

Aus der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie
Vertreten in der Sektion Naturwissenschaften durch Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse,
Standortleiter der Fraunhofer EMB

Biologisierung von Tiefenhirn-Implantaten durch Besiedelung mit adulten glandulären Stammzellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion der Naturwissenschaften-

vorgelegt von
Anja Richter
aus Dresden

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich G. Hofmann

Prüfungstermin: 01. Juni 2012

Für meine Familie

*Es gibt scheinbar zu jeder Zeit so viel Wichtiges, das erstrebenswert scheint.
Doch sind es die Banalitäten, die scheinbaren Selbstverständlichkeiten, die kleinen Momente,
die einen so unsagbar bereichern, dass man dafür schon jeden Tag dankbar sein kann.*

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	- 1 -
1. Abstract.....	- 2 -
2. Einleitung	- 3 -
2.1. Psychomotorische Erkrankungen und Therapieformen.....	- 3 -
2.2. Aufbau des humanen Hirns.....	- 4 -
2.3. Zelltypen im Hirn.....	- 5 -
2.3.1. Neurone (Nervenzellen)	- 5 -
2.3.2. Gliazellen (Glia)	- 6 -
2.3.3. Gewebeständige Stamm- und Vorläuferzellen.....	- 7 -
2.4. Basalganglien und Morbus Parkinson	- 9 -
2.5. Die Tiefenhirn-Stimulation	- 11 -
2.5.1. Implantat-Materialien in Anwendung und Forschung.....	- 13 -
2.6. Das klinische Problem: Gliose.....	- 15 -
2.6.1. Die akute Reaktion	- 15 -
2.6.2. Die chronische Reaktion.....	- 17 -
2.6.3. Reaktion der Neuronen auf die Gliose:	- 18 -
2.6.4. Einfluss eingewanderter Fibroblasten:	- 20 -
2.7. Therapeutischer Einsatz von Stammzellen für Morbus Parkinson.....	- 21 -
2.8. Adulte glanduläre Stammzellen für in vivo-Applikationen.....	- 24 -
2.9. Ziel der Arbeit	- 26 -
3. Material und Methoden	- 27 -
3.1. Material	- 27 -
3.1.1. Reagenzien und Medikamente.....	- 27 -
3.1.2. Kits	- 28 -
3.1.3. Verbrauchsmittel.....	- 28 -
3.1.4. Geräte.....	- 29 -
3.1.5. Software.....	- 29 -
3.1.6. Primer	- 30 -
3.1.7. Primärantikörper	- 31 -
3.1.8. Isotyp-Kontrollen	- 32 -
3.1.9. Sekundär-Antikörper	- 32 -
3.1.10. Lösungen.....	- 32 -
3.1.11. Medien	- 32 -
3.1.12. Zellen, Gewebe und Tiere	- 33 -
3.2. In vitro-Untersuchungen	- 34 -
3.2.1. Isolation von pankreatischen Stammzellen	- 34 -
3.2.2. Kultivierung von pankreatischen Stammzellen.....	- 34 -

3.2.3.	Analyse des RNA-Expression	- 40 -
3.2.4.	Analyse der Proteinexpression	- 44 -
3.2.5.	Untersuchungen zum Zellmetabolismus	- 46 -
3.3.	Zugversuch.....	- 47 -
3.4.	In situ-Simulation der Transplantation mit organo-typischen Hirnschnitten.....	- 47 -
3.4.1.	Anfertigung von Hirnschnitten.....	- 47 -
3.4.2.	Kultivierung von Hirnschnitten.....	- 47 -
3.4.3.	<i>Whole-mount</i> -immunhistologische Färbung von lebenden Hirnschnitten	- 48 -
3.5.	In vivo-Untersuchungen	- 49 -
3.5.1.	Zeitplan.....	- 49 -
3.5.2.	Gruppierung der Tiere	- 50 -
3.5.3.	Durchführung des Tierversuchs.....	- 50 -
3.5.4.	Tötung der Tiere und Entnahme der Proben.....	- 56 -
3.5.5.	Konzept zur immunhistologischen Analyse der Hirnschnitte	- 57 -
4.	Ergebnisse.....	- 61 -
4.1.	In vitro-Untersuchungen	- 61 -
4.1.1.	Auswahl der geeigneten glandulären Stammzellpopulation	- 61 -
4.2.	Markierung der Zellen für Transplantationsexperimente	- 65 -
4.3.	Zellbesiedlung von Implantatmaterialien	- 69 -
4.4.	Induzierbarkeit neuronaler Differenzierung	- 74 -
4.4.1.	Induktion neuraler Differenzierung durch spezifische extrazelluläre Matrix	- 74 -
4.4.2.	Induktion neuraler Differenzierung mittels Kokultur.....	- 80 -
4.5.	Simulation von Scherstress auf Zell-besiedelten Sondenmaterialien	- 84 -
4.6.	Fibrin-Schutzschicht	- 87 -
4.7.	In situ-Simulation der Zelltransplantation	- 92 -
4.8.	In vivo-Untersuchung	- 95 -
4.8.1.	GFAP	- 95 -
4.8.2.	ED-1	- 101 -
4.8.3.	Nestin.....	- 106 -
4.8.4.	Neurofilament.....	- 111 -
4.8.5.	GFP.....	- 117 -
4.8.6.	CSPG und O4	- 120 -
4.8.7.	Besonderheiten während der histologischen Tierversuchs-Auswertung	- 122 -
5.	Diskussion	- 124 -
5.1.	In vitro-Untersuchungen	- 125 -
5.1.1.	Auswahl der geeigneten Stammzellpopulation	- 125 -
5.2.	In vivo-Untersuchungen	- 136 -
5.2.1.	Vergleich der cortikalen Gliose	- 137 -
5.2.2.	Beobachtungen im Thalamus	- 142 -

5.2.3.	Gewebereaktion im Hypothalamus	- 144 -
5.2.4.	Zusammenfassende Betrachtungen	- 145 -
5.3.	Fazit	- 149 -
5.4.	Ausblick	- 150 -
5.4.1.	Grundlagenforschung:	- 150 -
5.4.2.	Anwendungsorientierte Forschung:.....	- 150 -
6.	Referenzen	- 152 -
7.	Anhang	- 158 -
7.1.	Abbildungsverzeichnis.....	- 158 -
7.2.	Tabellenverzeichnis.....	- 167 -
7.3.	Abkürzungsverzeichnis.....	- 168 -
7.4.	Induzierbarkeit mittels konventioneller Spezialmedien.....	- 169 -
7.5.	Induktion neuraler Differenzierung mit konditionierten Medien	- 178 -
7.6.	Auswertungstabellen des Tierversuches	- 180 -
7.7.	Wissenschaftliche Publikationen	- 186 -
7.8.	Diplomurkunde	- 187 -
7.9.	Diplomzeugnis	- 188 -
	Danksagung	- 189 -

1. Zusammenfassung

Die Biokompatibilität von Implantaten ist ein wichtiges Kriterium für deren erfolgreichen Einsatz zur Regenerierung von Körperfunktionen mit langfristigem Erfolg. Für neurologische Implantate trifft dies ebenso zu, da eine Fremdkörperreaktion auch im immunprivilegierten Organ Hirn eintritt. Besonders im Fall von elektrophysiologischen Implantaten stellt diese Abstoßungsreaktion ein großes Problem dar, da sie zum Funktionsverlust des Implantates führen kann, durch dessen Isolation aufgrund einer glialen Narbe. Sie wird in einem als Gliose bezeichneten Prozess von Astrocyten und Mikroglia gebildet und soll den Fremdkörper gegen das Gewebe abschotten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Biologisierung einer physikalisch optimierten Implantatgeneration als mögliche Option zur Minimierung der immunologisch vermittelten Reaktion untersucht werden.

Es kamen dabei flexible, minimal dimensionierte Implantate auf Basis von Polyimid zum Einsatz, welche mit adulten glandulären Stammzellen aus dem Pankreas besiedelt wurden. Im Hinblick auf den abschließenden Tierversuch und einer minimalen Immunogenität wurden bereits zu Beginn syngene pankreatische Stammzellen aus dem später verwendeten Modellorganismus Ratte isoliert. Dies ermöglichte eine *in vivo*-Untersuchung ohne Immunsuppression. Bevor jedoch diese Experimentserie begonnen wurde, fanden eingehende Untersuchungen der Stammzellpopulation auf dem Material statt, welche den Erhalt ihrer hohen Plastizität und Vitalität auf dem Implantatmaterial sicherstellten. Zudem wurde eine Untersuchungsmethode etabliert, um den Verbleib der Stammzellen auf dem Implantat unter Insertionsbedingungen zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Tests zeigten die Notwendigkeit einer Schutzschicht für die Stammzellen. Somit wurde in mehreren Versuchen erfolgreich eine Fibrin-Schutzschicht für die Stammzellen etabliert, welche deren Eigenschaften nicht änderte. Es wurde ebenso in *in situ*-Experimenten dargestellt, dass die gewählte Stammzellpopulation das Zielgewebe generell als Matrix akzeptiert.

Abschließend wurde ein Langzeit-Tierversuch über 24 Wochen durchgeführt, welcher die Gewebereaktion auf die biologisierten Implantate im zeitlichen Verlauf wiedergibt. Dabei wurden neue Erkenntnisse zur Gliose bis in tiefere Hirnbereiche gewonnen. Hierfür fand erstmalig ein Vergleich der Gewebereaktion in drei verschiedenen Hirnregionen (Cortex, Thalamus, Hypothalamus) statt.

Es konnte histologisch die gute Eignung flexibler Sonden für die Implantation in tiefe Hirnbereiche demonstriert werden, wobei die schnellste Reduktion der Gewebereaktion dabei mit den Stammzell-besiedelten Implantaten erzielt wurde.

1. Abstract

Biocompatibility is of key interest for designing an implant. This criterion may decide about successful longterm reconstitution of a body function by the implant. This is true for neural implants as well, as foreign body reactions occur in the immune-privileged organ brain. Especially for electrophysiological active implants these reactions harbor the key risk for loss of function in longterm applications. The reason is an encapsulating sheath of cells arising by the so called gliosis, preventing an efficient signal transduction to the nerve cells. The glial scar is formed by astrocytes and microglia with dense extracellular matrix.

This work aims to improve deep brain implants by introducing a new fully flexible class of implants with an actively integrating biologized surface made upon glandular stem cells.

Using minimal sized polyimide-based implants designed for deep-brain-stimulation in rats a biologization was performed by ensheathing those with a confluent layer of glandular stem cells.

First, the choice of stem cells was made by an introducing characterization of salivary gland stem cells and pancreatic stem cells. Both are known to influence regeneration processes in skin with a huge benefit. The latter ones showed the most promising features and the work continued exclusively with pancreatic stem cells. An extensive examination of growth performance, differentiation consistence and metabolism on different polyimides ensured their feasibility for the planned approach. Another question to answer was, whether the cellular coating of the implants survives the implantation procedure up to deep brain areas. Thus, a new experimental setting was established, that simulates the shear stress in a standardized manner. Using it, the cellular coated implant materials showed extensive abrasion of the cell sheath. Consequently, a protection strategy for the cellular coating needs to be investigated. This was done by introducing a biocompatible, clinically approved hydrogel-coating based upon fibrin. To get insights whether the cells can deal with the brain tissue as a matrix for survival, an additional in situ analysis was performed. Therefore, transgenic cells were seeded on living brain slices and immunohistochemically examined three days later. The result showed a successful homing of the GFP-transgene cells at nestin positive filaments in the brain tissue.

Thus, the final animal experiment started with examinations after 1, 6, 12 and 24 weeks in three different brain areas (Cortex, Thalamus, Hypothalamus). It gains new insights into the foreign body reaction of the different brain areas for flexible devices with and without biologization by glandular stem cells. Their suitability was proven by histochemical analysis and the best results were achieved with the stem cell-coated device, where the gliosis was almost abundant after 12 weeks.

2. Einleitung:

Diese interdisziplinäre Doktorarbeit umfasst die Untersuchung zur Besiedlung von neuronalen Implantaten mit glandulären Stammzellen pankreatischen Ursprungs. Ziel war es eine Stammzell-basierte Biokompatibilitätsoptimierung von flexiblen Implantaten zu erproben, welche das Einheilen dieser verbessern sollte. Hierzu soll zunächst kurz die Motivation, welche klinischen Ursprungs ist, eingeleitet werden. Technische Aspekte dieser Arbeit, vor allem bezüglich der Implantatmaterialien, werden anhand einiger Beispiele vorgestellt. Da die Durchführung der Forschungsarbeit einen biologischen Fokus hat, schließt sich eine Darstellung des biologischen Kontextes an.

2.1. Psychomotorische Erkrankungen und Therapieformen

Neurologische Erkrankungen verursachen in der Europäischen Union etwa ein Drittel aller jährlichen Kosten im Gesundheitswesen. Die meisten finanziellen Mittel psychomotorischer Krankheitsbilder werden dabei für Parkinson und Epilepsie aufgewendet (Abbildung 1)(Andlin-Sobocki et al., 2005).

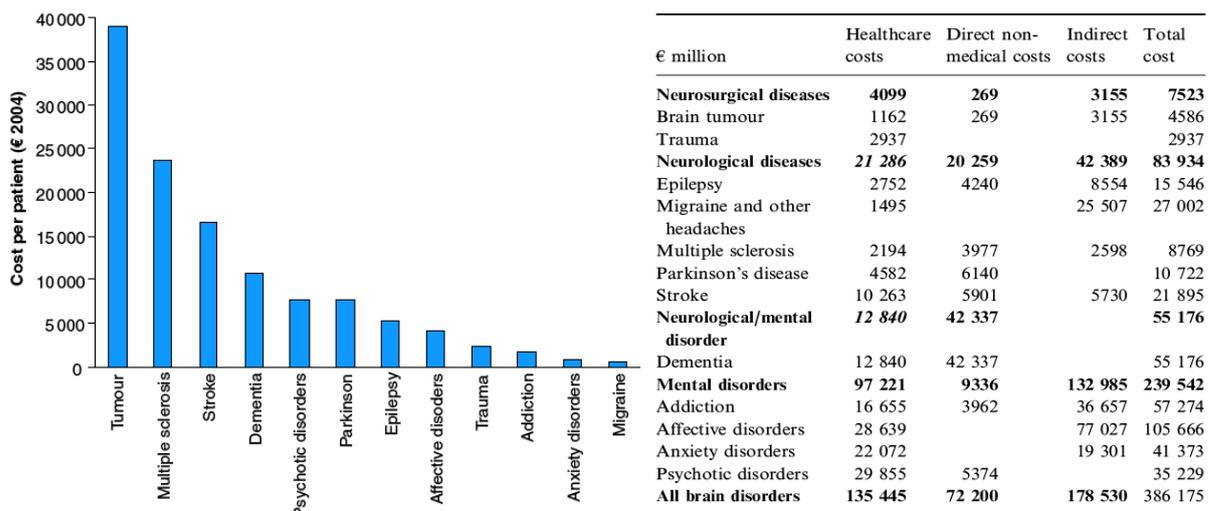


Abbildung 1: Verteilung der Kosten für Erkrankungen des Hirns in Europa im Jahr 2004. Der Graph (links) verdeutlicht die absoluten Werte (rechts) als Kosten pro Patient. Die psychomotorischen Erkrankungen mit den höchsten Kosten sind Parkinson und Epilepsie. (Andlin-Sobocki et al., 2005).

Die medikamentöse Behandlung dieser beiden Erkrankungen kann über Jahre sehr gute Erfolge erzielen, ist jedoch oft mit starken Nebenwirkungen verbunden oder zeigt in der Langzeitbetrachtung einen erheblichen Wirksamkeitsverlust durch Adaption des Körpers (Schiefer et al., 2011).

Neurologisch-psychiatrische Störungen, wie etwa Depressionen oder Verhaltensstörungen, beispielsweise obsessive Zwangsstörungen, sind in der Behandlung pro Person weniger kostenintensiv, jedoch weiter verbreitet in der Bevölkerung (Andlin-Sobocki et al., 2005). Auch diese Krankheitsbilder sind gut mit Psychopharmaka einstellbar, jedoch ebenso mit vielfältigen Problemen behaftet, die Langzeit-Therapie betreffend (Schlapfer and Bewernick,

2009; Schruers et al., 2005; Ward et al., 2010).

Sind die Nebenwirkungen oder der Wirksamkeitsverlust konventioneller Medikationen zu stark, besteht für den Patienten bei immer mehr neurologischen Erkrankungen eine weitere, langfristige Möglichkeit zur Symptom-Reduktion durch Implantation stimulierender Hirn-Elektroden unter Einsatz minimal-invasiver neurochirurgischer Techniken (Hemm and Wardell, 2010). Da die Behandlung von Parkinson mit diesen Strategien am weitesten verbreitet ist, sollen alle Betrachtungen primär für dieses Krankheitsbild gelten.

2.2. Aufbau des humanen Hirns

Das menschliche zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein bilaterales, symmetrisch gegliedertes Organ und lässt sich grob in sieben Regionen unterscheiden (Abbildung 2):

Das **Rückenmark** empfängt, prozessiert und leitet sensorische Informationen vom Körper zum Gehirn. Es stellt die Verbindung zwischen Körper und Gehirn dar. Die **Medulla oblongata** ist das Regulationszentrum aller autonomen Vitalfunktionen, wie Verdauung, Atmung oder Herzschlag. Die **Pons** überträgt

die Bewegungsinformationen von den cerebralen Hemisphären an das Cerebellum. Das **Cerebellum** moduliert Stärke und Art der Bewegung. Das **Mittelhirn** kontrolliert viele sensorische und motorische Funktionen, wie Augenbewegung oder visuelle und auditorische Reflexe. Das **Diencephalon** untergliedert sich in Thalamus und Hypothalamus. Der Thalamus

prozessiert die Informationen, welche aus den anderen Bereichen des ZNS in den Cortex geleitet werden. Im Hypothalamus werden autonome, endokrine und viscerale Funktionen reguliert. Die **cerebralen Hemisphären** untergliedern sich in eine äußere Schicht, dem Cortex, und drei innere Schichten. Zu diesen gehören die Basalganglien, welche Anteil an der motorischen Regulation haben, der Hippocampus, welcher wichtig für das Erinnerungsvermögen ist und die amygdaloiden Kerne, welche Emotionen, autonome und endokrine Regulationsmechanismen steuern. Beide Hemisphären sind über das Corpus callosum verbunden. Der Cortex wird in verschiedene Loben unterteilt und aufgrund seiner Gyri

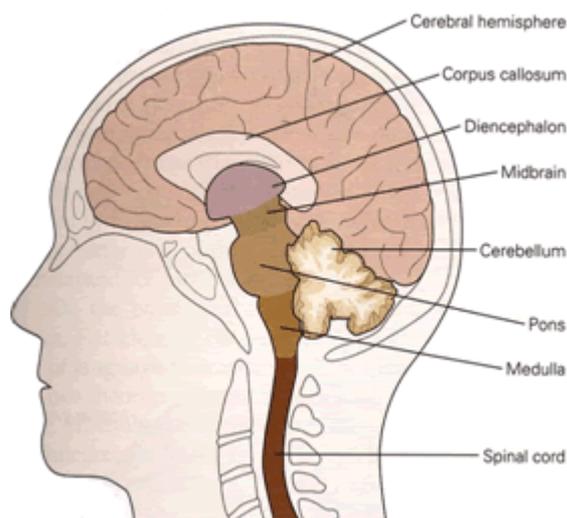


Abbildung 2: Schematische Gliederung des humanen Gehirns in die sieben wesentlichen Abschnitte. Das Rückenmark (Spinal cord) geht in die Medulla oblongata (Medulla) und anschließend in die Pons über. Zu dieser hat das Cerebellum eine enge Verknüpfung. Der Pons schließt sich das Mittelhirn (Midbrain) an. Anterior vor diesem befindet sich das Diencephalon mit Thalamus und Hypothalamus. Es wird umschlossen von den cerebralen Hemisphären, welche über das Corpus callosum verbunden sind. (Aus: Eric Kandel: Principles of neural science. 2000) .

(Leisten) und Sulci (Falten) als gefurchte graue Masse der cerebralen Hemisphären bezeichnet. Er zeichnet sich durch seine Kontralateralität aus, da jede Hemisphäre sensorische und motorische Funktionen der gegenüberliegenden Körperhälfte steuert. Dennoch sind beide Hemisphären nicht symmetrisch strukturiert oder funktionsgleich (Kandel, 2000). Zum besseren Verständnis der zellulären Komposition dieses Organs seien nun kurz die verschiedenen Zelltypen des Gehirns erläutert.

2.3. Zelltypen im Hirn

2.3.1. Neurone (Nervenzellen):

Neurone sind die Signalüberträger des Nervensystems. Ihre Morphologie ist von vier typischen Merkmalen gekennzeichnet (Abbildung 3): Der als *Soma* bezeichnete Zellkörper ist das metabolische Zentrum der Zelle und enthält neben dem Nukleus auch das Endoplasmatische Retikulum. Vom Soma ausgehend erstrecken sich zwei verschiedene Zellfortsatztypen – die Dendriten und das Axon. Die meist relativ kurzen *Dendriten* verästeln sich oft baumförmig und nehmen ankommende Signale, z.B. von anderen Neuronen, wahr. Das *Axon* ist ein langer tubulärer Ausläufer des Somas der als Hauptleiter für abgehende Signale, z.B. zu anderen Neuronen, dient. Am proximalen Abschnitt des Axons befindet sich dessen Initialsegment, der sog. Axonhügel, welcher die Triggerregion zur Generierung von Aktionspotentialen ist. Hier werden neuronale Signale nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip generiert. Das Axon kann von einer Myelinscheide umschlossen sein, welche in regelmäßigen Abständen von Ranvier'schen Schnürringen unterbrochen ist. Dies ermöglicht eine schnellere Reizleitung, welche als Saltatorische Erregungsleitung bezeichnet wird. Das Axon mündet in bis zu 1.000 Verästelungen, den sog. Endknöpfchen. Jedes von ihnen formt mit der nachfolgenden Zelle eine Synapse. Die *Synapse* ist keine feste morphologische Verbindung zwischen beiden Zellen, sondern die Endknöpfchen des "sendenden" Neurons, welches als präsynaptisches Neuron bezeichnet wird, richten einen Teil der Zellmembran gegen die "empfangende" respektive postsynaptische Zelle. Dazwischen liegt ein synaptischer Spalt über diesen hinweg die sog. Neurotransmitter diffundieren und in der postsynaptischen Zelle ein Signal generieren. Die Synapse als solche wird also von der prä- und postsynaptischen Membran und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt gebildet.

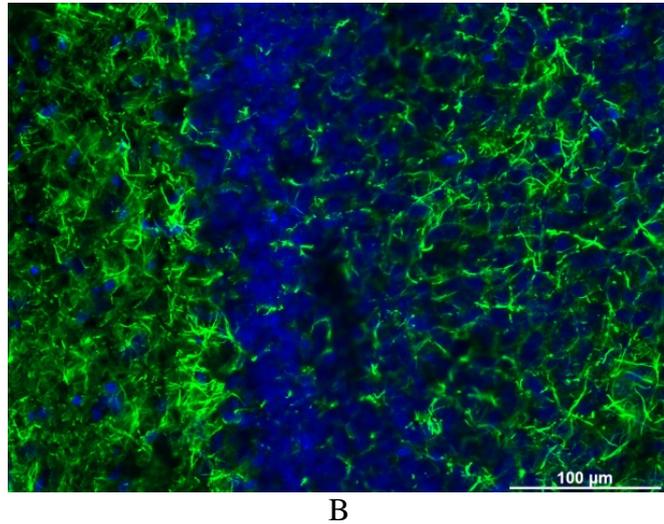
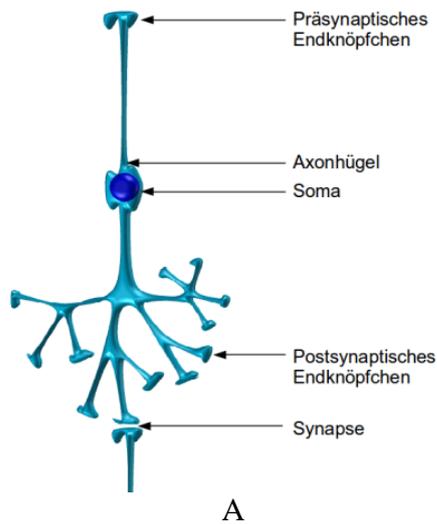


Abbildung 3: Schema einer charakteristischen Neuron-Morphologie (A). Im Hirngewebe erscheint dieser Zelltyp vornehmlich durch ein filigranes Geflecht seiner filamentären Ausläufer (B; grün: Neurofilament, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)

2.3.2. Gliazellen (Glia):

Diese Helfer-, Stütz- und Ernärerzellen des Nervensystems sind in Wirbeltieren 10-50 mal häufiger vorhanden als Nervenzellen. Ihr Name leitet sich von vom griechischen Wort für "kleben" ab und kennzeichnet damit eine wichtige Eigenschaft dieser Zellgruppe: sie umgeben in engem Kontakt Soma, Axone und Dendriten der Neurone. Es wird postuliert, dass sie keinen Einfluss auf die Signalprozessierung der Neurone besitzen. Die wichtigsten Zelltypen der Glia des zentralen Nervensystems sind:

3.3.2.1. Astrocyten

Astrocyten stellen den größten Anteil an Gliazellen. Wie der Name schon andeutet besitzen sie eine sternförmige Morphologie, welche von langen Fortsätzen, tw. mit Endfüßen gekennzeichnet ist (Abbildung 4). Diese Endfüsschen liegen entweder der Zellmembran von Neuronen an und dienen dann deren Nährstoffversorgung oder sie umschließen die Blutgefäße, wobei durch Bildung von tight junctions mit den Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke hergestellt wird. Astrocyten sind desweiteren hochpermeabel für Kalium-Ionen. Dadurch bereinigen sie die Synapse und schützen benachbarte Neuronen vor Fehlaktivierung oder Exocytotoxizität. Ebenso ist bekannt, dass die Astrocyten Neurotransmitter aus dem Synaptischen Spalt aufnehmen können, um diesen zu bereinigen.

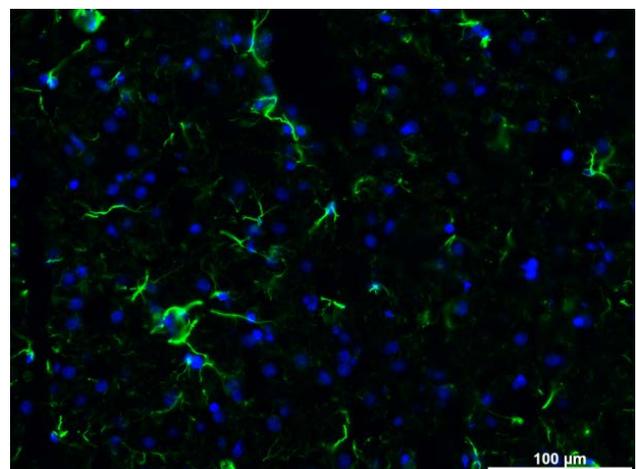


Abbildung 4: Astrocyten im Hirngewebe. In regelmäßiger Verteilung sind stern-förmige Zellen mit verschiedenen langen Ausläufern im Hirngewebe zu finden (grün: GFAP, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)

3.3.2.2. Oligodendrocyten

Oligodendrocyten sind kleine Zellen mit wenigen Fortsätzen. Im Zentralen Nervensystem sind es nicht mehr als 15 Ausläufer, die zu verschiedenen Axonen aussprossen und dort eine isolierende Myelinscheide synthetisieren. Wie oben bereits angedeutet wird durch diese eine saltatorische Erregungsleitung hervorgerufen. Im peripheren Nervensystem heißt ihr Analogon Schwann'sche Zelle, welche jedoch nur für ein Neuron eine Myelinscheide synthetisieren kann, deren Zusammensetzung sich auch von der im Zentralen Nervensystem unterscheidet. Oligodendrocyten sind also die klassischen isolierenden Zellen im Gehirn.

3.3.2.3. Mikroglia

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Astro- und Oligodendrocyten, welche auch als Makroglia zusammengefasst werden, hat die sog. Mikroglia keinen neuronalen Ursprung. Die Mikroglia ist eng mit den Makrophagen verwandt und hat somit physiologisch auch eine phagozytierende Funktion im Gewebe (Abbildung 5). Sie ist der wichtigste Antigen-präsentierende Zelltyp im Zentralnervensystem und bildet somit eine, wenn auch reduzierte, immunologische Kompetenz des

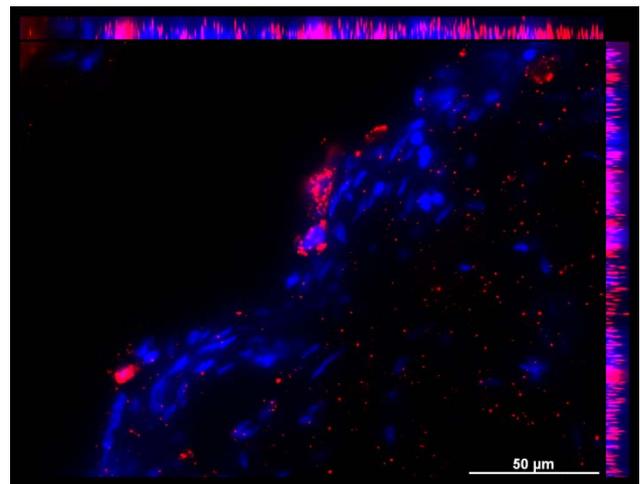


Abbildung 5: Mikroglia-Zellen (rot) in einer Läsion. Die gewebsständigen Immunzellen wandern im Fall einer Verletzung an die betroffene Stelle und bereinigen sie von Zell-Trümmern. (rot: ED-1, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x)

Hirngewebes. Entsprechend werden sie bei Verletzung, Infektion oder Erkrankung rekrutiert und aktiviert, was pathologisch durch einen ausgeprägten einseitigen Zellfortsatz erkennbar wird. Mikroglia-Zellen haben bei AIDS-bedingter Demenz, Multipler Sklerose, Parkinsonismus und der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle.

2.3.3. Gewebeständige Stamm- und Vorläuferzellen

In bestimmten Regionen des Gehirns sind Stammzellnischen zu finden aus denen Vorläuferzellen hervorgehen können. Es wurden Stamm- und Vorläuferzellen in der Subventrikularzone der lateralen Ventrikel und in der Subgranularzone des Hippocampus und Gyrus dentatus beschrieben (Gotz and Huttner, 2005; Leach et al., 2010; Lenington et al., 2003; Lledo et al., 2006; Mendez-Otero et al., 2005; Scheffler et al., 2005). Bisher nimmt man jedoch an, dass die durch sie vermittelte Regenerationsfähigkeit des Gewebes begrenzt ist und sie vorwiegend zur Gewebe-Homöostase dienen, weshalb größere Gewebeerstörung von ihnen nicht kompensiert werden kann (Leach et al., 2010). Aktuell gibt es mehrere Modelle ihres Dif-

ferenzierungsverhaltens, wobei häufig ein gemeinsamer Vorläufer für Neurone und Makroglia benannt wird, welcher Nestin und wenig GFAP (glial fibrillary acidic protein) synthetisiert (Abbildung 6)(Lennington et al., 2003; Mendez-Otero et al., 2005; Scheffler et al., 2005). Welche Rolle diese Zellen in der Integration eines Implantates haben könnten, soll an entsprechender Stelle nochmals aufgegriffen werden, da die pathologische Situation natürlicherweise keine normale Gewebe-Umgebung darstellt und somit die derzeit diskutierten Stamm- und Vorläuferzell-Interaktionen für den Normalzustand vermutlich nicht vorliegen.

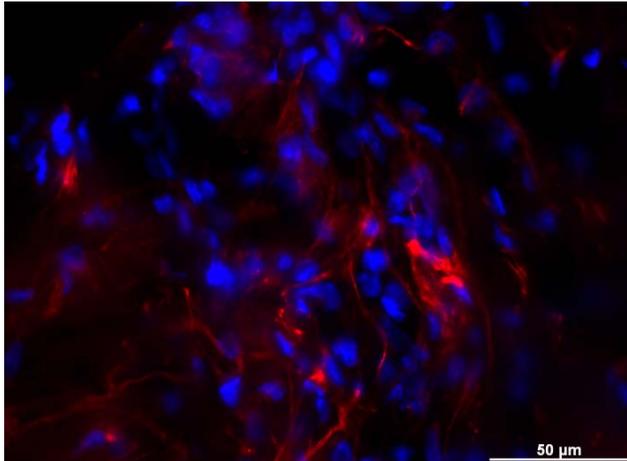


Abbildung 6: Nestin-positive residente Vorläufer- bzw. Stammzellen im Gehirn. (rot: Nestin, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x)

2.4. Basalganglien und Morbus Parkinson

Als Beispiel für psychomotorische Bewegungsstörungen soll kurz das Beispiel des Morbus Parkinson eingeleitet werden, da es für die weiterführende Betrachtungen zur Tiefenhirn-Stimulation die prominenteste Indikation ist. Das Parkinson-Syndrom entsteht durch die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra. Die Substantia nigra zählt neben dem Globus pallidus, dem Striatum (bestehend aus Putamen und Nucleus caudatus) und dem Subthalamischen Nucleus (STN) zu den Basalganglien (Abbildung 7).

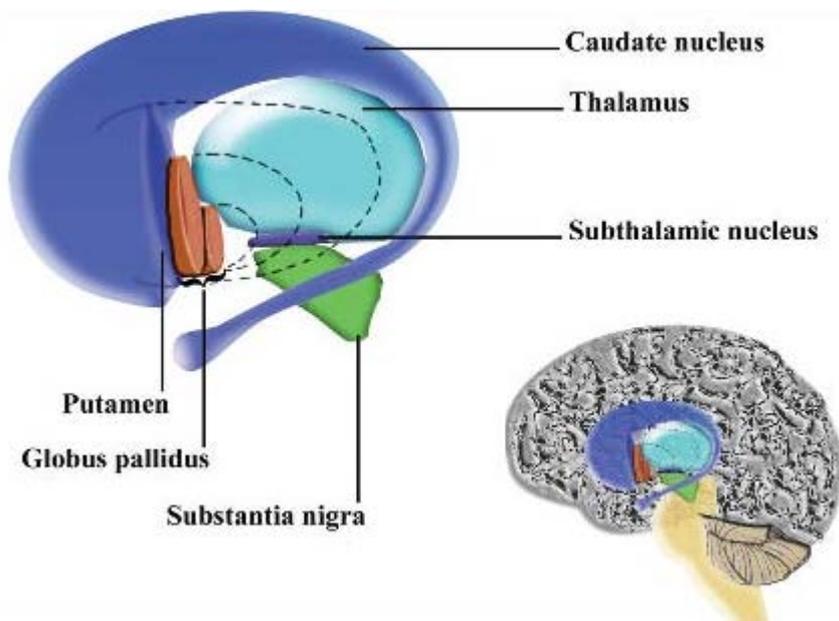


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Basalganglien im Hirn. Putamen und Nucleus caudatus (lila) werden auch als Striatum zusammengefasst. Der Globus Pallidus (orange) wird in einen medianen und lateralen Anteil gegliedert. Zwischen Thalamus (hellblau) und Substantia nigra (grün) liegt der Subthalamische Nucleus (blau). (Quelle: <http://www.acceleratedcu.re.org/msresources/neuroanatomy/>)

Sie bilden an der Basis des Vorderhirns eine funktionelle Einheit und sind nicht nur untereinander durch stringente Signalwege miteinander vernetzt, sondern weisen ebenfalls zum Thalamus und Cortex eine starke Verknüpfung auf. Diese Interaktionsnetzwerke werden als Regelkreise mit dem Zusatz der beteiligten Ganglien bezeichnet und im besonderen Fall von Morbus Parkinson ist der cortiko-striatal-pallidale Regelkreis betroffen (Abbildung 8). Dabei stellen die dopaminergen Neurone der Substantia nigra wichtige Regulatoren der cortico-striatalen Reizweiterleitung dar, also der Reizweiterleitung der aus dem Cortex stammenden Signale im Striatum zum Globus pallidus. Ihre Degeneration erschwert die Aktivierung der striato-pallido-thalamischen Signalleitung - der Thalamus wird also durch

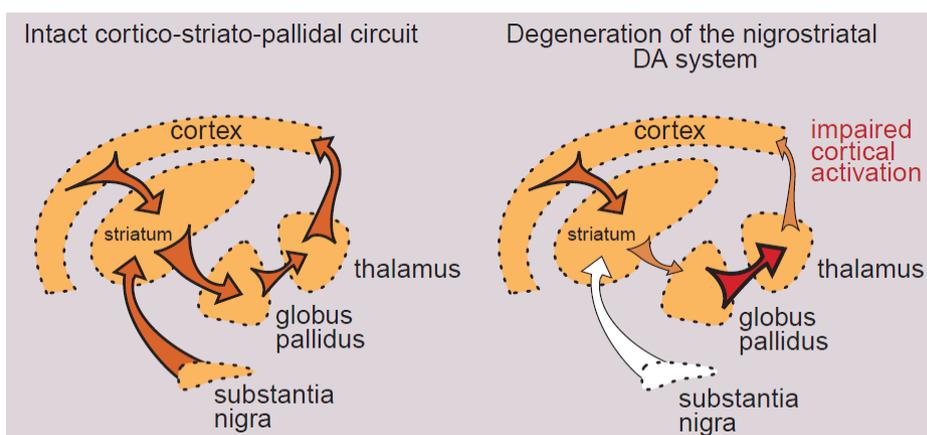
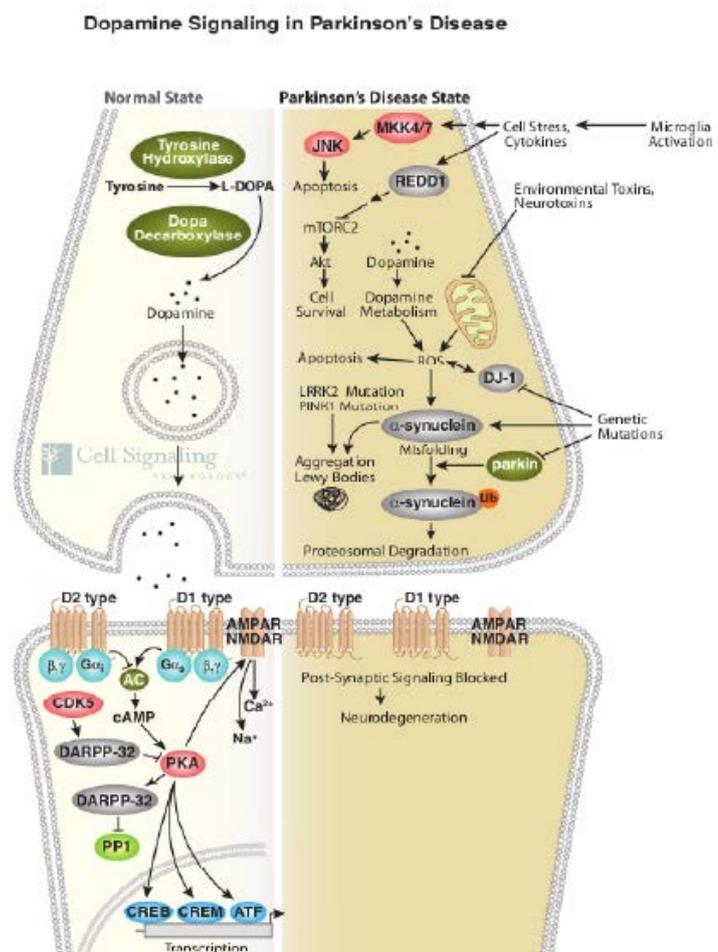


Abbildung 8: Intakter cortico-striatal-pallidaler Regelkreis (links) im Vergleich zur reduzierten nigro-striatalen dopaminergen Signalleitung bei Morbus Parkinson. Quelle: (Bjorklund and Lindvall, 2000)

fehlerhafte Aktivierung des Globus pallidus seitens des Striatums nicht korrekt stimuliert. Der Thalamus kann dadurch wiederum nicht korrekt den präfrontalen Motorcortex aktivieren und beeinträchtigte Bewegungsabläufe sind die Folge (Abbildung 8). Zu diesen Bewegungsstörungen zählen typischerweise Bradykinesie (verlangsamte Bewegung) bis hin zur Akinesie (Bewegungslosigkeit), Rigor (Muskelstarre), Tremor (Muskelzittern) sowie posturale Instabilität (Haltungsinstabilität) (Bjorklund and Lindvall, 2000; Schiefer et al., 2011).

Die molekularen Mechanismen dieser chronisch progressiven neurodegenerativen Erkrankung sollen an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden. Das Absterben der dopaminergen Neurone wird einerseits über äußere Faktoren, wie Umwelttoxine, Neurotoxine oder negative Effekte aktivierter Mikroglia hervorgerufen, welche die dopaminergen Neurone apoptotisch werden lassen (Abbildung 9). Andererseits sind auch genetische Ursachen für den Verlust der dopaminergen Signalwege bekannt. Dabei ist die Missfaltung von α -Synuclein unter Einfluss des Proteins Parkin wohl die am besten untersuchte genetische Ursache. Das Protein α -Synuclein ist als integrales Trans-transportprotein an der Dopamin-Ausschüttung beteiligt. Es kann zur Bildung von unlöslichen Lewy-Körpern durch Aggregation von α -Synuclein-Molekülen führen und somit einen Parkinson-assoziierten Morbus Alzheimer verursachen (Kandel, 2000).

