellverlust | | n.m. | n.m. | Massive Apoptose und Nekrose, Morphologie: granulierte Zellen in Zellaggregaten |

3. Diskussion

4.1. Veränderung des Konvertierungsprotokolls

Viele Studien zeigen, dass mesenchymale Stammzellen einen Neuronen-ähnlichen Zelltyp *in vitro* annehmen können. Diese Beobachtung stützt sich dabei auf morphologische Veränderungen und veränderte Zellexpressionsmuster (Raedt 2007; Hermann 2004; Woodbury 2000; Sanchez-Ramos 2002; Choong 2007). In Transplantationsversuchen wurde untersucht, ob diese gewonnenen Zellen einen positiven therapeutischen Effekt auf neurodegenerative Erkrankungen haben.

Ein umfangreicher Transplantationsversuch, bei dem die hier verwendeten mNSC intrathekal in ein ALS Mausmodell (Überexpression der G93A-Mutante des SOD1 Gens) injiziert wurden, zeigte eine weite Verbreitung der Zellen im Subarachnoidalraum, aber sehr geringe Penetration ins Gewebe. Die Überlebensrate der Zellen war zu gering, was daher zu der Frage führte, wie die Überlebensrate verbessert werden könnte (Habisch 2007). Gleichzeitig müssen die Protokolle überarbeitet und ausgeweitet werden, um den Grad bzw. die Effizienz der transgerminalen Konvertierung zu erhöhen. Hermann spricht von „need for better protocols“ (Hermann 2009). Die Idee war daher, weitere Faktoren zu testen, die eine Erhöhung der Proliferation bewirken. Durch vermehrte Zellteilung sollte erreicht werden, dass Zellen ihr epigenetisches Muster (z.B. Geninaktivierung durch DNA-Methylierung und Histonacetylierung) mesenchymaler Stammzellen zu einem mehr neuroektodermalen Zelltyp verändern. Ziel war es, Faktoren in einer Art Screeningversuch zu identifizieren, die die Proliferation verbessern und die Apoptose verringern, gerade auch in Hinblick darauf, dass die in vielen Transdifferenzierungs- und transgerminalen Konvertierungsprotokollen verwendete Hypoxie und Serumdeprivation Apoptose in den mesenchymalen Stammzellen induziert (Zhu 2006).

4.2. Proliferation oder Transdifferenzierung

Weiterhin lässt sich ergänzen, dass es schwierig ist, Transdifferenzierung direkt zu messen. Zur Evaluierung, ob eine Transdifferenzierung bzw. eine transgerminale Konvertierung stattgefunden hat, stützen sich die in der Literatur beschriebenen Experimente auf die

Exprimierung von einem Set neuronaler Gene sowie auf morphologische Veränderungen. Montzka zeigte, dass einige Marker, die als Indikator für die neurale Transdifferenzierung verwendet werden, schon in undifferenzierten MSC exprimiert werden. Beispiele hierfür sind Nestin, Enolase 2 oder microtubule associated protein 1b (MAP 1b) (Montzka 2009). Außerdem könnte die Veränderung der Expression gewisser Marker auf Zellstress und nicht auf Transdifferenzierung zurückzuführen sein (Raedt 2007).

Lu listet eine Reihe von Tatsachen auf, die die gefundene Transdifferenzierung aus seiner Sicht ungewöhnlich macht, und spricht sogar von einem Artefakt (Lu 2004). Die Wachstumsbedingungen, die von Woodbury (Woodbury 2000 und 2002) und zum Teil im hier verwendeten Protokoll von Hermann eingesetzt werden (Hermann 2004), führen zu morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen. Nach Lu sind diese aber nicht Zeichen für eine neuroektodermale Konvertierung, sondern für Zellstress. Er zeigt in mehreren Versuchsreihen, wie die Zellen über die Zeit Ihre Morphologie durch Schrumpfung in eine Neuronen-ähnliche verändern, ohne eine Zellteilung zu durchlaufen (Lu 2004). Schon alleine der Serumentzug kann zu Zellschrumpfung und Apoptose führen. (Zhu 2005; Potier 2007).

Daher brauchte es für den vorliegenden Versuch eine Art „Softfaktor“ mit der sich ein Einfluss auf die Zellen messen und sichtbar machen lässt. Proliferation und Transdifferenzierung sind keine gänzlich voneinander unabhängigen Prozesse. Zellen, die sich transdifferenzieren, proliferieren weniger und umgekehrt. Gleichzeitig führt die Proliferation und damit die Zellteilung auf epigenetischer Ebene zu einer Umstrukturierung und macht die Zellen dann eventuell empfänglicher für exogene Faktoren, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren.

4.3.Messung der Proliferation und Apoptose

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Substanzen auf Ihre Wirkung während der transgerminalen Konvertierung mesenchymaler Stammzellen hin getestet. Es interessierte hierbei vor allem die Wirkung auf die Proliferation und die Apoptose sowie auf Veränderungen der Morphologie.

Zur Messung der Proliferation und Apoptose mussten mehrere Verfahren erst auf Ihre Funktionstüchtigkeit getestet und für die Zellen etabliert werden. Dabei hat sich die Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie als gute und schnell durchführbare

Methode (im Sinne einer schnellen Zählung großer Zellmengen) erwiesen. Gerade für die Zellen in Suspension ist die Messung mit anderen Methoden schwieriger.

Zur Durchführung von immunhistochemischen Färbungen müssen die Zellen erst adhären werden. Während dieses Prozesses kann es passieren, dass ein Teil der Zellen nicht anwächst oder dass sich Zellen wieder ablösen. Diese Effekte können zu einer Veränderung des Ergebnisses führen. Desweiteren müssen die Ergebnisse von Hand unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Dies ist mit einer höheren Ungenauigkeit und einer geringeren Auswertungsmenge verbunden.

Eine erweiterte Möglichkeit böte die gleichzeitige Messung von KI67, Annexin und PI mittels Flowzytometrie. Dies war allerdings nicht durchführbar, weil das von uns verwendete FACS nicht über die entsprechend benötigten Emissions- und Absorptionsfilter verfügte.

Die Etablierung der Methode wurde im Vergleich mit der BrdU Färbung durchgeführt. Es fanden sich vergleichbare Werte für die BrdU Färbung und für die Zellzyklusmessung, woraufhin bei den folgenden Versuchen unter Zugabe der Substanzen nur noch die Zellzyklusmessung zum Einsatz kam.

Eine weitere Methode zur Abschätzung der Entwicklung der Gesamtzellzahl und damit der Proliferation ist die Auszählung unter dem Mikroskop. Dies konnte zum Vergleich nur für adhären Zellen durchgeführt werden. Durch zufällige Auswahl der Zählausschnitte und Hochrechnung wurde versucht eine Fehlabschätzung zu vermeiden. Trotz der Gefahr falscher Zählergebnisse liefert diese Methode zumindest einen guten Überblick der Zellzahl über die Zeit.