Abbildung 9: Gegenüberstellung der gesunden dopaminergen Synapsenübertragung (links) zum dysfunktionalen Zustand bei Morbus Parkinson. Neben externen Faktoren, wie aktivierter Mikroglia oder toxischen Einflüssen sind auch genetische Faktoren eine Ursache für die molekulare Ausprägung von Morbus Parkinson. (Quelle: <http://www.cellsignal.com>)



2.5. Die Tiefenhirn-Stimulation

Bei der Tiefenhirn-Stimulation werden durch aktive Stimulation von erkrankten, dysfunktionalen Hirnarealen fehlende körpereigene Signale wieder hergestellt. Eine Heilung kann in diesem Fall nicht erreicht werden, jedoch vermag diese invasive Technik die Ursache der Erkrankung wesentlich genauer zu adressieren, als medikamentöse Behandlungen. Für letztere ist die Entwicklung der präzisen Wirkung in einem spezifischen Hirnareal nicht nur durch die Blut-Hirn-Schranke eingeschränkt, sondern ihre gleichzeitige Präsenz in der gesamten Physiologie des Körpers führt auf Dauer zu starken Belastungen anderer Organe, wie Niere oder Leber. Unvorteilhafterweise stellt sich häufig langfristig eine Adaption der neuronalen Strukturen an die medikamentöse Behandlung ein und somit ein Wirksamkeitsverlust unter persistenter Belastung nicht-betroffener Organe (Schiefer et al., 2011; Schlapfer and Bewernick, 2009; Schruers et al., 2005).

Für eine effektive Langzeit-Therapie werden nach Ausschöpfung der medikamentösen Möglichkeiten, in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung, zunehmend invasive Methoden, wie die Tiefenhirn-Stimulation eingesetzt, um Symptom-Reduktion herbeizuführen. Klinisch werden hierfür bisher fast ausschließlich Elektroden der Firma Medtronic verwendet, welche als rigide stabförmige Elektroden im Schädel verankert sind. Ihre mit vier Elektrodenkontakten versehene Spitze wurde bereits bei über 80.000 Patienten weltweit in einer stereotaktisch präzisen Operation in das betroffene Hirnareal eingepflanzt, also vorwiegend im Subthalamischen Nukleus (STN) oder Globus pallidus internus (GPi) der Substantia nigra oder dem ventral-intermediären Thalamus (VIM) (Schiefer et al., 2011). Die Elektroden werden mit dem Schädel fest verbunden und sind an Kabel angeschlossen, welche subcutan bis zum Schrittmacher reichen, welcher meist im oberen Brustbereich ebenfalls subcutan implantiert ist (Abbildung 10).

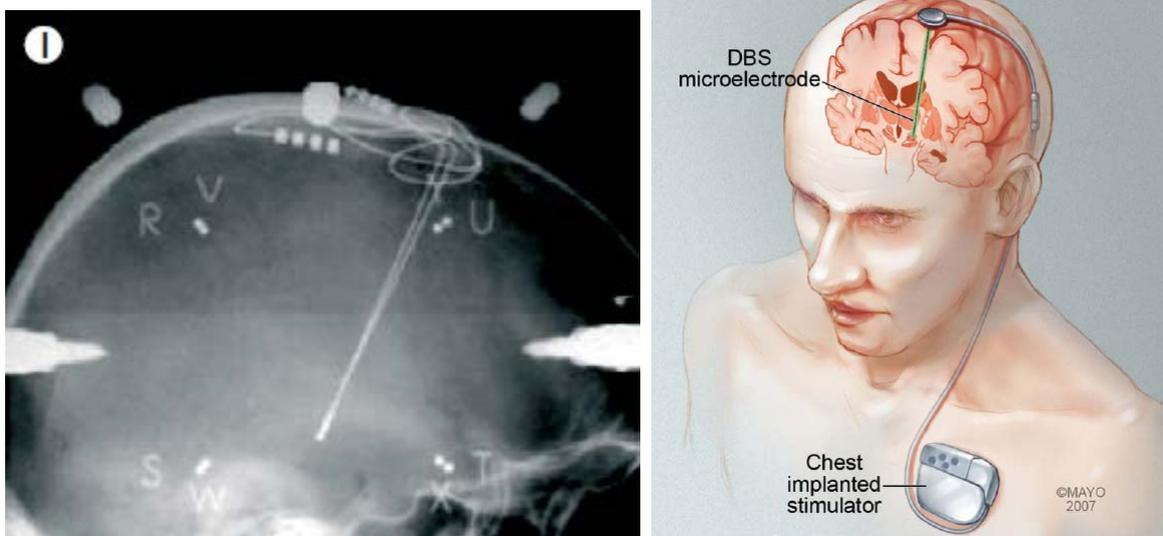


Abbildung 10: Röntgenbild von Tiefenhirn-stimulierenden Implantaten im Hirn (links). Schema der vollständigen Implantation mit subcutanen Kabeln und Schrittmacher (rechts). (Quelle: (Benabid et al., 2009; Schiefer et al., 2011))

Abhängig vom adressierten Krankheitsbild kann also eine chirurgisch präzise Positionierung der Elektroden vorgenommen werden. Mit zunehmendem Einsatz und somit Erfahrung in dieser Anwendung eröffnete sich in den letzten Jahren ein breiteres Anwendungsspektrum für die Tiefenhirn-Stimulation. Es wird neben den Bewegungsstörungen, wie Morbus Parkinson, Dystonie, Epilepsie oder Tremoren verschiedenen Ursprungs auch zunehmend ein Einsatz für psychiatrische Krankheitsbilder, wie Depression oder Zwangsstörungen angestrebt. Zudem zeigte der Einsatz solcher Implantate auch schon positive Ergebnisse in Schmerzpatienten mit chronischem Schmerz oder Cluster-Kopfschmerz (Benabid et al., 2009; Pizzolato and Mandat, 2012; Schiefer et al., 2011; Schlapfer and Bewernick, 2009; Schruers et al., 2005).

Dabei ist die weitere Anwendung der bisherigen Medikamente oft nötig, wobei sich jedoch deutlich Reduktionen der Dosierung einstellen (Pizzolato and Mandat, 2012; Schiefer et al., 2011).

Welche Wirkmechanismen der Tiefenhirn-Stimulation zugrunde liegen, wurde während der über 20 Jahre ihres Einsatzes noch nicht genau geklärt. Es wird beispielsweise eine chaotische Desynchronisation zwischen Subthalamischen Nucleus und Globus pallidus durch Interaktion mit den intrinsischen oszillatorischen Mechanismen der Neuronen des Globus pallidus vorgeschlagen (Schiefer et al., 2011; Wilson et al., 2011). Eine genauere Kenntnis dieser Zusammenhänge würde wahrscheinlich die Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen der Tiefenhirn-Stimulation erlauben. So kann es beispielsweise zu psychologischen Nebenwirkungen wie Identitätsänderungen, Stimmungsschwankungen, Hypomanie oder Angstreduktion kommen (Mackenzie, 2011; Schlapfer and Bewernick, 2009).

Hingegen ist jedoch um einiges besser bekannt, dass es auch bei Tiefenhirn-Stimulationselektroden im vermeintlich immunprivilegierten Organ Hirn zur Funktionsverminderung bzw. zum Funktionsverlust kommen kann, da die Implantate Fremdkörper darstellen. Es wird für Implantationszeiten von 2 bis 7 Jahren eine extensive Einkapselung der Implantate über ihre gesamte Länge beschrieben, welche als Gliose bezeichnet wird und zum neuronalen Zellverlust um das Implantat mit einem Radius von bis zu einem Millimeter führt (Biran et al., 2005). Dadurch wird die Signalübertragung stark eingeschränkt, denn die Elektroden werden nicht nur vom Implantat abgeschirmt, sondern zu erreichende Neuronen sind nicht in ausreichender Nähe zur Stimulation (Mercanzini et al., 2009). Diese Tatsache vermindert nach einer doch guten Funktionswiedergewinnung erneut erheblich die Lebensqualität des Patienten und soll als zentraler Ansatzpunkt für diese Arbeit dienen.

2.5.1. Implantat-Materialien in Anwendung und Forschung



Abbildung 11: Spitzen der Implantate Model 3387 (links) und 3389 (rechts) von der Firma Medtronic Corporation. (Bildquelle: Medtronic)

© Medtronic, Inc. 2008

Die weitverbreitetste Elektrodenart für die Tiefenhirn-Stimulation wird von der Firma Medtronic hergestellt und hat für die Modelle 3387 und 3389 einen Durchmesser von 1,27mm (Abbildung 11). Die vier zylindrisch um die Sonde laufenden Kontakte (Pfeile) sind selbst 1,5mm breit an der Oberfläche exponiert und bei Model 3387 über eine Länge von 10,5mm bzw. bei Model 3389 über eine Länge von 7,5mm gleichmäßig an der Sondenspitze verteilt. Nach Implantation wird in Interaktion mit dem Patienten über den Schrittmacher das Stimulationsmuster festgelegt.

Typische Größenordnungen für die Stimulation liegen bei einer Spannung von 1-4V, einer Frequenz zwischen 130Hz und 185Hz sowie einer Pulsweite von 60µs bis 450µs. Es werden dabei sowohl mono- als auch bipolare rektanguläre Stimulationsmuster eingesetzt (Hemm and Wardell, 2010; Pizzolato and Mandat, 2012).

Viele mögliche Ansatzpunkte für die Verbesserung der Wirkung von Tiefenhirn-stimulierenden Elektroden, vor allem über einen langen Zeitraum, sind Gegenstand einiger Forschungsvorhaben weltweit. Insbesondere bezüglich der Biokompatibilität des Implantates, also der Fähigkeit eines Materials, unter den spezifischen Bedingungen und einer angemessenen Fremdkörperreaktion den gewünschten Zweck zu erfüllen, werden vielseitige Anstrengungen unternommen (Marin and Fernandez, 2010; Williams, 2008). Dazu gehört beispielsweise die mechanische Adaption an das Zielgewebe oder die Erforschung von neuroattraktiven, möglichst nativen Oberflächen (Leach et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wird das Prinzip der „*compliance match*“- Hypothese verfolgt, indem etwa 20µm dünne, hochflexible Polyimid-Implantate verwendet wurden (Rousche et al., 2001; Stieglitz and Meyer, 1999). Dabei soll durch die nötige Flexibilität des Implantates bereits eine Adaption an die Festigkeit des Zielgewebes erreicht werden – also eine „weiches“ Implantat in ein „weiches“ Gewebe gebracht werden, anstelle eines rigiden Fremdkörpers.

Polyimide bilden dabei die temperaturbeständige, isolierende Gerüststruktur, in welche über lithographische Prozesse metallische Leiter eingebracht werden, weshalb sie in der Elektrotechnik als Hochleistungskunststoffe eingesetzt werden. Verschiedene Polyimide, welche für die geplante Anwendung eingesetzt werden sollten, wurden bereits auf Langzeitstabilität in vitro getestet und stellen damit eine gute Grundlage für die Applikation in vivo dar (Rubehn and Stieglitz, 2010). In die Polyimid-Gerüststruktur eingebettet wurde im

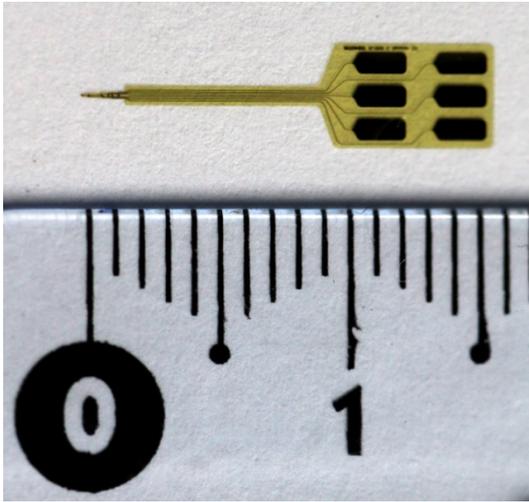


Abbildung 12: Polyimid-Elektrode mit Leitungen und Kontakten aus Platin für Versuche im Rattenmodell. Hersteller: IMTEK, Freiburg, Deutschland.

Fall der späteren Anwendungen Gold oder Platin als Elektrodenmaterial. Desweiteren ist es mit dieser Technik möglich die Implantate in ihrer Größe, verglichen zu den Medtronic-Implantaten, stark zu reduzieren. Es wurden für das Tiermodell Implantate mit einer Dicke von $20\mu\text{m}$ und einer Breite von $350\mu\text{m}$ bzw. $700\mu\text{m}$ hergestellt (Abbildung 12). Es ist also möglich in diesen Dimensionen ein funktionsfähiges elektro-physiologisches Implantat herzustellen (Mercanzini et al., 2009; Rousche et al., 2001; Rubehn et al., 2009). Ähnliche Ansätze werden

auch mit anderen Gerüstsubstanzen für die Elektroden verfolgt, wie beispielsweise Polyanilin-Polypropylen-Mischungen (Cullen et al., 2008).

Für die Steigerung der Biokompatibilität wurden ebenfalls verschiedene Techniken zur Biologisierung der Oberfläche und Attraktion von Neuronen erprobt. Dabei reicht das Spektrum eingesetzter Materialien von anti-inflammatorischen Komponenten, wie Dexamethason, Adhäsionsproteinen oder deren funktioneller Peptide über Zuckerverbindungen oder Wachstumsfaktoren bis hin zu Hydrogelen und Zellen (Kam et al., 2002; Marin and Fernandez, 2010; Purcell et al., 2009; Rao and Winter, 2009; Spataro et al., 2005; Zhong and Bellamkonda, 2008). In allen Fällen sollte eine geringere Gliose gepaart mit einer besseren Konnektivität zu umgebenden Neuronen erreicht werden. Im Sinne der Biokompatibilität muss jedoch insbesondere für die letzten beiden Möglichkeiten bedacht werden, dass Substanzen aus anderen Organismen ein hohes immunogenes Potential bergen und möglicherweise durch Aktivierung von Mikroglia-Zellen für diese Zielsetzung nur limitierte Kapazität besitzen. Ein sehr geeignetes Hydrogel, welches bisher nach hiesigem Kenntnisstand noch nicht für die Biologisierung von Tiefenhirn-stimulierenden Elektroden verwendet wurde, ist Fibrin. Dieses Polymer wird durch enzymatische Verknüpfung mittels Thrombin aus Fibrinogen gebildet und ist Bestandteil der Blutgerinnungskaskade. Es kann also theoretisch auch autolog verwendet werden und ist klinisch zugelassen. Zudem zeigte Fibrin eine positive Wirkung auf das Einsprossen von Neuriten im Rückenmark mit einhergehender Reduktion der astroglialen Aktivierung (Johnson et al., 2009a; Johnson et al., 2009b; Ju et al., 2007). Zudem ist es für die Transplantation von Stammzellen ins ZNS eine geeignete Matrix (Ho et al., 2006; Itosaka et al., 2009; Yasuda et al., 2010). Die Anwendung von Stammzellen im Hirn bei Morbus Parkinson wird in Abschnitt 2.7. nochmals erläutert.

2.6. Das klinische Problem: Gliose

Wird ein Implantat in den menschlichen Körper eingesetzt, so ist dies mit einem invasiven Eingriff verbunden. Initial liegt somit der Fremdkörper im Wundareal des Zielgewebes. Folglich tritt eine inflammatorische Wundheilung, mit dem Ziel das verletzte Gewebe zu regenerieren, ein. Nach Abklingen dieser akuten Reaktion sollte das Implantat bestenfalls im regenerierten Gewebe strukturell und funktionell integriert sein.

Für das vermeintlich immunprivilegierte Organ Hirn trifft dies ebenso zu.

2.6.1. Die akute Reaktion

Durch die Implantation von Elektroden werden neben den Meninges und dem Hirngewebe auch die Neurovaskulatur und damit die Blut-Hirn-Schranke verletzt. Dabei kommt es zum Bluteintritt ins Hirngewebe begleitet von hypoxischen Ereignissen. Die damit einhergehende Inflammation wird unter anderem auch durch die mechanische Nekrose von Hirnzellen ausgelöst und erfolgt durch Aktivierung von Mikroglia, Astrocyten und peripheren Makrophagen, welche aus den Blutgefäßen eingewandert sind. Durch Sekretion von Cytokinen, Chemokinen, Neurotransmittern sowie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wird von diesen Zellen der Entzündungsprozess vermittelt. Zudem kommt es bis Tag 4 osmotisch zum Flüssigkeitseinstrom, einhergehend mit dem Anschwellen des Gewebes und somit zur lokalen Erhöhung des physikalischen Druckes (Polikov et al., 2005). Aus den verletzten Blutgefäßen dringen ebenfalls bis Tag 4 weitere Leukocyten, Erythrocyten und Serum ein, welche ebenso Anteil an der aktiven Inflammation und Wundheilung haben (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005).

Dieser Inflammationsprozess dient initial zur Bereinigung des Wundareals von zellulärem Debris sowie per Einkapselung durch reaktive Astrocyten zur Abschottung vom gesunden Gewebe und zur Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke. Eine kaskadierende Welle der Gewebeerstörung durch die vorhandenen löslichen cyto- und besonders neurotoxischen Faktoren, wie excitatorische Aminosäuren (Glutamat), reaktive Stickstoffintermediate (NO) sowie Wasserstoffperoxid oder Superoxid-Anionen (respiratory burst), soll verhindert werden. Das Gesamtüberleben des Organs hat in diesem Prozess allerhöchste Priorität (Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004).

Betrachtet man nun den weiteren Verlauf der Gewebereaktion nach diesen initialen Ereignissen der akuten Phase, kann nach sechs bis acht Tagen die Absorption des Ödems und die Beseitigung von Debris durch die Mikroglia beobachtet werden (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005).

Durch Proliferation, Hypertrophie und verstärkte Vernetzung von Zellfortsätzen bilden

reaktive Astrocyten ein dichtes, isolierendes Geflecht um die Insertionsstelle (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004; Turner et al., 1999). Diese akute Reaktion ist als starke Impedanz sichtbar, wenn mit einer Elektrode elektrophysiologische Messungen im Gewebe stattfinden (Leach et al., 2010).

Die Akkumulation von Astrocyten wird in verschiedenen Publikationen mit unterschiedlichen Zeitverläufen dargestellt. Ursächlich hierfür sind offensichtlich experimentelle Unterschiede der verschiedenen Publikationen. Dabei haben Faktoren, wie Elektrodenmaterial, -durchmesser und -form, Insertionsweg und -weise sowie -geschwindigkeit einen starken Einfluss auf die zeitlichen Differenzen, jedoch bleibt der prinzipielle Verlauf identisch (Bjornsson et al., 2006; Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004; Turner et al., 1999).

Diesem Prozess ist unverkennbar eine zentrale Rolle in der Ausprägung einer glialen Narbe zuzuschreiben, da die Zunahme der Anzahl und des Vernetzungsgrades der Astrocyten das wesentlichste Kennzeichen der glialen Narbenbildung ist. Die hierbei entstehende Zellhülle ist nach zwei Wochen noch durch eine relativ lockere Vernetzung der Astrocyten gekennzeichnet (Turner et al., 1999). Jedoch nimmt die Aktivierung von Astrocyten durch Serumfaktoren, wie Thrombin oder Albumin sowie von Makrophagen und deren Verwandten (Mikroglia) sezernierter transforming growth factor (TGF) β und Interleukin 1 (IL-1), im weiteren Verlauf zu und ist auch nach vier bis sechs Wochen in einem Radius von ca. 500 μ m um die Läsion noch deutlich erhöht (Leach et al., 2010; Silver and Miller, 2004; Turner et al., 1999). Es wurde eine starke Verdichtung der reaktiven Astrocyten in dieser Zeit beobachtet, einhergehend mit einer TGF β -2-getriebenen verstärkten Sekretion von extracellulärer Matrix, welche vorwiegend aus Chondroitinsulfatproteoglycan (CSPG) besteht (Polikov et al., 2005). Diese immunologisch induzierte Reaktion, welche nicht nur durch TGF β und IL-1 getriggert wird, sondern ebenso dem Einfluss von Interferon (IFN) γ , Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor (TNF) α oder Fibroblast growth factor-2 (FGF2) sowie mutmaßlich einigen weiteren Cytokinen unterliegt, wird mehrheitlich durch Mikroglia-Zellen und eingewanderten Makrophagen ausgelöst (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004).

Die Mikroglia und eingewanderte Phagozyten beginnen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt mit dem Implantat zu interagieren, da sie seit Beginn der Verletzung aktiviert sind und im Wundareal ihre inflammatorische und phagozytierende Wirkung entfalten (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005). Ist dieses von löslichen und phagozytierbaren Substanzen befreit, richtet sich die immunologische Antwort mit ungeschwächter Intensität gegen das Implantat. Da es jedoch durch die zuvor beschriebene Freisetzung von reaktiven Substanzen nicht beseitigt werden kann, tritt eine sog. frustrierte Phagozytose (frustrated phagocytosis)

ein (Polikov et al., 2005). Dabei reichern sich die immunologisch reaktiven Zellen auf der Implantatoberfläche an, bilden zuweilen polyenergide Riesenzellen und versuchen den Fremdkörper durch persistente, konstitutive Freisetzung von Substanzen, die in dieser Konzentration neurotoxisch wirken, zu beseitigen. Es wird hierbei zusätzlich ein chemoattraktiver Mechanismus von an der Implantatoberfläche adsorbierten Serumfaktoren, wie monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1) oder macrophages inflammatory protein-1 (MIP-1) vermutet (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005).

Neben den bereits beschriebenen pro-inflammatorischen Cytokinen sezernieren die phagozytierende Zellen zwar auch neurotrophe Faktoren, wie nerve growth factor (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), jedoch bleibt durch die persistente Freisetzung o.g. neurotoxischer Substanzen ihr Effekt limitiert (s.u.). Es wird durch die Cytokine hingegen eine verstärkte Attraktion und Aktivierung von Astrocyten hervorgerufen, da nach Bereinigung der Wunde schließlich immer noch ein Fremdkörper zu beseitigen bleibt. Somit verdichtet sich die Menge an Gliazellen zunehmend mit einhergehender verstärkter Sezernierung von extrazellulärer Matrix (Abbildung 13)(Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005).

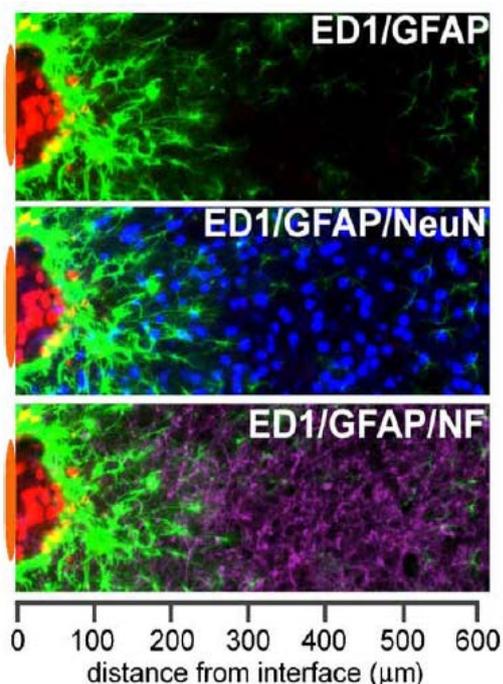


Abbildung 13: Stratifizierung zellulärer Immunreaktivität vor dem Implantat (oranger Strich links) nach 4 Wochen in vivo. Zelltypische Marker wurden immunfluoreszent gefärbt und zeigen Microglia/Macrophagen (ED-1, rot), Astrocyten (GFAP, grün), neuronale Soma (NeuN, blau) und Neurofilamente (lila). (Quelle: Biran et al., 2005)

2.6.2. Die chronische Reaktion

Wie aus der starken Verflechtung und Konzertierung der Zellinteraktionen ersichtlich ist, kann man keinen klaren Beginn einer chronischen Reaktion deklarieren. Es ergeben sich aus der konstanten Präsenz des Implantates mehrere Komplikationen im Heilungsprozess, welche letztendlich zur Etablierung einer chronischen Situation führen, die sich in einem fließenden Übergang aus der akuten Gewebeantwort bildet. Für die hiesigen Betrachtungen soll die chronische Reaktion als der Zustand definiert werden, in welchem die vollständige Ausbildung der glialen Narbe vorliegt und langfristig keine Änderungen mehr zeigt. Dabei ist nach vier bis sechs Wochen ein Zustand eingetreten, der von einer physikalischen und chemischen Barriere um das Implantat gekennzeichnet ist und als gliale Narbe (glial scar) bezeichnet wird

(Polikov et al., 2005). Es handelt sich hierbei um stark verwobene, hochkompaktierte Astrocyten, welche durch die immunologische Attraktion der auf dem Implantat

akkumulierten Mikroglia zudem eine kondensierte extracelluläre Matrix sezerniert haben. Dadurch wird das Implantat passiviert und vom Gewebe abgeschottet (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004; Turner et al., 1999). Es wurde beobachtet, dass die Verbindung zwischen den Zellen, insbesondere der Astrocyten, stärker ist, als zum Implantat, da sie sich nicht vollständig mit dem Implantat herausziehen lassen (Turner et al., 1999). Dieser Zustand wird als Anisomorphe Gliose bezeichnet (Leach et al., 2010). Die sogenannte Isomorphe Gliose ist in weniger zerstörtem Gewebe bzw. entfernter von der Implantationsstelle vorzufinden. Sie ist gekennzeichnet von hypertrophen Astrocyten, mitunter ohne gliale Narbenbildung und kann ebenfalls als Bezeichnung für das oben beschriebene Transitionsstadium zur ausgeprägten glialen Narbe verwendet werden (Leach et al., 2010).

Ist eine vollständige gliale Narbe etabliert, liegt ein kompaktes, kontinuierliches Schild an stark vernetzten Astrocyten um dem Implantat, in welchem die Identifizierung von einzelnen Zellkörpern oder -fortsätzen nicht möglich ist (Turner et al., 1999).

Es bildet hierdurch sowie über die starke Sekretion von extracellulärer Matrix, vorwiegend in Form von Chondroitinsulfatproteoglycan, eine gummiartige, feste und wachstumsbehindernde Membran um das Implantat (Silver and Miller, 2004).

2.6.3. Reaktion der Neuronen auf die Gliose:

Generell sind die Mechanismen, denen die Neuronen in diesem Regenerationsprozess folgen noch nicht so genau klassifizierbar, wie für die Gliazellen (Polikov et al., 2005).

Allgemein ist die Aussprossung und Regeneration von Axonen an eine chemotaktische Orientierung von endständigen Wachstumskegeln gebunden, welche durch Interaktion mit der extracellulären Matrix die Richtung des Axons festlegt. Der Wachstumskegel an der Spitze des Neurons orientiert sich über die Interaktion mit attraktierenden und repellenten Substanzen der extracellulären Matrix. Im Hirngewebe besteht diese mehrheitlich aus Proteoglycanen, von denen vier verschiedene Klassen von den Astrocyten synthetisiert werden: Heparansulfatproteoglycane, Dermatan-sulfatproteoglycane, Keratansulfatproteoglycane und Chondroitinsulfatproteoglycane. Zu letzteren gehören wiederum Aggrecan, Brevican, Neurocan, NG2, Versican und Phosphacan, welche allesamt wichtig während der glialen Narbenbildung sind. Ihre repellente Wirkung auf Wachstumskegel der regenerierenden Neuronen wird durch eine selektive Retraktion der Filopodien deutlich. Diese extracellulären Matrixproteine werden verstärkt von aktivierten Astrocyten und möglicherweise auch von Oligodendrocyten sezerniert. Attraktiv für die Wachstumskegel der regenerierenden Axone wiederum wirkt z.B. Laminin. Es ist in dem Matrix-Geflecht sozusagen die Zielstruktur für die Wachstumskegel. Die Richtung des Axons wird also mittels eines Zusammenspiels

attraktierender und repellenter Substanzen festlegt. Dieser Prozess ist während der ganzen Ontogenese fundamental und konserviert und findet ebenfalls bei Regenerationsprozessen des Gewebes infolge einer Verletzung statt. Nach dem initialen mechanischen Trauma der Implantation, sind entsprechend der Implantatgröße auch Neuronen zerstört oder deren Ausläufer durchtrennt. Die in der akuten Reaktion freigesetzten Substanzen der Mikroglia und Makrophagen sind mehrheitlich neurotoxisch. Sie generieren auch aufgrund ihrer kontinuierlichen Präsenz während der Wundbereinigung kein Neuronen-freundliches Milieu, weshalb sich die bereits beeinträchtigten Zellen schlecht oder nicht regenerieren können. Ebenfalls negativ wirkt sich der erhöhte Gewebe-Druck durch das Ödem aus, gekoppelt an eine schwierige osmotische Situation für die sensiblen Nervenzellen (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005).

Durch die akute Phase bildet sich eine sog. Exklusionszone (*“kill zone”*) um das Implantat, in der wenige oder keine Nervenzellen überleben. Der Radius dieser Todeszone wird je nach Literatur unterschiedlich groß angegeben, kann jedoch dauerhaft mehr als 100µm vom Implantat betragen (Polikov et al., 2005). Beobachtet wurde dabei, dass der Radius der ED-1-gefärbten Mikroglia um die Elektrode über die Zeit zunimmt, einhergehend mit einer Abnahme der NeuN- und Neurofilament- gefärbten Nervenzellen in diesem Bereich. Dies indiziert eine aktive Neurotoxizität der glialen Narbenbildung in Korrelation zur Neuroinflammation durch Mikroglia-Zellen (Polikov et al., 2005). Ähnliche Prozesse sind auch für chronisch neurodegenerative Leiden, wie die Alzheimer-Erkrankung, bekannt (Leach et al., 2010). Außerdem werden allein durch die physische Anreicherung nicht-neuronaler Zellen, also Astrocyten und Mikroglia, die Soma der Nervenzellen vom Implantat weggedrückt, was zusätzlich die gute Konnektivität des Implantates zu einzelnen Neuronen-Subpopulationen erschwert (Leach et al., 2010; Turner et al., 1999). Elektrophysiologische Messungen zeigten, dass es langfristig wahrscheinlich eher zur beschriebenen Regression von Neuronen oder langsamen Ummodellierung kommt, als zum Absterben der Zellen, da die Signalstärke sich mit der Zeit kontinuierlich verringerte. Dabei waren die stärksten Veränderungen in den ersten vier bis acht Wochen zu beobachten (Polikov et al., 2005).

Die hierfür verantwortlichen Regenerationsprozesse sind nur grob beschrieben. Es kommt beispielsweise zur Ausbildung von sogenannten dystrophischen Endkugeln (*dystrophic endbulbs/-balls*) an regenerierenden Axonen. Diese ungewöhnlich geformte Struktur wurde bereits von Ramon y Cajal (1928) beschrieben und lange Zeit für regenerativ steril gehalten, also unfähig Wachstumskegel auszubilden. Jedoch wurde in jüngerer Zeit gezeigt, dass dies durch Zugabe von BDNF möglich ist und mittlerweile konnte ein besseres subcelluläres Verständnis für diese Erscheinungen erworben werden. Erreicht ein regenerierendes Axon mit

seinem Wachstumskegel den Bereich der glialen Narbe, einem Aggrecan- und Laminin-Gradienten folgend, dann verbleibt dieser stationär an der Barriere, begleitet von einem konstanten *turnover* der distalen Membranen unter permanentem Cytoskelett-Wechsel und Integrin-Rezeptor-Austausch (Silver and Miller, 2004). Das Axon befindet sich sozusagen in einer Sackgasse, da es durch die gliale Narbe nicht hindurch sprossen, jedoch auch nicht entgegen des Aggrecan- und Laminin-Gradienten retraktieren kann. Genaueres Verständnis dieses Prozesses existiert noch nicht, jedoch wird vermutet, dass ein starker Einfluss von Proteoglycan-Gradienten vorliegt und dass ähnliche Prozesse auch bei sensorischen Neuronen natürlicherweise stattfinden, um in neuro-schädlichen Umgebungen zu überleben. Um diese dystrophischen Endkugeln lagern und verwinkeln sich zudem reaktive Astrocyten und blockieren damit physisch endgültig die Regeneration der Neurone (Silver and Miller, 2004). Neben der dystrophischen Endkugel kann es auch zum totalen Wachstumskegel-Kollaps kommen. Reife, regenerierende Axone erhalten solange ihre endständigen Wachstumskegel in dem unterstützenden Substrat der extracellulären Matrix aufrecht, bis ein Membran-Membran-Kontakt entsteht. In vivo sind diese Kollaps-induzierenden Substanzen Membranbestandteile reifer Oligodendrocyten und deren sezerniertes Myelin. Ein totaler Zusammenbruch des Wachstumskegel ist die Folge sowie die Retraktion des Axons und somit eine fehlgeschlagene Regeneration (Silver and Miller, 2004).

2.6.4. Einfluss eingewanderter Fibroblasten:

In der glialen Narbe existieren weitere inhibitorische Signale für die Wachstumskegel der Neuronen. Sema3 beispielsweise ist ein Chemorepellent, welches über den hochaffinen Rezeptor Neuropilin 1 von dem Wachstumskegel erkannt wird. Es wird von Fibroblasten synthetisiert, die z.B. aus den Meninges in die Läsion eingewandert sind. Dort wo diese Substanz vorliegt, wird eine sog. Exklusionszone (Vgl. "*kill zone*") im Zentrum der Läsion geschaffen, welche keine Neuronen enthält (Silver and Miller, 2004). Desweiteren wurde im Rückenmark eine Beteiligung von Ephrin-B2 und dessen Rezeptor EPHB2 an einer besonderen Form der glialen Narbenbildung gezeigt. Ephrin-B2 wird, anscheinend unipolar, auf der Oberfläche von aktivierten Astrocyten präsentiert. Die EPHB2-exponierenden Fibroblasten separieren sich aus der vermischten Zellpopulation und bilden im Wechsel mit den Astrocyten Zellbänder aus, welche wie eine mehrlagige Isolierschicht die Läsion umschließen. Diese spezielle Form nennt man glial-mesenchymale Narbe und ist ebenfalls eine starke Barriere für die Neuronenregeneration und -einsprossung (Silver and Miller, 2004).

Insgesamt ergibt sich aus dieser, für rigide Implantate beschriebenen Situation eine elektrische Isolation der Tiefenhirn-stimulierenden Sonde ohne funktionale Signalübermittlung.

2.7. Therapeutischer Einsatz von Stammzellen für Morbus Parkinson

Das Gehirn besitzt nur eine limitierte Fähigkeit sich selbst zu regenerieren, bzw. die funktional wichtigsten Einheiten, die Nervenzellen, nach deren Absterben zu ersetzen. Es sind bisher nur zwei Bereiche in diesem Organ beschrieben, welche residente Stammzellen enthalten: die Subventrikularzone, welche die Grenze zwischen Striatum und lateralem Ventrikel auskleidet und v.a. Neurone für das olfaktorische Epithel regeneriert und die Subgranularzone im hippocampalen Gyrus dentatus und vorwiegend Granulazellen des Gyrus dentatus hervorbringt (Gotz and Huttner, 2005; Lenington et al., 2003; Lledo et al., 2006; Mendez-Otero et al., 2005; Scheffler et al., 2005).

Da das Hirngewebe im Fall von Läsionen und vielen neurodegenerativen Erkrankungen nur sehr begrenzt zur Regeneration von Neuronen fähig ist, wurden bereits einige Applikationen getestet, in welchen Stammzellen aus anderen Quellen zur Hirnregeneration beitragen können. Beispielsweise wurden murine embryonale Stammzellen in das Striatum von Parkinson-Ratten implantiert und differenzierten zu dopaminergen Neuronen, was wiederum zur Milderung der Symptome führte (Bjorklund et al., 2002). Jedoch starben viele Tiere durch Teratome im Versuch, was in diesem Zusammenhang ein hohes Sicherheitsrisiko in dieser Anwendung bedeutet. Theoretisch würde es durch präoperative Differenzierung der Stammzellen in die gewünschte Neuronenpopulation stark reduziert, wobei sichergestellt sein muss, dass keine undifferenzierte Zelle implantiert wird. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Transplantation in dopaminerge Neuronen differenzierter embryonaler Stammzellen keine funktionale Verbesserung brachte und die Zellen schlecht in vivo überleben (Zietlow et al., 2008). In Parkinson-Patienten führte die Applikation humaner fötaler Zellen im Nucleus caudatus und Putamen zur Milderung von Symptomen wie Dyskinesien oder Wirkungsfluktuation. Jedoch stellten sich sekundäre schwere Dyskinesien als Folge der Transplantation (GID – *graft induced dyskinesia*) ein (Nikkhah, 2009). Eine Alternative wären embryonale Keimzellen, welche ähnlich wie embryonale Stammzellen pluripotent sind. Werden sie undifferenziert bzw. nicht über lange Zeiträume vorkultiviert transplantiert, wurde nach bisherigen Erkenntnissen keine Teratome beobachtet (Turnpenny et al., 2006). Unvorteilhafterweise sind diese in somatischen Geweben nicht lange genug proliferativ und in vitro differenzieren sie spontan, was eine Expansion begrenzt, weshalb für die therapeutische Applikation somit eine große Anzahl Embryonen nötig wäre, ausreichend Zellen zu liefern (Turnpenny et al., 2003; Zietlow et al., 2008). Die ethischen Bedenken, welche für beide Stammzellquellen resultieren seien nicht weiter vertieft.

Die Schwierigkeit der limitierten präoperativen Zellexpansion liegt nicht bei neuronalen

Stammzellen vor. Sie können nach Isolation aus fötalem oder adultem Hirn lange in vitro kultiviert werden und bleiben neural geprägt, was theoretisch das Tumorrisiko reduziert. Jedoch nimmt ihre Differenzierungsfähigkeit mit der Kultivierungsdauer ab und somit war nach Transplantation der nötigen Zellmengen nur ein geringer Transplantationserfolg ersichtlich. Im Tiermodell wurde die erfolgreiche Differenzierung und Integration der transplantierten Zellen schon gezeigt. Jedoch traten dabei häufig Mischpopulationen auf, gekoppelt mit der Vermutung, dass viele positive Effekte durch die Sekretion trophischer Faktoren verursacht waren (Yasuhara et al., 2006; Zietlow et al., 2008).

Die Möglichkeit zur autologen und somit ethisch einfacheren Transplantation bieten adulte Stammzellen. Hier wurde vorwiegend die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen getestet, da sie aus vielen Geweben isoliert werden können. Dabei ist besonderer Focus auf die Knochenmark-Stromazellen gelegt worden, denn sie können die Blut-Hirn-Schranke überschreiten und ins Hirn migrieren, was wiederum eine Gabe über die peripheren Blutgefäße ermöglicht und so die invasive Applikation nicht mehr nötig ist (Tang et al., 2007). Durch diese periphere Administration der Zellen wurde keine Aktivierung der gewebeständigen Immunzellen oder Gliose beobachtet. Sie sezernieren neurotrophische Faktoren und es konnte auch in vitro schon deren Transdifferenzierung in Neuronen und Gliazellen gezeigt werden, was sie für eine Zellersatztherapie geeignet erscheinen ließ (Majumdar et al., 1998; Pisati et al., 2007). In vivo zeigten die Zellen diese Charakteristika nicht mehr und überlebten meist nicht länger als vier Wochen in der Zielregion. Dyskinesien schwächen sich zwar ab, aber blieben prinzipiell erhalten, wenn die mesenchymalen Stammzellen eingesetzt wurden. Da sie nicht in dopaminerge Neuronen differenzierten, werden *Bystander*-Effekte für die Symptom-Verbesserung angenommen (Zietlow et al., 2008). Es wird vermutet, dass die krankheitsbedingte Inflammation bzw. Akkumulation toxischer Proteine zum Absterben der transplantierten Stammzellen führt und reine Stammzellpopulationen im Hirn nicht lange überleben (Zietlow et al., 2008). Weitere mesenchymale Stammzellquellen, die für Transplantationen ins Hirn getestet wurden waren beispielsweise Nabelschnurblutzellen, welche im Schlaganfallmodell in der Ratte sehr gute Effekte zeigten und für Morbus Parkinson bisher im Tierversuch die Lebenserwartung verlängerten (Ende and Chen, 2002). In klinischen Versuchen verbessern sie das Krankheitsbild nicht so gut wie primäre transplantierte Zellen. Amniocyten wurden im ischämischen Rattenhirn auch schon eingesetzt und transdifferenzierten in Astrocyten (Cipriani et al., 2007; Nikkhah, 2009; Zietlow et al., 2008).

Es sind also für die aktuell rege Forschung auf diesem Gebiet viele Ansätze vorhanden. Bisherige Erfahrungen legen einige Kriterien nahe, welche zur Verbesserung der

Symptomatik von Morbus Parkinson nötig sind und generell für den sicheren Einsatz von Stammzellen im menschlichen Körper erfüllt sein müssen. So muss vor der humanen Applikation einer Stammzell-Therapie die Proliferation und Differenzierung in spezifische Zelltypen kontrollierbar sein. Es muss eine Tumorbildung verhindert werden, indem die Zelllinien über einige Passagen hinweg gut charakterisiert werden. Dies setzt eine Langzeit-Kultivierbarkeit und Kryokonservierung technisch voraus. Für den effizienten regenerierenden Einsatz einer möglichst homogenen Zellpopulation im Menschen muss verstanden sein, wie man die pathologische Situation im Gewebe, einschließlich Inflammation und Immunreaktionen, beeinflussen kann. Nur dann ist der therapeutische Einsatz von Stammzellen möglich, sodass sie sichere, langanhaltende und substantielle Verbesserungen im Leben des Patienten mit neurologischen Erkrankungen erreichen können (Lindvall and Kokaia, 2006; Zietlow et al., 2008).

2.8. Adulte glanduläre Stammzellen für *in vivo*-Applikationen

Adulte Stammzellen aus Drüsengeweben weisen eine enorme Plastizität auf. Es wurde für pankreatische Stammzellen gezeigt, dass ihre Tochterzellen spontan neben mesodermalen Charakteristika auch endodermale und ektodermale Phänotypen annehmen können (Abbildung 14) (Choi et al., 2004; Kruse et al., 2004; Kruse et al., 2006; Rapoport et al., 2009; Seaberg et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für einfacher zugängliche Stammzellquellen, wie Speicheldrüse oder Schweißdrüse demonstriert (Gorjup et al., 2009; Petschnik et al., 2009). Selbst Oocyten-ähnliche Zellen wurden aus ihnen bereits generiert

(Danner et al., 2007).

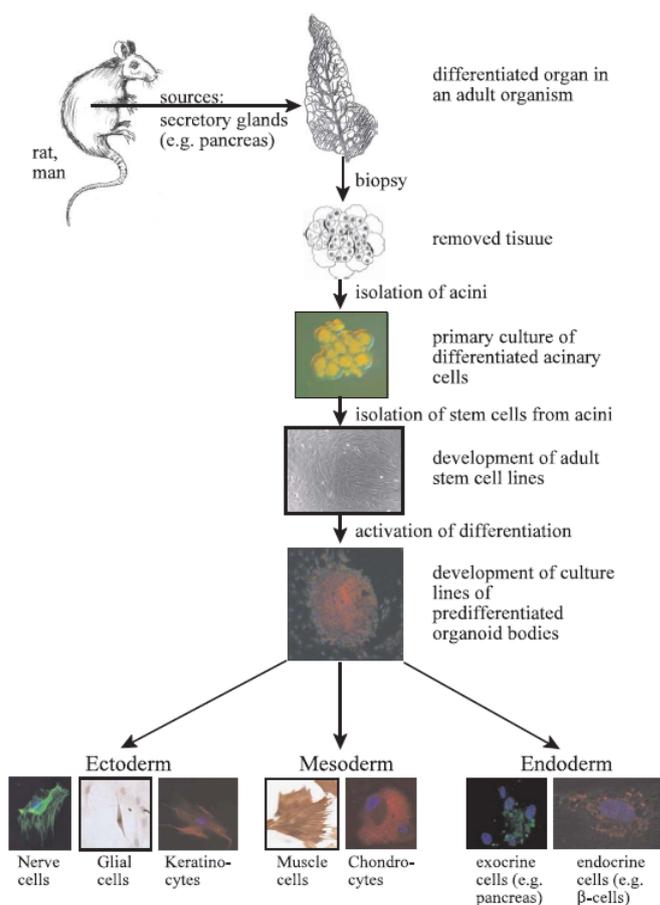


Abbildung 14: Schema zum experimentellen Ablauf der Isolation, Kultivierung und Charakterisierung adulter pankreatischer Stammzellen. (Kruse et al., 2004)

In Anbetracht der bereits zuvor dargestellten Möglichkeiten und Probleme des Einsatzes von Stammzellen zur Zelltherapie im Menschen, stellen adulte glanduläre Stammzellen eine echte Alternative zu den bisher erforschten embryonalen oder mesenchymalen adulten Stammzellen dar (Danner, 2007; Kruse et al., 2008). Für den Einsatz in der Regeneration von Hautdefekten wurden bereits pankreatische Stammzellen im Tiermodell mit sehr positiven Ergebnissen eingesetzt. Es konnte eine bessere Epithelialisierung, Vaskularisierung und verkürzte Heilungsdauer demonstriert werden (Salem et al., 2009). Für Zellen der

submandibularen Speicheldrüse wurden im Vergleich mit pankreatischen Stammzellen ebenfalls vorteilhafte Ergebnisse in der dermalen Wundheilung, insbesondere der Vaskularisierung beobachtet (Egana et al., 2009). Ob sie Anteil an dem entstandenen Gewebe durch Transdifferenzierung haben, wurde dabei nicht eindeutig festgestellt. Jedoch zeigte eine Studie zur Regeneration von β -Zellen im Pankreas, dass offenbar ein starkes instruktives Signal von den pankreatischen Stammzellen an das Zielgewebe abgegeben wird, welches die

endogene Regeneration anregt (Stevenson et al., 2011). Dabei war ein Überleben der transplantierten Zellen über einen längeren Zeitraum offenbar nicht notwendig. Anhand ihrer Proteinexpression zeigten bisher die pankreatischen Stammzellen die stärkste Tendenz bereits nicht-induziert, also spontan, neurale differenzierende Tochterzellen hervorzubringen (Gorjup et al., 2009; Rapoport et al., 2009; Seaberg et al., 2004). Es war ebenso möglich, für humane glanduläre Stammzellen aus der Parotis, der Gesamthaut und dem Pankreas eine gute neuronale Induktion durch den parakrinen Einfluss einer xenogenen Kokultur mit Rattenhirnbiopsien zu erzeugen (Petschnik et al., 2009).

2.9. Ziel der Arbeit

Die Gewebereaktion des Gehirns bei der Implantation von Tiefenhirn-stimulierenden Elektroden stellt eine Komplikation in der Langzeitanwendung dieser Implantate dar, da sie zum Wirksamkeitsverlust und damit zur rapiden Verschlechterung der Lebensqualität des Patienten führt. Dabei wird die elektrophysiologische Konnektivität von Implantaten im ZNS von drei verschiedenen Faktoren beeinflusst (He et al., 2006):

- Eine chemisch inhibierende Umgebung für neurale Ausläufer im regenerierenden Gewebe.
- Eine Erhöhung der Distanz zwischen Ableitungspunkt und nächstem Neuron.
- Eine Isolation der Sonde von umgebenden Neuronen durch Gliose, welche die Impedanz erhöht.

Diese unvollständige Biokompatibilität sollte im Rahmen dieser Arbeit verbessert werden, indem einem neuen Typ von Implantaten eine biologisch attraktive Oberfläche verliehen wird, welche fähig ist, durch aktive Interaktion mit dem Zielgewebe eine Abstoßungsreaktion zu minimieren.

Dabei sollten minimal invasive, flexible Implantate auf Basis von Polyimid mit adulten glandulären Stammzellen besiedelt werden, da diese bereits in Regenerationsprozessen der Haut sehr positive Effekte zeigten.

Zunächst musste eine geeignete Stammzellpopulation ausgewählt werden, welche anschließend auf dem Implantatmaterial hinsichtlich ihrer Erhaltung von Plastizität und Vitalität eingehend zu testen war. Desweiteren war die Möglichkeit der prä-operativen neuronalen Induktion zu überprüfen, um eine eventuelle Steigerung der Regenerationseffektivität durch potentiellen Ersatz gewebständiger Zellen abzuklären. Im Hinblick auf die Implantationsprozedur musste ebenfalls in einem für diesen Zweck entwickelten Scherstress-Experiment geklärt werden, ob die Zellbesiedelung auf der Sonde die Insertion ins Gewebe übersteht. Dabei zeigte sich, dass ein Schutzmechanismus für die Zellen nötig war, um dies zu gewährleisten. Somit wurde die Entwicklung eines effektiven und biokompatiblen Schutzmechanismus nötig, welcher zu der Überschichtung der Stammzellschicht mit einem Fibrin-Hydrogel führte. Auch für diese Kultivierungsbedingungen musste die Plastizität und Vitalität der Stammzellen sichergestellt werden. Abschließend sollte im Langzeit-Tierversuch über 24 Wochen im Tiermodell Ratte überprüft werden ob die Biologisierung der flexiblen Implantate mit glandulären Stammzellen die Gliose reduzieren kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien und Medikamente

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Medikamente mit Bezeichnung, Abkürzung und Hersteller.

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Carl Roth GmbH, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol	DAPI	Roche, Schweiz
Aceton		Carl Roth GmbH, Deutschland
Agarose (low melt)		Carl Roth GmbH, Deutschland
Bovines Serumalbumin	BSA	PAA Laboratories, Österreich
Calciumchlorid		Merck, Deutschland
Collagenase		Serva, Deutschland
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	Gibco, Deutschland
Fibrinogen (humanes Plasma)		Merck, Deutschland
Fötales Kälberserum	FKS	PAA Laboratories, Österreich
Instant Krazy(R)Glue		Elmer's Products, U.S.A
Isopropanol		Carl Roth GmbH, Deutschland
Ketamin 10%		WDT, Deutschland
Laminin		Becton Dickinson, U.S.A.
Lysis-Buffer		Chemometec, Dänemark
Methanol		Carl Roth GmbH, Deutschland
Modified Eagle's Medium		Gibco, Deutschland
Natriumchlorid		Carl Roth GmbH, Deutschland
Panthenol-Augensalbe		Bayer Vital GmbH, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin		PAA Laboratories, Österreich
Phalloidin FluoProbes 547		Interchim, Frankreich
QIAxcel Alignment Marker 15 bp/500 bp		Qiagen, Deutschland
QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII		Qiagen, Deutschland
Rompun 2%		Bayer Vital GmbH, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare		Carl Roth GmbH, Deutschland
Scandicain		AstraZeneca, Deutschland
Stabilization Buffer		Chemometec, Dänemark

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
StemPro Neuronal Supplement		Invitrogen GmbH, Deutschland
Thrombin (humanes Plasma)		Merck, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. compound		Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Trasylol®		Bayer, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid	Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Deutschland
Triton-X100		Fluka, Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure	Trypsin	PAA Laboratories, Österreich
Tween 20		VWR, U.S.A.
Vakuum-Silicon		Dow Corning, U.S.A.
Xylacin (Rompun ©)		Bayer Vital GmbH, Deutschland
Ziegennormalserum	NGS	Vector Laboratories, U.S.A.
β-Mercaptoethanol		Sigma, Deutschland

3.1.2. Kits

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Kits mit zugehörigen Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Deutschland
QuantiFast SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Deutschland

3.1.3. Verbrauchsmittel

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmittel einschließlich Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
2- Well- Chamberslides	BD Biosciences, Deutschland
6- Well- Zellkulturplatten	Techno Plastic Products, Schweiz
Deckgläschen	VWR
Gewebekultureinsätze (0,4µm Poren)	Greiner Bio- One, Deutschland
Glaspipette (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Nylonmembran	Sefar, Schweiz
Propidiumiodid- Einwegkassetten	Chemometec, Dänemark
Objektträger - SuperFrostPlus	Menzel, Deutschland
Tuberkulin-Einmalspritze mit Spardorn	Henry Schein Inc., U.S.A.
Tungsten (Wolfram-Stab) 0,008x4inch	A-M Systems Inc., U.S.A.
Vicryl-Nahtmaterial (4-0; SH-1 plus, 70cm)	Johnson&Johnson Intl., U.S.A.
Zellkulturflaschen	Techno Plastic Products, Schweiz
Zellkulturschalen	Techno Plastic Products, Schweiz

3.1.4. Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte einschließlich Hersteller

Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
Bohrer, 0,9mm Durchmesser	FineScienceTools Inc., U.S.A.
Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot pus	Carl Zeiss AG, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop AxioObserverZ.1	Carl Zeiss AG, Deutschland
Isopropanoleinfrierbox	Thermo Fisher Scientific, Denmark
Kabelloser Mikrobohrer, wiederaufladbar	Stoelting Co., U.S.A.
Kapillargelelektrophorese QIAxcel	Qiagen, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PeqLab, Deutschland
Nukleinsäureaufreinigungsroboter QIAcube	Qiagen, Deutschland
qPCR Cycler Mastercycler ep Realplex2	Eppendorf, Deutschland
Stereotaktischer Operationsrahmen Modell 900	David Kopf Instruments, U.S.A.
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf, Deutschland
Zellzählautomat Nucleocounter	Chemometec, Dänemark

3.1.5. Software

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Software und deren Quelle

Bezeichnung	Anbieter
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Deutschland
BioCalculator 3.0	Qiagen, Deutschland
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2007	Microsoft, Deutschland
realplex 2.2	Eppendorf, Deutschland

3.1.6. Primer

Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten Primer in Form von validierten QuantiTectAssays der Firma QIAGEN, Deutschland.

Gen	Hersteller-Bezeichnung	Spezifität
Acta2	Rn_Acta2_1_SG	α -smooth-muscle-actin
Act b	Rn_Actb_1_SG	β -actin (Haushaltsgen)
Cd9	Rn_Cd9_2_SG	CD9-Antigen
Eno2	Rn_Eno2_1_SG	neuronale Enolase 2- γ
Gata4	Rn_Gata4_1_SG	GATA-binding protein 4
Gfap	Rn_Gfap_1_SG	glial fibrillary acidic protein
Klf4	Rn_Klf4_1_SG	kruppel-like factor 4
Mbp	Rn_Mbp_1_SG	myelin-basic protein
Myc	Rn_Myc_1_SG	cellular myelocytomatosis oncogene
Ncam1	Rn_Ncam1_1_SG	neural cell adhesion molecule 1
Nef3	Rn_Nef3_1_SG	neurofilament 3, medium polypeptide
Nefh	Rn_Nefh_1_SG	neurofilament, heavy polypeptide
Nefl	Rn_Nefl_1_SG	neurofilament, light polypeptide
Nes	Rn_Nes_1_SG	nestin
Pou5F1	Rn_Pou5f1_1_SG	oct4
Pparg	Rn_Pparg_1_SG	peroxisome proliferator activator receptor γ
S100b	Rn_S100b_1_SG	S100 (Ca ²⁺ -bindendes Protein v. Astrocyten)
Spp1	Rn_Spp1_1_SG	secreted phosphoprotein 1, Osteopontin
Tubb3	Rn_Tubb3_1_SG	β 3-tubulin

3.1.7. Primärantikörper

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primärantikörper nach Zielprotein mit zugehörigem Quellspezies, Verdünnung, Hersteller und Gewebespezifität)

Protein	Quelle	Verdünnung	Hersteller	Gewebespezifität
α -smooth muscle actin	Maus, monoklonal	1:500	Dako, Deutschland	Mesoderm (Saint-Jeannet et al., 1994)
CSPG (NG2)	Maus, monoklonal	1:500	Millipore, U.S.A.	Ektoderm, Neurale ECM (Domowicz et al., 1995)
ED-1	Maus, monoklonal	1:100	AbDSerotec, U.S.A.	Mikroglia (Biran et al., 2005)
EGFR	Kaninchen, polyklonal	1:250	Santa Cruz, U.S.A.	Endoderm (Szuts et al., 1998)
GATA4	Maus, monoklonal	1:100	Santa Cruz, U.S.A.	Endoderm, frühe Herzentwicklung (Rojas et al., 2009)
GFAP	Kaninchen, polyklonal		Dako, Deutschland	Ektoderm, Astrocyten (Eng, 1985)
Ki-67	Kaninchen, polyklonal	1:500	Abcam, UK	Proliferation (Bulmer et al., 1988)
Nestin	Maus, monoklonal	1:500	Abcam, UK	Stammzellen (Wiese et al., 2004)
Neurofilament L	Kaninchen, polyklonal	1:1500	AbDSerotec, U.S.A.	Ektoderm, Neurone (Fedoroff et al., 1982)
Neurofilament L	Kaninchen, polyklonal	1:1500	Thermo Scientific, U.S.A.	Ektoderm, Neurone
Neurofilament M	Kaninchen, polyklonal	1:1500	AbDSerotec, U.S.A.	Ektoderm, Neurone (Fedoroff et al., 1982)
Neurofilament H	Kaninchen, polyklonal	1:1500	AbDSerotec, U.S.A.	Ektoderm, Neurone (Fedoroff et al., 1982)
Nucleostemin	Kaninchen, polyklonal	1:500	Santa Cruz, U.S.A.	Stammzellen (Nomura et al., 2009)
O4	Maus, monoklonal	1:100	Millipore, U.S.A.	Ektoderm, Oligodendrocyten (Warrington and Pfeiffer, 1992)
Troponin I (Subtyp3)	Maus, monoklonal	1:50	Acris Antibodies, U.S.A.	Mesoderm, Herz (Sasse et al., 1993)
Von-Willebrandt-Faktor	Kaninchen, polyklonal	1:500	Abcam, UK	Endoderm, Endothel (Jahroudi and Lynch, 1994)

3.1.8. Isotyp-Kontrollen

Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Isotypkontrollen. Die Konzentration wurde entsprechend der höchsten verwendeten Antikörperkonzentration im jeweiligen Färbe-Panel eingestellt.

Isotyp	Quelle	Hersteller
IgG, polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, U.S.A.
IgG, polyklonal	Maus	Santa Cruz, U.S.A.
IgG1	Maus	Santa Cruz, U.S.A.
IgG2 _a	Maus	Santa Cruz, U.S.A.

3.1.9. Sekundär-Antikörper

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Sekundär-Antikörper nach Zielorganismus und Konjugat, mit zugehörigem Ursprungsorganismus, Verdünnung und Hersteller.

Zielorganismus	Konjugat	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	FITC	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch, U.S.A.
Anti-Kaninchen	DyLight488	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch, U.S.A.
Anti-Maus	Cy3	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch, U.S.A.
Anti-Maus	DyLight594	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch, U.S.A.
Anti-Huhn	DyLight649	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch, U.S.A.

3.1.10. Lösungen

TBST: 150mM Natriumchlorid
10mM Tris (pH 8,8)
0,05% (v/v) Triton X-100
in PBS

Krebs-Ringer-Puffer:

125mM Natriumchlorid
5mM Kaliumchlorid
1,1mM Magnesiumsulfat
1,25mM Kaliumdihydrogenphosphat
2mM Calciumchlorid
0,001mM Ascorbinsäure
25mM Natriumhydrogencarbonat
10mM Glucose
Gelöst in Wasser, Carbogen-gesättigt, pH=7,4

3.1.11. Medien

10% FKS-DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS)
1 U/ml Penicillin
10 mg/ml Streptomycin

20% FKS-DMEM: DMEM
20% (v/v) FKS
1 U/ml Penicillin
10 mg/ml Streptomycin

Digestionsmedium: 10 mM HEPES Puffer
70 % (v/v) Modified Eagle's Medium
0.5 % (v/v) Trasylol
1 % (w/v) bovinem Serumalbumin
2,4 mM Calciumchlorid
0.63 PZ/mg Collagenase

Einfriermedium: 90 % (v/v) Dimethylsulfoxid
10 % (v/v) fötales Kälberserum

Isolationsmedium: 10 mM HEPES Puffer
70 % (v/v) Modified Eagle's Medium
0.5 % (v/v) Trasylol
1 % (w/v) bovines Serumalbumin
2,4 mM Calciumchlorid

3.1.12. Zellen, Gewebe und Tiere

- Adulte Stammzellen aus exokrinem Pankreas von Ratten
- Adulte Stammzellen aus submandibularen Speicheldrüsen von Ratten
- Rattenhirnbiopsien aus männlichen Sprague-Dawley oder Wistar-Ratten

Im Rahmen von Kooperationen mit der Klinik für Neurologie an der Universität zu Lübeck wurden uns versuchsbedingt dekapitierte Wistar-Männchen mit einem Alter zwischen 13 und 40 Wochen zur Verfügung gestellt.

Die GFP-transgenen Tiere des Stammes WistarTg(CAG-GFP)184Ys (NBRPRAT No.: 0273) waren eine freundliches Geschenk von Tadao Serikawa, Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan.

Für den Tierversuch wurden Wistar-Männchen von Janvier (Frankreich) im Alter von acht Wochen bezogen.

3.2. In vitro-Untersuchungen

3.2.1. Isolation von pankreatischen Stammzellen

Alle Tiere sind in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck unter tierschutzrechtlichen Vorschriften gehalten und getötet worden.

Nach Ableben des Tieres wurde dieses bis zur Organentnahme auf Eis gekühlt. Zur Entnahme des Pankreas wurde das Abdomen median eröffnet, gefolgt von je zwei rostralen und caudalen Entlastungsschnitten nach lateral. Der Darm wurde vorsichtig zur rechten Körperhälfte verschoben und der Magen unter der Leber hervorgezogen. Vom Magen absteigend konnte anschließend das zwischen ihm, der ersten Darmschlinge und der Milz aufgespannte Pankreas mit einer feinen Schere freipräpariert werden.

Das blassrosa, netzartige Gewebe des Pankreas wurde sofort in ein Becherglas mit etwas Digestionsmedium überführt und mit der Schere in feine Stücke zerkleinert. Nach Begasung mit Carbogen und Inkubation bei 37°C für 20 Minuten unter Schütteln (150rpm), wurde das Digestionsmedium abgesaugt. Hierbei war bereits anhängendes Fett, dass durch den Isolationsprozess aufschwamm, entfernt worden. Durch zweifaches Spülen mit Isolationsmedium unter erneutem Zerkleinern mit der Schere sollte weiteres Fett aus dem Gewebe entfernt werden. Nach erneuter Inkubation in Digestionsmedium für weitere 15 Minuten unter Schütteln (150rpm) bei 37°C erfolgte eine mechanische Scherung der Gewebestücke durch mehrfaches Pipettieren durch serologische Pipetten in absteigender Größe, beginnend mit 25ml bis zu 1ml Gesamtvolumen. Dadurch wurden aus den enzymatisch vorverdauten Gewebestücken die exokrinen Acini befreit. Mittels Pipettieren der erhaltenen, milchigen Flüssigkeit durch ein 250µm-Nylonnetz konnten die isolierten Acini von anderen Gewebebestandteilen getrennt und in ein 15ml-Röhrchen überführt werden. Nach dessen Zentrifugation für 5 Minuten bei 130g wurde das gebildete Pellet in 20% FKS-DMEM resuspendiert und in Zellkulturgefäße überführt. Durch mikroskopische Kontrolle konnte abschließend eine erfolgreiche Isolation pankreatischer Acini sichergestellt werden (Kruse et al., 2004). Die Kultivierung der so erzeugten primären Kulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.2. Kultivierung von pankreatischen Stammzellen

4.2.2.1. Propagation pankreatischer Stammzellen

Nach der Isolation von pankreatischen Stammzellen wurden diese bis zur Subkonfluenz (ca. 80% Bedeckung der Zellkulturfläche) kultiviert. Anschließend erfolgte eine Vereinzelung der gewonnenen Zellen zur Expansion der Population in größere Zellkulturgefäße durch Trypsinierung. Die sog. Passagierung beginnt mit dem Spülen der Zellen mit Phosphat-

gepufferter Kochsalzlösung (Phosphate buffered Saline, PBS) zur Entfernung von Proteinresten aus dem Medium, welches zuvor abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen nach erneutem Absaugen des PBS mit 0,1%-Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und im Brutschrank für 2 Minuten inkubiert. Dabei löst die Serinprotease Trypsin enzymatisch besonders effektiv die Bindung der Zellen zu ihrer Wachstumsoberfläche, da im Brutschrank bei 37°C die physiologische Temperatur erreicht wird. Sobald die Inkubationszeit abgelaufen war, wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen der Flasche mechanisch abgelöst. Eine umgehende Überschichtung mit der doppelten Menge 10%FKS-DMEM blockierte weitere Enzymwirkung auf die Zellen durch Übersättigung mit Serumproteinen. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension bei 130g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspendierung des erhaltenen Zellpellets erfolgte in frischem Kulturmedium, sodass gleiche Teile der Suspension in neue Kulturgefäße bequem überführbar waren. Dabei wurde generell eine Erhöhung der angebotenen Zellkulturfläche um den Faktor drei zugrundegelegt. Am Tag nach der Passagierung erfolgte ein Medienwechsel, um nicht-adhärenente Zellen aus dem Überstand zu entfernen, da diese durch Apoptose oder Nekrose cytotoxische Substanzen an die wachsende Zellpopulation am Boden des Gefäßes freisetzen könnten. Während der Wachstumsphase zum nächsten subkonfluenten Zellrasen fand etwa 2 mal wöchentlich ein Medienwechsel statt, sodass frische Nährsubstanzen zugeführt und Stoffwechselendprodukte entfernt wurden.

4.2.2.2. Lebendzellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde automatisiert in einem Hemazytometer mit Fluoreszenzdetektion, dem Nucleocounter, gemessen. Bei der Bestimmung der Lebendzellzahl wurde von den resuspendierten Zellen nach einem Trypsinierungsschritt ein kleines Aliquot von ca. 500 µl abgenommen. Von diesem Aliquot wiederum wurden einmal direkt 50 µl in einer Kartusche des Nucleocounters aufgezogen und gemessen. Hierbei kann nur in sterbende oder bereits tote Zellen der Kernfarbstoff Propidiumiodid eindringen, da er bei vitalen Zellen nicht fähig ist, die Zellemembran zu passieren. Die so rot gefärbten Zellen wurden also gezählt und stellen den Anteil an toten Zellen der Gesamtpopulation dar. Weitere 50 µl des Aliquots wurden inzwischen mit 50 µl *Lysis-Buffer* aus dem zugehörigen Kit von Chemometec bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 50 µl *Stabilization-Buffer* wurde die Lyse der gesamten Zellmenge gestoppt und nun konnte auch diese Probe durch Aufziehen in eine Messkartusche gemessen werden. Nach Berücksichtigung der Verdünnung um den Faktor 3 ergab sich die Gesamtzellzahl, von der man nun die toten Zellen abzog und somit die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension erhielt.

4.2.2.3. Kryokonservierung pankreatischer Stammzellen

Für die Lagerung von Zellen wurden diese nach Trypsinierung und Zentrifugation in Einfriermedium aus DMSO und FKS (1:9) resuspendiert. In spezielle Kryo-Röhrchen gefüllt fand dann ein kontinuierlicher Abkühlungsprozess der Zellsuspension in Isopropanolummantelten Boxen bei -80°C statt, wobei durch das DMSO eine intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert wird. Bei dieser Temperatur verblieben die Zellen bis zur monatlichen Überführung in einen Stickstoff-Tank bei etwa -145°C . Dort sind die Zellen mehrere Jahre lagerbar.

4.2.2.4. Auftauen kryokonservierter pankreatischer Stammzellen

Wurden Zellen aus dem Kryo-Archiv benötigt, so entnahm man ihm eines der gewünschten Kryo-Röhrchen und erwärmte dieses kurz im Wasserbad, bis der enthaltene Eiskörper sich von der Gefäßwand gelöst hatte. Anschließend füllte man das Röhrchen mit etwas vorgewärmtem 20%FKS-DMEM auf und pipettierte die gesamte Flüssigkeit in ein 15 ml-Röhrchen. Falls noch nicht alle Eispartikel so geschmolzen werden konnten, musste dieser Schritt wiederholt werden. Durch die nun folgende Zentrifugation bei 180g für 5 Minuten pelletierten die Zellen und es war möglich das Einfriermedium mit dem Absaugen des Überstandes zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen im zur Aussaat benötigten Volumen resuspendiert und in die bereitgestellten Kulturgefäße ausgesät.

4.2.2.5. Anpassung der Kultivierungsbedingungen zur Kultivierung von Zellen auf Polyimid

Sollten Zellen auf Polyimid kultiviert werden, wurde hierfür ein passendes Stück Polyimid-Film direkt auf dem Wafer (Abbildung 15) mit einem Skalpell zugeschnitten und vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen. Für Wachstumskurven wurden 1x1 cm große Quadrate angefertigt. Für immuncytochemische Untersuchungen wurde Stücken von etwa 1,5x1,8 cm geschnitten und für Transkriptionsuntersuchungen Kreise mit einem Durchmesser von 5,7 cm. Diese passten dann problemlos in dafür vorgesehene Kulturkammern oder -schalen. Zur Befestigung der Polyimid-Stücken wurde punktförmig Vakuum-Silikon auf den Boden des Kulturgefäßes aufgebracht und das jeweilige Polyimid-Stück aufgelegt. Unter vorsichtigem Streichen über den Polyimidfilm konnte das gelartige Silikon unter der Folie verstrichen werden und führte so zur vollständigen Vernetzung unterhalb des Polyimides. Für die Einsaat der Zellen wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen, wobei jedoch zunächst eine Flüssigkeitsmenge mit den Zellen aufgebracht wurde die genau den Kunststoffilm bedeckte. Nach etwa 30 Minuten Inkubation, in denen die Zellen auf dem Film absinken konnten, wurde durch vorsichtiges Eingeben von weiterem Kulturmedium über die Wandung des Kulturgefäßes auf das Gesamtvolumen im Kulturgefäß aufgefüllt.

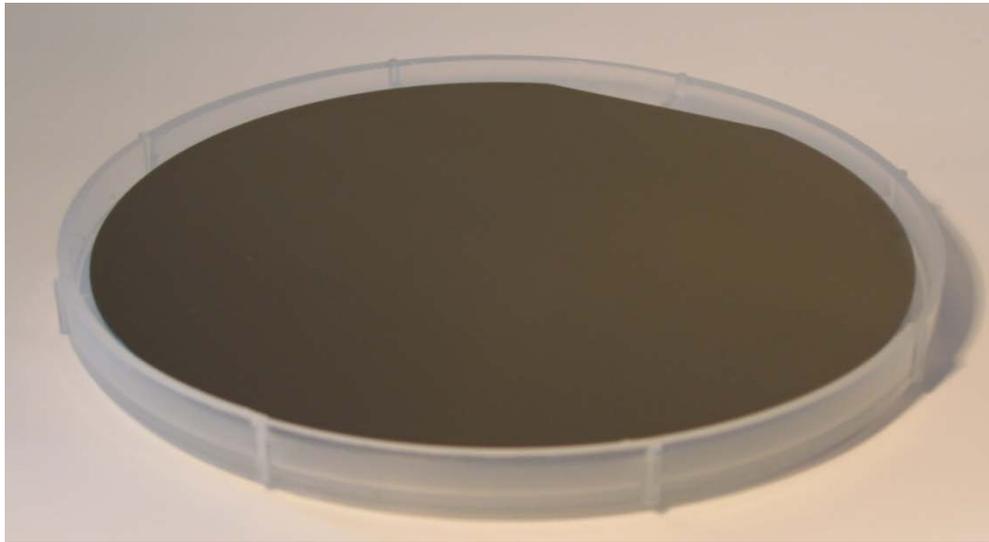


Abbildung 15: Polyimid-beschichteter 5-Zoll-Waver in passendem Kunststoffträger. Polyimid ist eine homogene Kunststoffschicht, welche als Lack auf die Waver-Fläche gesponnen wird und dann einen gleichmässigen Film bildet.

4.2.2.6. Kokultur mit Hirnbiopsien

Für die Kokultur mit Hirnbiopsien wurden die glandulären Stammzellen hochkonfluent auf Deckgläschen in einer Zellkulturplatte kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und spezielle Zellkultur-Einsätze, sogenannte ThinCerts (BD Biosciences) mit einer Porengröße von $0,4\mu\text{m}$, in die wells gehängt. Nun konnte Medium unter das Insert pipettiert werden, bis die gesamte Luft zwischen Insert und unterliegender Kammer verdrängt war (ca. 1,5ml). Nach Entnahme des Hirns aus den Tieren wurden beide Hemisphären des Cerebrums und das Cerebellum voneinander getrennt und in etwa $2\times 2\text{mm}$ große Stücke geschnitten. Von jeder Hemisphäre und vom Cerebellum wurde je ein Stück in das Insert gelegt und nun ebenfalls 0,5ml Medium zugegeben (Abbildung 16). Bei dieser Versuchsanordnung können nun lösliche Faktoren zwischen der oberen und unteren Kulturkammer ausgetauscht werden, während die Membran mit einer Porengröße von $0,4\mu\text{m}$ die Migration von Zellen blockiert. Die weitere Kultivierung fand unter normalen Bedingungen für zwei Tage statt, wenn nicht anders angegeben.

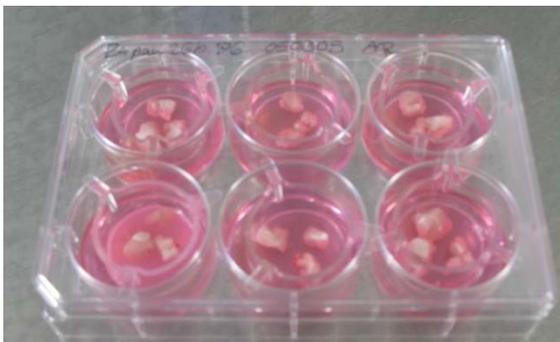


Abbildung 16: Aufbau eines Kokultur-Experimentes. In einer 6well-Platte hängen Einsätze mit Hirn-Biopsien. Sie liegen am Boden des Einsatzes auf einer Nylonmembran. Zwischen dieser und dem zellbewachsenen Deckgläschen am Boden des wells befindet sich Medium, welches sich beide biologischen Proben teilen.

4.2.2.7. Verwendung extrazellulärer Matrix-Proteine in der Zellkultur

Es kamen Laminin und Fibrin als Extrazelluläre Matrixproteine zum Einsatz.

Die Laminin-Lösung wurde aus der Stammlösung mit einer Konzentration von 2mg/ml durch Verdünnung mit normalem Kulturmedium auf eine Konzentration von 0,1mg/ml eingestellt und pro cm² Kultivierungsfläche 50µl dieser Lösung aufgetragen. Der Tropfen wurde anschließend mit einem Zellkulturschaber gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nach einstündiger Inkubation in der Werkbank wurde die überschüssige Laminin-Lösung abgesaugt und das Zellkulturgefäß kurz mit PBS gespült. Anschließend konnten die Zellen darauf ausgesät werden oder das Gefäß wurde für max. 1 Woche bei 4°C steril gelagert.

Fibrin-Gele wurden aus den zwei Komponenten Fibrinogen (human Plasma) und Thrombin (human Plasma) hergestellt. Zunächst wurde das benötigte Gesamtvolumen kalkuliert, um eine Schichtdicke von 0,5 mm zu erreichen. Dann wurde je eine Hälfte dieses Volumens an Kulturmedium in zwei 50ml-Reaktionsgefäße vorgelegt. In eines dieser Gefäße wurde nun 3,5 mg Fibrinogen pro Milliliter Medium gegeben. In das andere Gefäß wurden 5 U Thrombin dem Medium hinzugefügt. Zum Polymerisieren wurde nun die Fibrinogen-Lösung in das Zellkulturgefäß gegeben, vorsichtig und gleichmäßig verteilt und die Thrombin-Lösung überschichtet. Die weitere Polymerisation fand im Brutschrank bei 37°C statt, um die beste Enzymaktivität zu gewährleisten. Nach etwa 30 Minuten konnte das Gel mit Medium überschichtet werden, wobei das Gelvolumen vom Gesamtvolumen abzuziehen war, sodass die Gasversorgung für die Zellen unter dem Gel noch ausreichend gewährleistet war.

4.2.2.8. Herstellung von Organoid Bodies

Organoid bodies wurden nach Trypsinierung und Zentrifugation nach folgendem Protokoll hergestellt: Die Aufnahme der Zellen einer großen Zellkulturflasche (150cm²) erfolgte in 5ml Differenzierungsmedium (380ml DMEM, 95ml Hitze-inaktiviertes FKS, 5ml Glutamin, 3,5µl β-Mercaptoethanol in 5ml PBS, nicht essentielle Aminosäuren, 5ml/Penicillin-Streptomycin). Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und eine Zellkonzentration von 500.000 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde gut gemischt und nun als regelmäßige Tropfen zu je 20µl in den Deckel einer bakteriologischen Petrischale getropft. Nach zügigem Umdrehen des Deckels wurde dieser auf die mit 10ml PBS gefüllte Petrischale gesetzt und im Brutschrank inkubiert. 48 Stunden später wurde der Deckel wieder von der Petrischale entfernt und vorsichtig die Tropfen mit 2ml DMEM mit 20%FKS in eine neue bakteriologische Schale abgespült. Bei mehreren Deckeln wurden alle organoid bodies in eine neue Schale ausgespült und auf insgesamt 10 ml Medium aufgefüllt. Weitere vier Tage später konnten die organoid bodies verwendet oder weiter kultiviert werden (Kruse et al., 2006).

4.2.2.9. Färbung lebender Zellen mit LavaCell

Die Färbung von adhärennten Zellen mit LavaCell, einem rot fluoreszierenden Protein aus *Epicoccum nigrum*, erfolgte für 15 Minuten mit einer 5µM LavaCell-Verdünnung in PBS bei 37°C. Vorangehendes zweimaliges Spülen mit PBS entzog dem Zellrasen Serumproteine des Mediums, sodass der Hintergrund reduziert wurde. Anschließendes 2-faches Spülen mit PBS entfernte ebenso LavaCell-Reste, die nicht in die Zellen eingedrungen waren. Anschließend wurden die Zellen mit normalem Medium weiter kultiviert.

4.2.2.10. Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Abbildung 17) mittels Elektroporation im Microporator. Hiermit ist es möglich, kleine Zellmengen in einer speziellen Kapillare zu elektroporieren. Hierzu wurde zunächst das Optimierungsprotokoll

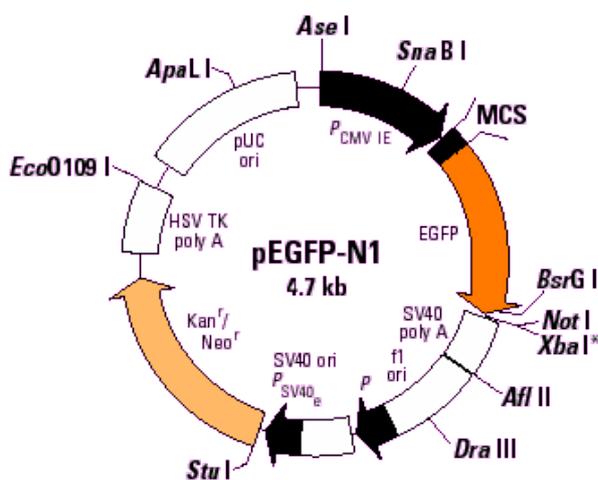


Abbildung 17: Plasmidkarte des pEGFP-N1-Plasmides.

Optimization quick protocol von Digital Bio im 24well-Format unter Verwendung von 10µl-Gold-Spitzen durchgeführt. Die Kondition Nummer 13 mit einer Spannung von 1100V, Pulsweite 20 und 2 rektangulären Pulsen wurde nach den ersten Durchführungen favorisiert. Nach Transfektion und Aussaat der Zellen waren diese bereits nach zwei Tagen konfluent und wurden passagiert. Am folgenden Tag begann die Selektion mit G418 bei einer Konzentration von 50µg/ml Kulturmedium. Da im Plasmid eine Kanamycin/Neomycin-Resistenz integriert war, würde G418 alle Zellen ohne Plasmid über die Kultivierungsdauer töten und es könnten nur solche überleben, die das Plasmid enthalten. Damit wäre auch die Selektion auf eine stabile Expression von EGFP gewährleistet, da nur Zellen überleben, die das Plasmid vervielfältigen und an ihre Nachkommen weitergeben können.

4.2.2.11. Phalloidin-Hoechst-Färbung von zellbesiedelten Oberflächen

Nach Spülen mit PBS und Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd für eine Stunde wurde drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1% Triton-X100 in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einer einstündigen Blockierung des Präparates mit 2% (w/v) BSA in PBS mit 0,1% (v/v) Hoechst (0,5µg/µl in DMSO) wurde mit Phalloidin bei einer Konzentration von 25µg/ml in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Präparate drei Mal mit PBS gewaschen und eingedeckelt.

3.2.3. Analyse des RNA-Expression

4.2.3.1. RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wurden die hierfür kultivierten Zellen 2 mal mit PBS gespült um störende Proteine aus dem Medium zu entfernen. Dann wurde erneut mit PBS überschichtet, die Flasche etwas schräg gestellt und die Zellen schnell mit einem Zellkulturschaber von der Wachstumsoberfläche in die Flüssigkeit gekratzt. Diese konnte nach Überführen in ein 15 ml-Reaktionsgefäß bei 180 g zentrifugiert werden. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet umgehend bei -80°C eingefroren. Dort verblieb es bis zur eigentlichen RNA-Isolation unter Verwendung des RNeasy Mini-Kits von Qiagen. Hierbei fand zunächst die Lyse der Zellen mit 350µl RLT-Puffer statt, dem β-Mercaptoethanol 1:100 zugesetzt war. Aus der so aufgearbeiteten Probe wurde nun mittels des RNeasy Plus Mini Kits die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgte die Messung der RNA-Konzentration und jede Probe wurde ausschließlich bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde unter Verwendung eines *NanoDrop1000*-Spectrophotometers durchgeführt. Hierbei wird die Absorption eines 2µl großen Tropfen des RNA-Eluates bei 260 und 280nm Wellenlänge ermittelt. Die sogenannte optische Dichte (OD) bei 260nm, erzeugt durch ein Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge, lässt eine Kalkulation der RNA-Konzentration zu. Hierbei liegt die Verhältnismäßigkeit von OD=1 entspricht 40µg/ml RNA zugrunde. Setzt man die OD bei 260nm zu der OD bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ins Verhältnis, erhält man eine Aussage über mögliche Verunreinigungen durch Proteine und somit über die Qualität der Aufreinigung. Als *Blank* wurde das RNase-freie Wasser verwendet, mit dem die RNA eluiert wurde.

4.2.3.3. cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die Untersuchung der gewünschten Transkripte mittels RealTime PCR muss die isolierte RNA wieder in DNA zurück übersetzt werden. Die bei dieser sog. reversen Transkription erzeugte cDNA (*complementary DNA*) wird dabei von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus Nukleotiden synthetisiert. Dieser Prozess wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei ein Verdau genomischer DNA vorgeschaltet ist. Pro Probe sind hierfür folgende Komponenten auf Eis zusammen vorgelegt worden:

- 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase
- 4 µl 5x RT-Puffer
- 1 µl RT-Primermix incl. MgCl₂ und Desoxyribonukleotidtriphosphaten

Die enzymatische Reaktion lief anschließend für 30 Minuten bei 42°C im Mastercycler ab und wurde durch einen abschließenden Inaktivierungsschritt bei 95°C für 3 Minuten beendet. Jede RNA-Probe wurde als Dublette revers transkribiert, anschließend gepoolt und wieder aufgeteilt, um zufällige Variationen in diesem Prozess zu reduzieren. Die entstandenen cDNA-Proben lagerten bis zur Verwendung bei -20°C.