4.4. Inhomogenität der Zellen

Die MSC von der Abteilung Prof. Dr. Brenner sind keine homogene Population; sie exprimieren in hohem Prozentsatz die Oberflächenmarker CD9, CD 73, CD90, CD105 und CD166, sind aber negativ für CD14, CD34 und CD45. Derzeit gibt es kein eindeutiges Oberflächenmarkerprotein, um mesenchymale Progenitor Zellen (MPC) eindeutig zu identifizieren (Fickert 2003 und 2004; Fiedler 2002). Gleichzeitig müssen sie *in vitro* in die mesenchymale Zellreihe ausdifferenzieren können (osteogen, chondrogen, adipogen). Gerade für die Proliferation ist es interessant zu wissen, ob es Subpopulationen der angereicherten Zellen gibt, die besonders gut oder schlecht proliferieren. Hermann und Fu

gehen davon aus, dass es ganz bestimmte Subpopulationen sind, die unter speziellen Zellkulturbedingungen transgerminal konvertieren. Fu spricht in diesem Zusammenhang von den „bipotenten Stammzellen“ (Fu 2008). Hermann geht hierbei von ca. 60% aus und Fu von 8 %. Beiden ist es jedoch nicht gelungen, spezielle Kriterien oder Sortiermechanismen herauszuarbeiten, um diese Subpopulation zu gewinnen. (Hermann 2006; Fu 2008).

Ein Versuch, Subgruppen zu isolieren, wurde von Jiang unternommen. Seine Arbeitsgruppe identifizierte in murinen und aus Ratten gewonnenen BMMNCs (bone marrow mononuclear cells), die negativ für hämatopoetische und murine erythroide Zellmarker (CD45 und TER119 negativ) sind, eine Subpopulation. Diese ist nach Kultur negativ für CD34, CD44, CD 45 sowie c-Kit, MHC I und II, sowie CD13 und SSEA positiv. Er postulierte, dass nur ungefähr 1/1000 der BMMNCs in der Lage waren, diese bei ihm „multipotente adulte progenitor Zellen“ (MAPC) genannten Subkulturen zu bilden. Diese waren dann allerdings in der Lage, Zellen aus allen 3 Keimbahnblättern zu bilden (Jiang 2002).

Lu gibt die Anzahl an multipotenten adulten progenitor Zellen (MAPCs) an der gesamten MSC Zellpopulation mit unter 1 % an. Diese Zellen seien in der Lage, in neuroektodermale Zellen zu differenzieren (Lu 2004; Jiang 2002).

In der Debatte um Stammzellen wird immer wieder diskutiert, dass es keine Standards innerhalb der Stammzellenforschung gibt. Verschiedene Stammzellen werden von verschiedenen Geweben gewonnen, es gibt eine Vielzahl an Konvertierungsprotokollen zur transgerminalen Umwandlung von MSC in neuron-ähnliche Zelltypen (für eine Übersicht, siehe Hermann 2006) oder Isolierungsprotokollen.

Die Isolierungsprotokolle unterscheiden sich dabei vor allem in der Art der Gewebe aus denen MSC gewonnen werden. Weitere Unterschiede sind die Art und Weise der Weiterverarbeitung, sowie unterschiedliche Oberflächenmarker mit deren Hilfe aus dem Zellsupernatant die entscheidenden Zellen aussortiert werden (siehe Ficker 2004 im Vergleich zu Montzka 2009).

Fu merkt daher an, dass all diese Variablen dazu führen können, dass es zu unterschiedlichen Zusammensetzungen von Zellsubpopulationen kommt, bestimmte Zellen innerhalb der Subpopulation selektioniert werden, und das wiederum einen Einfluss auf das Verhalten der adulten Stammzellen in der Kultur hat (Fu 2008). So könnte es sein, dass

trotz gleicher Entnahme – beim gleichen Spender – die Menge an Zellen einer gewissen Subpopulation von Versuch zu Versuch variiert. Genau diese Subpopulationen könnten aber die Zellen enthalten, die für einen bestimmten Wachstumsfaktor sensibel sind. Unterschiedliche Proliferationsmessungen ergäben sich dann durch eine unterschiedliche Konzentration an sensiblen Subpopulationen. Gleichzeitig erschweren die vielen unterschiedlichen Protokolle eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander.

4.5. Anoikis

Anoikis ist definiert als „programmierter Zelltod der auftritt aufgrund der Ruptur von Integrin Verbindungen bei der Ablösung einer Zelle von ihrer extrazellulären Matrix“ (Taddei 2012).

In nahezu allen Versuchen war signifikant messbar, dass die Zellen unter adhärenen Wachstumsbedingungen im Gegensatz zu Zellen in Suspension einen geringeren Sub-G₁ Anteil bei etwa gleicher Proliferation aufwiesen.

Die Anoikis könnte eine plausible Erklärung für die höhere Apoptoserate unter Wachstum in Suspension sein.

4.6. Alter der Patienten, Zellspender und Zellkultur, Fallzahl

Die Stammzellen wurden intraoperativ aus Knochenmark gewonnen. Hierbei kamen für die Versuche Zellpopulationen von weiblichen Patienten unterschiedlichen Alters zum Einsatz. Hermann zeigte, dass die neuroektodermale Differenzierungsmöglichkeit von humanen mesenchymalen Stammzellen altersabhängig ist. Er unterscheidet hier eine Altersstufe von >45 Jahren und eine Altersstufe von 18-35 Jahren. Er beschreibt, dass die Zellen der Patienten aus der ersten und älteren Gruppe ihr neuroektodermales Differenzierungspotential vollständig verloren haben (Hermann 2009). Die Spender der hier verwendeten Zellen kamen aus der zweiten Gruppe der 18 – 35 Jährigen. Eine Spenderin war 14 Jahre alt.

Beim Anzüchten der Zellen bis zur Konvertierung wurde darauf geachtet, dass sie nur wenige Zellkontakte untereinander herstellen können. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von ungefähr 70% getrennt und auf mehrere Kulturflaschen gesplittet. Auch der

Zeitraum nach Konvertierung bis zur Messung wurde auf 7 Tage beschränkt um Zell-Zell Kontakte und Sphere Bildung zu vermeiden.

Die geringen Fallzahlen erklären sich aus dem Grundansatz der Versuchsanordnung. Ziel war es, neue Faktoren ausfindig zu machen, die am Ende interessant sein könnten, das Transdifferenzierungsprotokoll und die Transdifferenzierung zu verbessern. Durch die langen Wachstumsphasen der Zellen und die vielen Unterarme der Versuchsreihen war die Anzahl möglicher Versuche logistisch begrenzt. Es bestand die Wahl entweder viele Faktoren mit geringer Fallzahl oder weniger Faktoren mit leicht erhöhter Fallzahl zu testen.