4.2.3.4. RealTime Polymerasekettenreaktion

Für die Untersuchung der vorhandenen Transkripte wurde die RealTime Polymerasekettenreaktion (PCR) im *Mastercycler ep Realplex²* mit dem *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* und kommerziell erhältlichen und validierten *QuantiTect Primer Assays* durchgeführt. Bei dieser Untersuchung findet eine exponentielle Amplifikation vorhandener cDNA (Templat) mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase statt. Dazu wurden zunächst die synthetisierten cDNA-Proben mit 180µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Ein Mastermix mit folgenden Komponenten pro Ansatz wurde dann angefertigt:

- 12,5 µl 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix
- 10 µl cDNA-Probe (bzw. RNase-freies Wasser für die Templat-freie Kontrolle)

Jeder Test umfasste die Prüfung auf ein Transkript in zwei identischen Ansätzen mit einem entsprechenden Primerpaar der *QuantiTect Primer-Assays*. Also wurde der Mastermix für alle Tests einer cDNA-Probe hochkalkuliert, in einem Mix angesetzt und dann auf die vorgesehenen wells einer 96well-PCR-Platte verteilt. Nach Zugabe von 2,5 µl Primer pro well war das Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz erreicht und die Reaktion konnte gestartet werden. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 18 wiedergegeben. Beginnend mit einer Denaturierung bei 95°C wurde für 5 min die cDNA aufgeschmolzen, sodass für das anschließende Anlagern der Primer bei 60°C einzelne cDNA-Stränge vorlagen. Nach diesem sog. Annealing wurde die cDNA durch die Polymerase verlängert. Dieser Prozess fand bei Temperaturen zwischen 60°C und 72°C statt. Er wird auch als Elongation bezeichnet und führte zur Amplifikation der cDNA-Stränge indem das Primer-cDNA-Hybrid-Stück von der Polymerase durch Anknüpfen von dNTPs an den Primer dem cDNA-Strang komplementär verlängert wurde. Bei der Synthese von doppelsträngiger DNA lagerte sich der zugesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in diese ein und konnte nun durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 494nm zur Emission von Licht der Wellenlänge 521nm angeregt werden. So wird nach jeder Elongation die Menge vorhandener doppelsträngiger DNA durch Detektion

der Fluoreszenzintensität bestimmt – also in Echtzeit (engl.: *RealTime*)(Abbildung 19). Dies alles geschieht als Teil des dem 60°C-Annealing-Schritt folgenden Heizschrittes auf 95°C. Ist letztere Temperatur erreicht beginnt der gesamte Zyklus erneut mit der Denaturierung. Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine finale Aufschmelzung der PCR-Produkte über 20 Minuten bis auf 95°C. Durch diese langsame Denaturierung der doppelsträngigen DNA kann für die gebildeten Amplikons eine Schmelzkurve aufgezeichnet werden mit einem konkreten Schmelzpunkt (Abbildung 20). Dieser wurde zuvor auch für standardisierte gesamt cDNA der Spezies bestimmt und somit kann über einen Abgleich dieses Wertes die Spezifität des PCR-Produktes eingeschätzt werden.

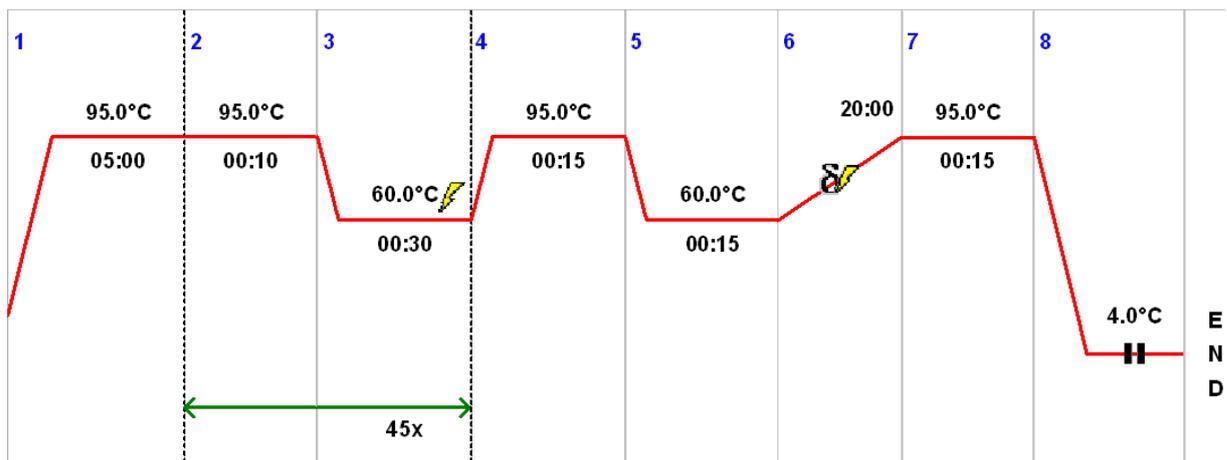


Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf eines RealTime PCR-Durchgangs. Zunächst denaturieren die Proben bei 95°C für 5:00min (1). Anschließend erfolgten 45 Zyklen aus Annealing, Elongation, Denaturierung (2 und 3). Nach einem finalen Zyklus (4 und 5) werden die Proben 20:00 min langsam aufgewärmt zur Schmelzpunktbestimmung(6). Nach der abschließenden Denaturierung (7) verblieben sie gekühlt bei 4°C (8) bis zur Entnahme.

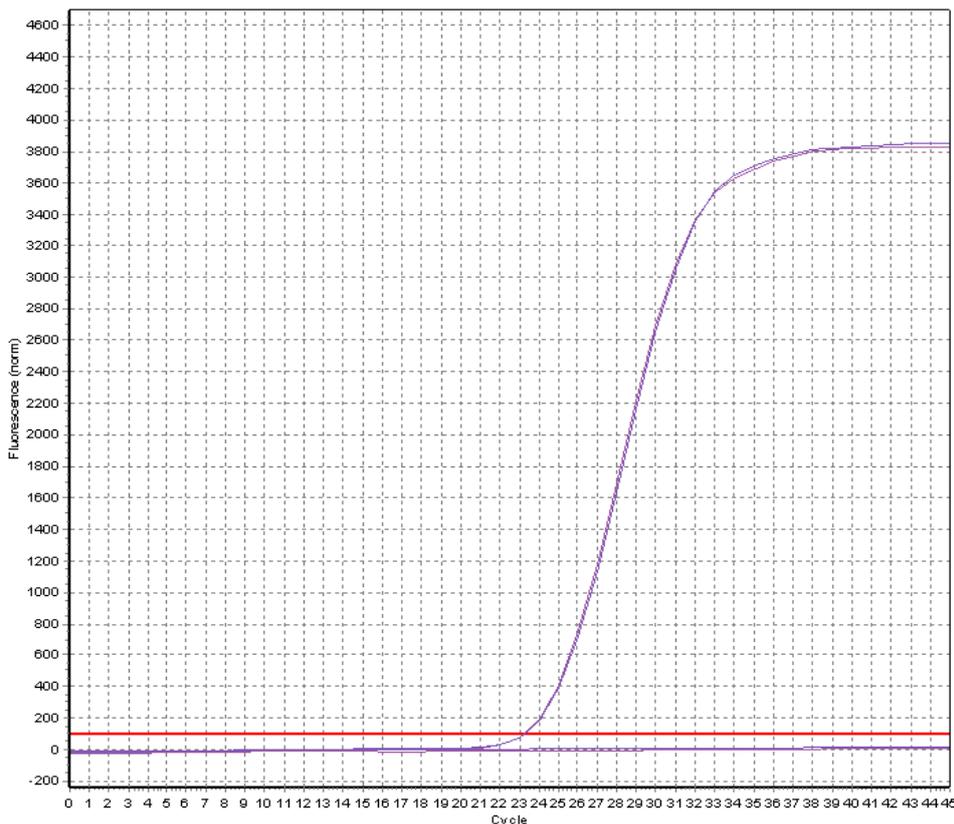


Abbildung 19: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die exponentielle Amplifikation von Neurofilament-cDNA (leichte Kette) über die Zyklen. Die exponentielle Zunahme der Amplikons beginnt etwa ab Zyklus 24 (rote Linie). Die Templatefreien Kontrollen zeigen keine Amplifikation (bleiben unter roter Linie).

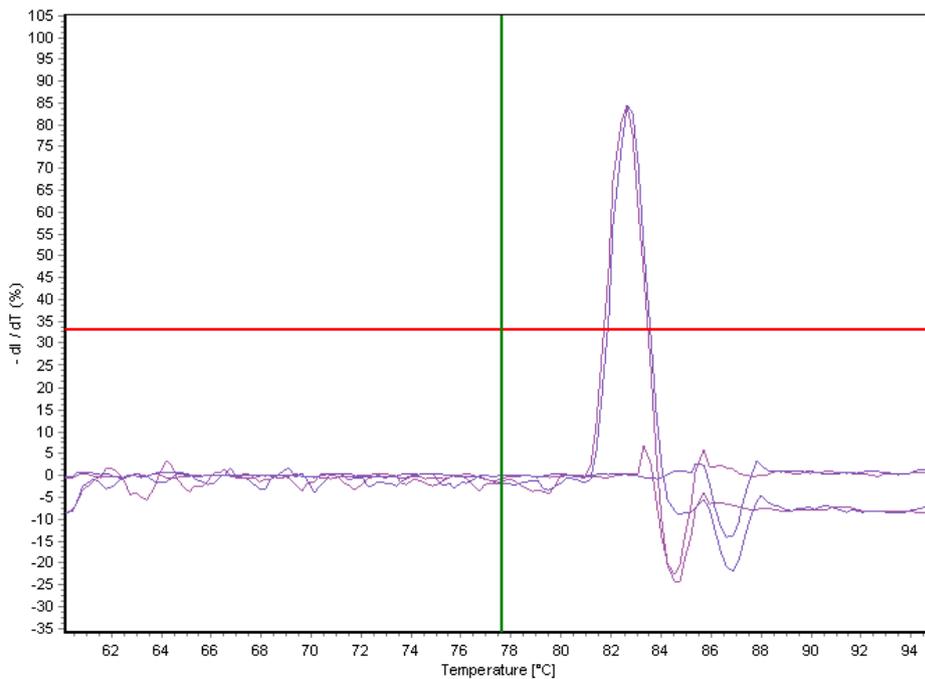


Abbildung 20: Schmelzkurve der Amplikons aus der RealTime PCR von Abbildung 20. Die Änderung der Fluoreszenzintensität (y-Achse) ist am Schmelzpunkt (x-Achse) durch Freisetzen von SYBR-Green am stärksten.

4.2.3.5. Kapillargelelektrophoretische Auftrennung

Die Visualisierung der PCR-Produkte wurde zur Qualitätskontrolle der Amplifikation und zur Illustration der Ergebnisse mit der automatisierten Kapillargelelektrophorese *QIAxcel* sowie dem zugehörigen *QIAxcel DNA Screening Kit* durchgeführt. Wie in herkömmlichen elektrophoretischen Auftrennungen von Nukleinsäuren wurden auch hier die negativ geladenen DNA-Stränge in einem elektrischen Feld, das an der Gel-Matrix anliegt, aufgetrennt. Hierzu saugte allerdings die Kapillare die Probe direkt aus der PCR-Platte auf und anschließend wurde für 7 Minuten eine elektrische Spannung von 5 kV angelegt. Dabei wanderten die Nukleinsäuren zum Pluspol mit einer Geschwindigkeit die direkt proportional zu ihrer Größe ist, denn das Agarose-Gel besitzt eine konstante Konzentration und somit Dichte. Gleichzeitig wurde in einer separaten Kapillare ein Größenstandard (z.B. *QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII*) mitgeführt, der verschiedene DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt und so eine Einordnung der PCR-Produkte erlaubte. In jeder Kapillare befand sich neben dem Gel auch der Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht Licht einer Wellenlänge zwischen 500 und 590 nm emittiert. Dieses Signal wurde von einem Photomultiplier detektiert und als Bande wiedergegeben. Die Auswertung der einzelnen Messungen in den Kapillaren erfolgte mit der zugehörigen Software *BioCalculator 3.0*. Mit diesem Programm konnten auch leichte Laufunterschiede der Kapillaren angepasst werden, wie sie beim Vergleich von zeitversetzten Aufnahmen durch unterschiedliche Umweltbedingungen oder Füllzustände der Kapillaren auftreten können. Dazu wurde jeder Probe ein sog. Alignment-Marker (*QIAxcel Alignment Marker 15 bp/500 bp*) zugesetzt, der ein 15 bp und ein 500 bp großes Fragment enthielt. Diese stellten die obere und untere Grenze des betrachteten Bereichs dar. Anhand dieser beiden

Signale wurden dann mit der Software die Bilder und somit die Laufstrecken aneinander angehängen (Abbildung 21).

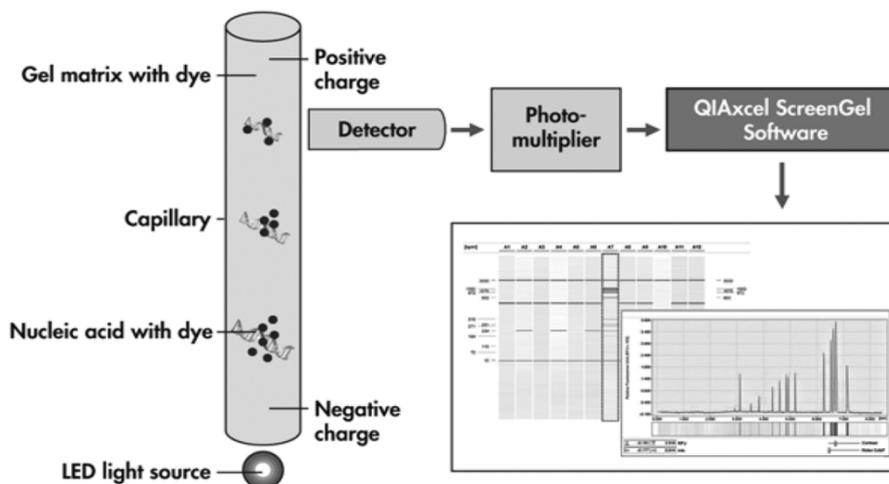


Abbildung 21: Prinzip einer Kapillargelelektrophoretischen Analyse. In der gelgefüllten Kapillare trennen sich die Nucleinsäuren größenabhängig zwischen Anode und Kathode auf. Durch Bestrahlung kann der interkalierte Farbstoff Ethidiumbromid vor einem Detektor angeregt werden. Die Laufstrecke wird mit dem Signal von der Software korreliert und als Gelbild ausgegeben.

3.2.4. Analyse der Proteinexpression

4.2.4.1. Immuncytochemie

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurde die immuncytochemische Färbung von definierten Proteinen in den kultivierten Zellen angewendet. Diese Nachweismethode wurde indirekt durchgeführt, wobei ein Primärantikörper gegen das gewünschte Paratop der Zelle gerichtet ist. Dieser kann nach seiner Bindung an das Zielprotein mit einem markierten Sekundärantikörper detektiert werden. Die Markierung des sekundären Antikörpers kann ein Fluorophor oder Enzym sein. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Ergebnisse fluoreszenter Färbungen vorgestellt, weshalb die Erläuterung zur Technik auf diese Möglichkeit beschränkt sein soll.

Für die Durchführung der Färbung wurden die Zellen zunächst fixiert. Die Wahl des Fixans ist primär von der Art des Zielproteins abhängig. Die meisten Fixierungen in dieser Arbeit sind mit einem eisgekühlten Methanol-Aceton-Gemisch (7:3) für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Einige Proteine benötigen jedoch eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA). Bei dieser Fixierung wurde der PBS-basierten PFA-Lösung zusätzlich 10% (v/v) Sucrose hinzugefügt. Wurde diese Fixierung angewendet, so ist es explizit vermerkt. Ansonsten ist immer von einer Methanol-Aceton-Fixierung auszugehen.

Während der Methanol-Aceton-Fixierung wurde bereits zur besseren Orientierung eine Gegenfärbung im Präparat durchgeführt. Mit dem Zusatz von 1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) zum Fixans konnte durch diese interkalierende

Substanz eine gute Färbung der Zellkerne erreicht werden. Im Anschluss an die Fixierung wurde dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden unspezifische Bindungen durch Übersättigung mit Normal-Ziegen-Serum (*normal goat serum*, NGS) blockiert. Dazu wurde 16,5µl NGS/ml PBS als Blockierlösung angesetzt, eine adäquate Menge auf die Probe gegeben (ca. 100µl/1cm² Probenfläche) und für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Absaugen der Blockierlösung wurde direkt die Primärantikörper-Lösung in gleichem Volumen aufgetragen. Die Primärantikörper wurden in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung mit TWEEN (*TRIS-buffered saline TWEEN*, TBST) mit 1% (v/v) BSA entsprechend der Herstellerangaben und eigener Verdünnungsreihen verdünnt. Die Inkubation erfolgte entweder für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Vor der Inkubation mit dem markierten Sekundärantikörper wurden die Proben erneut drei Mal mit PBS gespült und dann mit der Sekundärantikörper-Lösung in PBS überschichtet. Dieser Färbeschritt dauerte eine Stunde und wurde bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben erneut drei Mal mit PBS gespült und kurz mit Wasser rehydriert bevor sie mit VectaShield Mounting Medium eingedeckelt wurden. Bis zur Mikroskopie lagerten die Präparate bei 4°C.

4.2.4.2. Gewebefixierung & Kryoschnitte

Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die gewonnen Organe/Organteile direkt nach der Entnahme in 4% (v/v) Paraformaldehyd mit 10% (v/v) Sucrose in PBS bei 4°C für 4 Stunden fixiert. Da das Fixans in dieser Komposition etwa 1 mm pro Stunde ins Gewebe diffundiert, sollten die Proben einen Querschnitt von 8x8mm nicht überschreiten. Nach erfolgter Fixierung wurde die Probe dann in einer selbstgeformten Aluminium-Form in *TissueTek* (OCT) eingebettet und unverzüglich bei -80°C schockgefroren. Unter diesen Bedingungen verblieben sie bis zum Schneiden am Kryotom. Für diesen Prozess wurden die Präparate von ihrer Aluminium-Form befreit und mit etwas *TissueTek* auf einen Präparatträger in der gewünschten Orientierung im Schnellgefrierfeld gefroren. Nun konnte das Objekt in die Schneidevorrichtung eingespannt und mit dem Anfertigen der Kryoschnitte begonnen werden. Die Dicke von Hirnschnitten wurde mit 16µm gewählt, um ausreichend Zellschichten abbilden zu können. Bei anderen Präparaten wird die Dicke explizit erwähnt. Zur Aufnahme der Kryoschnitte wurden SuperFrost PLUS Gold Objektträger verwendet.

4.2.4.3. Histologie und Immunhistochemie

Die Kryoschnitte wurden zur Färbung zunächst für zwei Minuten aufgetaut. Anschließend fand eine Rehydrierung durch Überschichten mit destilliertem Wasser statt. Nach diesem Schritt wurde erneut für 5 Minuten mit 4%iger (w/v) Paraformaldehyd-Lösung mit 10% (w/v)

Saccharose fixiert, um eventuell im *whole mount* ungenügend fixierte Strukturen zu erreichen. Diesem Schritt anschließend wurden die Präparate drei Mal für jeweils fünf Minuten mit PBS gespült. Nun fand eine kombinierte Blockierung und Permeabilisierung statt. Beide Schritte wurden kombiniert, um eine minimale Anzahl Spülschritte zu erzeugen, welche jedes Mal ein erneutes Risiko bergen, die im Schnitt liegenden Hirnsonden herauszureißen. Dazu wurden pro Objektträger 500µl PBS 10% (v/v) normales Ziegen Serum sowie zu 1% (v/v) TritonX-100 hinzugefügt und diese Lösung auf die Objektträger aufgetragen. Die anschließende Inkubation fand bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über eine Zeit von einer Stunde statt. Nach diesem Schritt wurden die Objektträger gründlich von Flüssigkeit befreit ohne die Schnitte austrocknen zu lassen. Nach Umranden der Schnitte mit einem *Dako-Pen* konnten in die so hydrophob abgegrenzten Probenflächen die Primärantikörper-Lösungen aufgetragen werden. Die Primärantikörper wurden in PBS mit einem Anteil von 10% (v/v) normalem Ziegen Serum gelöst, um die Konzentration der blockierenden Substanz aufrecht zu erhalten und nicht durch Konzentrationsunterschiede einen Diffusionsgradient zu erzeugen. Die Inkubation des Primärantikörpers fand über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer statt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zur optimalen Entfernung der Primärantikörper zunächst drei Mal für je 5 Minuten mit PBS vorsichtig gespült. Dann wurde das Sekundärantikörper-Gemisch aufgetragen, welches in der gleichen Lösung wie die Primärantikörper gelöst war. Die Inkubation der sekundären Antikörper wurde für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach diesem Schritt wurde erneut drei Mal für je 5 Minuten mit PBS gespült, wobei im ersten Spülschritt 1µg/ml DAPI zugefügt war. Nach diesem Entfernen der Sekundärantikörper wurde abschließend erneut mit destilliertem Wasser überschichtet, um Salze aus dem Präparat vor dem Einbetten in *RotiMount* zu entfernen.

3.2.5. Untersuchungen zum Zellmetabolismus

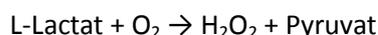
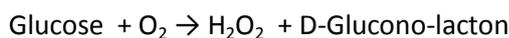
4.2.5.1. Fluoresceindiacetat(FDA)/Propidiumiodid(PI)-Färbung

Fluoresceindiacetat färbt lebende, metabolisierende Zellen indem es die Zellmembran passiert und dann durch Esterasen des Zellstoffwechsels von dem Molekül zwei Acetatreste abgespalten werden. Es kann nun nicht mehr die Zelle verlassen und durch Anregung mit blauem Licht grünes Licht emittieren. Propidiumiodid ist im Gegensatz dazu nicht membrangängig. Es kann nur in geschädigte oder tote Zellen eindringen und interkaliert dort stabil in die DNA im Zellkern. Es emittiert nach Anregung mit grünem Licht rotes Licht. Zur Färbung lebender und toter Zellen wurden 10ml Kulturmedium mit 16µl FDA-Lösung (1,5mg/ml) und 100µl PI-Lösung (1mg/ml) versetzt. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden

die Zellen mit der Färbelösung überschichtet und 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt, mit PBS überschichtet und unverzüglich mikroskopiert.

4.2.5.2. Messung des Glucose/Lactat-Gehaltes im Medium

Die Messung des Glucose-Verbrauchs und der Lactat-Bildung im Medium gibt Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen. Hierzu wurde der *Analysator YSI 2700 Select* verwendet. Im Gerät sind an jeweils einer Cellulose-Membran die Enzyme Glucose-Oxidase und Laktat-Oxidase immobilisiert. Wird nun in einer Flüssigkeit das entsprechende Substrat exponiert, kommt es zu dessen Umsetzung unter Bildung von Wasserstoffperoxid.



Das Wasserstoffperoxid wird anschließend an einer Elektrode mit Platinanode oxidiert. Der entstehende Strom ist proportional zur Konzentration des Substrates.



3.3. Zugversuch

Die Zugversuche wurden wie in 4.5. beschrieben mit einer Geschwindigkeit von 7.5 mm pro Sekunde durchgeführt. Dabei lagen die Proben unter PBS-Benetzung zwischen 2% (w/v) Agaroseblöcken oder den Schnittkanten von Hirnhemisphären.

3.4. In situ-Simulation der Transplantation mit organotypischen Hirnschnitten

3.4.1. Anfertigung von Hirnschnitten

Direkt nach Eintritt des Todes wurde aus männlichen Wistar-Ratten mit einem Alter von 8-10 Wochen die Hirne entnommen und binnen zwei Minuten im Tissue-Chopper in koronarer Orientierung 300µm dick geschnitten. Anschließend wurden die zusammenklebenden Hirnschnitte in ein 50ml- Röhrchen mit eisgekühltem Krebs-Ringer-Buffer überführt und kurz geschüttelt, sodass sich die Schnitte im Puffer sanft voneinander lösen und die gesamte Gewebefläche mit Puffer versorgt war. Zum Transport in das Labor verblieben die Proben auf Eis.

3.4.2. Kultivierung von Hirnschnitten

Vor der Kultivierung in 24well-ImagingPlates wurden die Schnitte mitsamt Puffer steril in eine Petri-Schalen gegossen und konnten von dort einzeln mit einer serologischen Pipette in

die ImagingPlate überführt werden. Nach Entfernen des überschüssigen Puffers wurden die Schnitte vorsichtig mit 1ml Medium, dem 25% (v/v) frischer Krebs-Ringer-Buffer zugefügt war, überschichtet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei der Kultivierung mit pankreatischen Stammzellen wurden diese im Medium vor Überschichtung resuspendiert.

3.4.3. *Whole-mount*-immunhistologische Färbung von lebenden Hirnschnitten

Die Hirnschnitte wurden nach Waschen mit PBS mit 4%-PFA-Lösung mit 10% (v/v) Sucrose in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte erneutes Waschen dreimal nacheinander. Nun permeabilisierten die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer 0,1%igen TritonX-100-Lösung basierend auf PBS, der 1µl/ml DAPI zugesetzt war. Anschließend wurde erneut drei Mal mit PBS gewaschen und die Hirnschnitte mit 16,5µl/ml NGS in TBST mit 0,1% (w/v) BSA blockiert. Dies geschah für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler zur besseren Penetration des Gewebes durch Verhinderung eines Diffusionsgleichgewichtes. Über Nacht wurde anschließend bei 4°C der Primärantikörper in TBST mit 0,1% (w/v) BSA inkubiert. Am nächsten Morgen wusch man die Schnitte erneut drei Mal mit PBS und inkubierte dann für vier Stunden den Sekundärantikörper in PBS bei Raumtemperatur. Nach diesem Schritt wurde erneut drei Mal mit PBS gewaschen und dann einmal mit destilliertem Wasser. Nun wurden die Schnitte in VectaShield Mounting Medium eingedeckelt und konnten mikroskopiert werden.

3.5. In vivo-Untersuchungen

Der Tierversuch wurde gemäß §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch das Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950) genehmigt und durchgeführt.

3.5.1. Zeitplan

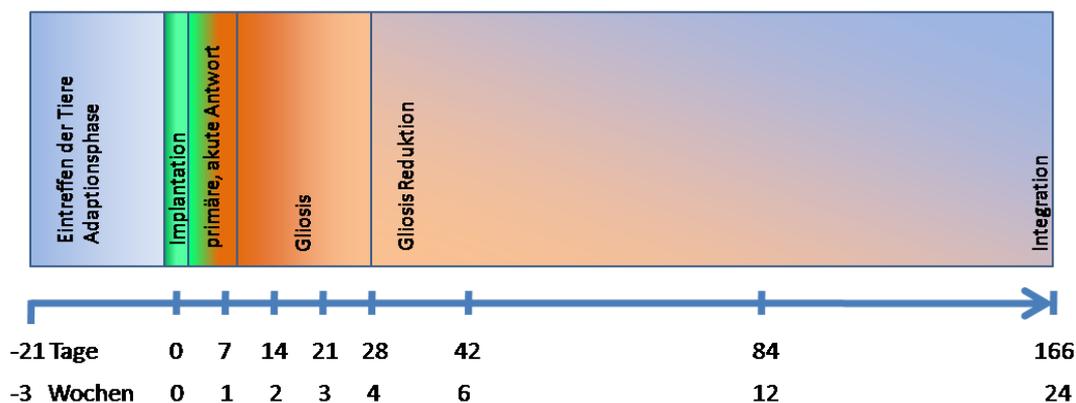


Abbildung 22: Zeitschema der Messpunkte vom Tierversuch in Relation zum Ablauf der experimentellen Vorarbeit und der Gliose.

Der Zeitplan (Abbildung 22) des Tierversuchs richtete sich nach den bereits publizierten Daten zum Verlauf der Reaktion des Hirngewebes auf chronisch implantierte Sonden (Abschnitt 2.6.). Er kann grob in die Kurzzeitentwicklung, bis vier Wochen, sowie in die Langzeitentwicklung, vier bis 24 Wochen, untergliedert werden. Nach Eintreffen der Tiere wurden diese nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche, jedoch spätestens nach drei Wochen operiert. Im Regelfall 7 bis 10 Tage nach Eintreffen. Dies sollte ausschließen, dass zu große ontogenetische Unterschiede zwischen den Tieren entstehen und die biologische Varianz im Versuch minimieren. Nach der Implantation sollte bzgl. der Literatur nach einer Woche die primäre Immunantwort am stärksten ausgeprägt sein, sodass der erste Messpunkt 7 Tage nach Implantation gewählt wurde. Von diesem Zeitpunkt beginnend sollte ein fließender Übergang zur Einkapselung des Implantates durch nicht-neuronale Zellen laut Literatur stattfinden. Dieser als Gliose bezeichnete Prozess erreicht nach bisherigen Kenntnissen seine endgültige Ausprägung nach etwa 4 Wochen (s. Abschnitt). Da in dieser Zeit die zellulären Veränderungen im Bereich der Sonde am stärksten und schnellsten verlaufen ist hier der Abstand der Messpunkte ebenfalls mit einer Woche gewählt, um den Einfluss der entwickelten Modifikationen in diesem entscheidenden Vorgang gut beurteilen zu können. Bisherige Langzeituntersuchungen mit rigiden Sonden konnten bis zum dritten Monat nach Implantation eine Reduktion der Gliose beschreiben. Um diese beobachten zu können, wurde sechs und zwölf Wochen nach der Implantation ein Messpunkt

eingeführt. In der humanen Anwendung sollte ein Implantat dieser Art eine Funktionalität über die halbe Lebensdauer erhalten. Da zwölf Wochen Beobachtungszeitraum, also etwa drei Monate, nur ungefähr ein Achtel bis ein Zehntel der Gesamtlebensdauer des Tieres abbildet wurde der Tierversuch um einen weiteren Messpunkt nach 24 Wochen, etwa sechs Monaten angelegt. Es gibt noch keine Aussagen zu Entwicklungen und Funktionalität von Tiefenhirn-stimulierenden Implantaten in vivo über einen so langen Zeitraum relativ zur Gesamtlebensdauer in einer Tierstudie mit so einer großen Gruppengröße.

3.5.2. Gruppierung der Tiere

Es wurden insgesamt drei Gruppen gebildet, von denen jeweils 6 Tiere für Messung zu den 7 Zeitpunkten operiert wurden. Die Gruppierung war wie folgt ausgelegt:

Gruppe A: Insertion Polyimid-Elektrode ohne Beschichtung

Diese Gruppe stellt den Einfluss von flexiblen Sonden auf das Hirngewebe dar.

Gruppe B: Insertion Polyimid-Elektrode überschichtet mit Fibrin als Abrasionsschutz

Zur Darstellung des Einflusses des schützenden Hydrogels Fibrin auf die Gewebereaktion.

Gruppe C: Insertion Polyimid-Elektrode konfluent bewachsen mit glandulären Stammzellen und überschichtet mit Fibrin als Abrasionsschutz

Zur Darstellung der Integrationsfähigkeit der Polyimid-Elektrode mit aufgewachsenen glandulären Stammzellen.

3.5.3. Durchführung des Tierversuchs

4.5.3.1. Tierhaltung

Die Ratten wurden von der Ankunft bis zur Operation in Gruppen zu drei Tieren in Käfigen Größe 4 gehalten. Dabei war ein Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden pro Intervall eingehalten und Wasser sowie Nahrung ad libitum zur Verfügung gestellt worden. „Käfigenrichement“ wurde durch zwei DIN A3-Blätter Mullpapier eingerichtet. Nach der Operation sind die Tiere in Käfigen gleicher Größe einzeln gehalten worden. Die Käfigausstattung wurde hierbei durch die zusätzliche Gabe von leeren Handschuhboxen nach Verfügbarkeit, jedoch mindestens eine pro Woche erweitert.

4.5.3.2. Konditionierung der Tiere auf Kontakt mit dem Mensch (Handling)

Zwei bis drei Tage nach der Ankunft der Ratten wurden diese *gehandelt*. Dazu wurde jedes Tier für fünf Minuten dem Käfig entnommen und zunächst etwa ein bis zwei Minuten durch Herumkrabbeln auf dem Schoß und Oberkörper des, durch wasserundurchlässigen

Rückenschlußkittel geschützten Experimentators, an den Menschen gewöhnt. In der dritten Minute wurde durch vorsichtiges Hochheben des Tieres mit beiden Händen auf Kopfhöhe des Experimentators das Betrachten des Tieres in der Hand geübt. Durch stetigen leichten Handkontakt während des *Handlings* wurden die Tiere an die stressfreie Berührung gewöhnt. In den letzten beiden Minuten war das Üben des Anästhesiegriffes und Schwenken für je ca. 10 Sekunden durchzuführen, jeweils unterbrochen vom Betrachten auf Kopfhöhe oder Krabbeln auf dem Schoß, je nach Aufregung des Tieres. Bis zur Operation wurde diese Prozedur mindestens ein weiteres Mal wiederholt.

4.5.3.3. Durchführung der Operation

Zu Beginn der Operation wurde zunächst der Operationsplatz vorbereitet. Neben dem Desinfizieren der Instrumente in 70% Ethanol für mindestens 30 Minuten, Reinigen und Auslegen der Operationsflächen mit frischen OP-Tüchern, Bereitstellen aller Verbrauchsmittel und Medikamente war das Vorheizen des Wärmekissens und die genaue Kontrolle und Reinigung des stereotaktischen Rahmens incl. Insertionsapparatur vorzunehmen.

Anschließend wurden die Tiere bereitgestellt und es konnte mit der Narkose begonnen werden. Hierfür war zunächst das Gewicht des zu narkotisierenden Tieres zu bestimmen. Alle operierten Tiere waren zwischen 290 und 330g schwer. Gemäß dem Gewicht (es wurde auf die nächsten 10 g aufgerundet) wurde die Initialdosis von 100µl/100g KG Ketamin und 40 µl/100g KG Rompun in einer 1ml-Spritze mit Spardorn gemischt.

Nun wurde das Tier dem Käfig entnommen, etwa eine Minute auf dem Arm beruhigt und dann direkt nach rhythmischem Schwenken im perithorakalen Griff die Narkosedosis intraperitoneal appliziert. Die folgenden 15-20 Minuten verbrachte das Tier in einem frischen, abgedeckten Käfig, sodass die Narkose in Ruhe anfluten konnte. Weitere Operationsvorbereitungen wurden unterdessen durchgeführt. Dazu gehörte das Einspannen eines 140µm Tungsten-Drahtes in die Insertionsapparatur und die Vorbereitung einer Nachdosierungsspritze mit einem 5:2-Gemisch aus Ketamin:Rompun. Nach spätestens 20 Minuten wurde durch Reflexkontrolle an den Zehenzwischenhäuten und den Augenlidern die Narkosetiefe überprüft und gegebenenfalls nachdosiert. In 20-Minuten-Intervallen erfolgte dies erneut bis zum Operationsende.

War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, konnte nun nach genügendem Befeuchten des Schädels mit 70%igen Ethanol dieser rasiert werden. Anschließend wurden verbliebende Haare auf der freigelegten Haut erneut mit Ethanol abgewischt und so gleichzeitig diese desinfiziert.

Nach Überführen des Tieres auf das Wärmekissen des OP-Platzes wurde nun der Schädel mit den Interaural-Stäbe im stereotaktischen Rahmen fixiert.

Nach Feststellen der Interaural-Stäbe in den Schraubfixierungen und anschließender Zentrierung wurden nochmals die Liedreflexe geprüft und sorgfältig aber vorsichtig Augensalbe zum Schutz auf die geöffneten Augen aufgetragen. Nun konnte die Operationslampe justiert und die Oberkieferhalterung angebracht werden. Nach erneuter Kontrolle des Zwischenzehenreflexes wurde zur lokalen Anästhesie die Haut auf dem Schädel intensiv mit Lidocain betupft. Nach kurzer Einwirkzeit wurde nun ein glatter Schnitt von ca. 1,0-1,3cm Länge median, beginnend bei der gedachten Interaural-Linie gesetzt. Mittels zweier Wattestäbchen schob man nun die Haut stumpf auseinander, wobei man durch stärkeres Schieben das cutanöse und subcutane Gewebe nach lateral deplatzierte. Das Periost wurde dann ebenfalls durch stumpfes Schieben mit Wattestäbchen auf dem Schädel vom Knochen entfernt. Zwischenzeitliches Spülen mit Ringer-Lösung wurde zur Reinigung und Blutstillung durchgeführt.

Anschließend wurde inferior und lateral zu jeder Seite je eine Schlaufe mit Nahtmaterial gelegt und durch deren Festkleben am stereotaktischen Rahmen das Operationsfeld aufgespannt (Abbildung 23).

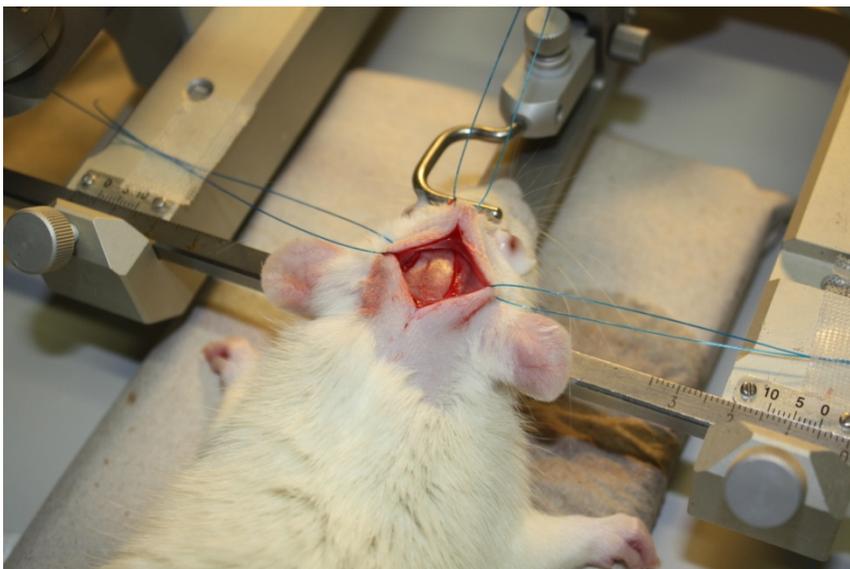


Abbildung 23: Aufsicht auf das stereotaktisch eingespannte Versuchstier mit eröffneter Kopfhaut. Die Schlaufen des Nahtmaterials (blau) werden am Rahmen festgeklebt.

Nun konnten mit dem vollständig justierten stereotaktischen Rahmen die Zielkoordinaten eingemessen werden. Dazu stellte man zunächst den Tungsten-Draht auf den Interaural-Punkt ein. Die Oxyd-Koordinaten wurden notiert und die Zielkoordinaten nach folgendem Schema kalkuliert:

$$x - \text{median: lateral-Distanz (2,6mm)} = z_{\text{iel}}$$

$$y + \text{Interaural-Distanz (5,2mm)} = z_{\text{iel}}$$

Diese neuen Koordinaten wurden nun eingestellt und der Tungsten-Draht bis zum Schädelkontakt herabgefahren. Dann konnte man die Schädelhöhe ablesen und durch Abzug von 8,5mm die Zieltiefe bestimmen und im Protokoll notieren. Mit einer Kanüle markierte

man anschließend den Zielpunkt auf dem Schädel durch leichtes Drehen in den Knochen. Zur Vorbereitung des Bohrens wurden nun die über dem Bohrloch befindlichen Gerätschaften entfernt und mit Ringer-Lösung gespült. An dieser Stelle ist eine erneute Anästhesie-Kontrolle notwendig gewesen, da folgende Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden sollten. Mit Hilfe eines elektrischen Handbohrers und eines 0,9mm Bohrers setzt man nun freihändig das Bohrloch im Schädel. Durch erneutes sorgfältiges Spülen und sofortiges Abtupfen mit einer Kompresse mussten nun alle Knochensplinter entfernt werden (Abbildung 24).



Abbildung 24: Aufsicht auf die stereotaktische Trepanation des Schädels. Das 0,9mm weite Bohrloch liegt entsprechend der stereotaktischen Koordinaten 2,6mm rechts neben Sutura sagittalis.

Mit einer 27-Gauge Kanüle wurde nun vorsichtig in das Bohrloch eingedrungen und die Dura und Pia Mater freihändig durchgezupft. Die eintretende Blutung wird sofort durch Tupfen und Spülen mit Ringer-Lösung gestillt. Nach Abklingen der Blutung und gründlicher Reinigung konnte das 2% Agarose-Gel in das Operationsfeld eingepasst werden. Nach Unterspülen des Operationsfeldes mit Ringerlösung und Entfernung von eventuellen Luftblasen, ist ein kleiner Tropfen Krebs-Ringer-Puffer auf den Agarose-Block gesetzt

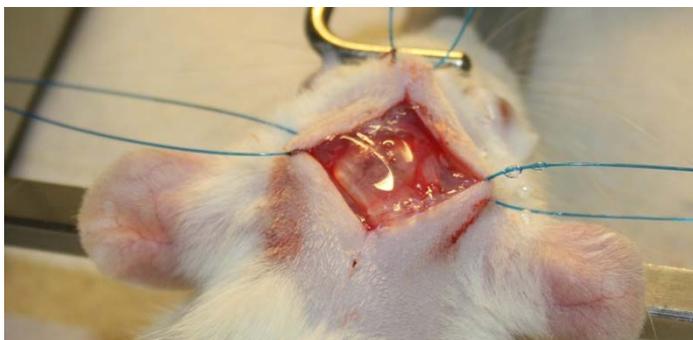


Abbildung 25: Aufsicht auf das Operationsfeld mit eingesetztem Agarose-Block.

worden (Abbildung 25).