Da letztlich eher interessant war, gewisse Tendenzen zu erkennen, um neue Hypothesen aufzustellen und daraufhin weitere Versuche zu planen, entschieden wir uns für die erstere Variante. Fraglich ist generell, ob mit einer leicht erhöhten Fallzahl statt $n=3$ oder 4 mit $n=6$ bessere Aussagen hätten getroffen werden können. Für die Kontrolle wurde bei den Versuchen mit zusätzlichen Substanzen eine Fallzahl $n=6$ möglich. Aber auch hier zeigte sich eine sehr hohe Standardabweichung.

4.7. Einfluss der Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen

Die hier verwendeten Wachstumsfaktoren werden in vielen Konvertierungsprotokollen verwendet, um eine Veränderung von MSC in Neuronen-ähnliche Zellen zu erzeugen. Die Protokolle beschäftigen sich dabei vor allem mit dem Status der Transdifferenzierung bzw. transgerminalen Konvertierung und weniger mit dem Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Die zusätzlich verwendeten Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen zeigten bei den Zellen zwischen den Versuchsreihen einen sehr unterschiedlichen Einfluss.

Die neurotrophen Wachstumsfaktoren LIF, BDNF, FGF8 und SHH erwiesen sich als wachstumsneutral. Es könnte sein, dass der Beobachtungszeitraum zu kurz gewählt wurde. So beobachtete Carpenter für FGF, EGF und LIF, im Gegensatz zur Behandlung von embryonalen Stammzellen nur mit FGF und EGF, einen Wachstumsvorteil für die Zellen ab dem 50. bis 60. Tag *in vitro* (Carpenter 1999). Der Beobachtungszeitraum der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente betrug 7 Tage nach Konvertierungsbeginn und Zugabe von weiteren Substanzen. Dieser wurde gewählt, da es in diesem Zeitraum noch nicht zu ausgeprägten Zell-Zell Kontakten und zur Neurosphere-

Bildung kommt. Die Kontaktbildung der Zellen führt u.a. zu einer Abnahme der Proliferation und erschwert darüber hinaus die Messung vereinzelter Zellen mittels FACS.

Trichostatin A ist ein Vertreter der HDAC (Histon Deacetylase) Hemmer. HDAC Hemmer können zu Reexpressierung von Genen, Zellzyklusarrest, zur Differenzierung oder zum Zelltod führen. Speziell für TSA konnte gezeigt werden, dass es einen Zellzyklusarrest induzieren kann. Ein Weg, über den TSA dabei wirkt, ist die Acetylierung von p53 (Roy 2005; Yoshida 1990; Ogryzko 1996).

TSA zeigt im Vergleich zur Kontrolle unter Ausschluss von Ausreißern eine statistisch signifikante Erhöhung des S und G₂/M Anteils bei adhärenen und suspendierten Zellen. Desweiteren war der Anteil von Annexin⁺ Zellen erhöht, und es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von CDCP1/CD318. Die Wachstumskurven zeigen allerdings insgesamt im Verlauf der Zeit eher eine gleichbleibende bis leicht abnehmende Zellzahl. Für diese Kombination aus erhöhtem S und G₂/M Anteil bei abnehmender Zellzahl in der Zellzahlmessung für adhärenente Zellen kommen daher 2 Erklärungen in Betracht. Zum einen könnte es zu einer erhöhten Proliferation mit gleichzeitig erhöhtem Zellsterben kommen. Dafür würde sprechen, dass die Annexinfärbung zunimmt. Ein Zeichen für einen frühen apoptotischen bzw. Zellstoffwechsel reduzierten Zustand. Der Sub-G₁ Wert ist zwar im Mittel auch erhöht aber nicht signifikant für n=3.

Eine weitere Erklärung könnte der bei Roy beschriebene Zellzyklusarrest sein. Er fand heraus, dass die Behandlung von humanen Prostata Zellen mit TSA zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M Phase führte. Dieser Effekt wurde zwar noch nicht für MSC aber auch für viele andere Zellreihen beschrieben (Roy 2005).

Es erscheint vor diesem Hintergrund durchaus plausibel, dass die erhöhte S und G₂/M Phase im Zellzyklus nicht vermehrte Proliferation, sondern einen Arrest anzeigt.

Für Valproinsäure, ein weiterer Deacetylase-Hemmer, beschreibt Cho in verschiedenen Versuchen die Förderung der osteogenen Differenzierung von Knochenmarks-Stroma Zellen (BMSC) in einer Dosis abhängigen Weise. Gleichzeitig stellte er fest, dass VPA die Proliferation dieser Zellen verringert (Cho 2005).

Safford untersuchte in seiner Publikation die neurogene Differenzierung von murinen und humanen ADAS (Adipose Derived Stromal Cells). Zur neuronalen Induktion verwendete er ein Medium, das unter anderem BHA, VPA und Forskolin, Cortison und Insulin

enthielt. Er beobachtete dabei morphologische Veränderungen der Zellen, die vergleichbar mit den Beobachtungen im Rahmen dieser Doktorarbeit waren. Der Zellkörper wurde flacher und etwas größer, die Zellausläufer länger. Gleichzeitig beobachtete Safford eine Abnahme der Gesamtzellzahl in der Kultur. Seine Erklärung dafür war, dass die Morphologieveränderungen eine Antwort oder Folge von Zellstress waren (Safford 2002). Die Morphologieveränderung der MSC unter VPA könnten also Ausdruck für eine osteogene Differenzierung wie bei Cho, für Zellstress wie von Safford beschrieben oder die Differenzierung hin in einen neuronalen Zelltyp darstellen. Weiterführende Untersuchungen wären daher angebracht, etwa mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, um herauszufinden, ob die Expression neuraler Gene durch Inkubation mit VPA steigt.

Retinsäure zeigte in den Versuchen eine erhebliche Hemmung der Proliferation. Für RA beschrieb Maden, dass sie bei verschiedenen Stammzelltypen eine neurale Differenzierung induzieren kann. Für diese Induktion werden aber neben RA noch weitere neurotrophe Wachstumsfaktoren wie SHH, BDNF, Neurotrophin 3 (NT-3) ergänzend hinzugegeben. Für hämatopoetische Knochenmarksstammzellen führte eine Behandlung mit RA und SHH zur Induktion in glutaminerge neurale Zellen. Für RA sowie RA mit FGF sind keine spezifischen Veränderungen beschrieben worden. Desweiteren beschreibt Maden für neurale Stammzellen eine bessere Proliferation unter RA. Allerdings ist dieser Effekt Dosis abhängig. Bei zu hoher Konzentration wirkt RA wieder hemmend auf die Proliferation (Maden 2007). Die Hemmung der Proliferation von MSC während der Konvertierung kann durch eine zu hohe Dosis verursacht worden sein.

Es finden sich Hinweise, dass RA Presinilin und APP (Amyloid Precursor Protein) Gene reguliert. Die Menge an APP Gen Splice Varianten reduziert sich im Hippocampus, wenn Versuchstieren Retinsäure gegeben wird (Pan 1993). Die nach dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokolle gewonnenen Zellen vermindern auch *in vitro* die Menge an APP (Habisch 2010). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Effekte von RA und den mNSC zu kombinieren wären. Aufgrund der hier gefundenen massiven Apoptose und Nekrose müsste die ideale Konzentration eruiert werden. Diese muss so gewählt werden, dass RA einen zusätzlichen therapeutischen Effekt bei gleichzeitiger idealer Wirkung auf die Proliferation der mNSC hat.

Der eher wachstumsneutrale Effekt der Faktoren FGF8, LIF, BDNF und SHH könnte dahingehend gedeutet werden, dass zumindest der Zellstress nicht erhöht wird. Die Morphologieveränderungen bei VPA könnten als Schrumpfungsartefakte gedeutet werden und die Abnahme der Zellzahl bei TSA, VPA und 5AC als Erhöhung von Zellstress.

Interessanterweise scheinen die kleinmolekularen Substanzen TSA, 5AC und L-DOPA bei Zellen, die in Suspension wachsen, zu einer Abnahme des Sub-G₁ Anteils führen. Dieser Effekt war bei den neurotrophen Wachstumsfaktoren nur noch für EGF100 (also erhöhter Konzentration) beobachtbar.

Die erhöhte Apoptoserate bei Zellen, die in Suspension wachsen, im Gegensatz zu Zellen in Adhärenz kann wie oben durch den Effekt der Anoikis verursacht werden.

In Zellen, die sich von Ihrer Extrazellulärmatrix lösen, kommt es zu einer Herunterregulierung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), was zur Erhöhung der Bim Todes-Kaskade führt; eine Erklärung für Anoikis. Umgekehrt führt eine vermehrte Stimulierung des EGFR über ERK und PKB/Akt Signalwege zu einer Reduktion von Bim und somit zur Reduktion von Anoikis (Taddei 2012). Auch dies könnte eine plausible Erklärung für den protektiven Effekt einer höheren EGF Konzentration im Serum sein. Das Konvertierungsprotokoll könnte grundsätzlich in diesem Punkt abgeändert werden, es sollte eine höhere Konzentration von EGF verwendet werden.

Als Hypothese könnte man postulieren, dass auch TSA, 5AC und L-DOPA einen hemmenden Effekt auf die Anoikis haben und so die Abnahme des Sub-G₁ Anteils im Vergleich zur Kontrolle erklären.

Es gibt eine Reihe weiterer Faktoren, die einen Schutz für MSC vor den Stress induzierenden Bedingungen der Hypoxie und Serumdeprivation bieten. Diese arbeiten über den PI3K/Akt und ERK 1/2 Signalweg. Dazu gehören u.a. Lovastatin (Xu 2008), Heregulin (Gui 2007), Angiopoietin-1 (Liu 2008), SDF-1 (Yin 2011), Lysophosphsäure (Chen 2008).

Für die therapeutische Nutzung der Zellen *in toto* ist die phänotypische und funktionelle Transdifferenzierung eine unabdingbare Voraussetzung. Möchte man die Zellen eher als eine Art „biologische Fabrik“ tropher Faktoren verwenden, reicht es absolut aus, wenn die Zellen im Allgemeinen therapeutisch wirksam sind. Physiologische Wirkung könnten die

konvertierten MSC entfalten durch Milieuveränderung oder durch parakrine Effekte, um so direkt auf neurale Zellen Einfluss zu nehmen. Dadurch könnten die pathophysiologischen Vorgänge bei neurodegenerativen Erkrankungen eingeschränkt oder abgewendet werden. MSC produzieren Zytokine, die mitogen im ZNS wirken und das neuronale Zellüberleben verbessern. Sie produzieren desweiteren ein Substrat, das förderlich ist für die axonale Regeneration und die Proliferation von Schwannzellen. Desweiteren scheinen sie anti-inflammatorisch zu wirken, was den positiven Effekt in manchen Tierversuchen erklären könnte (Gruh 2009).

Es darf allerdings nie außer Acht gelassen werden, dass MSC auch negative Auswirkungen verursachen können. MSC können sich im Zuge einer mesenchymal-epithelialen Umwandlung in Karzinom assoziierte Fibroblasten verändern (Mishra 2009).

4.8. Substratrigidität als Einfluss auf die Differenzierung von MSC

Engler zeigte für MSCs eine Abhängigkeit der Transdifferenzierung von der Elastizität des Substrates, auf dem die Stammzellen wuchsen. Dabei fand er heraus, dass auf weichem Material eher eine Induktion in einen neuronalen Zelltyp induziert wurde und auf hartem Material eher eine osteogene Differenzierung stattfand. Diese Effekte zeigten sich nach etwa 3-4 Wochen. In der ersten Woche waren die Zellen noch sensitiv auf lösliche Induktionsfaktoren (Engler 2006).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Substratrigidität in vorliegender Versuchsreihe bei den adhärent wachsenden Zellen keinen Einfluss auf die Zellen hatte. Diese wurden schon nach einer Woche Konvertierung untersucht. Ein Zeitraum, der nach Engler noch keine Veränderungen aufgrund der Oberflächenrigidität verursacht.

4.9. Schlussfolgerung und Aussicht

In allen Versuchen war eindeutig zu erkennen, dass die konvertierten Zellen unter adhärennten Bedingungen besser wachsen als unter Suspensionsbedingungen. Genauer gesagt zeigen sie weniger Apoptose bei etwa gleicher Proliferation. Eine mögliche Erklärung ist die weiter oben beschriebene Anoikis.

Die Veränderung der Konvertierungsprotokolle mit neurotrophen Wachstumsfaktoren zeigte einen wachstumsneutralen Effekt. Daher können diese gut in zukünftige Protokolle eingebunden und näher untersucht werden. Kleinmolekulare Substanzen zeigten in den gegebenen Konzentrationen und Wachstumsbedingungen keinen Benefit gegenüber dem ursprünglichen von Hermann etablierten Protokoll. Einen „Superfaktor“, der den Zellen auch unter den extremen Bedingungen der Hypoxie und des Serumentzuges einen Proliferationsschub gibt, konnte unter den hier untersuchten nicht ausfindig gemacht werden.

Die gefundenen Morphologieveränderungen bei einzelnen Faktoren (VPA, Retinsäure) könnten zum einen eine Veränderung des Expressionsmusters bedeuten. Zum anderen wäre es auch möglich, dass der schon herrschende enorme Zellstress durch die Kulturveränderung verstärkt wird. Einen ähnlichen Effekt der Zellmorphologieveränderung durch die Kulturbedingungen, die auch zum Teil hier für die transgerminale Konvertierung verwendet wurden, zeigen Phinney (Phinney 2005) und Neuhuber (Neuhuber 2004).