Die Sonde wurde jetzt vorsichtig auf dem Agarose-Block in den Tropfen Puffer über dem Bohrloch platziert. Dabei ist der Brechungsindex der Flüssigkeit und des Gels zu berücksichtigen.

Vorsichtig wurde nun mit dem Tungsten-Draht die Sonde, die auf dem Agarose-Block liegt exakt mittig taxiert und zur Fixierung ein wenig in das Gel gedrückt (Abbildung 27).

Durch vorsichtiges Unterspülen der gesamten Sonde konnte diese nun vollständig aufgeschwemmt werden, sodass keine Adhäsionskräfte zum Gel während der Insertion bestehen. Durch gleichmäßiges Drehen am Z-Trieb wurde nun kontinuierlich die Sonde in das Hirn bis auf Zieltiefe inseriert. Dabei war ununterbrochen die Tiefe der Insertion als auch das

ungestörte Gleiten der Sonde auf dem Gel zu beachten und gegebenenfalls die Sonde durch weiteres Spülen oder vorsichtiges Anheben zu unterstützen. Dabei stellte sich die Sonde u.U. von allein auf, was keinesfalls rückgängig gemacht werden sollte, um die sichere Positionierung zu gewährleisten (Abbildung 27).

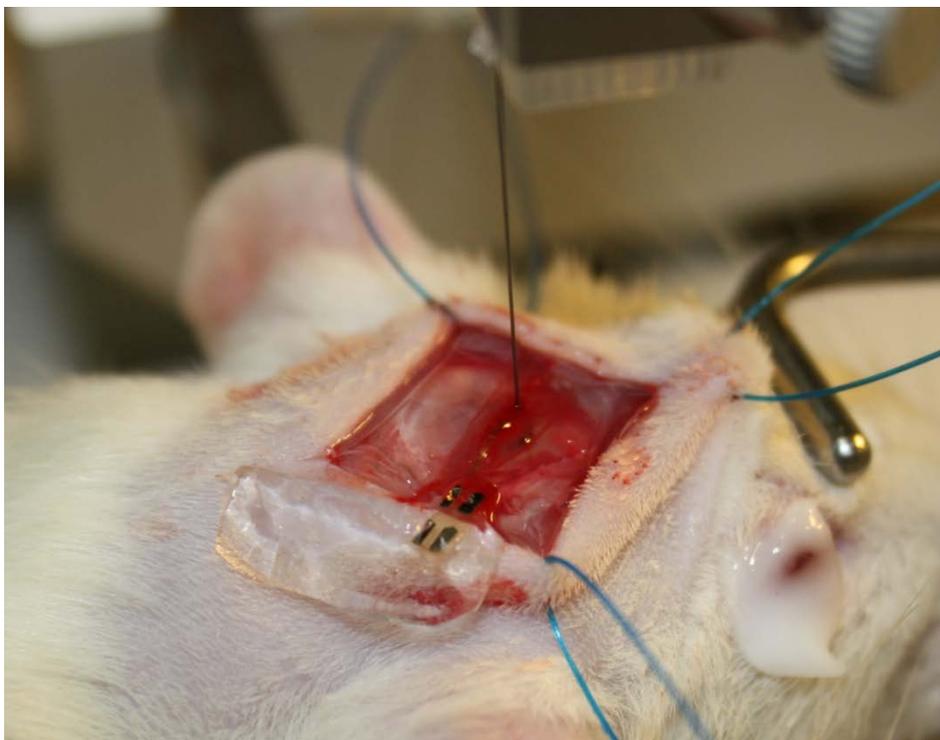


Abbildung 27: Seitliche Aufsicht auf das Operationsfeld nach Insertion des Implantates ins Agarose-Gel.

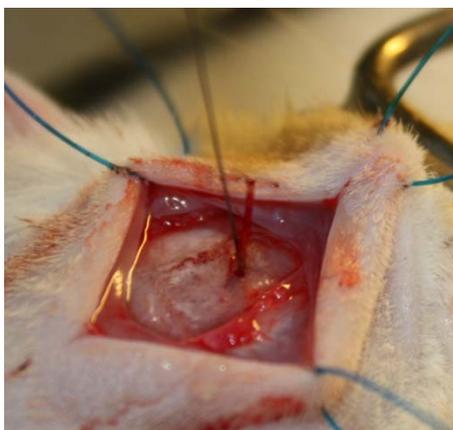


Abbildung 26: Aufsicht auf das Operationsfeld nach Entfernen des Agarose-Blocks. Das Implantat stellte sich parallel zur Insertionsnadel auf.

Am Zielpunkt angelangt wurde die Sonde gegen den Tungsten-Draht geklappt, wo sie adhäsiv aufrecht verblieb. Nun schnitt man nasal direkt vor dem Tungsten-Draht mit einem spitzen Skalpell parallel zur Interaurallinie die Vorderspitze des Gels ab und klappte es vorsichtig aus dem Operationsfeld nach vorn heraus. Die Sonde dicht am Schädel mit einer superfeinen Pinzette fixierend ohne dabei den Tungsten-Draht zu bewegen, konnte man nun auch den hinteren Teil des Agarose-Blocks aus dem Operationsfeld entfernen.

Durch vorsichtiges Tupfen mit Kompressen und Tupfern wurde nun die Schädeldecke getrocknet. Etwa 3 bis 5mm caudal vom Bohrloch wurde nun ein kleiner Tropfen *KrazyGlue* mit einem Durchmesser von 2mm aufgetragen. Durch Umklappen des Sondenkopfes wurde dieser im Klebepunkt fixiert. Dazu verwendete man ein Skalpell, da sich dieses von allein freischneiden kann. Nach kurzer Prüfung, ob die Sonde fest mit dem

Schädel verbunden ist, wurde ein zweiter Tropfen KrazyGlue auf den Sondenkopf gegeben wobei eine Abdeckung der spitzen Ecken der Sonde anzustreben war, um eine Reizung des Gewebes durch diese zu verhindern (Abbildung 28).

Abschließend wurden nach Aushärten des Klebers und Spülung mit Ringer-Lösung

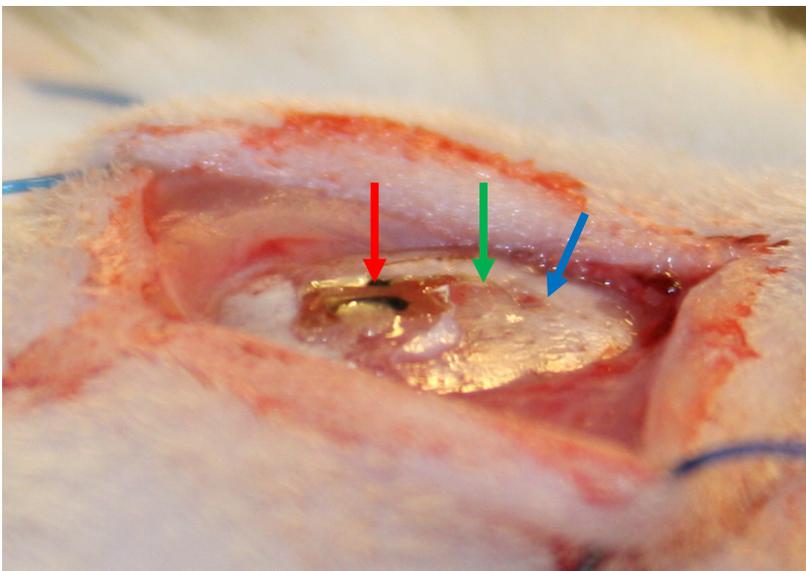


Abbildung 28: Seitliche Ansicht des Operationsfeldes mit fixiertem Sondenkopf auf dem Schädel. Aus dem Bohrloch (blauer Pfeil) ragt der unfixierte Implantatschaft (grüner Pfeil). Erst der Kopf des Implantates (roter Pfeil) ist mit dem Schädel fest verbunden.

überschüssige Kleberreste mit einer superfeinen Pinzette entfernt und anschließend die Wunde mit 5-7 einfachen Knopfnähten (2-2-2) aus 0,4 Vicryl verschlossen. Die Naht wurde nun mit Betaisodona-Lösung bestrichen und dem Tier subcutan 1,5ml 3:1 NaCl-Glucoselösung verteilt zu zwei gleichen Dosen, thorso-lateral injiziert. Bis zur Erlangung der vollständigen Bewegungsfähigkeit nach ca. 45-60 Minuten wurde das Tier unter einer 40W-Schreibtischlampe (Distanz ca. 30cm) gewärmt.

4.5.3.4. Operationsnachsorge und Monitoring

Am Tag nach der Operation wurde der Allgemeinzustand der Tiere durch Sichtkontrolle überprüft.

Diese Sicherstellung des Wohlbefindens fand mindestens zweimal wöchentlich durch den Experimentator und täglich durch das Pflegepersonal statt. Besondere Merkmale waren dabei:

- Agilität und Neugier
- motorische Beobachtung
- anatomische Beobachtung
- Zustand des Fells (Farbe, Aufstellung), der Augen (Farbe, Eintrübung), der Nasen-Mundpartie (Farbe, Verkrustung)

3.5.4. Tötung der Tiere und Entnahme der Proben

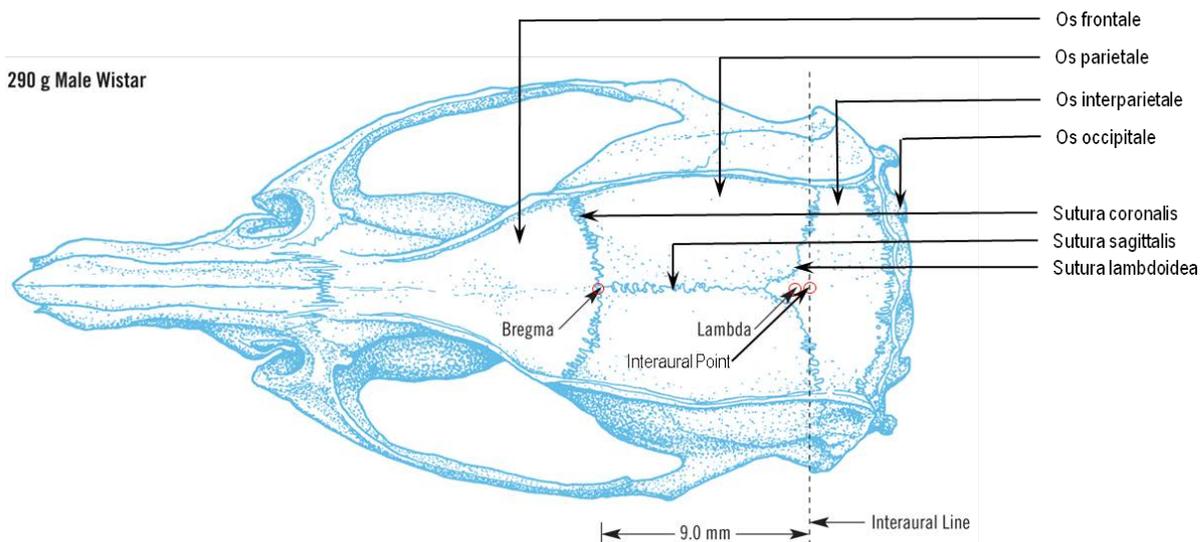


Abbildung 29: Aufsicht auf die Anatomie des Rattenschädels (Quelle: (Paxinos and Watson, 2007)).

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Überdosierung des Inhalationsanästhetikums Isofluran. Hierzu wurde in einer 30x30x40cm großen Acryl-Box der Boden mit Labortüchern ausgelegt und das Tier in die Box gesetzt. Dann wurde ein Labortuch mit ~3ml Isofluran getränkt, in die Box gelegt und diese gut verschlossen. Nach wenigen Minuten konnte der Tod durch Atem- und Herzstillstand, bläulich gefärbte Haut an den Füßen und Reflexlosigkeit festgestellt werden. Nun wurde das Tier gewogen und anschließend der Schädel eröffnet. Dazu wurde das Weichgewebe im Nacken transversal so geschnitten, dass ein weiterer Schnitt zwischen Atlas und Axis das Rückenmark durchtrennt. Nun wurde schnell ein Stück Labortuch in die Läsion gesteckt, um das Blut aufzunehmen. Währenddessen wurde entlang der Sutura sagittalis bis auf Höhe der Augen einen langer Schnitt gesetzt, die Haut zur Seite weggezogen und die Implantationsstelle vorsichtig mit einer Pinzette von Bindegewebe und Periost befreit. Nun schnitt man senkrecht zur Sonde am Schädelloch die Sonde von ihrem Kopf ab. Anschließend durchtrennte man lateral zu beiden Seiten den Atlas mit einer Knochenschere und setzte ebenfalls einen Schnitt median auf dem Schädel die Sutura sagittalis verlängernd durch das Os occipitalis. Nun wurde die Knochenschere mit einer Klinge unter das Os parietale der unbehandelten Seite geführt und das Knochenstück durch den Hebel der Schere über die äußere Klinge nach lateral umgeklappt. Durch diese Prozedere wird die Sutura sagittalis aufgebrochen und die unbehandelte Hemisphäre liegt frei. Mit einer spitzen Schere wurde nun unter leichtem Anheben des Os parietale auf der implantierten Seite vorsichtig die Sonde durchgeschnitten und anschließend auch diese Hälfte des Schädeldachs zur Seite geklappt. Nach vorsichtigem Durchzupfen der Dura und Pia mater entlang der Mittellinie und deren Abziehen zur Seite lag das Hirn frei und es wurde mit einem spitzen Skalpell das Cerebellum

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des immunhistochemischen Färbepanels für vier serielle Schnitte einer Hirnregion auf einem Objektträger.

Schnitt	Protein	Zellspezifität
1	Nestin	Stammzellen
	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Astrocyten, neuronale Vorläuferzellen
2	Chondroitinsulfatproteoglycan (CSPG)	Extracelluläre Matrix, Reinnervationsbarriere
	Neurofilamente	Neurone
3	ED-1 (CD68)	Mikroglia
	GFAP	s.o.
4	O4	Oligodendrocyten
	GFAP	s.o.
1,2,4	GFP für Gruppe C	Green Fluorescent Protein

Für die Untersuchung wurden, zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Präparate über einen langen Analysezeitraum hinweg, nicht nur die Verdünnungen der Antikörper in den nötigen vorangegangenen Testfärbungen festgelegt, sondern auch ein konstantes Belichtungsschema entwickelt. Dieses gilt für den Axio-ObserverZ.1 mit Xenon-Lampe bei der Intensitätsstufe 1 (von 5):

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des Belichtungsschemas für die immunfluoreszente Detektion der Proteine in den Proben des Tierversuchs. Zeitangaben in Millisekunden (ms).

Objektiv	Filtersatz				
	43 HE (Cy3)	38 HE (FITC)	50 (Cy5)	49 (DAPI)	DL (PlasDIC)
10x	600ms	600ms	1000ms	5ms	10ms
20x	600ms	300ms	1000ms	5ms	10ms
40x	600ms	200ms	1000ms	5ms	10ms

Desweiteren wurde zur korrekten Erfassung aller Proben ein einheitliches Erfassungsschema entwickelt, welches in den Objektiven mit 10x- und 20x- Vergrößerung je eine Aufnahme der zentrierten Implantationsstelle und der lateral liegenden Implantationsstelle mit Darstellung des Gewebes vor dem Implantat umfasst. Ebenfalls wurde standardisiert eine Mosaix-

Aufnahme im 10x-Objektiv mit 4x4 Bildern durchgeführt, um den größeren Gewebekontext jederzeit wiederherstellen zu können. Desweiteren kamen im 20x-Objektiv an o.g. Positionen Z-Stapel-Aufnahmen mit einer Schichtdicke von 1µm zum Einsatz, sodass filamentäre Strukturen über die gesamte Präparatdicke nachvollzogen werden konnten. Solche Aufnahmen werden in dieser Arbeit generell als Maximale Intensitätsprojektion des Stapels wiedergegeben. Alle Aufnahmen wurden mit dem Programm AxioVision von Carl Zeiss aufgenommen und prozessiert.

Während der Untersuchung der verschiedenen Präparate wurden einige Definitionen für charakteristische Strukturen im Wundareal vorgenommen, welche eine einheitliche Beschreibung und Klassifizierung der verschiedenen Proben erlauben. Im Folgenden sollen diese kurz eingeführt werden:

In der Vielzahl der Proben befand sich hinter dem Implantat ein relativ großes zellfreies Areal, welches vom Implantationsmechanismus herrührt. Es handelt sich hierbei um den **Implantationskanal**, der nach der Operation noch nicht wieder verschlossen ist und in welchem die Insertionsnadel das Gewebe penetrierte (Abbildung 31). Auf der anderen Seite des Implantates befindet sich das **Zielareal** für die Stimulation und von besonderem Interesse ist hierbei die **Kontaktfläche Implantat:Hirngewebe** (*brain-device-interface*).

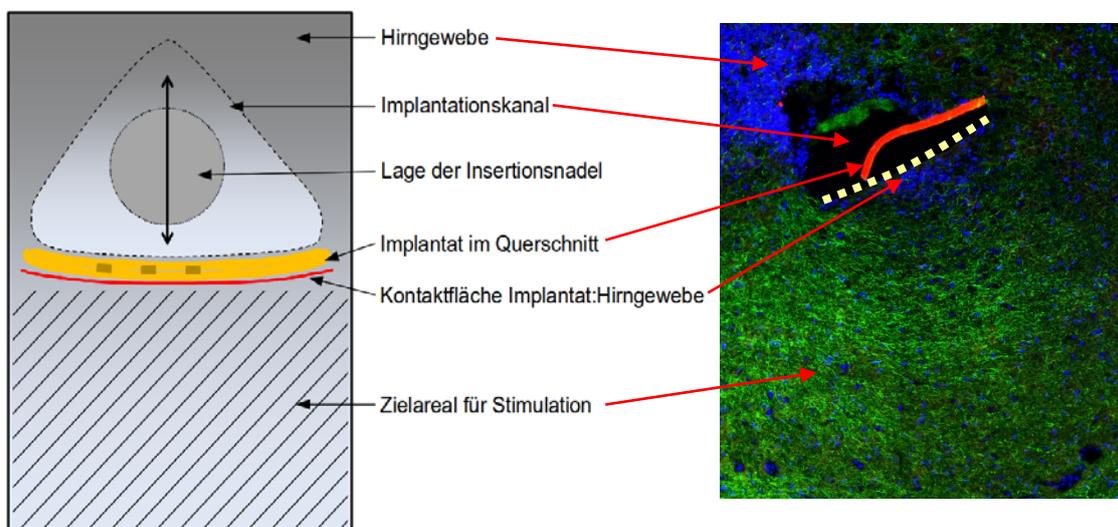


Abbildung 31: Schema des Implantationsareals (links) im Vergleich zu einer Übersichtsaufnahme eines Präparates aus dem Tierversuch. Vor dem Implantat (gelb) liegt das Zielareal für die Stimulation (schraffiert). Hinter dem Implantat befindet sich der mehr oder weniger große Implantationskanal (hellgrau). Im histologischen Schnitt ist die ursprünglich Lage des Implantates (rote Linie) mit einer gelben gepunkteten Linie eingezeichnet. (blau: DAPI, grün: Neurofilament, Vergrößerung: 100x Mosaix)

Für diese Interaktionsstelle müssen nun kurz noch drei kurze prägnante Erscheinungsbilder erläutert werden:

War vor dem Implantat als direkter Abschluss des Hirngewebes eine deutliche GFAP-positive Linie zu beobachten, wurde diese als **Lining** klassifiziert (Abbildung 32).

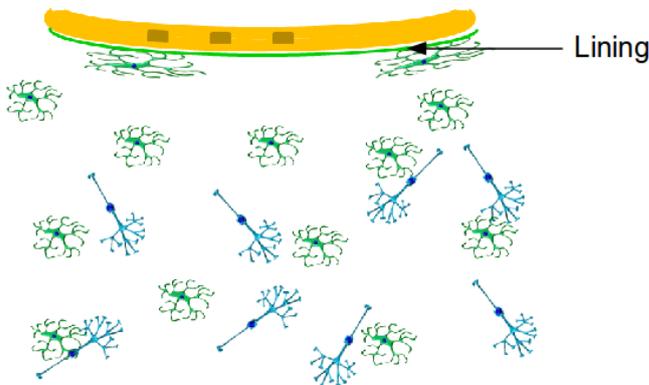


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Lining an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).

Es sind in einigen Fällen vor dem Lining Zellen in Interaktion mit dem Implantat sichtbar, welche beispielsweise ED-1-positiv waren. Oftmals erscheinen sie als reihenförmiges Cluster. Sie werden im Weiteren als **Frontline** bezeichnet (Abbildung 33).

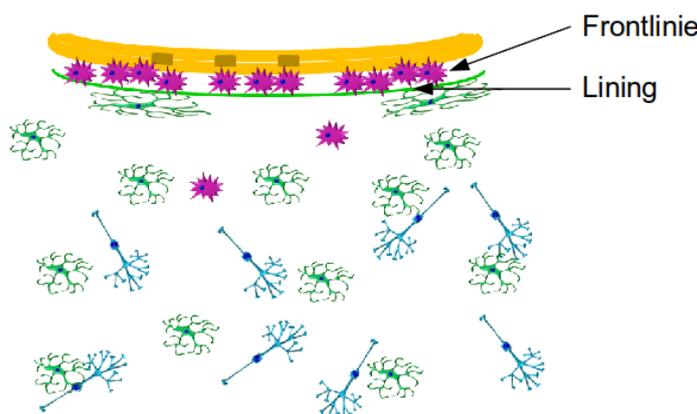


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Lining und davor liegenden Frontlinie an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).

Als letzte charakteristische Färbestruktur wurde der doppelreihige linienförmige Abschluss des Gewebes zum Implantat in der GFAP-Färbung beobachtet. Hierfür wird der Begriff **Belt** verwendet (Abbildung 34).

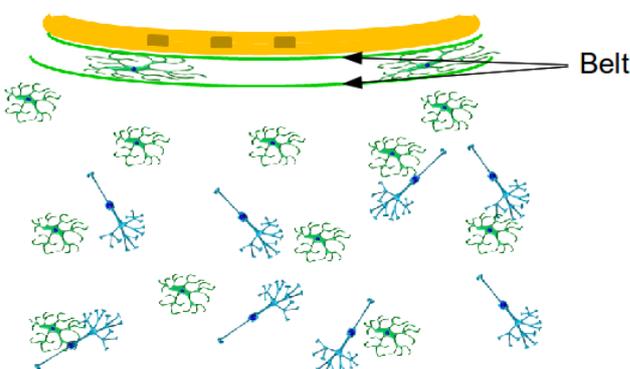


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Belt an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).

4. Ergebnisse

4.1. *In vitro*-Untersuchungen

4.1.1. Auswahl der geeigneten glandulären Stammzellpopulation

Zu Beginn dieses Projektes wurde aus zwei verschiedenen glandulären Stammzellpopulationen durch eine Zellcharakterisierung eine geeignete Population für die spätere Anwendung im Gehirn ausgewählt. Hierfür standen glanduläre Stammzellen aus dem Pankreas und der submandibulären Speicheldrüse von Sprague-Dawley Ratten zur Verfügung, die bereits in vorangegangenen Studien isoliert wurden. Diese Zellen wurden nun in relativ jungen aber stabilen Passagen aufgetaut und *in vitro* kultiviert. Nach mindestens zwei Passagen wurde das Proteinexpressionsprofil der Zellen durch eine immunocytochemische Färbung verglichen. Hierzu wurden Proteine mittels spezifischer Antikörper angefärbt die repräsentativ für verschiedene Differenzierungsrichtungen sind. Neural differenzierende Zellen sollten durch Detektion von *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Neurofilamente angezeigt werden und mesodermal differenzierende Zellen durch *α-smooth muscle actin* (αSMA). Desweiteren schloss diese Untersuchung den Stammzellmarker Nestin und den Proliferationsmarker Ki67 mit ein. Es konnten in diesem Experiment keine Nestin- oder GFAP-synthetisierenden Zellen unter den submandibulären Stammzellen gefunden werden (Abbildung 35). Dies war auch mit Wiederholung dieses Versuchs in den anschließenden zwei Passagen nicht möglich. Im Gegensatz hierzu zeigten die pankreatischen Stammzellen eine gute, über Passagen hinweg konsistente Expression dieser Proteine (Vgl. Abbildung 35 und Abbildung 38). Der mesodermale Marker αSMA konnte ausnahmslos in beiden Stammzellpopulationen in einigen Zellen festgestellt werden. Selbiges gilt für den Proliferationsmarker Ki67. Für Neurofilamente zeigten die pankreatischen Stammzellen redundant singuläre Zellen mit guter Morphologie, die dieses Protein in einer geordneten filamentären Struktur enthalten. Unter den submandibulären Stammzellen sind zunächst vergleichsweise häufiger singuläre Neurofilament-positive Zellen zu beobachten jedoch ergibt sich bei genauerer Betrachtung, dass es sich hierbei mehrheitlich um hyperplastische oder seneszente Zellen handelt. Es konnte keine filamentäre Strukturierung in diesen festgestellt werden, weshalb sie nicht als positiv gewertet wurden. Zusammenfassend wurde für das gute Potential neural zu differenzieren die Expression von Nestin, GFAP und/oder Neurofilament als Prämisse festgelegt. Diese Fähigkeit ließ sich schon bei diesem Versuch für die pankreatischen Stammzellen bereits darstellen. Um die gesamte Differenzierungspotenz der submandibulären Stammzellen überblicken zu können, wurde die neurale Differenzierung im anschließenden Versuch durch eine Kokultur mit Rattenhirn induziert.

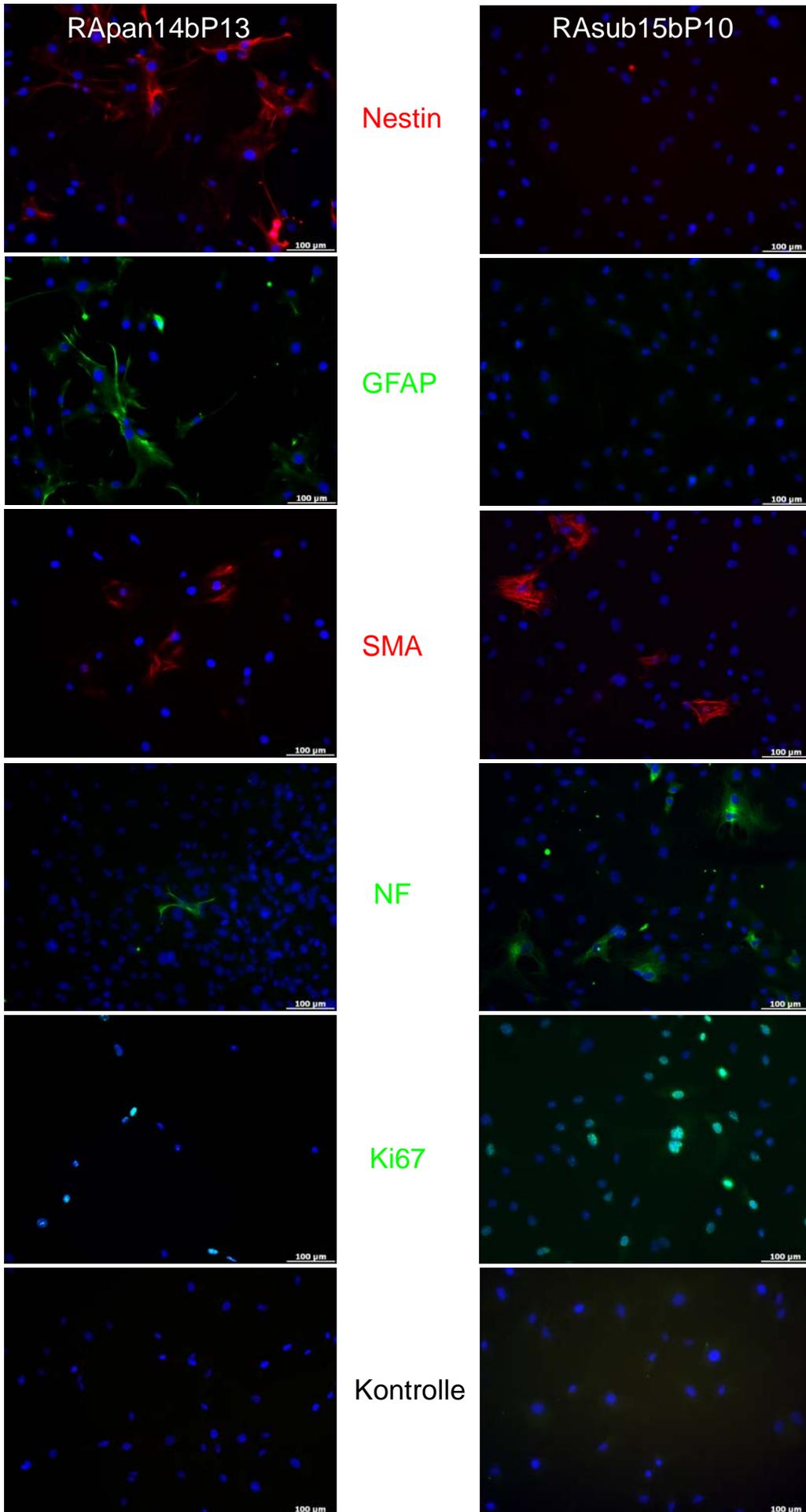


Abbildung 35: Immunocytochemischer Vergleich pankreatischer und submandibularer Stammzellen aus der Ratte. Das jeweils detektierte Protein in der entsprechenden Farbe steht zwischen beiden Populationen. (blau: DAPI; Vergrößerung 100x)

Die Kokultur mit Gewebebiopsien ist eine gut etablierte Kultivierungstechnik für Stammzellen. Hiermit konnte bereits für humane glanduläre Stammzellen eine erhebliche Steigerung des neuronalen Differenzierungspotentials demonstriert werden (Petschnik et al., 2011). Nun sollte dies auch für submandibuläre Stammzellen aus der Ratte versucht werden.

Wie in Abbildung 36 dargestellt konnte durch die Kokultur mit Rattenhirnbiopsien die Anzahl neuronal differenzierender Zellen nicht gesteigert werden. Es sind unerwarteterweise in der unstimulierten Population mehr Neurofilament-positive Zellen zu beobachten gewesen als in der stimulierten Population. Dort war keine positive Zelle für das gesuchte Protein zu finden. Selbiges gilt für die Proteine Nestin und GFAP.

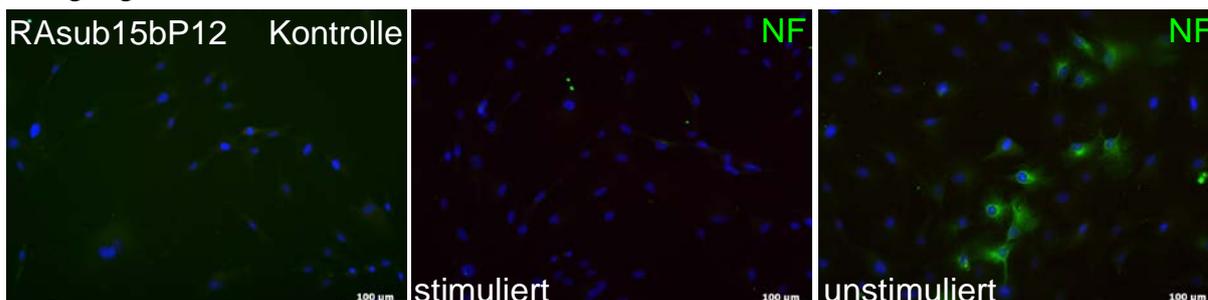


Abbildung 36: Ergebnisse der immunfluoreszenten Färbung für Neurofilament in Proben von submandibulären Stammzellen aus dem Kokultur-Experiment. Die Kontrolle (links) ist ohne Primärantikörper gefärbt. Stimulierte Zellen (mitte) wurden mit Rattenhirnbiopsien kokultiviert, synthetisierten jedoch kein Neurofilament. Unter den Zellen, welche in normalem Medium kultiviert wurden (unstimuliert, rechts), waren einige, welche Neurofilament synthetisierten.

Da offensichtlich das neuronale Potential der pankreatischen Stammzellen höher ist und zu diesem Zeitpunkt über diesen Zelltyp ebenfalls mehr Erkenntnisse vorlagen, was eine bessere Einordnung des Zellverhaltens unter verschiedenen Umständen ermöglichte, konzentrierte sich die zukünftige Arbeit auf die pankreatischen Stammzellen.

Für diese wurde im Folgenden eine Transkriptom-Untersuchung mittels RealTime-PCR durchgeführt, um die Ergebnisse der Immunocytochemie zu unterstützen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 38 nach der kapillargelelektrophoretischen Auftrennung dargestellt. Während dieser Untersuchung ist ein umfangreiches Spektrum an mRNAs analysiert worden, mit einem klaren Fokus auf solche, die Anteil an der neuronalen Differenzierung haben. Hierzu gehören Gene, die für die Proteine glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100, myelin basic protein (MBP), β 3-Tubulin (Tubb3), Enolase, neuronal cell adhesion molecule (NCAM) und Neurofilament (NF) codieren. Für Neurofilament wurde für alle drei Spleißvarianten, leichte, mittelschwere und schwere Kette, die Untersuchung durchgeführt (Akronym: l= light chain, m=medium heavy chain, h=heavy chain). Es konnte für alle neuronalen Transkripte, ausgenommen GFAP, erfolgreich der Nachweis durchgeführt werden (Abbildung 37). GFAP ist in allen RT-PCR-Untersuchungen nicht kontinuierlich detektierbar gewesen, aus diesem Grund kann nicht davon ausgegangen werden, dass es

tatsächlich konstitutiv in der Population exprimiert wird. Das Protein wurde in der Immunocytochemie verschiedener Passagen meist nur in wenigen Zellen, im Vergleich zu Neurofilament und Nestin detektiert (Vgl. Abbildung und Abbildung 37). Insofern kann man annehmen, dass das Transkript im Vergleich zum Protein eine wesentlich kürzere Halbwertszeit in der Zelle hat und aufgrund der wenigen positiven Zellen nicht zwingend in jeder Probe das Transkript detektiert werden kann. Für die Bewertung der Multipotenz wurde desweiteren nach Transkripten für Proteine aus Zellen, die ihren Ursprung in vivo im mesodermalen und endodermalen Keimblatt haben, gesucht. Hierbei sind repräsentativ für die mesodermale Differenzierungsrichtung Transkripte für secreted phosphoprotein 1 (SPP1), welches typischerweise von Knochenzellen exprimiert wird, sowie für α SMA, welches ein prominentes Protein glatter Muskelzellen ist, detektierbar gewesen. Außerdem konnte erfolgreich das Transkript für peroxidase proliferator activator receptor 1 γ (PPAR γ), welches normalerweise in Fettzellen vorkommt, detektiert werden. Als endodermaler Marker konnte GATA binding protein 4 (GATA4) nachgewiesen werden. Es ist in vivo Bestandteil der frühen Endoderm-Differenzierung (Rojas et al., 2009). Für die Stammzell-spezifischen Transkripte c-myc, oct-4, klf4, nestin und CD9 konnte ebenfalls ein positiver Nachweis auf mRNA-Ebene geführt werden.

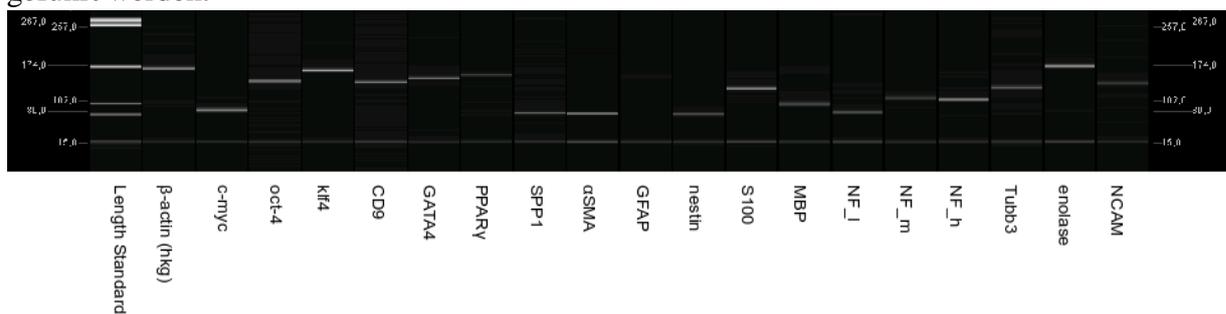


Abbildung 37: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen. Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. Die unterste Bande ist der Alignment-Marker bei 15bp.

Insgesamt kann man also von einer multipotenten glandulären Stammzellpopulation ausgehen, welche eine starke Tendenz aufweist, spontan Zellen mit neuronalen Charakteristika hervorzubringen. Diese Fähigkeit bleibt auch in Passagen, welche im Transplantationsversuch eingesetzt werden sollen, erhalten, wie der immunocytochemische Nachweis von Nestin,

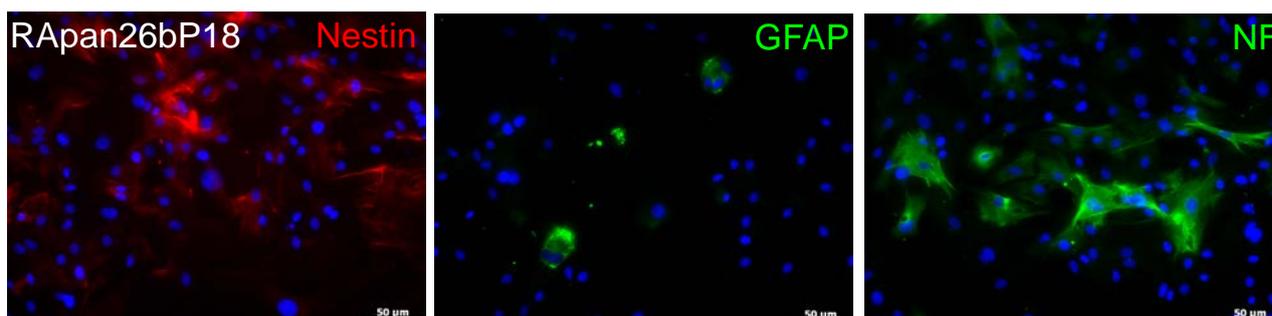


Abbildung 38: Immunocytochemische Färbungen pankreatischer Stammzellen für Nestin, GFAP und Neurofilament (NF) in Passage 18. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)

Neurofilament und GFAP in Passage 18 in Abbildung 38 veranschaulicht.

4.2. Markierung der Zellen für Transplantationsexperimente

Im Vorfeld von Zelltransplantationsstudien im Tiermodell sollten bereits frühzeitig Überlegungen angestellt werden, auf welche Weise die Auswertung solcher Untersuchungen erfolgen soll und Voruntersuchungen *in vitro* bereits an diese Erfordernisse angepasst werden. Für die geplanten immunhistologischen Untersuchungen des in diesem Projekt geplanten Tierversuches wurde es als sehr wünschenswert erachtet die transplantierten Zellen wiederzufinden, um deren Schicksal *in vivo* bewerten zu können. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Zellen für einen solchen Zweck zu markieren, wobei jedoch die Dauer der sichtbaren Markierung eine wichtige Limitierung für die *in vivo*-Applikation darstellt. Aus diesem Grund wurde zunächst der Versuch unternommen, die Zellen mit einem Plasmid zu transfizieren, welches konstitutiv das grün fluoreszierende Protein EGFP unter dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor synthetisiert. Hierbei wurde die Methode der Elektroporation angewandt, um das Plasmid in die Zelle einzuschleusen. In Abbildung 39 sind die Beobachtungen während des Experimentes zusammengefasst. Einen Tag nach der Transfektionsprozedur waren die Zellen adhären und es konnten viele grün fluoreszierende unter ihnen beobachtet werden. Drei Tage nach der Transfektion war die Zellteilung in der Population so weit vorangeschritten, dass diese passagiert werden musste, um eine Expansion der Population zu ermöglichen. Zu diesem Zeitpunkt wurde nach dem Anheften der Zellen mit der G418-Behandlung begonnen, um die Selektion einzuleiten. Weitere zwei Tage später waren unter Selektionsbedingungen mehrheitlich Zellen zu beobachten, die kein EGFP synthetisierten. Hierfür könnte eine ungenügende Aktivierung oder Silencing des CMV-Promotors, unter welchem die EGFP-Expression im Plasmid stattfinden sollte, verantwortlich sein.



Abbildung 39: Verlauf des Transfektionsexperimentes anhand von drei repräsentativen Bildern. 22 Stunden nach der Transfektion sind einige fluoreszente Zellen in der Population vorhanden gewesen (links). Weitere zwei Tage später wurde mit der Selektion auf G418 begonnen (mittig). Nach drei Tagen unter Selektionsbedingungen nahm jedoch die Anzahl der nichtfluoreszenten Zellen nicht ab (rechts). (Masstab: 50µm; Vergrößerung: 100x).

Somit schien dieses Verfahren für das letztendliche Ziel ungeeignet zu sein und es mussten alternative Markierungsmethoden gefunden werden, welche zu einer längerfristigen Markier-

ung der Zellen führen könnten und dabei die Eigenschaften der Zellen nicht verändern.

Verschiedene Möglichkeiten der irreversiblen Einlagerung chemischer Agenzien in das Zellsoma wurden nun favorisiert, da die sehr populären Methoden der DNA-Interkalation, beispielsweise mit BrdU, bei proliferierenden Zellen negative Effekte hervorrufen könnten.

Es wurde nun die Markierung mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff aus dem Pilz *Epicoccum nigrum* versucht. Dazu wurde das kommerziell erhältliche LavaCell-Kit verwendet. Wie in Abbildung 40 dargestellt ist, sind nach der ersten Passagierung alle Zellen mehr oder weniger stark rot fluoreszent, jedoch war die gesamte Population in ihrer Vitalität stark beeinträchtigt, was in der Zellkultur unmittelbar durch eine sehr schlechte Morphologie bemerkbar wurde. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass auch dieser, als “zellfreundlich” klassifizierte Farbstoff zu Abnormitäten der Population führte und diese Markierungsmethode wurde ebenso als ungeeignet eingestuft.



Abbildung 40: Pankreatische Stammzellen nach der LavaCell-Markierung. (Vergrößerung: 200x)

Nachdem diese Möglichkeiten des Markierens bereits etablierter Stammzellpopulationen nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde die Isolation von pankreatischen Stammzellen aus transgenen Tieren, welche EGFP konstitutiv exprimieren, erwogen. Hierbei verwies die Literatur stringent auf den Rattenstamm WistarTg(CAG-GFP)184Ys (NBRPRAT No.: 0273), dessen Zellen bereits bei Transplantationsexperimenten, u.a. im zentralen Nervensystem, ohne sekundäre Detektion durch Antikörper wiedergefunden wurden (Hakamata et al., 2001; Mothe et al., 2005). Drei männliche Tiere dieses Stammes wurden aus Japan importiert und pankreatische Stammzellen aus ihnen isoliert. Anschließend wurde mittels Immuncytochemie und RT-PCR erneut eine Charakterisierung der transgenen Stammzellpopulationen durchgeführt. Dabei konnte, wie bei den zuvor untersuchten Populationen pankreatischer Stammzellen aus Ratten, Nestin, Neurofilament, GFAP und α SMA in verschiedenen Passagen nachgewiesen werden (Abbildung 42). Es wurden außerdem weitere Proteine in die Untersuchung eingeschlossen, um ein besseres Gesamtbild der transgenen Zellen zu erhalten. Dazu gehören GATA 4, von-Willebrand-Faktor (VWF) und endothelial growth factor receptor (EGFR), welche typisch für Zellen endodermalen Ursprungs sind. Desweiteren wurde

erfolgreich Troponin I (Subtyp 3) nachgewiesen. Dieses Strukturprotein wird vornehmlich in Herzmuskelzellen synthetisiert. Überdies konnte in vielen Zellen Nucleostemin mit der Immuncytochemie gefärbt werden. Dieses Protein vermindert die Degradation von Telomeren durch Interaktion mit dem telomeric repeat-binding factor 1 (TRF1) – ein Prozess, der in der frühen Embryonalentwicklung wichtig ist (Zhu et al., 2006). Der Proliferationsmarker Ki67 konnte ebenso in den kultivierten Zellen gezeigt werden und wird in den folgenden Untersuchungen zunehmend an Bedeutung für die Abschätzung der Zellvitalität finden.

Zur Absicherung der immuncytochemischen Untersuchungen sollte eine RT-PCR-Untersuchung dienen (Abbildung 41). Es wurden hierbei Transkripte für die Proteine α SMA, Neurofilament mittelschwere Kette (NF_m), Nestin und GATA4 gefunden. Nicht detektierbar hingegen war die mRNA von GFAP. Es wurden weiterhin Transkripte für die neuronalen Proteine Enolase und β 3-Tubulin detektiert, welche die ebenso vorhandene neurale Differenzierungsfähigkeit unterstreichen. Die mRNA-Nachweise für oct4 sowie CD9 zeigen neben Nestin an, dass Stammzell-typische Gene in dieser Zellpopulation transkribiert werden. Der mesodermale Marker peroxidase proliferator activator receptor γ (PPAR γ) konnte ebenfalls als Transkripte in diesem Population nachgewiesen werden.

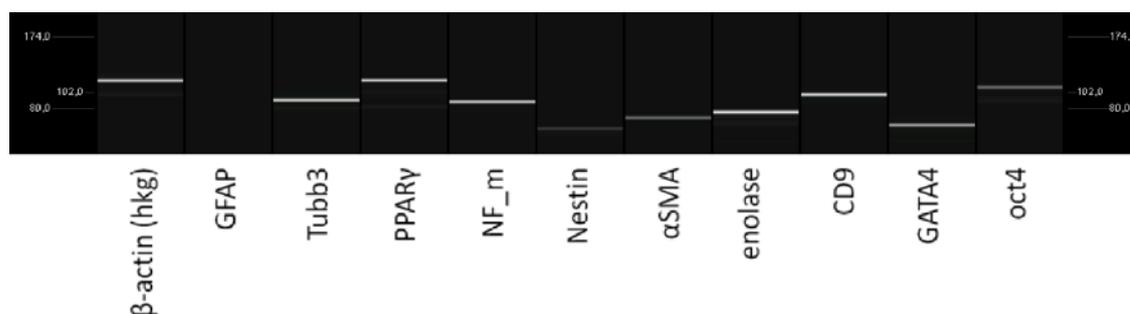


Abbildung 41: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptom von GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen. Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die pankreatische Stammzellpopulation aus den GFP-transgenen Tieren vergleichbare Charakteristika aufweist wie die aus den zuvor untersuchten Wistar- und Sprague-Dawley- Ratten. Es gab keine Hinweise, dass eine reduzierte Multipotenz einschließlich neuraler Differenzierungsfähigkeit vorlag. Somit wurde mit der Testung der Zellen auf Implantatmaterialien fortgefahren.

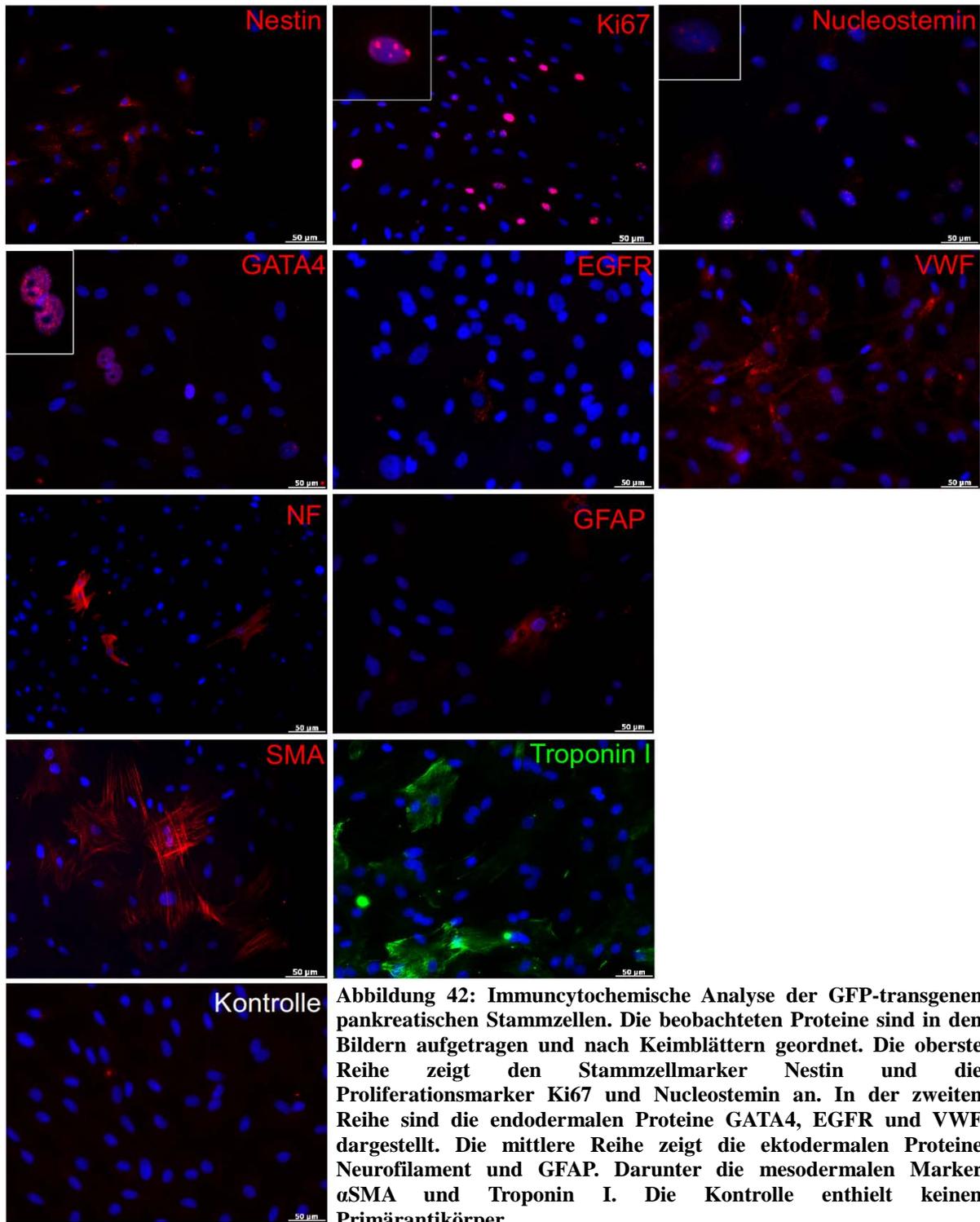


Abbildung 42: Immuncytochemische Analyse der GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen. Die beobachteten Proteine sind in den Bildern aufgetragen und nach Keimblättern geordnet. Die oberste Reihe zeigt den Stammzellmarker Nestin und die Proliferationsmarker Ki67 und Nucleostemin an. In der zweiten Reihe sind die endodermalen Proteine GATA4, EGFR und VWF dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt die ektodermalen Proteine Neurofilament und GFAP. Darunter die mesodermalen Marker α SMA und Troponin I. Die Kontrolle enthielt keinen Primärantikörper.

4.3. Zellbesiedlung von Implantatmaterialien

Zunächst wurden Zellen auf bereits existierenden Polyimid-Sonden kultiviert und überprüft, ob die Sonden als Wachstumsfläche akzeptiert werden (Abbildung 43). Es konnte eine regelmässige Besiedlung der Präparate durch die Zellen festgestellt werden.

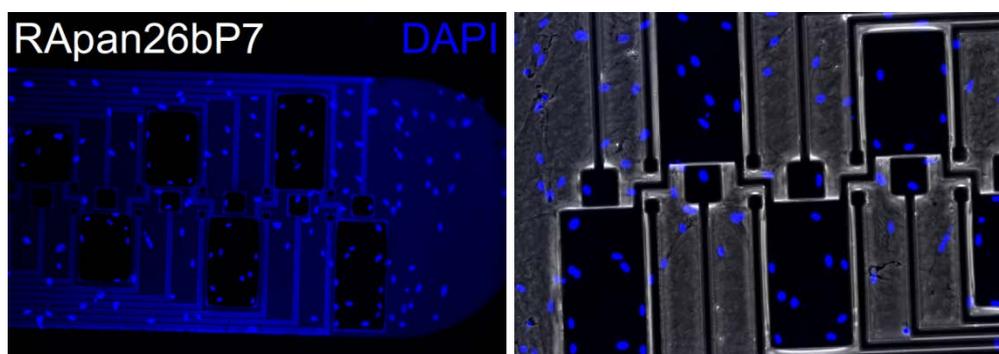


Abbildung 43: Polyimid-Sonden mit Stammzellen bewachsen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 100x (links); 200x (rechts)).

Um die Zellmorphologie besser darstellen zu können wurde anschließend das Experiment wiederholt und eine Phalloidin-DAPI-Färbung angeschlossen (Abbildung 44). Hierbei wurden verschiedene Konfluenzstadien betrachtet, sodass die Zellmorphologie eine etwaige Adhäsionspräferenz darstellen kann. Es ist zu beobachten gewesen, dass sich die Zellen bei niedrigen Konfluenzen vorzugsweise auf den Elektroden befinden und dort die Elektrodenfläche großflächig von den Zellen überspannt wird. Bei mittleren Konfluenzen ergab sich ein ähnliches Bild, jedoch nun ebenso für die Polyimid-bedeckten Areale. Bei hohen Konfluenzen scheint es keine Präferenz für Elektrodenflächen zu geben. Es ist eine

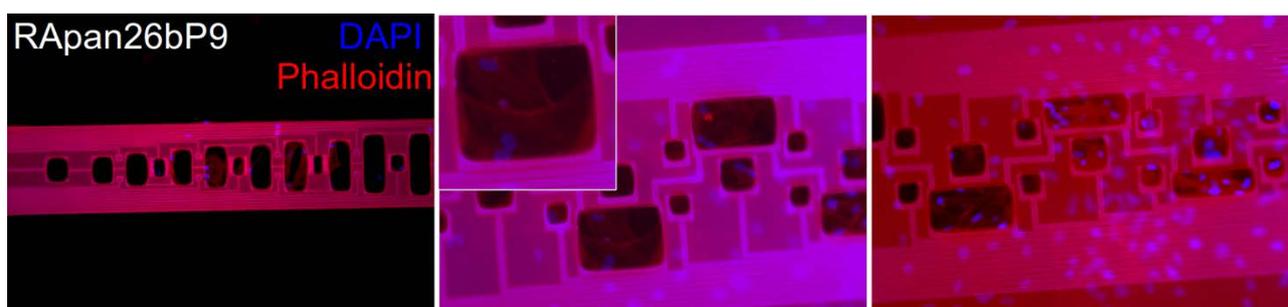


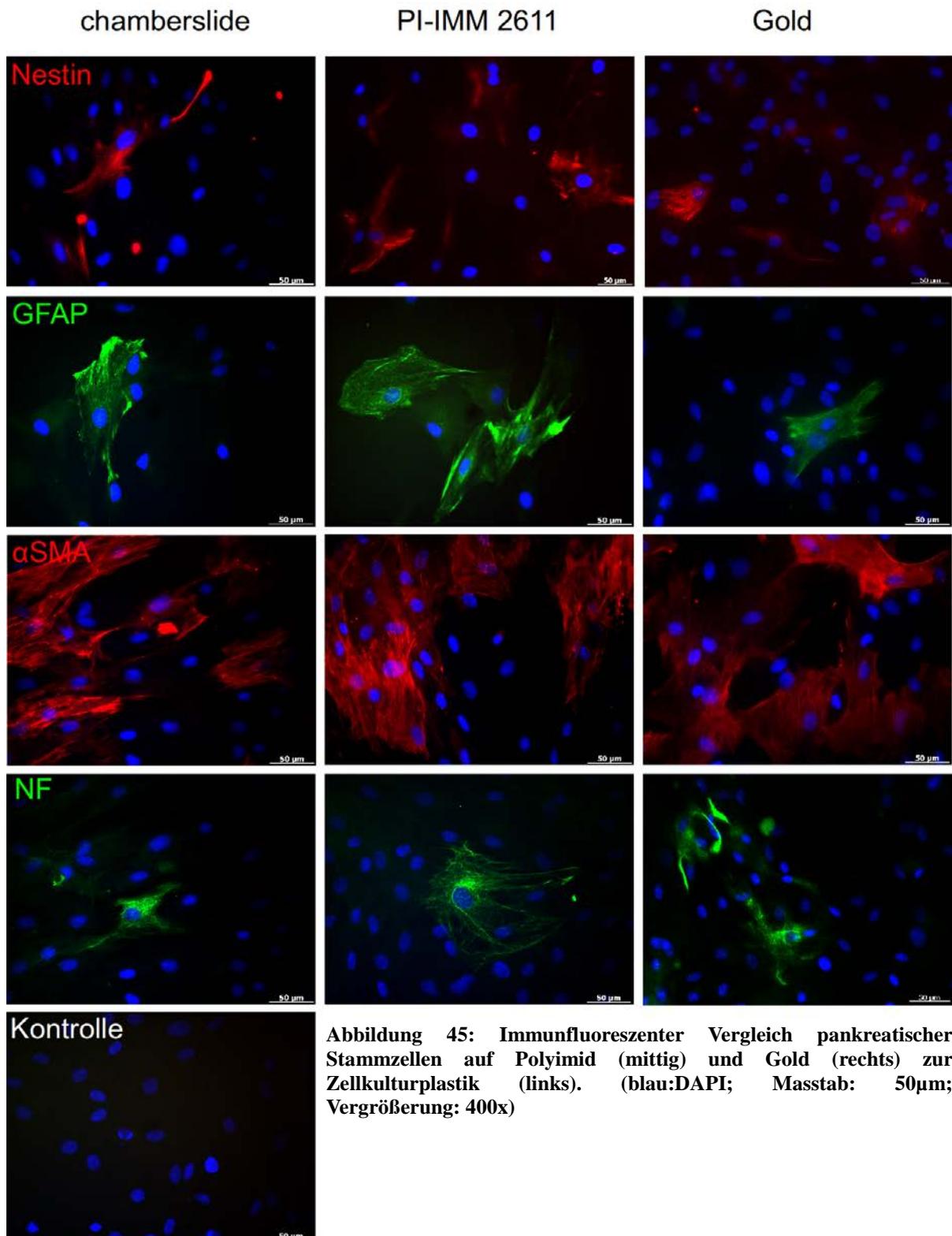
Abbildung 44: Phalloidin-gefärbte Zellen auf Polyimid-Sonden. (blau:DAPI; Vergrößerung v.l.n.r.: 50x; 200x, 200x)

hochkonfluente Besiedlung für Polyimid-bedeckte Bereiche, sowie für Elektroden-Bereiche festgestellt worden.

Als Zwischenergebnis konnte festgehalten werden, dass die Besiedelung der Sonden mit pankreatischen Stammzellen möglich ist und mit zunehmender Konfluenz zu einer gleichförmigen Abdeckung der Oberfläche führt.

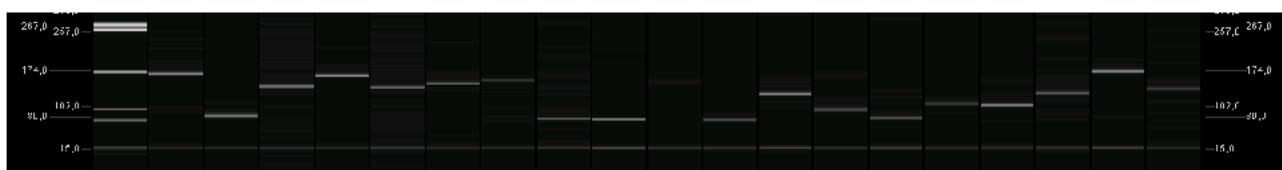
Im nächsten Schritt wurde das Augenmerk auf den Einfluss des Sondenmaterials auf die

Zellen gelegt. Da Zellen ihre Umgebung auch als induktiv wahrnehmen können, ist besonders bei Stammzellen sicherzustellen, dass sie in ihrer Plastizität nicht beeinträchtigt werden. Für die spätere Applikation wurde in diesen Untersuchungen, wie bereits zuvor, besonderes Augenmerk auf die neurale Differenzierungsrichtung gelegt. Die Immunocytochemie ergab für die nicht-transgenen pankreatischen Stammzellen keine Veränderung der Proteinsynthese auf den untersuchten Materialien. Es konnte ein unverändertes Protein-Profil, mit Expression von Nestin, GFAP, α SMA und Neurofilamenten, beobachtet werden (Abbildung 45).



Die immuncytochemischen Ergebnisse wurden wie in den vorangegangenen Experimenten mit einer Untersuchung der mRNA-Expression untermauert. Es erfolgte eine identische RT-PCR-Analyse für Zellen auf Polyimid im Vergleich zu Zellkulturplastik, um eventuelle Veränderungen der Genexpression veranschaulichen zu können. Wie in Abbildung 46 zu sehen, konnten keine wesentlichen Veränderungen der Genexpression detektiert werden. Es sind auf beiden Oberflächen die Transkripte für Stammzellfaktoren (c-myc, oct-4, klf4, CD9, Nestin), ektodermale respektive neurale Marker (S100, MBP, NF_1, NF_m, NF_h, Tubb3, Enolase, NCAM), mesodermale Marker (PPAR γ , SPP1, α SMA) sowie für den endodermalen Marker GATA4 nachweisbar gewesen. Ebenfalls bleibt unter beiden Konditionen GFAP abundant. Im Vergleich der Genexpressionsprofile der Zellen auf den verschiedenen Wachstumsoberflächen gab es keine signifikanten Unterschiede. Anschließend erfolgte diese

Zellkulturplastik (TPP)



Polyimide °1 (2611)

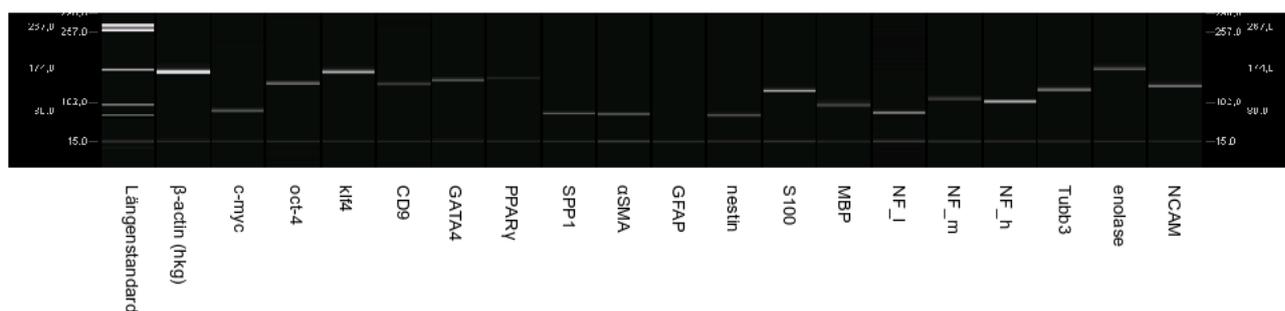


Abbildung 46: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und Polyimid (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. Die unterste Bande ist der Alignment-Marker bei 15 bp.

Untersuchung auch für die GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen, um damit die vorangegangenen Ergebnisse für die, für den Tierversuch einzusetzenden Zellen zu validieren. Es wurden also mit diesen Populationen ebenfalls immuncytochemische sowie PCR-Daten im Vergleich zwischen Zellkulturplastik und Polyimid erhoben. Hierbei wurde zudem ein weiteres Polyimid getestet, welches von einem weiteren Institut (Fraunhofer ISIT, Itzehoe) hergestellt wurde. Die Immuncytochemie und RT-PCR-Untersuchungen zeigten äquivalente Ergebnisse zu den bereits zuvor durchgeführten Versuchen. Es konnten keine Veränderungen in der Expression von Nestin, GFAP, α SMA oder Neurofilamenten auf transkriptioneller und translationeller Ebene festgestellt werden (Abbildung 47 und Abbildung 48). Die Transkripte von β 3-Tubulin (Tubb3), Enolase, PPAR γ , GATA4, oct4 und CD9 waren ebenso unter beiden Konditionen gut zu detektieren (Abbildung 48).

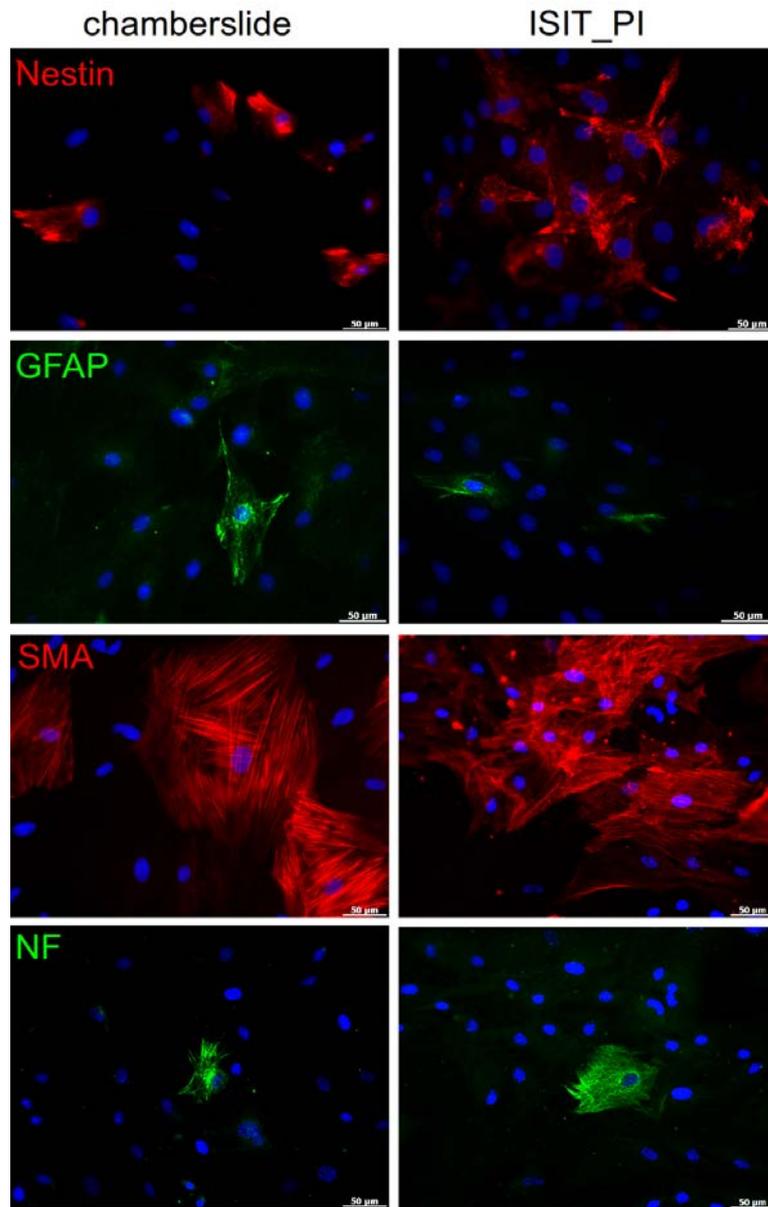


Abbildung 47: Immunfluoreszenter Vergleich pankreatischer Stammzellen auf dem zweiten Polyimid (rechts) zur Zellkulturplastik (links). (blau:DAPI; Masstab: 50µm; Vergrößerung: 400x)

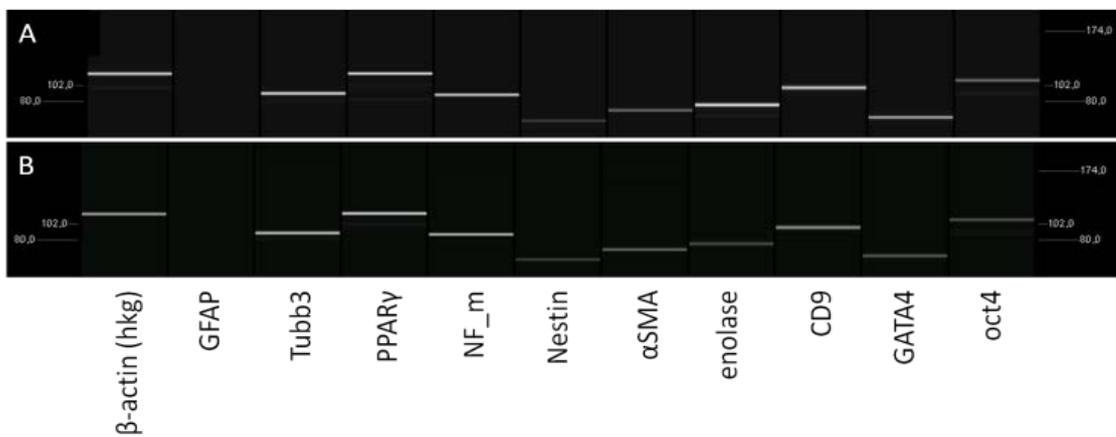


Abbildung 48: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und dem zweiten Polyimid (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet.

Es ist auch für die transgene pankreatische Stammzellpopulation ein unverändertes Differenzierungspotential auf Polyimid darstellbar.

Somit konnte angenommen werden, dass das gute neuronale Differenzierungspotential, indiziert durch die stabile Existenz von neuronalen Markern, unter allen bisher getesteten Konditionen, erhalten bleibt.

Ob eine stärkere Induktion der neuralen Differenzierung möglich ist, sollte in den folgenden Analysen untersucht werden.

4.4. Induzierbarkeit neuronaler Differenzierung

4.4.1. Induktion neuraler Differenzierung durch spezifische extrazelluläre Matrix

Jeder Zelltyp im Körper ist in eine gewebespezifische extrazelluläre Matrix eingebettet und interagiert mit ihr in aktiver Weise. Es ist somit nicht verwunderlich, dass spezialisierte Zelltypen *in vitro* häufig nur durch definierte Beschichtungen über lange Zeit erfolgreich kultiviert werden können, da ihnen außerhalb des Körpers eine möglichst native Umgebung zu Verfügung gestellt werden muss. Durch die aktive Perzeption der Wachstumsoberfläche kann allerdings auch eine instruktive Umgebung geschaffen werden für Zellen, die noch über ausreichend Plastizität verfügen. Diese Hypothese lag dem folgenden Induktionsversuch zugrunde.

Zunächst wurden Zellkulturoberflächen mit Laminin aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumorzellen beschichtet. Diese Glycoproteine sind nativ als Trimere aus α -, β - und γ -Untereinheiten vor allem in Basalmembranen zu finden und als besonders instruktiv für einige neural differenzierende Zelltypen beschrieben (Martinez-Ramos et al., 2008). Laminin spielt eine wichtige Rolle in der Geweberegeneration und fördert beispielsweise die Orientierung von Wachstumskegeln aussprossender neuronaler Zellfortsätze (Heaton and Swanson, 1988).

Um die Möglichkeit einer neuronalen Induktion der pankreatischen Stammzellen durch Laminin zu untersuchen, wurden sowohl Glas-Deckgläschen als auch Polyimid-Streifen mit der Laminin-Lösung beschichtet und die Zellen darauf kultiviert. Eine vergleichende Immunocytochemie sollte erste Hinweise auf eine neuronale Induktion der pankreatischen Stammzellen auf dieser Oberfläche geben (Abbildung 49). Die Untersuchung zeigte, dass die Marker Nestin, GFAP, α SMA und Neurofilament auf beschichteten und als Kontrolle unbeschichteten Oberflächen in vergleichbarer Weise in der Gesamtpopulation vorlagen. Es war weder eine tendenzielle Steigerung der Neurofilament-positiven Zellen zu beobachten, noch ein Indiz für die Verminderung der Zellen, die für den Stammzell-Marker Nestin positiv waren – beides Anzeichen einer gesteigerten neuronalen Differenzierung. Die Neurofilament-positiven Zellen wiesen ebenfalls keine deutlich verlängerten Zellfortsätze auf, welche an aussprossende Dendriten erinnern könnten. GFAP war in allen Kultivierungsbedingungen nur in wenigen Zellen, jedoch dort sehr prominent vorhanden. Die Menge der α SMA-positiven Zellen bleibt in einem beträchtlichen Anteil der Zellen in allen Ansätzen positiv. Bei einer erfolgreichen neuronalen Induktion, wäre eine starke Erhöhung der Neurofilament-positiven Zellen einhergehend mit einer Reduktion der α SMA-positiven Zellen zu erwarten gewesen. Da beides weder auf Laminin-beschichtetem Glas oder Polyimid aufgetreten ist, sowie keine

offensichtliche Änderung in der Nestin- oder GFAP-Synthese zu beobachten war, kann man davon ausgehen, dass die pankreatischen Stammzellen durch eine Laminin-Beschichtung nicht induzierbar sind. Auf weitere RT-PCR-Untersuchungen wurde verzichtet. Man möge die schlechte Bildqualität für einige Polyimid-Proben nachsehen, doch bei diesem Polyimid war die Opferschicht dicker als bei vorangegangenen Proben, weshalb die Eigenfluoreszenz stark erhöht war.

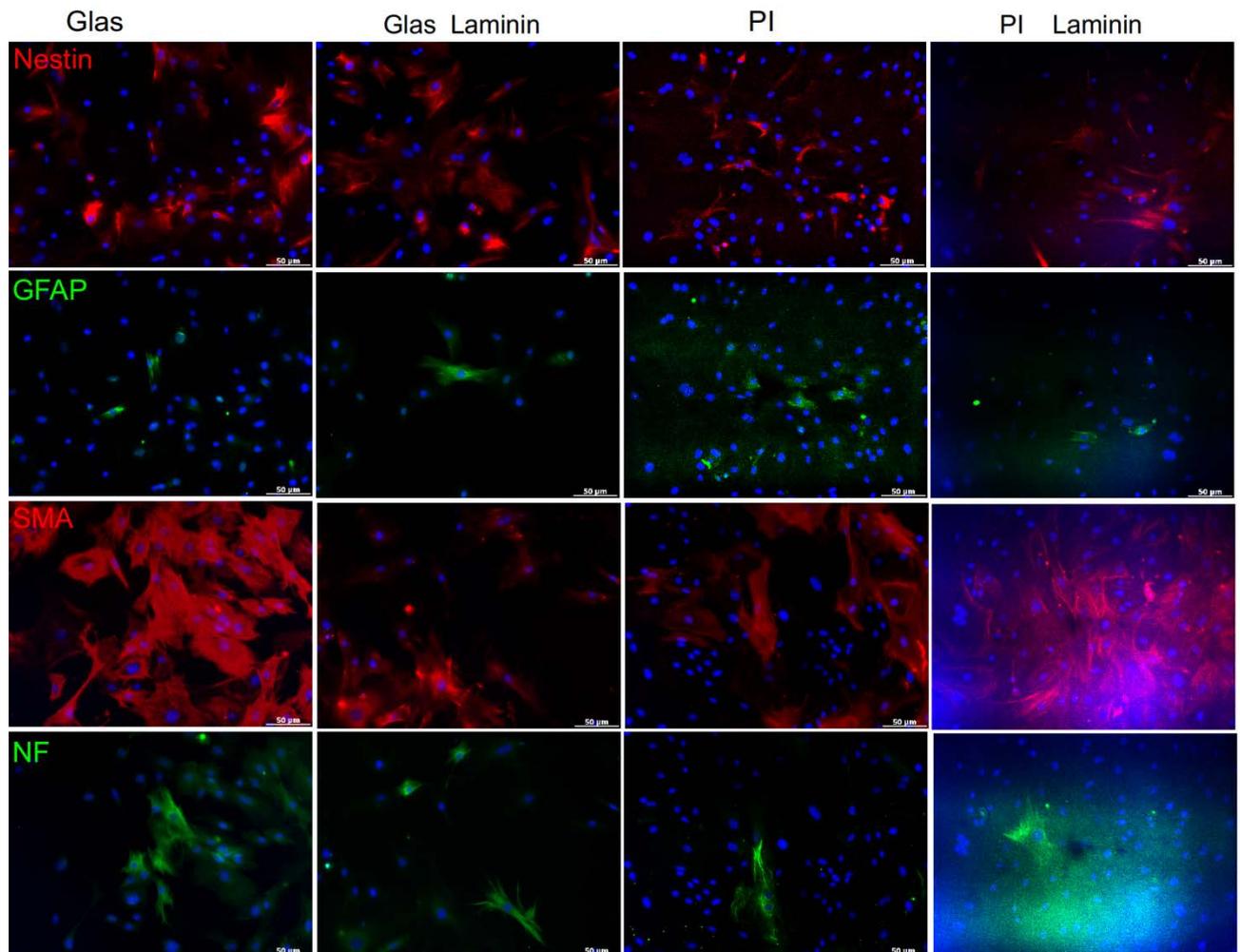


Abbildung 49: Vergleichende Immunfluoreszenz für pankreatische Stammzellen auf Laminin-beschichteten und unbeschichteten Deckgläschen (Glas) oder Polyimid-Streifen (PI). Es wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA und Neurofilament (NF) detektiert. (Vergrößerung: 200x).

Ein zweiter Versuch zur Induktion der pankreatischen Stammzellen wurde parallel mit Fibrin durchgeführt. Als Kontrolle dienten die auf Glas ausgesäten Zellen aus Abbildung 49. Fibrin ist zentraler Bestandteil der Wundheilung und wird auch *in vitro* aus den beiden Komponenten Fibrinogen und Thrombin hergestellt. Es fand in diesem Versuch eine Polymerisation von humanem Plasma-Fibrinogen mit humanem Thrombin zu einem Hydrogel Calcium-abhängig statt. Da es sich hierbei nicht um einen dünnen Film, wie bei Laminin handelt, sind im folgenden Versuch Zellen unter Fibrin, in Fibrin und auf Fibrin kultiviert worden, um die verschiedenen Möglichkeiten der dreidimensionalen Exposition der Extrazellulären Matrix zu den Zellen herstellen zu können. Es wurde wie bereits zuvor eine

immuncytochemische Untersuchung angeschlossen, um erste Hinweise auf eine mögliche neuronale Differenzierung zu erhalten (Abbildung 50).

In dieser Untersuchung zeigte sich, dass Nestin-positive Zellen in allen Ansätzen vertreten waren und von diesen besonders bei der Kultivierung auf und unter Fibrin vermehrt sehr kleine positive Zellen auffielen. Ähnlich verhielt es sich unter allen Konditionen für die GFAP-positiven Zellen. In allen Proben waren tendentiell viele α SMA-positiven Zellen zu beobachten. Dies könnte mit der veränderten Elastizität der Extrazellulären-Matrix und ihrer Dreidimensionalität zusammenhängen. Dadurch könnte sowohl die Kontraktilität als auch die Mobilität der einzelnen Zellen beeinflusst sein, was zu einer verstärkten Synthese von Cytoskelett-Bestandteilen, wie α SMA, führen kann. Für Neurofilament lässt sich feststellen, dass in allen Proben positive, kleine, kompakte Zellen vorlagen. Hierbei zeichnete sich die Probe der Zellen, welche unter Fibrin kultiviert wurden durch eine besondere Regelmäßigkeit in der Verteilung der Neurofilament-positiven Zellen aus.

An dieser Stelle soll ausnahmsweise einmal auf die genauere Verteilung der jeweiligen Protein-exprimierenden Zellen zueinander eingegangen werden. Zunächst eine kurze Bemerkung zu den Neurofilament-positiven Zellen im Verhältnis zu den α SMA-positiven Zellen. Die Zellen, welche Neurofilament synthetisierten, waren vielfach von α SMA-positiven Zellen umgeben. Es wurde nie beobachtet, dass die beiden Population voneinander getrennt auftraten. Häufig schienen sich die Neurofilament-positiven Zellen in Teilen über Ausläufer der α SMA-positiven Zellen zu erstrecken. War dies nicht der Fall und die Zellen waren distinkt voneinander getrennt, so waren es meist kleine, kompakte Neurofilament-positive Zellen, welche umringt von α SMA-positiven Zellen eingeschlossen waren und zu ihnen direkten Kontakt hatten (Abbildung 50).

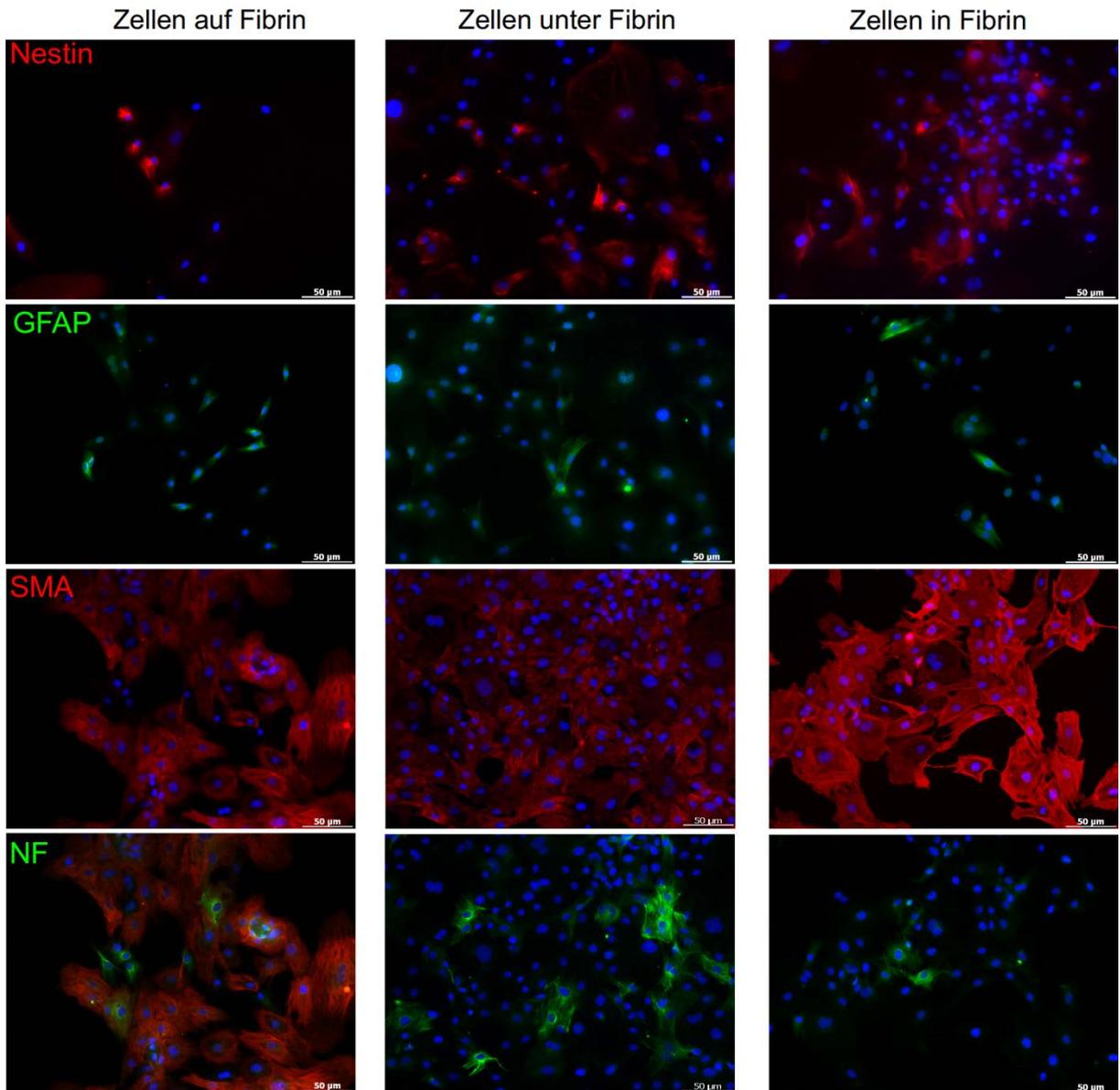


Abbildung 50: Vergleichende Immunfluoreszenz für pankreatische Stammzellen auf, unter und in Fibrin gewachsen. Es wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA und Neurofilament (NF) detektiert. (Vergrößerung: 200x).