Vor dem Hintergrund der Eigenschaften, die die Zellen unter den hier beschriebenen Wachstumsfaktoren haben, ist es interessant zu untersuchen, ob es unter den getesteten Faktoren einen gibt, der die Migration verbessert und/oder die Expression von protektiven Zytokinen, zytotrophen Faktoren, oder Neprilysin erhöhen.

Denn Habisch fand eine Erhöhung der Expression auf mRNA und Proteinebene während der Konvertierung der MSC (mit den auch in dieser Doktorarbeit verwendeten Standardprotokollen) von verschiedenen löslichen zytotrophen Faktoren wie HGF, VEGF und Amphiregulin. Für diese ist bekannt, dass sie neuronale Differenzierung fördern und neuroprotektiv wirken (Habisch 2010b).

Während der Konvertierung kam es außerdem zu einer Induktion der beiden Gene F-spondin und Neprilysin (CD10). Für diese ist bekannt, dass sie einerseits die Synthese von A-Beta Peptiden hemmen, andererseits deren Abbau fördern. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass mNSC, die mit HEK-293 Zellen, die APP exprimieren, co-kultiviert wurden, dafür sorgen, dass im Zellkulturüberstand weniger A-Beta Peptide vorhanden sind. Dies könnte ein Zugang für eine Stammzellentherapie gegen Morbus Alzheimer sein (Habisch 2010a).

Für die kleinmolekularen Substanzen wie 5-AC, TSA und VPA konnte für Mausembryofibroblasten (MEF) gezeigt werden, dass sie die Effizienz der

Reprogrammierung dieser Zellen in „induzierte pluripotente Stammzellen“ (iPS) verbessert (Huangfu 2008). Diese Reprogrammierung erfordert die verstärkte Expression von 4 Transkriptionsfaktoren, Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc (Takahashi 2006; Okita 2007; Maherali 2007; Wernig 2007). Für die Chromatin- modifizierenden Agenzien TSA und 5AC konnte für Neurosphere-Zellen gezeigt werden, dass die Pluripotenz-assoziierten Gene vermehrt exprimiert werden (Ruao 2008). Weitere Forschung in der Veränderung und Verbesserung von Konvertierungsprotokollen für MSC in mNSC kann hier ansetzen und untersuchen, ob die kleinmolekularen Substanzen auch während der proneuralen trans-germinalen Konvertierung mesenchymaler Stammzellen einen gleichen oder ähnlichen Effekt auf jene Transkriptionsfaktoren haben. Ein erster Schritt hierzu wäre etwa auch, die von uns bereits untersuchten Substanzen in niedrigeren Konzentrationen zu testen, um toxische Effekte zu minimieren.

5. Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Demenz stellen für die Betroffenen einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität dar. Derzeit stehen für diese Erkrankungen keine kurativen Therapien zur Verfügung. Eine Idee diese Lücke zu schließen ist die Behandlung mit adulten Stammzellen. Ziel ist der Ersatz des funktionellen Neuronenverlusts. Neurale Stammzellen sind schwierig zu gewinnen. Daher wird und wurde versucht mesenchymale Stammzellen zu verwenden, welche sich in vielen leicht zugänglichen Gewebearten finden. Das Problem ist die Zugehörigkeit der mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu einem anderen Keimblatt als Zellen neuralen Typs. Es gibt eine wachsende Anzahl an Hinweisen, dass Stammzellen nicht Keimblatt-restringiert sind. Forscher haben unterschiedliche Protokolle entwickelt, um Zellen transgerminal zu konvertieren. In Transplantationsversuchen zeigte sich bei den so veränderten Zellen ein hoher Zellverlust. Die Protokolle sind in dieser Hinsicht und in der Effizienz der Konvertierung noch erweiterungsbedürftig.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, den Einfluss von Faktoren, die in der Neurogenese eine Rolle spielen, auf das Wachstum von konvertierten mesenchymalen Stammzellen messbar und sichtbar zu machen und herauszufinden, ob die Zellen überhaupt noch unter den Bedingungen Teilungs- und damit Aktivitätsverhalten zeigen. Gerade in Hinblick auf das Bedürfnis, bessere Konvertierungsprotokolle zu etablieren, dürfen zusätzliche Faktoren nicht negativ auf das Wachstum wirken, sondern sollten dieses begünstigen.

Ein Indikator für Wachstum ist die Zellzyklusverteilung, sowie Färbungen und Messungen mit Molekülen, die während der DNA Synthese eingebaut werden. Dazu mussten bekannte Methoden auf diesen speziellen Zelltyp hin etabliert werden. Die adhärent wachsenden MSC wurden nach erfolgter Zellkultivierung umgesetzt, mit Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), Epidermal Growth Factor (EGF), Heparin + neurotrophe Faktoren oder kleinmolekularen Substanzen behandelt und in serumfreiem Medium sowie unter Hypoxie gezüchtet. Nach der Umsetzung gab es 2 Versuchsansätze: (1) Zellen, die am Boden anwachsen konnten (adhärente Bedingungen) und (2) Zellen, die frei im Medium schwimmen und nicht anwachsen konnten (Zellen in Suspension). 7 Tage nach dieser als Konvertierung bezeichneten Methode wurden die Zellen dann u.a. mittels

Zellzyklusmessung auf Proliferation und Apoptose überprüft, oder unter dem Mikroskop auf Morphologieveränderungen hin untersucht. Desweiteren wurde untersucht, ob die Zellen unter gewissen Faktoren eine Erhöhung der CD318 Expression zeigten. Die Dauer von 7 Tagen ergab sich, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt in der Monolayerkultur noch nicht „dicht“ sind, d.h. es kommt noch kaum zu Kontakt zwischen den Zellen.

Es zeigte sich, dass 26,2% der MSC proliferierten. Von den mNSC (MSC-derived NSC-like cells; NSC: Neurale Stammzelle) unter Adhärenz nur noch ca. 12% und unter Suspension nur noch ca. 8% Proliferation zeigten. Auch bei der Zugabe weiterer Faktoren war ersichtlich, dass die Zellen unter Adhärenz grundsätzlich besser wuchsen, als Zellen in Suspension. Eine Erklärung dafür ist die Anoikis: der Zelltod aufgrund von Adhärenzverlust. Die neurotrophen Wachstumsfaktoren Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) sowie Sonic Hedgehog (SHH) waren wachstumsneutral. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) zeigte für Zellen in Suspension eine Erhöhung des Anteils Annexin und Propidiumiodid (PI) positiver Zellen. EGF in hoher Konzentration scheint einen anti-apoptotischen Effekt für Zellen in Suspension zu bewirken. Valproinsäure (VPA) bewirkte eine Veränderung der Morphologie. Die Zellkörper wurden etwas flacher und die Zellausläufer zahlreicher und länger. Der Histon-Deacetylase Hemmer Trichostatin A (TSA) könnte einen Zellzyklusarrest induziert haben, da der S und G₂/M signifikant zunahm, gleichzeitig aber die Zellzahl kleiner wurde. TSA zeigte auch Erhöhung von CD318, ein Oberflächenprotein, das vor allem auf Stammzellen aber auch auf neoplastischen Zellen vermehrt exprimiert wird. 5-Azacytidin (5AC) und L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) schienen keinen Vorteil für das Zellwachstum zu haben. Retinsäure führte zu massiver Apoptose sowie Morphologieveränderungen (die Zellen lagerten sich in Gruppen zusammen und waren sehr stark granuliert) und war in der verwendeten Konzentration nicht vorteilhaft für die Zellen.