Für die genauere Betrachtung der Verhältnismäßigkeit von Nestin-positiven Zellen zu GFAP-positiven Zellen sei zunächst auf Abbildung 51 verwiesen.

In dieser Untersuchung ist erstmalig und mehrheitlich aufgefallen, dass pankreatische Stammzellen, welche positiv für Nestin waren in direktem Zell-Zell-Kontakt mit GFAP-positiven Zellen stehen. Selbst dann, wenn nur kleine, räumlich getrennte Cluster der Zellen vorliegen. Ebenfalls neu war die Erkenntnis, dass Nestin und GFAP von den pankreatischen Stammzellen koexprimiert werden können. Dies konnte in diesem Versuch besonders gut für Zellen gezeigt werden, welche auf und in einer Fibrin-Matrix gewachsen waren.

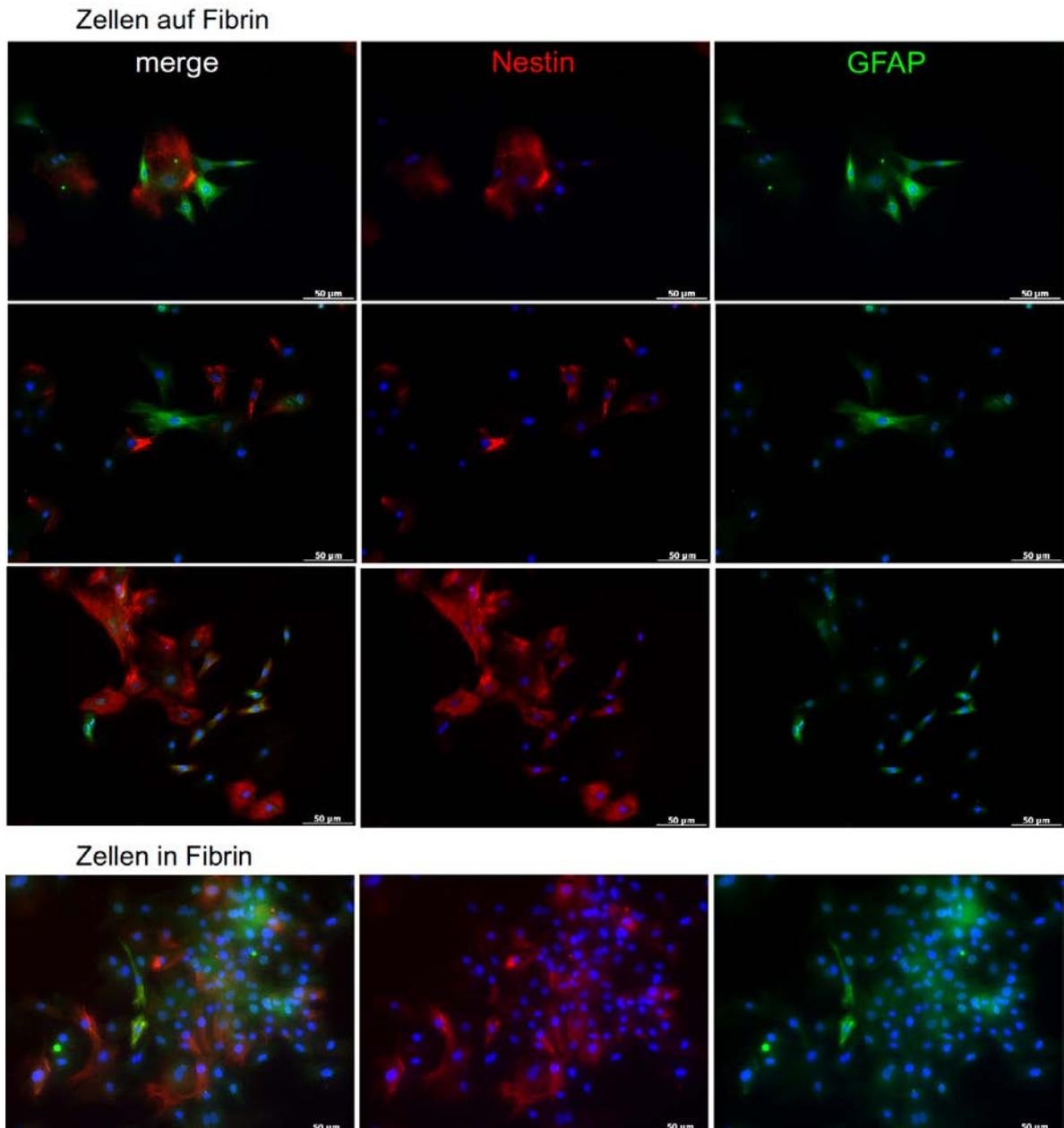


Abbildung 51: Nestin- und GFAP-Färbung für pankreatische Stammzellen auf und in Fibrin gewachsen. Es wird eine räumliche Nähe der Zellen in den Clustern beobachtet, sowie teilweise doppelt positive Zellen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x).

Interessanterweise war dies teilweise ebenfalls für Laminin-beschichtete Oberflächen festgestellt worden. In einer Wiederholung des vorangegangenen Versuches mit Laminin konnte dies bestätigt werden (Abbildung 52).

Diese Erkenntnisse trugen nur mittelbar zur Weiterentwicklung dieses Projektes bei, da sich keine Erhöhung der Synthese des neuronalen Proteins Neurofilament oder Verminderung des mesodermalen Proteins α SMA zeigen lies. Jedoch kann dieser kleine, konkrete Einblick in die Verteilung des Stammzell-Markers Nestin in seiner Verhältnismäßigkeit zu GFAP möglicherweise zum Verständnis der neuronalen Differenzierungsfähigkeit pankreatischer Stammzellen beitragen. GFAP ist *in vivo* nicht nur ein spezifischer Marker der glialen

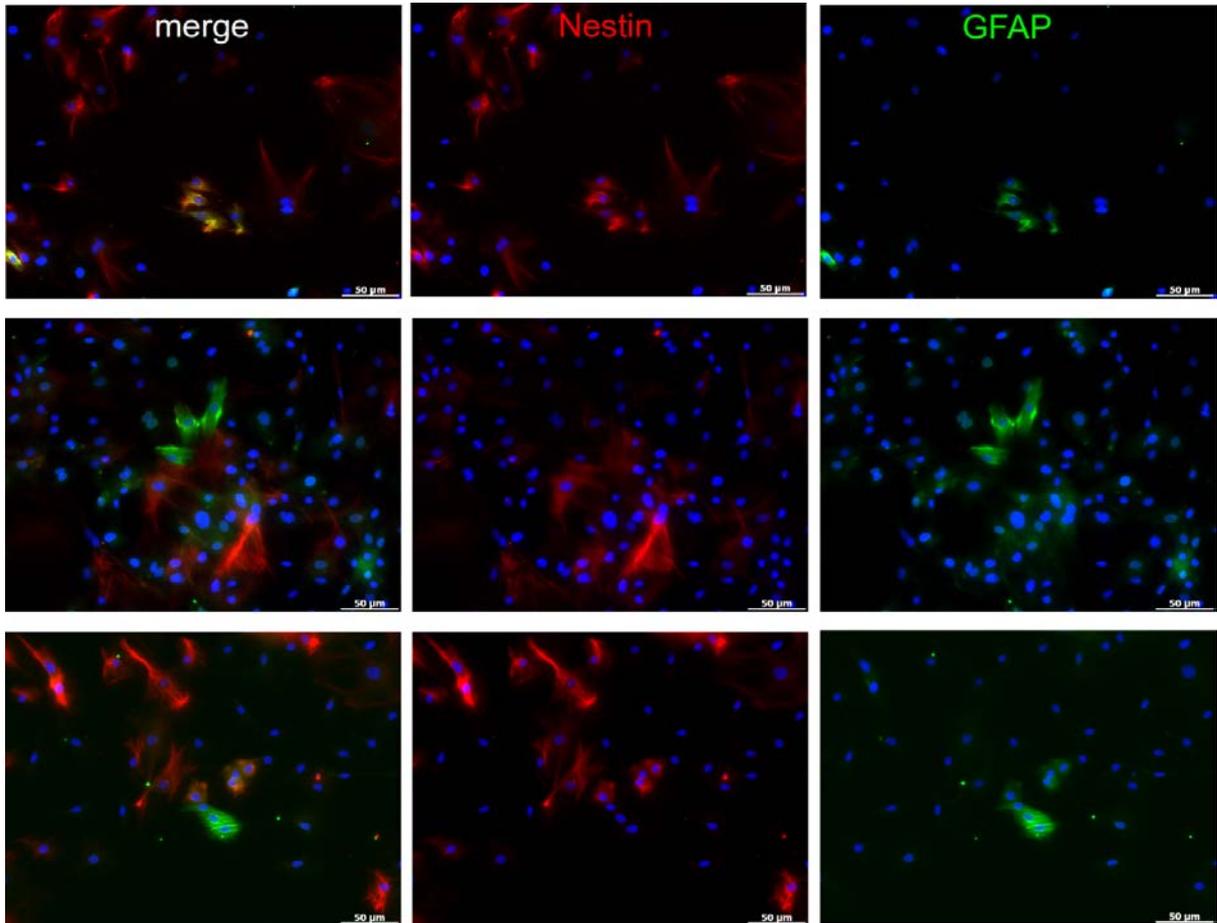


Abbildung 52: Nestin- und GFAP-Färbung für pankreatische Stammzellen auf Laminin gewachsen. Es wird in diesen Präparaten ebenfalls eine räumliche Nähe der Zellen in den Clustern beobachtet, sowie teilweise doppelt positive Zellen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x).

Population im Hirn, sondern auch kurzfristig in der frühen Differenzierung von neuronalen Vorläufern, vor der Entscheidung für die gliale oder neuronale Differenzierungsrichtung, exprimiert. Es deuten somit die Untersuchungen bezüglich der Extrazellulären-Matrix-Moleküle, insbesondere Fibrin, darauf hin, dass auch in pankreatischen Stammzellen ein ähnliches Differenzierungsprogramm induziert werden könnte, was wiederum die Eignung dieser Zellen für den Einsatz im Hirn bestätigt.

4.4.2. Induktion neuraler Differenzierung mittels Kokultur

Die Kokultur mit Hirnbiopsien ist ein bereits gut etabliertes Verfahren, um humane pankreatische Stammzellen neuronal zu induzieren. Hierbei sind gesteigerte Mengen Nestin- und Neurofilament-positiver Zellen durch immunocytochemische Untersuchungen sowie eine stark elongierte Morphologie dieser Zellen Kennzeichen für eine erfolgreiche Induktion. Dieser Ansatz wurde in diesem Versuch verfolgt, um die pankreatischen Stammzellen der Ratte auf ihre neuronale Induzierbarkeit zu untersuchen. Neben den parakrinen Einflüssen des Gewebes auf die darunter kultivierten Zellen kann es auch zu einer umgekehrten Beeinflussung, von den Zellen auf das Gewebe, kommen. Für anschließende immunocytochemische Untersuchungen wurden die pankreatischen Stammzellen auf Deckgläschen ausgesät, welche sich später färben und eindeckeln lassen für die Mikroskopie.

Die immunocytochemischen Färbung wurde mit dem bereits zuvor verwendeten Markerprofil aus Nestin, GFAP, α SMA sowie Neurofilament durchgeführt. Nach zwei Tagen war jedoch keine erfolgreich Induktion der neuronalen Differenzierung durch die Kokultur feststellbar, wie sie bereits für humane Zellen gezeigt wurde. Als mögliche Ursache wurde die Kultivierungsdauer in Betracht gezogen. Möglicherweise müssen pankreatische Stammzellen aus Ratten länger dem Einfluss der Hirnbiopsien ausgesetzt werden, als es für humane Zellen nötig ist. Dazu wurde obiger Versuch wiederholt und ein weiterer Messpunkt nach 4 Tagen eingeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs repräsentieren in Abbildung 53 exemplarisch an der Färbung für α SMA und Neurofilamente die Resultate aller Induktionsexperimente, welche auf diese Weise durchgeführt wurden. Es wurde für α SMA eine geringere Menge positiver Zellen sichtbar unter dem Einfluss der Kokultur als ohne diesen. Jedoch ist dies ebenso der

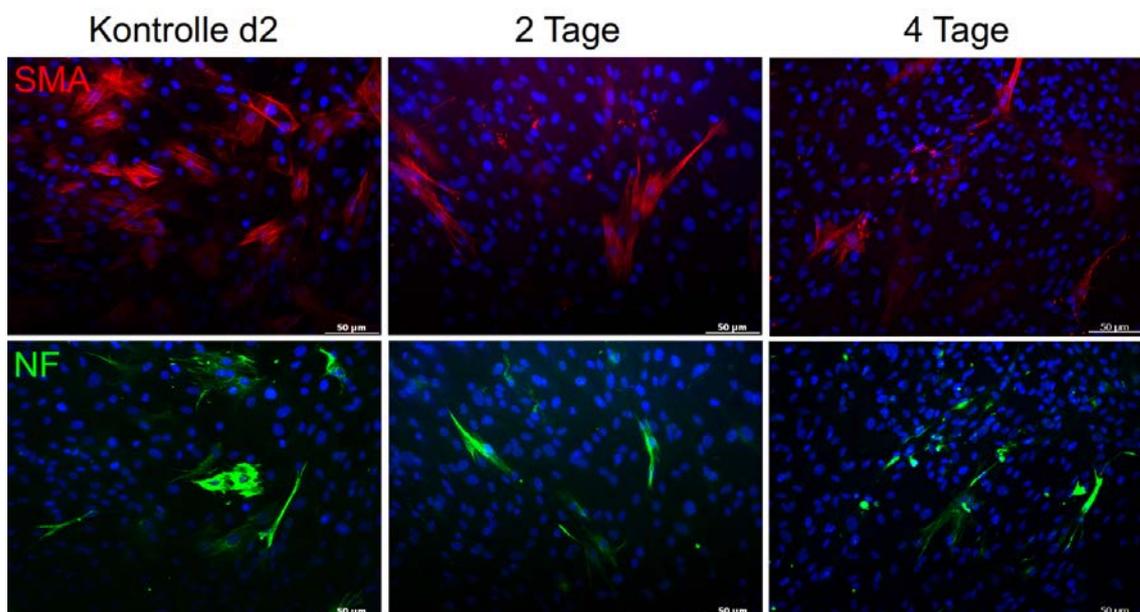


Abbildung 53: Immunfluoreszenzanalyse pankreatischer Stammzellen für α SMA und Neurofilament (NF) nach zwei und vier Tagen unter Kokultur mit Hirnbiopsien aus Ratten. Als Kontrolle (ohne Kokultureinfluss) sind die Zellen nach Tag 2 (d2) abgebildet. Es wurde keine neurale Induktion beobachtet.

Fall für Neurofilament-positive Zellen. Es ist auch zwischen den verschiedenen Kokultur-Zeiträumen keine wesentliche Zunahme der Neurofilament-positiven Zellen zu verzeichnen. Morphologisch sind in allen Populationen ähnliche spindelförmige, elongierte Zellen ohne nennenswerte Fortsätze zu sehen gewesen. Somit schien auch die Verlängerung der Kokultivierungszeit nicht zu einer besseren Induktion der pankreatischen Stammzellen zu führen.

Da bisherige Versuche nur einen Faktor der Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung betrachten, entweder die Zellkulturmatrix oder parakrine Effekte, jedoch beide Interaktionsebenen zugleich auf Zellen wirken können und möglicherweise nötig sind, sollte eine Steigerung der Induzierbarkeit neuraler Differenzierung mit einer Kombination beider Interaktionsebenen als nächstes untersucht werden. So wurde im folgenden Versuch eine Induktion durch Kokultur pankreatischer Stammzellen auf Deckgläschen, beschichtet mit Fibrin oder Laminin, versucht und anschließend wieder eine immunocytochemische Färbung durchgeführt (Abbildung 54).

Vergleicht man die Nestin-positiven Zellen pro Ansatz, so zeigt sich zunächst kein Unterschied zwischen den kokultivierten und normal kultivierten Ansätzen. Wenn man nun sein Augenmerk auf die GFAP-gefärbten Zellen legt, so sind unter normalen Kulturbedingungen nur in der Population, welche auf Fibrin wuchs, positive Zellen zu beobachten gewesen. Für die kokultivierten Zellen aller Ansätze war übereinstimmend viel nicht-filamentäres Signal zu sehen, welches häufig punkt- oder schleierförmig auftrat. Dabei handelte es sich offensichtlich nicht um GFAP-positive Zellen, sondern um andersartige Rückstände, welche Antikörper binden, möglicherweise Debris toter Zellen. Ähnliche Unspezifitäten wiesen ebenfalls die weiteren Färbungen der kokultivierten Zellen auf. Es zeigte sich in der Färbung für α SMA nur im Fall von Fibrin-beschichteten Oberflächen eine Reduktion positiver Zellen unter Kokulturbedingungen. Bei allen anderen Konditionen wurde zwischen Kokultur und normaler Kultivierung für dieses Protein keine Veränderung ersichtlich. Die Färbung für Neurofilament zeigte in den Proben ohne Beschichtung der Glasfläche mit und ohne Kokultur stark verzweigte, sternförmige Zellen mit filamentär gefärbten Strukturen. Betrachtet man jedoch die Zellkerne genauer, so scheinen diese Zellen trotz ihrer ausgeprägten Zellfortsätze nicht mehr vital zu sein. Möglicherweise besitzen sie aufgrund nekrotischer Retraktion eine solche Morphologie. Sollten effektiv neuronale Zellen induziert worden sein, wäre auch eine sternförmige Morphologie ungewöhnlich und eher eine sehr langgestreckte Zellform zu erwarten. Bei der Kultivierung auf Laminin- oder Fibrin-beschichteten Oberflächen wurden erneut besagte Unspezifitäten beobachtet, sowie keine steigende positive Zellmenge für dieses Protein unter Kokultur-Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen.

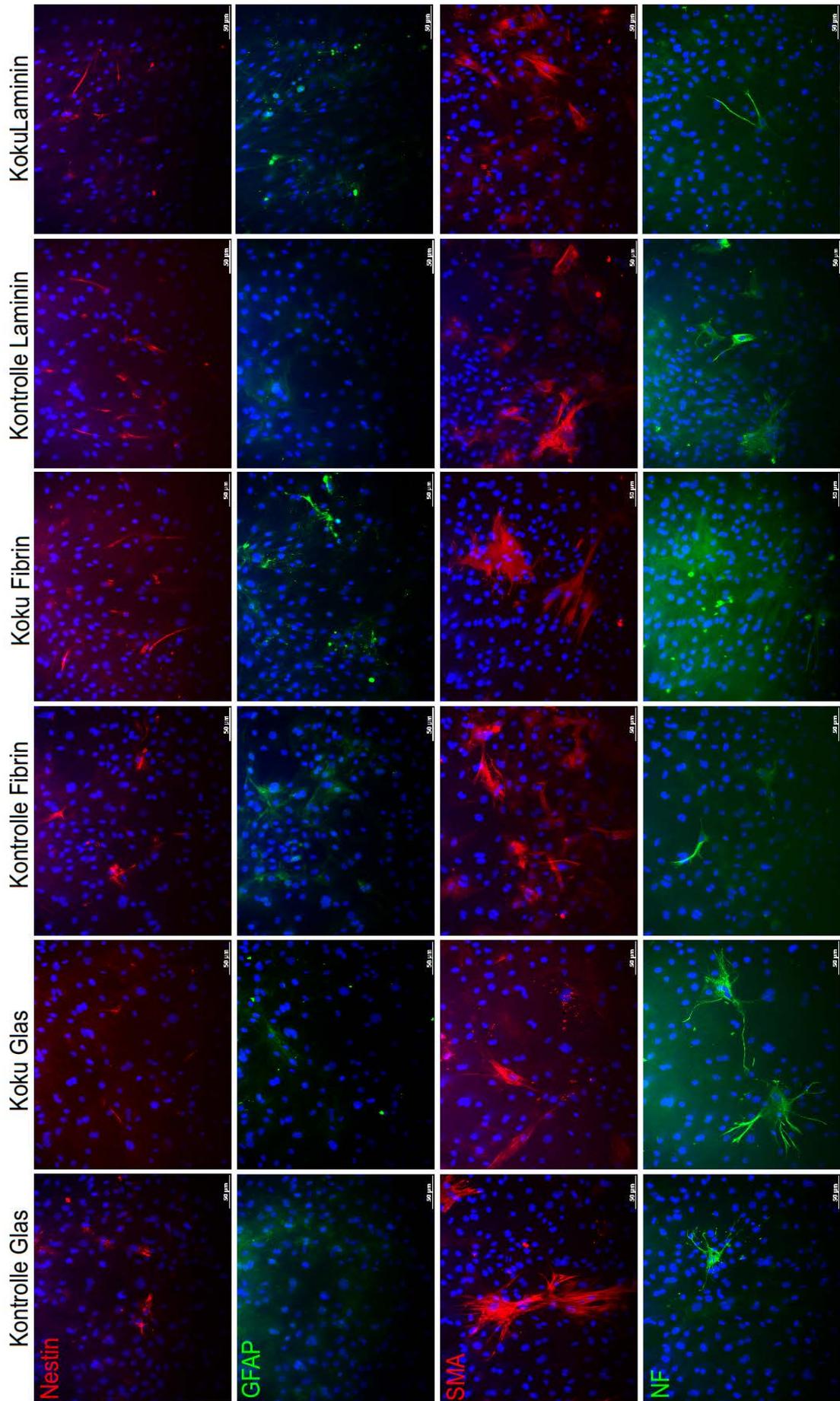


Abbildung 54: Immunfluoreszenz Untersuchung von pankreatischen Stammzellen gewachsen auf Laminin- oder Fibrin-beschichteten Deckgläschen unter Kokultur (Koku) mit dazugehörigen Kontrollen ohne Kokultur-Einfluss. Untersucht wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament(NF). (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x)

Ergänzend zu den bisherigen Versuchen pankreatische Stammzellen aus der Ratte mit Rattenhirn-Biopsien zu induzieren, sollte nun überprüft werden, ob dies mit Mäusehirn-Biopsien gelingen könnte, was darauf hindeuten würde, dass ein immunogener Einfluss aufgrund der Speziesunterschiede nötig ist. Die immunocytochemische Färbung zeigte keine positiven Resultate für die Färbung gegen Nestin, da auch diese Antikörper-Charge nicht funktionierte (Abbildung 55). Allerdings konnte für GFAP eine leichte Zunahme beobachtet werden. Das Protein α SMA war in vielen Zellen unter beiden Bedingungen zu beobachten. Jedoch wird in diesem Versuch durch die starke Veränderung der Neurofilament-positiven Zellen eine erfolgreiche neuronale Induktion ersichtlich. Sind in der Kontrolle vorwiegend kleine kompakte Zellen zwischen den α SMA-positiven Zellen zu beobachten gewesen, zeigten sich nach der Kokultur sehr viele langgestreckte Zellen mit deutlicher Färbung. Dieses Ergebnis entspricht den bereits zuvor erfolgreich induzierten humanen pankreatischen Stammzellen. Weitere Färbungen für Ki67 zeigen unter beiden Konditionen einige proliferierende Zellen an. Augenscheinlich liegen bei den kokultivierten Populationen in jeder Probe mehr Zellen vor, als bei den Kontrollen. Zählt man jedoch Ki67-positive und negative Nuclei in beiden Proben aus, so ergibt sich kein Unterschied. Das würde bedeuten, dass der Anteil proliferierender Zellen in beiden Populationen gleich ist, sich jedoch möglicherweise die Zeit der Zellteilungen unter Kokultur-Bedingungen verkürzt.

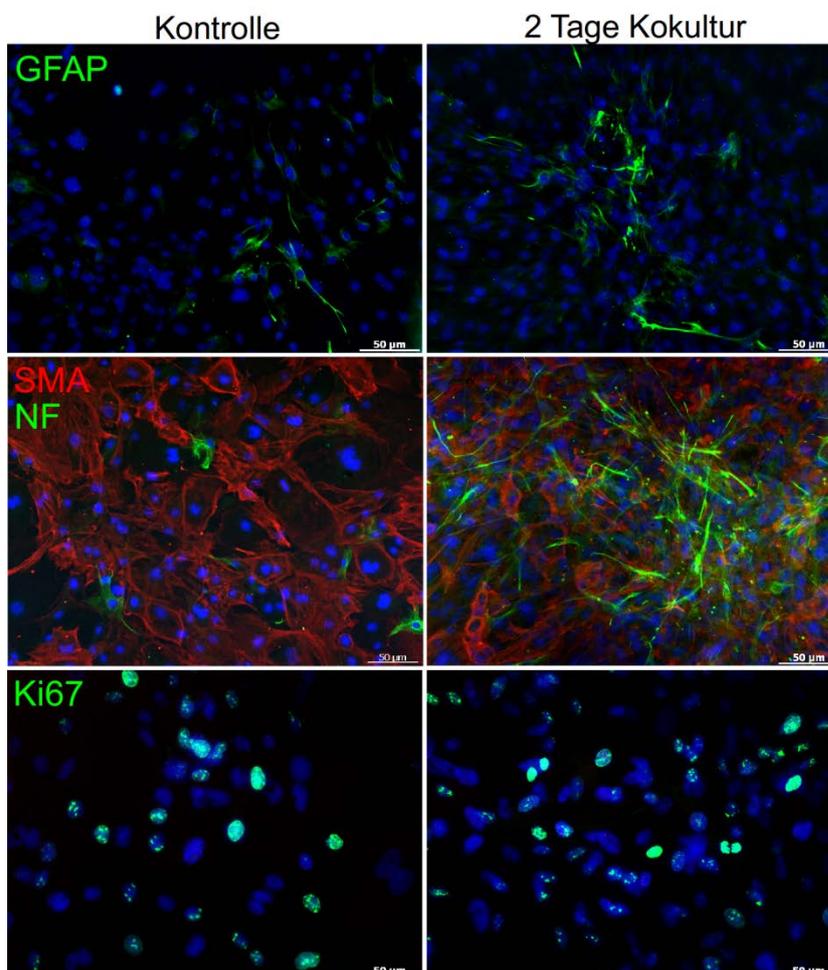


Abbildung 55: Immunfluoreszenz Untersuchung pankreatischer Stammzellen nach xenogener Kokultur für zwei Tage im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne Kokultureinfluss). Untersucht wurden die Proteine GFAP, α SMA, Neurofilament (NF) und Ki67. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x).

4.5. Simulation von Scherstress auf Zell-besiedelten Sondenmaterialien

Für die Implantation von Tiefenhirn-stimulierenden Elektroden, welche mit Stammzellen bedeckt sind, ergab sich mittelfristig eine rein praktische Fragestellung: Was passiert mit den Stammzellen während des Implantationsprozederes?

Ein konfluenter Monolayer von Zellen könnte durch die starken mechanischen Kräfte bei der Gewebepenetration zerstört werden, da er eine sehr empfindliche biologische Oberfläche darstellt.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung war es nötig ein Testsystem zu entwickeln, welches standardisiert und reproduzierbar einen solchen Prozess in vitro widergegeben kann. Grundlegend hierfür ist die Orientierung an existierenden, praktisch verwendeten Parametern. Die Literatur beschreibt beispielsweise eine Implantationsgeschwindigkeit von $2.000\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ (Bjornsson et al., 2006). Während der theoretischen Entwicklung dieses Testsystems wurde jedoch angestrebt, mit diesem auch potentielle Schutzoptionen zu testen. Zur Sicherstellung ihrer Effizienz wurde die Insertionsgeschwindigkeit verdreifacht. Diese Modulation ließ den Schluss zu, dass Schutzmaßnahmen bei einer 3,5fachen Geschwindigkeit, verbunden mit einer entsprechend höheren Kraft auch bei einfachen, realen Parametern funktionieren können. Somit ist eine relativ zuverlässige Aussage möglich. Es wurde nun ein praktischer Aufbau für ein solches Testsystem erdacht. Hierbei wurden gängige Labormaterialien und -geräte zu folgendem Testsystem zusammengesetzt:

An den Trägerkopf eines Piezo-getriebenen Mikromanipulator wurde eine chirurgische Klemme mit rückstandslosem Klebeband befestigt, sodass sie in einem Winkel von 45° über der Oberfläche hängt (Abbildung 56). Damit verlängert sie die Bewegungsrichtung des Kopfes in direkter Fortsetzung.



Abbildung 56: Aufbau der Zugversuch-Aparatur am Mikromanipulator. Die chirurgische Klemme wurde an den Mikromanipulatorarm geklebt und auf einen Winkel von 45° eingestellt.

Unter diesem Zugarm wurde nun eine Petri-Schale positioniert und in diese ein Block aus 2% (w/v) Agarose gelegt, welcher $0,7 \times 1,0 \times 1,4\text{cm}$ (HxBxT) groß war. Dies entspricht etwa der Dimension einer Hirnhemisphäre von einer 320g schweren Wistar-Ratte. Nun wurde die

Petrischale mit PBS gefüllt bis der Block mit Flüssigkeit benetzt war. Würde man den Block nicht zuvor einlegen, sondern erst die Schale füllen, so bliebe er nicht ausreichend adhäsiv an der Oberfläche der Petri-Schale und würde bei der späteren Zugbewegung dieser folgen. Nach dem Erzeugen eines flüssigen Milieus mit dem physiologischen Puffer wurde vorsichtig die Stammzell-besiedelte Polyimid-Folie auf dem Agarose-Block positioniert. Es hat sich gezeigt, dass es keinen nennenswerten Einfluss hat, ob man die Zellen dem vorgelegten Block zuwendet oder nicht. Zur Standardisierung wurde allerdings der 1cm breite und 2cm lange Polyimidstreifen in allen Versuchen mit der Zell-besiedelten Seite nach unten gelegt. Dabei überlappte der Polyimid-Streifen den Agarose Block um ca. 6 mm in Richtung Mikromanipulator. Nun wurde ein identischer Agarose-Block auf dem Polyimid positioniert. Er soll die zweite Hirnhemisphäre darstellen und durch sein Gewicht einen gleichmäßigen, flächigen Druck aufbauen. Anschließend wurde eine Positionierung des Mikromanipulators oberhalb der Überlappung des Polyimides so vorgenommen, dass ein vorsichtiges Einklemmen dieses Stückes Polyimid in die chirurgische Klemme möglich war, ohne Zugspannung zu erzeugen (Abbildung 57)(Richter et al., 2010).

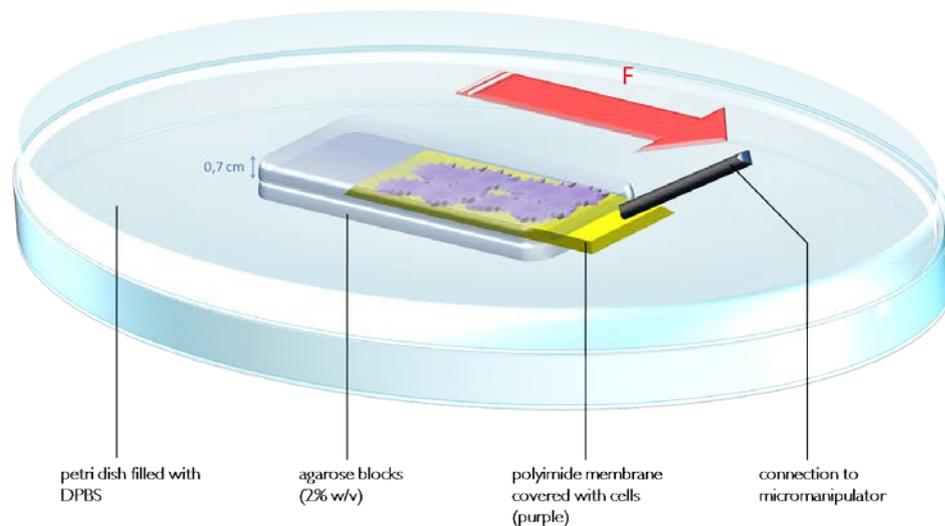


Abbildung 57: Schematischer Aufbau des Zugversuches. In der Petrischale wird der Agarose-Dummy platziert, zwischen welchem sich die Zellbesiedelte Polyimid-Folie befindet. In flüssigem Millieu wird unter Zug durch den Mikromanipulator der Scherstress auf der Zell-besiedelten Folie simuliert. (Richter et al., 2010)

Nun wurde mit dem Piezo-getriebenen Mikromanipulator das Polyimidstück zwischen beiden Hirn-Dummies mit einer konstanten Geschwindigkeit von $7.500\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ gezogen. Anschließend konnte die Polyimidfolie entfernt, mit DAPI gefärbt und für die mikroskopische Untersuchung eingebettet werden. Zur Validierung wurde dieses Experiment ebenfalls mit Hirnhemisphären durchgeführt. Es zeigte sich hierbei, dass die Zellen vom Polyimidfilm großflächig abgeschert werden, wenn sie im Dummy oder im Hirn den enormen Zugkräften ausgesetzt wurden (Abbildung 58). Dieses Ergebnis führte zu der Notwendigkeit, sich

Gedanken über einen möglichen Schutzfilm für die Zellen zu machen. Dabei wurden folgende Prämissen angesetzt: Es sollte idealerweise ein biodegradierbares Hydrogel sein, welches sich ohne toxische Protokolle auf die Zellen aufbringen lässt. Das verwendete Material sollte außerdem biokompatibel mit dem Zielgewebe und nach Möglichkeit schon klinisch zugelassen sein.

Es wurden verschiedenen Hydrogele (z.B. CloneMatrix von Genetix, low-melt-Agarose-Filme und Fibrin) in Vorversuchen getestet. Als endgültiger Favorit wurde Fibrin ausgewählt, da alle anderen Filme nur unzureichenden Schutz boten (zu flüssig, zu brüchig) und nicht klinisch zugelassen waren. Trug man auf die Zellen nun einen Fibrin-Film auf, wie es zuvor bei den Induktionsversuchen geschah, konnte die konfluente Zellschicht gut vor dem starken Scherstress des Zugversuches geschützt werden (Abbildung 58). Diese neu eingeführte Komponente des späteren Implantates führte zu der Notwendigkeit, ihren Einfluss auf die pankreatischen Stammzellen genauer zu untersuchen, da es sich ja hierbei um eine weitere Veränderung des Kultivierungsmilieus der Zellen handelt, welcher Einfluss auf deren Eigenschaften haben könnte.

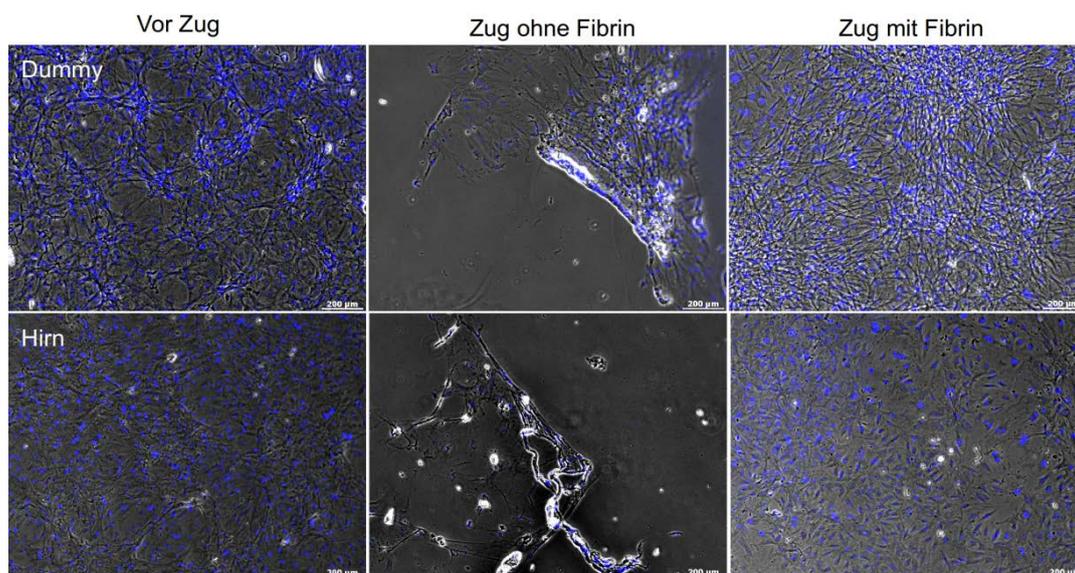


Abbildung 58: Ergebnisse des Scherstress-Tests mit Hirn-Dummy (oben) und Hirn-Hemisphären (unten). Vor dem Scherstress (Zug) sind die Polyimid-Folien konfluent mit pankreatischen Stammzellen besiedelt (links). Wird Scherstress auf sie ausgeübt, schält sich ohne Schutz ein Großteil des Zellrasens ab (mittig), was mit einer Fibrin-Schutzschicht verhindert werden kann (rechts). (blau: DAPI, Vergrößerung: 100x).

4.6. Fibrin-Schutzschicht

Da sich durch die Scherstress-Simulation zeigen ließ, dass Fibrin ein geeigneter Schutzfilm für die Insertion der Stammzell-besiedelten Elektroden sein kann, sollten hierzu nun weitere Untersuchungen stattfinden. Wie bereits in den Induktionsversuchen thematisiert, unterliegen Zellen *in vitro* dem Einfluss ihrer Kultivierungsbedingungen, zu denen neben den Parametern Temperatur, Gaszusammensetzung und Medium auch die Art der sie umgebenden Oberfläche zählt. Zumeist wird den Zellen eine planare Wachstumsfläche angeboten, wie man es von gängigen Zellkulturflaschen, -schalen oder -platten kennt. Dort bilden sie eine einlagige Zellschicht durch Proliferation aus. Werden diese Zellen nun auch von der anderen, oberen Seite mit einer Matrix versehen, kann es zu veränderten Eigenschaften bezüglich Überleben, Proliferation, Metabolismus und Differenzierung kommen, da sie aktiv von ihrer Umgebung beeinflusst werden können. In den Induktionsexperimenten und der Scherstress-Simulation wurde ersichtlich, dass eine Fibrin-Überschichtung ein kompatibler Film sein kann, um die pankreatischen Stammzellen zu schützen. Jedoch können die bisherigen Untersuchungen noch keine Auskunft darüber geben, ob die Zellen sich unter diesem Einfluss bezüglich oben genannter Parameter verändern. Dies war Inhalt der folgenden Experimente.

Initial wurde eine Metabolismus-Untersuchung mit einer finalen FDA-PI-Färbung von Fibrin-behandelten Proben in Analogie zu den bereits unter 0. beschriebenen Wachstumskurven durchgeführt. Dabei fand eine Messung des Glucoseverbrauches und der Lactatbildung durch die Zellen statt (Abbildung 59). Es wurden Fibrin-beschichtete und unbeschichtete Proben pankreatischer Stammzellen gewachsen auf Zellkulturplastik mit denen gewachsen auf Polyimid verglichen. Als Kontrollen dienten entsprechende Zell-freie Ansätze. In allen Zellhaltigen Proben wurde eine gleichartige Reduktion des Glucose-Gehaltes mit korrelierender Zunahme des Lactat-Wertes ermittelt. Die Zell-freien Proben der Kontrollen wiesen eine geringe Zunahme des Glucose-Gehaltes auf, welcher auf Verdunstung zurückzuführen ist. Es kann somit ein kontinuierlicher Zellstoffwechsel für alle Proben festgestellt werden.