Ein großes Problem generell in der transgerminalen Stammzellenforschung ist die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen, sowie von unterschiedlichen Versuchsprotokollen, was eine Vergleichbarkeit erheblich erschwert. Auch die hier verwendeten Zellen wurden zwar gut charakterisiert, dennoch ist von einer hohen Inhomogenität der Zellen auszugehen. Weiterer Forschungsbedarf auf molekularer Ebene muss zeigen, wie die Faktoren auf die Reprogrammierung der hier verwendeten Zellen wirken. Ein interessantes Untersuchungsobjekt wären stammzellenspezifische Transkriptionsfaktoren.

6. Literaturverzeichnis

1. Alexanian A R, Maiman D J, Kurpad S N, Gennarelli T A: In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells Dev.*, 17: 1123-1130(2008)
2. Altman J: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J.Comp.Neurol.*, 137: 433-457(1969)
3. Altman J, Das G D: Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207: 953-956(1965)
4. Belicchi M, Pisati F, Lopa R, Porretti L, Fortunato F, Sironi M, Scalamogna M, Parati E A, Bresolin N, Torrente Y: Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J.Neurosci.Res.*, 77: 475-486(2004)
5. Boer G J: Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR). *J.Neurol.*, 242: 1-13(1994)
6. Brighton C T, Lorch D G, Kupcha R, Reilly T M, Jones A R, Woodbury R A, 2nd: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin.Orthop.Relat.Res.*, (275): 287-299(1992)
7. Buhring H J, Kuci S, Conze T, Rathke G, Bartolovic K, Grunebach F, Scherl-Mostageer M, Brummendorf T H, Schweifer N, Lammers R: CD133 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem Cells*, 22: 334-343(2004)
8. Calloni G W, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin N M, Dupin E: Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104: 19879-19884(2007)

9. Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg L U: In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp.Neurol.*, 158: 265-278(1999)
10. Chase T N, Oh J D: Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends Neurosci.*, 23: S86-91(2000)
11. Chen J, Baydoun A R, Xu R, Deng L, Liu X, Zhu W, Shi L, Cong X, Hu S, Chen X: Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis. *Stem Cells*, 26: 135-145(2008)
12. Chen J H, Hales C N, Ozanne S E: DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.*, 35: 7417-7428(2007)
13. Cho H H, Park H T, Kim Y J, Bae Y C, Suh K T, Jung J S: Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J.Cell.Biochem.*, 96: 533-542(2005)
14. Choong P F, Mok P L, Cheong S K, Leong C F, Then K Y: Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy*, 9: 170-183(2007)
15. Clarkson E D: Fetal tissue transplantation for patients with Parkinson's disease: a database of published clinical results. *Drugs Aging*, 18: 773-785(2001)
16. Conze T, Lammers R, Kuci S, Scherl-Mostageer M, Schweifer N, Kanz L, Buhning H J: CDCP1 is a novel marker for hematopoietic stem cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 996: 222-226(2003)
17. Cowan C A, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker J P, Wang S, Morton C C, McMahon A P, Powers D, Melton D A: Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *N.Engl.J.Med.*, 350: 1353-1356(2004)
18. Curfs J H, Meis J F, Hoogkamp-Korstanje J A: A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin.Microbiol.Rev.*, 10: 742-780(1997)
19. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M: Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J.Cell.Mol.Med.*, 11: 21-38(2007)

20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317(2006)
21. Elbaz A, Moisan F: Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr.Opin.Neurol.*, 21: 454-460(2008)
22. Engler A J, Sen S, Sweeney H L, Discher D E: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126: 677-689(2006)
23. Eriksson P S, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A M, Nordborg C, Peterson D A, Gage F H: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.*, 4: 1313-1317(1998)
24. Fickert S, Fiedler J, Brenner R E: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res.Ther.*, 6: R422-32(2004)
25. Fickert S, Fiedler J, Brenner R E: Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*, 11: 790-800(2003)
26. Fiedler J, Roderer G, Gunther K P, Brenner R E: BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J.Cell.Biochem.*, 87: 305-312(2002)
27. Freed C R, Greene P E, Breeze R E, Tsai W Y, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski J Q, Eidelberg D, Fahn S: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.*, 344: 710-719(2001)
28. Friedenstein A J: Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat.(Basel)*, 45: 31-59(1961)
29. Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee T D, Forman S J, Shih C C: Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev.*, 17: 1109-1121(2008)

30. Gage F H: Mammalian neural stem cells. *Science*, 287: 1433-1438(2000)
31. Gould E, Reeves A J, Graziano M S, Gross C G: Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286: 548-552(1999)
32. Gruh I, Martin U: Transdifferentiation of Stem Cells: A Critical View. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 73-106(2009)
33. Gui C, Wang J A, He A N, Chen T L, Luo R H, Jiang J, Hu X Y, Xie X J: Heregulin protects mesenchymal stem cells from serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis. *Mol.Cell.Biochem.*, 305: 171-178(2007)
34. Guillot P V, O'Donoghue K, Kurata H, Fisk N M: Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin.Reprod.Med.*, 24: 340-347(2006)
35. Habisch H J, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habisch A, Schwalenstöcker B, Hermann A, Brenner R, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph A C, Storch A: Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J.Neural Transm.*, 114: 1395; 1395-406; 406(2007)
36. Habisch H J, Schmid B, von Arnim C A, Ludolph A C, Brenner R, Storch A: Efficient processing of Alzheimer's disease amyloid-Beta peptides by neuroectodermally converted mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 19: 629; 629-633; 633(2010a)
37. Habisch H J, Fiedler J, Ludolph A C, Storch A, Brenner R E: Altered migration and adhesion potential of pro-neurally converted human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 10: 824-833(2008)
38. Habisch H J, Liebau S, Lenk T, Ludolph A C, Brenner R, Storch A: Neuroectodermally converted human mesenchymal stromal cells provide cytoprotective effects on neural stem cells and inhibit their glial differentiation. *Cytotherapy*, 12: 491-504(2010b)
39. Hanon E., Vanderplasschen A., Pastoret P.-P.: The Use of Flow Cytometry for concomitant detection of apoptosis and cell cycle analysis. *Biochemica*, 2: 25-27(1996)

40. Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, Gould T D, Manji H K, Chen G: Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J.Neurosci.*, 24: 6590-6599(2004)
41. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa M O, Fiedler J, Boehm B O, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A: Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J.Cell.Sci.*, 117: 4411-4422(2004)
42. Hermann A, Liebau S, Gastl R, Fickert S, Habisch H J, Fiedler J, Schwarz J, Brenner R, Storch A: Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J.Neurosci.Res.*, 83: 1502-1514(2006)
43. Hermann A, Maisel M, Storch A: Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders. *Expert Opin.Biol.Ther.*, 6: 653-670(2006)
44. Hoffer B J, Olson L: Ethical issues in brain-cell transplantation. *Trends Neurosci.*, 14: 384-388(1991)
45. Hoglinger G U, Rizk P, Muriel M P, Duyckaerts C, Oertel W H, Caille I, Hirsch E C: Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat.Neurosci.*, 7: 726-735(2004)
46. Hsu Y C, Lee D C, Chiu I M: Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. *Cell Transplant.*, 16: 133-150(2007)
47. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen A E, Melton D A: Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat.Biotechnol.*, 26: 795-797(2008)
48. Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W C, Largaespada D A, Verfaillie C M: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49(2002)

49. Kerr C L, Gearhart J D, Elliott A M, Donovan P J: Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Semin.Reprod.Med.*, 24: 304-313(2006)
50. Kuznetsov S A, Mankani M H, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey P G: Circulating skeletal stem cells. *J.Cell Biol.*, 153: 1133-1140(2001)
51. Lee J, Elkahloun A G, Messina S A, Ferrari N, Xi D, Smith C L, Cooper R Jr, Albert P S, Fine H A: Cellular and genetic characterization of human adult bone marrow-derived neural stem-like cells: a potential antiglioma cellular vector. *Cancer Res.*, 63: 8877-8889(2003)
52. Lee J Y, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robbins P, Wernig A, Huard J: Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J.Cell Biol.*, 150: 1085-1100(2000)
53. Lee S M, Danielian P S, Fritsch B, McMahon A P: Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development*, 124: 959-969(1997)
54. Levy Y S, Bahat-Stroomza M, Barzilay R, Burshtein A, Bulvik S, Barhum Y, Panet H, Melamed E, Offen D: Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy*, 10: 340-352(2008)
55. Liu X B, Jiang J, Gui C, Hu X Y, Xiang M X, Wang J A: Angiopoietin-1 protects mesenchymal stem cells against serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *Acta Pharmacol.Sin.*, 29: 815-822(2008)
56. Lu B, Pang P T, Woo N H: The yin and yang of neurotrophin action. *Nat.Rev.Neurosci.*, 6: 603-614(2005)
57. Lu P, Blesch A, Tuszynski M H: Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J.Neurosci.Res.*, 77: 174-191(2004)
58. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K: Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell.Stem Cell.*, 1: 55-70(2007)

59. McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276: 66-71(1997)
60. Mishra P J, Mishra P J, Glod J W, Banerjee D: Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res.*, 69: 1255-1258(2009)
61. Mizuno S, Glowacki J: Chondroinduction of human dermal fibroblasts by demineralized bone in three-dimensional culture. *Exp.Cell Res.*, 227: 89-97(1996)
62. Montzka K, Lassonczyk N, Tschoke B, Neuss S, Fuhrmann T, Franzen R, Smeets R, Brook G A, Woltje M: Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.*, 10: 16(2009)
63. Mountford P, Nichols J, Zevnik B, O'Brien C, Smith A: Maintenance of pluripotential embryonic stem cells by stem cell selection. *Reprod.Fertil.Dev.*, 10: 527-533(1998)
64. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder J C: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90: 8424-8428(1993)
65. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I: Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J.Neurosci.Res.*, 77: 192-204(2004)
66. Ogryzko V V, Hirai T H, Russanova V R, Barbie D A, Howard B H: Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol.Cell.Biol.*, 16: 5210-5218(1996)
67. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-317(2007)
68. Olanow C W, Kordower J H, Lang A E, Obeso J A: Dopaminergic transplantation for Parkinson's disease: current status and future prospects. *Ann.Neurol.*, 66: 591-596(2009)
69. Ormerod M G, Payne A W, Watson J V: Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry*, 8: 637-641(1987)

70. Ornitz D M: Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, 2: 1-12(2001)
71. Ortega S, Ittmann M, Tsang S H, Ehrlich M, Basilico C: Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 5672-5677(1998)
72. Palma V, Lim D A, Dahmane N, Sanchez P, Brionne T C, Herzberg C D, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A: Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 132: 335-344(2005)
73. Pan J B, Monteggia L M, Giordano T: Altered levels and splicing of the amyloid precursor protein in the adult rat hippocampus after treatment with DMSO or retinoic acid. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 18: 259-266(1993)
74. Pekovic V, Hutchison C J: Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *J.Anat.*, 213: 5-25(2008)
75. Phinney D G, Isakova I: Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr.Pharm.Des.*, 11: 1255-1265(2005)
76. Potier E, Ferreira E, Meunier A, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H: Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng.*, 13: 1325-1331(2007)
77. Prockop D J: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74(1997)
78. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L: The epidemiology of the dementias: an update. *Curr.Opin.Psychiatry.*, 20: 380-385(2007)
79. Raedt R, Pinxteren J, Van Dycke A, Waeytens A, Craeye D, Timmermans F, Vonck K, Vandekerckhove B, Plum J, Boon P: Differentiation assays of bone marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cell (MAPC)-like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers. *Exp.Neurol.*, 203: 542-554(2007)

80. Ruau D, Ensenat-Waser R, Dinger T C, Vallabhapurapu D S, Rolletschek A, Hacker C, Hieronymus T, Wobus A M, Muller A M, Zenke M: Pluripotency associated genes are reactivated by chromatin-modifying agents in neurosphere cells. *Stem Cells*, 26: 920-926(2008)
81. Safford K M, Hicok K C, Safford S D, Halvorsen Y D, Wilkison W O, Gimble J M, Rice H E: Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 294: 371-379(2002)
82. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman T B, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper D R, Sanberg P R: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp.Neurol.*, 164: 247-256(2000)
83. Sanchez-Ramos J R: Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J.Neurosci.Res.*, 69: 880-893(2002)
84. Sawamoto K, Yamamoto A, Kawaguchi A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman S A, Okano H: Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J.Neurosci.Res.*, 65: 220-227(2001)
85. Scheffler B, Horn M, Blumcke I, Laywell E D, Coomes D, Kukekov V G, Steindler D A: Marrow-mindedness: a perspective on neurogenesis. *Trends Neurosci.*, 22: 348-357(1999)
86. Schmidt R, Unsicker K (Hrsg): *Lehrbuch der Vorklinik, Teil A. 1. Auflage*, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: 477-478(2003)
87. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein R S, Benvenisty N: Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res.*, 913: 201-205(2001)
88. Taddei M, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P: Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J.Pathol.*, 226: 380-393(2012)

89. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676(2006)
90. Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz M A, Swiergiel J J, Marshall V S, Jones J M: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147(1998)
91. Tosh D, Slack J M: How cells change their phenotype. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 3: 187-194(2002)
92. Uchida N, Buck D W, He D, Reitsma M J, Masek M, Phan T V, Tsukamoto A S, Gage F H, Weissman I L: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97: 14720-14725(2000)
93. Watson J V, Chambers S H, Smith P J: A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*, 8: 1-8(1987)
94. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein B E, Jaenisch R: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448: 318-324(2007)
95. Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, Black I B: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J.Neurosci.Res.*, 61: 364-370(2000)
96. Xu R, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X: Lovastatin protects mesenchymal stem cells against hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis by activation of PI3K/Akt and ERK1/2. *J.Cell.Biochem.*, 103: 256-269(2008)
97. Yin Q, Jin P, Liu X, Wei H, Lin X, Chi C, Liu Y, Sun C, Wei Y: SDF-1alpha inhibits hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Mol.Biol.Rep.*, 38: 9-16(2011)
98. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J.Biol.Chem.*, 265: 17174-17179(1990)
99. Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X: Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 416-425(2006)

Anhang

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Text zur Abbildung auf Seite 20: Flowchart über die Aufteilung auf die verschiedenen Versuchsarme beim Vergleich der Proliferation von Zellzyklusmessung und Bromodesoxyuridin (BrdU) Färbung. | 21 |
| Abbildung 2: mNSC 7 Tage nach Konvertierung unter adhärennten Wachstumsbedingungen. | 21 |
| Abbildung 3: Charakteristische Zellzyklusmessung durch Propidiumiodid (PI) Intensitätsverteilung. | 24 |
| Abbildung 4: Das Programm Cylchred zur Auswertung der Zellzyklusmessung. | 25 |
| Abbildung 5: Vorgehen und Aufteilung vor der FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) Messung mit Annexin V-FITC KIT und CD318 Antikörper. | 28 |
| Abbildung 6: Zellzyklusmessung durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) nach Inkubation mit Propidiumiodid (PI). | 30 |
| Abbildung 7: Die Abbildung zeigt mNSC die mittels Immunhistochemischer Färbung mit Bromodesoxyuridin (BrdU) und Alexa Orange gefärbt wurden. | 31 |
| Abbildung 8: Vergleich der Proliferationsmessung der beiden Verfahren. Messung mit Zellzyklus (ZZ) im Vergleich zu Bromodesoxyuridin (BrdU).. | 32 |
| Abbildung 9: Zellzyklusmessung unter Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). | 34 |
| Abbildung 10: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärennt wachsenden Zellen in Anwesenheit von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) im Vergleich zur Kontrolle ohne LIF. | 35 |
| Abbildung 11: Zellzyklusmessung unter Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)... | 36 |
| Abbildung 12: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärennt wachsenden Zellen in Anwesenheit von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) im Vergleich zur Kontrolle ohne BDNF. | 37 |
| Abbildung 13: Zellzyklusmessung unter Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8). | 38 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 14: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) im Vergleich zur Kontrolle ohne FGF8..... | 39 |
| Abbildung 15: Zellzyklusmessung unter Sonic Hedgehog (SHH) | 40 |
| Abbildung 16: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Sonic Hedgehog (SHH) im Vergleich zur Kontrolle ohne SHH..... | 41 |
| Abbildung 17: Zellzyklusmessung unter Epidermal Growth Factor 100µl/ml (EGF100) | 42 |
| Abbildung 18: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Epidermal Growth Factor mit 100µl/ml (EGF100) im Vergleich zur Kontrolle ohne EGF100. | 43 |
| Abbildung 19: Zellzyklusmessung unter L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA).. | 44 |
| Abbildung 20: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) im Vergleich zur Kontrolle ohne L-DOPA..... | 45 |
| Abbildung 21: Zellzyklusmessung unter Trichostatin A (TSA)..... | 46 |
| Abbildung 22: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Trichostatin A (TSA) im Vergleich zur Kontrolle ohne TSA..... | 47 |
| Abbildung 23: Zellzyklusmessung unter 5-Azacytidin (5AC). | 48 |
| Abbildung 24: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von 5-Azacytidin (5AC) im Vergleich zur Kontrolle ohne 5AC. | 49 |
| Abbildung 25: Zellzyklusmessung unter Valproinsäure (VPA).. | 50 |
| Abbildung 26: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Valproinsäure (VPA) im Vergleich zur Kontrolle ohne VPA. Messung durch mikroskopische Zellzählung..... | 51 |
| Abbildung 27: Zellmorphologie unter Valproinsäure (VPA) | 52 |
| Abbildung 28: Wachstumskurven für die 4 Versuche mit adhärent wachsenden Zellen in Anwesenheit von Retinsäure (RA) im Vergleich zur Kontrolle ohne RA. | 53 |
| Abbildung 29: Zellzyklusmessung der Zellen in Suspension unter Retinsäure 1 Woche nach Konvertierung. | 54 |
| Abbildung 30: Zellmorphologie unter Retinsäure. | 55 |
| Abbildung 31: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter Standard Konvertierungsbedingungen..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 32: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Trichostatin A (TSA)..... | 58 |
| Abbildung 33: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)..... | 60 |
| Abbildung 34: Propidiumiodid (PI)/Annexin Färbung unter der zusätzlichen Zugabe von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)..... | 62 |
| Abbildung 35: Anteil an CD318-positiven Zellen unter dem Einfluss verschiedener Substanzen..... | 64 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren und kleinmolekularen Substanzen sowie deren spezielle physiologischen und zellulären Wirkungen..... | 8 |
| Tabelle 2: Einstellung des FACS für die Zellzyklusmessungen..... | 23 |
| Tabelle 3: Konzentrationen der zugegebenen Substanzen..... | 26 |
| Tabelle 4: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Einstellungen bei der Messung mit Annexin V-FITC Detection KIT..... | 28 |
| Tabelle 5: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Einstellungen bei der Messung mit CD318..... | 30 |
| Tabelle 6: Übersicht über die Versuche über den Einfluss von neurotrophen und kleinmolekularen Substanzen auf das Wachstum von transgerminal konvertierten adulten mesenchymalen Stammzellen..... | 66 |

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Brenner und Herrn Dr. Hans-Jörg Habisch für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die Betreuung bedanken.

Herr Dr. Habisch hat dabei mit seinem Enthusiasmus und seiner Freude für die Forschung Begeisterung erzeugt und spannende Anstöße gegeben.

Weiter möchte ich Herrn Prof. Dr. Halatsch und Herrn PD Dr. Liebau für Anregungen und wertvolle Tipps danken.

Ein großes Dankeschön geht an Franziska Clas für Ihre Unterstützung in Layout und Design Fragen.

„Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.“