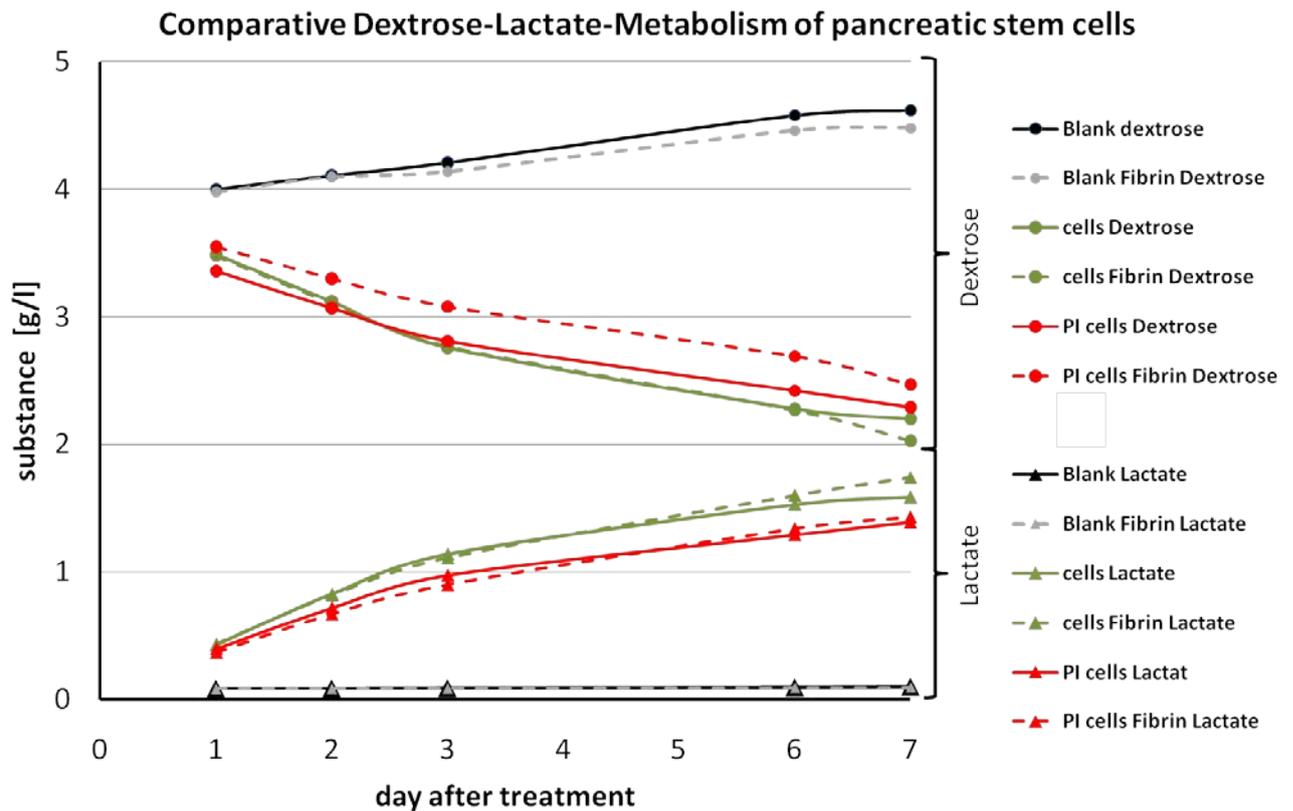


Abbildung 59: Graphische Darstellung der vergleichenden Metabolismus-Analyse durch Bestimmung des Glucose- und Lactat-Gehaltes im Medium. Die Glucosewerte (Punkt) sind mit ihren korrespondierenden Lactat-Werten (Dreieck) über sieben Tage Dauer aufgetragen. (Richter et al., 2011)

Die finale FDA-PI-Färbung ergab in allen Zell-haltigen Proben ein ebenso homogenes Bild. Die in Abbildung 60 exemplarisch dargestellten Proben illustrieren sowohl mit als auch ohne Fibrin-Überschichtung eine konfluente, vitale Zellpopulation.

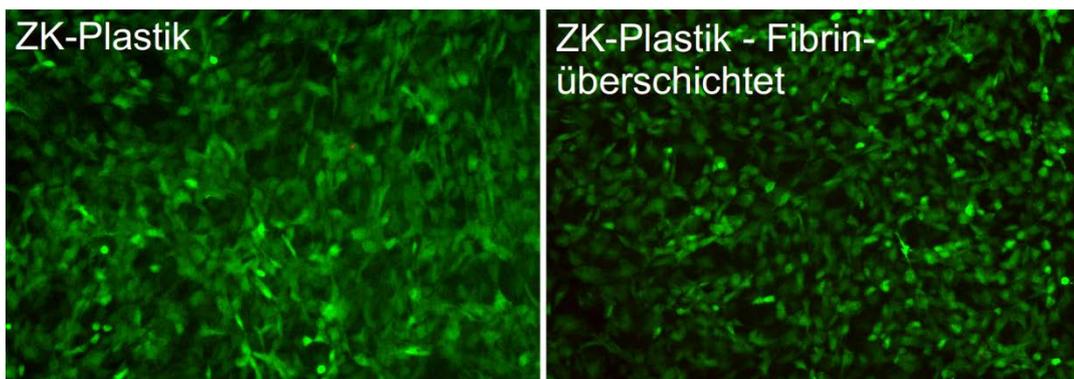


Abbildung 60: Fluoresceindiacetat (FDA)-Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen auf Zellkulturplastik ohne (links) und mit Fibrinbeschichtung (rechts). (Vergrößerung: 100x)

Eine Wachstumskurve mit Fibrin-beschichteten Zellen wurde versucht, jedoch stellte sich heraus, dass es nicht zuverlässig möglich war, die Zellen zu vereinzeln, nachdem sie unter dem Hydrogel kultiviert wurden. So sollte die Proliferationsaktivität in einer anschließenden immuncytochemischen Analyse durch den Proliferationsmarker Ki67 festgestellt werden

(Abbildung 62). Zunächst ergibt sich für die Vitalität, den Metabolismus und das Wachstumsverhalten, bezogen auf die Mikroskopie der FDA-PI-Färbungen, kein gravierender Unterschied im Zellverhalten.

Zur Untersuchung einer möglichen Änderung des Differenzierungsverhaltens wurden in Analogie zu vorangegangenen Versuchen nun mRNA-Analysen mittels RT-PCR sowie immunocytochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde die Untersuchung auf Zellen gewachsen auf Polyimid beschränkt, da dies der letztendlichen Applikation entspricht und eine andere Aussage für Zellen gewachsen auf Zellkulturplastik nach den bisherigen Analysen nicht zu erwarten war.

Die PCR-Ergebnisse, hier dargestellt mit den entsprechenden Kontrollen gewachsen auf Zellkulturplastik und Polyimid-Folie, zeigte kein verändertes mRNA-Expressionsprofil für die Fibrin-behandelten Proben (Abbildung 61). Es konnten in unveränderter Weise die

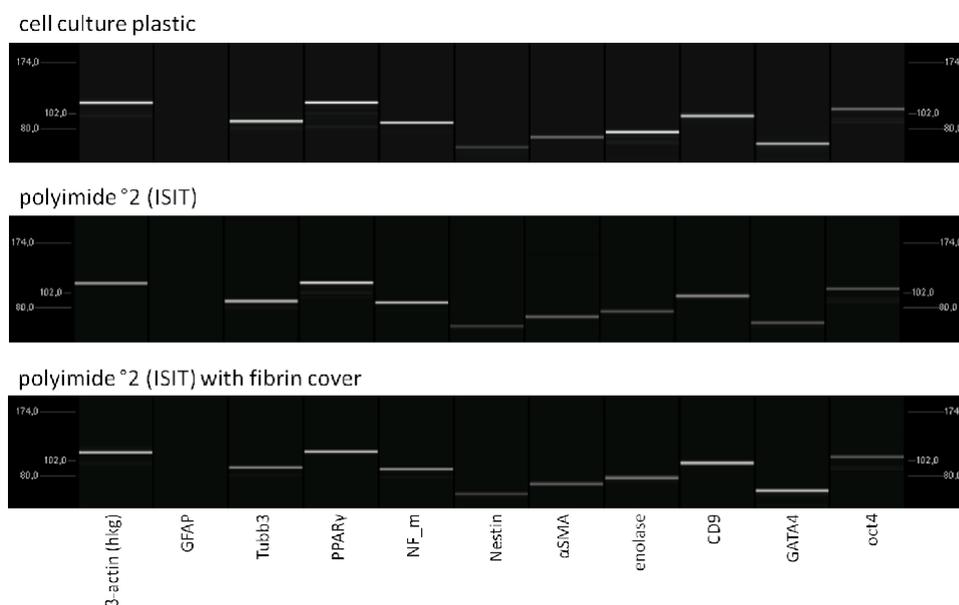


Abbildung 61: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptom von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und Polyimid ohne (mittig) und mit Fibrinbeschichtung (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. (Richter et al., 2011)

Stammzellmarker Nestin, oct4 und CD9 als mRNA detektiert werden. Selbiges trifft für die neuronalen Marker Neurofilament mittelschwere Kette, β 3-Tubulin und Enolase zu. Ebenfalls unverändert erschien das mRNA-Profil für die mesodermalen Marker α SMA und PPAR γ sowie für den endodermalen Marker GATA4. Die mRNA des neuronalen Markers GFAP ist wiederholt nicht detektiert worden.

Bezüglich des mRNA-Profiles war für die betrachteten Marker somit keine Veränderung feststellbar. Es schloss sich nun die Analyse der Protein-Synthese durch immunocytochemische Färbungen, ebenfalls in Analogie zu vorangegangenen Untersuchungen, an. Hierbei wurde in allen Proben eine gleichmäßige Menge Nestin-positiver Zellen festgestellt. Die filamentären

Strukturen in den auf Polyimid kultivierten Zellen sind schwer darstellbar, da die Eigenfluoreszenz des Kunststoffes die feinen Filamente stark überstrahlt. Für die GFAP-Färbung lässt sich feststellen, dass auf normaler Zellkulturplastik keine positiven Zellen in diesem Experiment gefunden wurden. Die Zellen auf Polyimid hingegen zeigten ein einzelnes Cluster GFAP-positiver Zellen. Für die Zellen, welche unter Fibrin kultiviert wurden scheint eine grüne Färbung dieses Proteins vorzuliegen. Jedoch zeigte sich bei genauerer Betrachtung keine filamentäre Färbung, sondern es scheint sich hierbei um die Fluoreszenz von extrazellulären Bestandteilen bzw. Unregelmäßigkeiten der Fibrin-Beschichtung zu handeln. Vesikuläre Verunreinigungen scheinen sich unter dem Fibrinnetz anzureichern, sind doch in allen Färbungen dieser Proben punktförmige Unspezifitäten in mehreren Ebenen detektierbar. Für das mesodermale Cytoskelett-Protein α SMA sind in allen Proben positive Nachweise geführt worden. Es fällt hierbei auf, dass mehr Zellen auf Polyimid mit und ohne Fibrin-Überschichtung positiv sind als auf Zellkulturplastik. Dies ist vermutlich, wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen angemerkt, auf eine veränderte Elastizität der Kultivierungsoberfläche bzw. -Matrix zurückzuführen. Zwischen den beiden Polyimid-Proben hingegen besteht nahezu kein Unterschied, da bereits ohne Fibrin die Majorität der Zellen positiv ist und somit eine weitere Steigerung schwer feststellbar wird. Für den neuronalen Marker Neurofilament wurde in der Kontrolle unter normalen Zellkulturbedingungen eine geringere Dichte positiver Zellen festgestellt, als für die Proben auf Polyimid mit und ohne Fibrin. Diese wiederum unterschieden sich kaum. Für den Proliferationsmarker Ki67 wurde in allen Proben ein positiver Nachweis geführt, sodass in allen Proben eine vorhandene Teilungsaktivität einzelner Zellen festgestellt werden konnte.

Zusammengefasst ergibt sich für die Fibrin-Beschichtung ein positives Bild. Es scheint nicht zu einer Veränderung der Stammzeleigenschaften zu kommen, die die Applikation im ZNS verhindern würde. Die pankreatischen Stammzellen sind unter diesen Konditionen vital, metabolisch stabil und fähig die Tochterzellen durch Proliferation hervorzubringen, welche die bisherigen Differenzierungsrichtungen einschlagen können. Somit kann die Komponente Fibrin als Schutzschicht zum Implantationsprotokoll hinzugefügt werden.

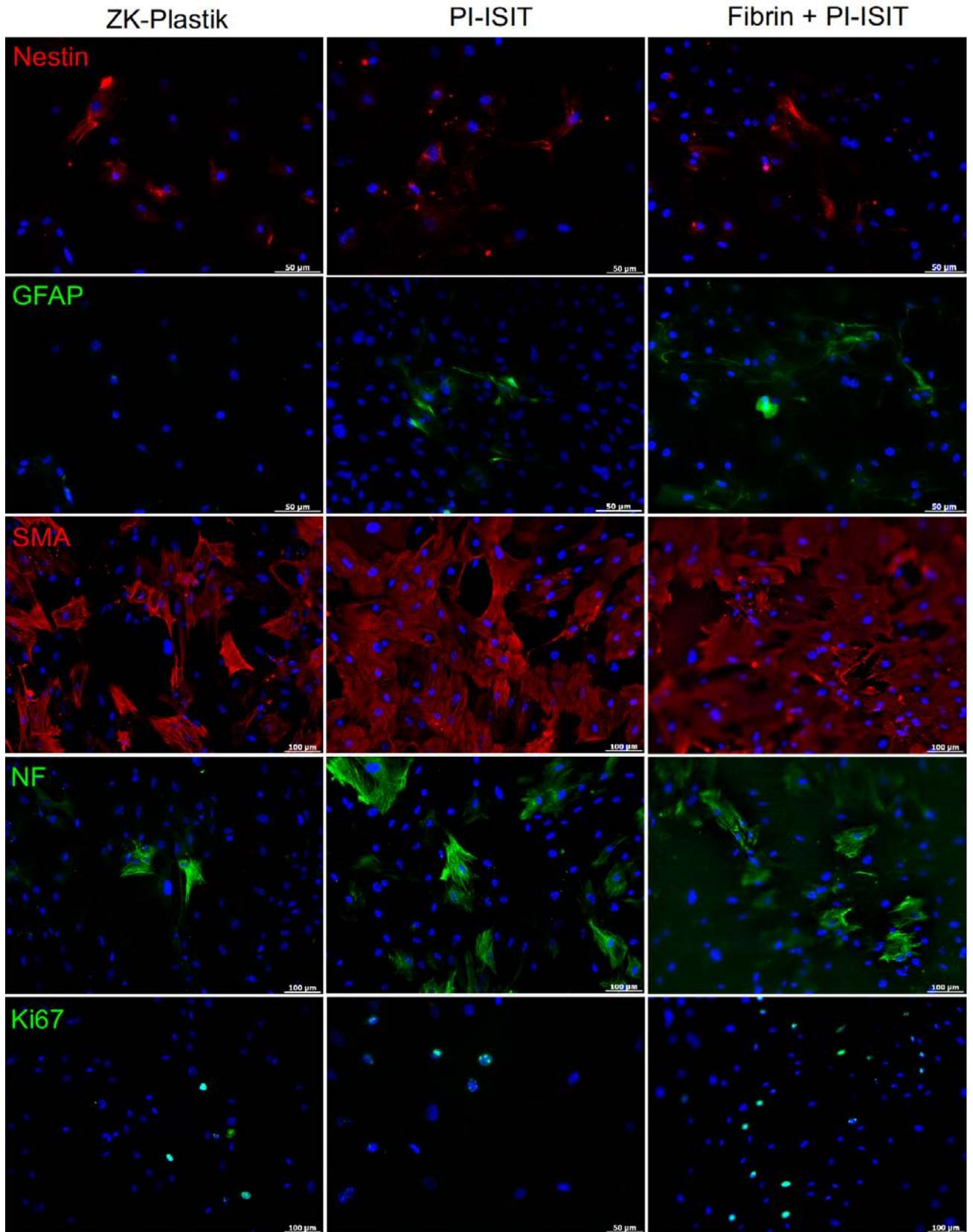


Abbildung 62: Vergleichende immunfluoreszente Analyse der Proteinexpression pankreatischer Stammzellen auf Zellkulturplastik (links), Polyimid (mittig) und Fibrin-beschichtetem Polyimid (rechts). Untersucht wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament (NF) und Ki67. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)

4.7. In situ-Simulation der Zelltransplantation

Im Vorfeld einer Zelltransplantation ins lebende Tier sollte idealerweise abgeklärt werden, wie sich die Zellen im Zielgewebe verhalten könnten. Es kann somit abgeschätzt werden, ob die Zellen proliferieren und möglicherweise das Gewebe als Matrix akzeptieren und es infiltrieren.

Es wurden hierfür Hirnschnitte mit ca. 300µm Dicke aus Ratten- und Nacktmäuse-Hirnen angefertigt und kultiviert. In die Hirnschnitte wurden manuell sogenannte Organoid Bodies, also durch hanging drop erzeugte Zellaggregate, aus GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen eingebracht. Durch ihre intrinsische Fluoreszenz lassen sie sich unter einem Binokular mit Fluoreszenz-Lampe im Gewebe wiederfinden. Die kompaktierte Form des Zellaggregates ist dabei leichter identifizierbar als aufgesäte Einzelzellen. In Experimenten mit Rattenhirnschnitten zeigte sich, dass sowohl unter Kultivierung mit 10% FKS-Anteil im Medium als auch mit 20%FKS-Anteil eine Invasion der transgenen Zellen über den gesamten Zeitraum von 5 Tagen stattfindet (Abbildung 63). Dies ist nicht für jeden Organoid Body zu sehen, jedoch in der Mehrzahl. Bereits nach einem Tag sind kleine Ausläufer der Aggregate unter 20%igem FKS-Anteil zu sehen. Nach drei Tagen ist unter beiden Bedingungen eine sternförmige Verästelung dieser offensichtlich und bereits einzelne Zellen weiter ins Gewebe eingewandert. Am fünften Tag sind viele transgene Einzelzellen über den gesamten Bildausschnitt verteilt. Offensichtlich können die pankreatischen Stammzellen mit dem Hirngewebe gut interagieren und es in kurzer Zeit aktiv besiedeln.

Es konnte festgestellt werden, dass die Hirnschnitte zwischen den ersten 24 bis 48 Stunden unter diesen Bedingungen enorm an Vitalität verlieren.

Es kann also aufgrund der Beobachtungen dieses Experimentes angenommen werden, dass die pankreatischen Stammzellen unter denkbar ungünstigen Bedingungen im Gewebe dennoch ausreichend vital sind, um zu migrieren.

Als Überprüfung dieses Konzeptes wurde, ähnlich wie bei den Kokulturen, dieses Experiment mit Hirnschnitten aus Nacktmäusen wiederholt. Hierbei wurde an Tag 3 ein geringerer Verzweigungsgrad der Organoid Bodies beobachtet als im syngenem Experiment (Abbildung 63). Nach fünf Tagen hingegen war eine deutliche sternförmige Verzweigung der Organoid Bodies sichtbar. Dieses Experiment wurde auf eine Dauer von 22 Tagen ausgedehnt und auch nach dieser Zeit wurde noch die Invasion der transgenen Zellen beobachtet. Somit lässt sich vermuten, dass die beobachteten Effekte nicht nur auf akuten Mechanismen beruhen, sondern ebenfalls in einer längerfristigen Situation vorliegen.

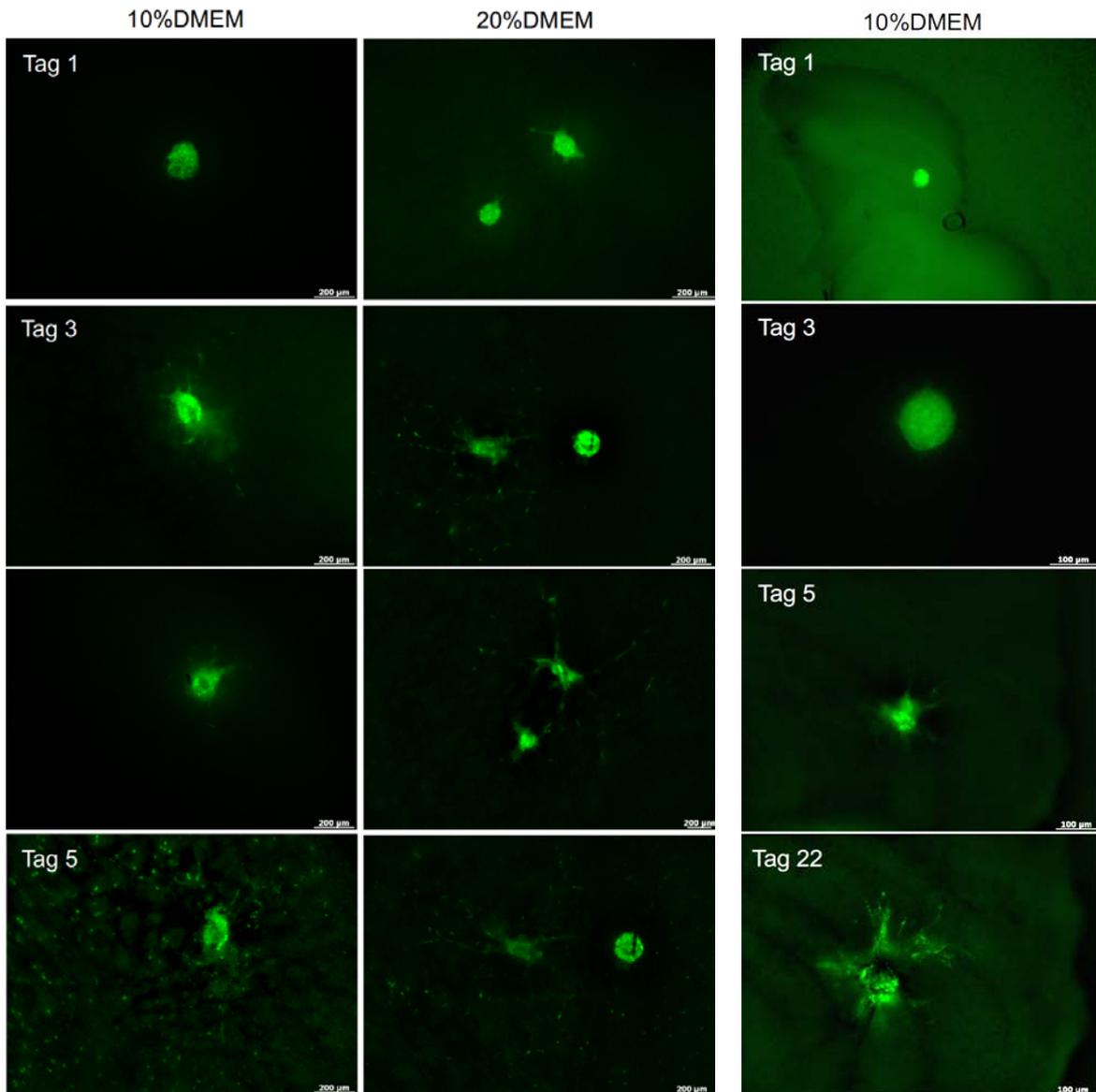


Abbildung 63: Mikroskopische Beobachtungen der Integration GFP-transgener pankreatischer Stammzellen in kultivierte Hirnschnitte. Für Hirnschnitte aus Ratten in 10%DMEM (links) und 20%DMEM (mittig) wurden bereits innerhalb von drei und fünf Tagen transgene Zellen beobachtet, welche ins Gewebe migrieren. Auch in Hirnschnitten von Nacktmäusen über einen langen Zeitraum von 22 Tagen in 10%DMEM (rechts) fand dies statt.

Desweiteren wurden auf kultivierten Hirnschnitten EGFP-transgene pankreatische Stammzellen als Einzelzellsuspension ausgesät. Nach Inkubation für drei Tage sind diese fixiert und im Ganzen gefärbt worden. Dabei ließ sich feststellen, dass sich Nestin-positive Stammzellen an Nestin-positiven Fasern ansiedeln, wie es auch für die residenten Hirnstammzellen der Fall war (Abbildung 64).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die pankreatischen Stammzellen erfolgreich im Gewebe integrieren und dabei die gleichen Leitstrukturen akzeptieren, wie die nativ vorliegenden Gewebestammzellen.

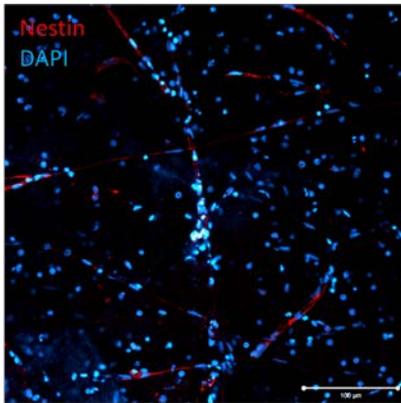
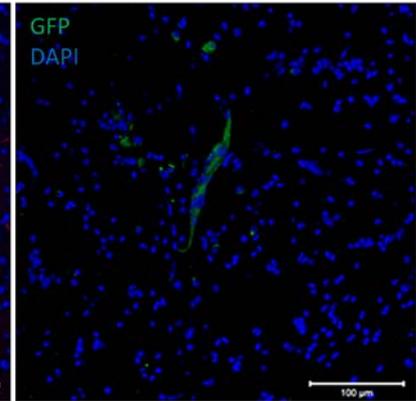
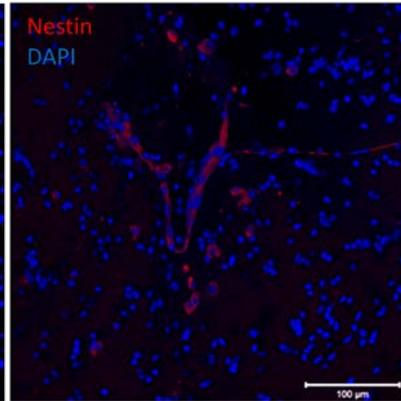
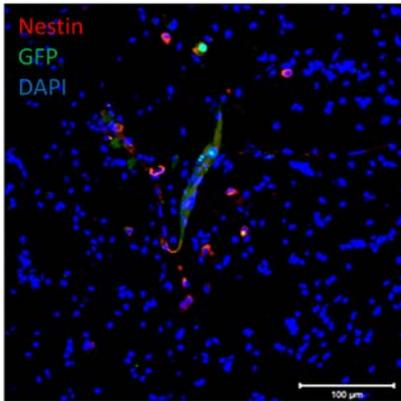


Abbildung 64: Immunfluoreszente Färbung von Stammzellen im Hirnschnitt. Die residenten Stammzellen (oben, Einzelbild) sind Nestin positiv und lokalisieren an Nestin-positiven Fasern im Gewebe. Die GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen (unten, Reihe) lokalisieren an den gleichen Strukturen. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)



4.8. In vivo-Untersuchung

Für die Auswertung des Tierversuches wurden die histologischen Präparate fluoreszent für verschiedene charakteristische Proteine der Zellen im Zielgewebe immunhistologisch markiert. Nach Mikroskopie von drei bis vier Präparaten jeder Färbung pro Gruppe und Hirnbereich wurden die Beobachtungen in einer Bewertungstabelle zusammengefasst und verglichen. Im Folgenden soll zunächst der einzelne Verlauf jeder Proteinsynthese über die gesamte Dauer des Versuches für alle Gruppen und die drei untersuchten Hirnregionen beschrieben werden.

4.8.1. GFAP

Betrachtet man die unbehandelte Sonde im Cortex (Abbildung 65 A,D,G,J) so war nach 6 Wochen (D) eine Aktivierung der Gliazellen, repräsentiert durch filamentäre GFAP-Färbung meist sternförmiger Zellen, in einem Radius von ca. 100µm vor der Sonde zu beobachten. Nach 12 Wochen (G) hatte diese Aktivierung im Cortex ihr Maximum erreicht und ist im gesamten Bild deutlich zu erkennen wohingegen sich die Färbung für Astrocyten nach 24 Wochen (J) nur noch auf einen kompakte, frontal vor der Sonde liegende Zellmenge beschränkt, welche maximal 100µm ins Zielareal hineinragt.

Für die Fibrin-beschichtete Sonde (Abbildung 65 B,E,H,K) wurde keine Aktivierung von Astrocyten in solchem Ausmaß beobachtet. Nach einer Woche (B) befand sich die Sonde offensichtlich noch nicht in Kontakt mit dem Hirngewebe. Bereits nach 6 Wochen (E) war eine beginnende Abschottung des Implantationskanals einschl. Implantat vom Gewebe durch ein beginnendes Lining vor der Sonde zu erkennen. Hinter diesem ist keine flächige Aktivierung ersichtlich, denn es können nur vereinzelt GFAP-positive Zellen wahrgenommen werden. Nach 12 Wochen erscheint dieses Lining etwas aufgelockert und wenige Zellen hinter ihm aktiviert, wobei jedoch einige Zellen vor dem Lining in der Frontline mehr oder weniger locker angelagert erscheinen und so zusätzlich Distanz zur Sonde schaffen. Nach 24 Wochen ist die Frontline als kontinuierliche Zellakkumulation vor dem reetablierten Lining deutlich zu erkennen und im Gewebe keine Aktivierung mehr feststellbar.

Für die Zell-bewachsene Sonde (Abbildung 65 C,F,I,L) ließ sich bereits nach einer Woche (C) eine gute Aktivierung der gewebsständigen Astrocyten feststellen, welche bereits fast so stark ist, wie bei der puren Sonde nach 12 Wochen. Nach 6 Wochen (F) ist die Aktivierung der Astrocyten in dieser Gruppe maximal und es ist neben einem durchgängigen Belt eine graduierte Akkumulation von Astrocyten vor dem Implantat zu erkennen, welche nach 200µm

nur noch wenige aktivierte GFAP-positive Zellen erkennen lässt. Zwischen Implantat und Belt sind einige GFAP-negative Zellen lokalisiert, etwa vergleichbar mit E. Bereits nach 12 Wochen (I) ist in dieser Gruppe nur noch ein Lining mit anschließender minimaler Aktivierung von ca. 30µm Distanz wahrnehmbar, diese erhält sich nach 24 Wochen (L) nur in den Randbereichen des Implantates und ist zentral vor ihm nicht mehr zu sehen. Im Gegensatz zu Fibrin-beschichteten Sonden wurde in dieser Gruppe nach 12 und 24 Wochen keine Zellakkumulation zwischen Implantat und Gewebe beobachtet.

Im Thalamus ließ sich für die unbeschichtete Sonde (Abbildung 66 A,D,G,J) nach einer Woche (A) ebenfalls fast keine Aktivierung von Astrocyten feststellen, wohingegen nach 6 Wochen (D) eine graduierte Aktivierung vor dem Implantat erkennbar ist, welche wie im Cortex etwa 100µm Stärke aufwies. Auch in diesem Gewebeabschnitt wurde nach 12 Wochen (G) die stärkste astrocytäre Aktivierung mit einer homogenen Verteilung der Zellen im Bild festgestellt. Dabei hatte sich vor dem Implantat außerdem bereits ein Belt gebildet. Dieser blieb auch nach 24 Wochen (J) erhalten und es war nur noch sehr wenig Aktivierung von Astrocyten im Gewebe feststellbar. Die Fibrin-beschichtete Sonde (Abbildung 66 B,E,H,K) erschien im Thalamus fast genauso wie im Cortex, wobei keine Akkumulation von Zellen zwischen Implantat und Lining zur Frontlinie auftrat. Das Maximum der Aktivierung von Astrocyten wurde hier nach 6 Wochen (E) beobachtet, mit anschließender Reduktion unter 100µm hinter dem Lining. Nach 24 Wochen befinden sich bei diesem Sondentyp einige aktivierte Astrocyten unmittelbar hinter dem Lining, wohingegen für die Zell-besiedelten Sonden (Abbildung 66 C,F,I,L) fast nur noch der Belt und sporadisch aktivierte Zellen dahinter zu erkennen waren (L). Die Astrocyten-Aktivierungsintensität in dieser Gruppe war bereits nach einer Woche (C) maximal und verminderte sich in den anschließenden 5 Wochen (F) nur wenig. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine leichte graduelle Reduktion der Aktivierung im Gewebe bereits ersichtlich, welche bis Woche 12 (I) zur starken Vereinzelung der aktivierten Zellen hinter dem sich formierenden Belt führte. Vor ihm und dem Implantat liegen zu diesem Zeitpunkt wenige GFAP-negative Zellen.

Im Bereich des Hypothalamus wurde für Sonden ohne Beschichtung (Abbildung 67 A,D,G,J) bereits nach 6 Wochen (D) eine starke Aktivierung gewebständiger Astrocyten vor dem Implantat beobachtet, nachdem eine Woche (A) post-operativ nur spärlich aktivierte Zellen in Implantatnähe ersichtlich waren. Nach 12 Wochen (G) schienen aktivierte Astrocyten stark angereichert am Implantat und moderat viele im Gewebe vorzuliegen. Nach 24 Wochen (J) konnte für diese Gruppe ein ausgeprägter Belt mit einigen assoziierten aktivierten Astrocyten beobachtet werden. Für Fibrin-beschichtete Sonden (Abbildung 67 B,E,H,K) zeigte sich ein vergleichbare Entwicklung zum Thalamus mit einer mittelstarken Aktivierung nach einer

Woche (B), Lining mit einigen assoziierten Astrocyten nach 6 Wochen (E) und einer leichten Auflockerung dieser Strukturen mit weniger Aktivierung nach 12 Wochen (H). Für den letzten Zeitpunkt nach 24 Wochen (K) ließ sich ein unregelmäßiges aber ausgeprägtes Lining mit einigen assoziierten Astrocyten erkennen, wobei eine graduelle Reduktion im Gewebe deutlich war. Im Gegensatz hierzu zeigten die Proben mit Zell-besiedelten Sonden (Abbildung 67 C,F,I,L) im Hypothalamus in Woche 1 (C) und 6 (F) eine etwa gleichstarke, maximale Aktivierung an Astrocyten, welche zunächst in Implantatnähe am stärksten ist und zum zweiten Messpunkt eine etwas gleichförmigere Verteilung, unter Belt-Bildung, im Schnitt annahm. Bereits nach 12 Wochen (I) konnte für zellbesiedelte Sonden nur noch der Belt eindeutig einer filamentären GFAP-Färbung zugeordnet werden. Im Gewebe liegende Zellen waren nur selten für GFAP gefärbt und dann zumeist punktuell, was auf degradierte Filamente hinweist. Dieser Zustand war unverändert auch nach 24 Wochen (L) ersichtlich.

Cortex - GFAP

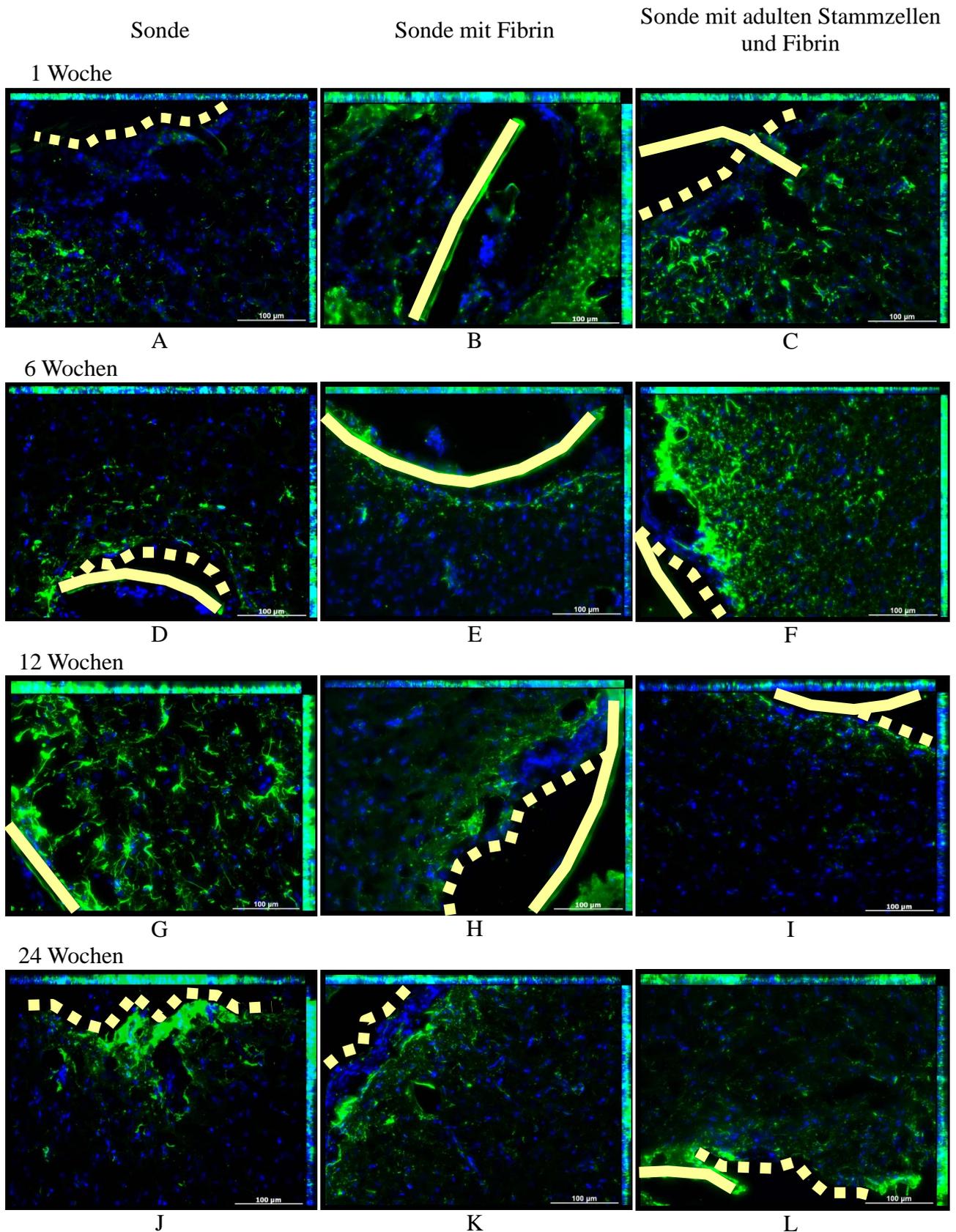


Abbildung 65: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Thalamus - GFAP

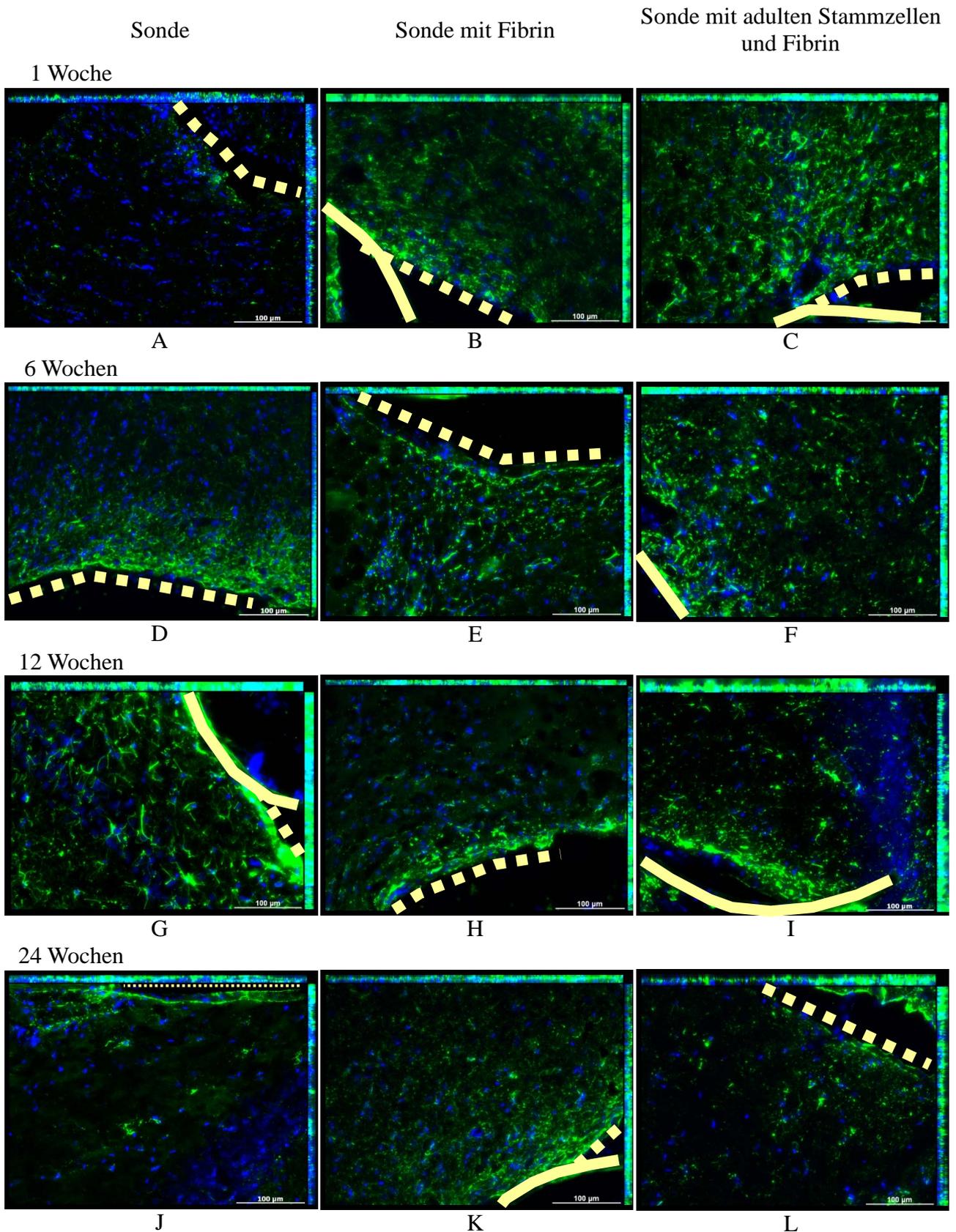


Abbildung 66: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Hypothalamus - GFAP

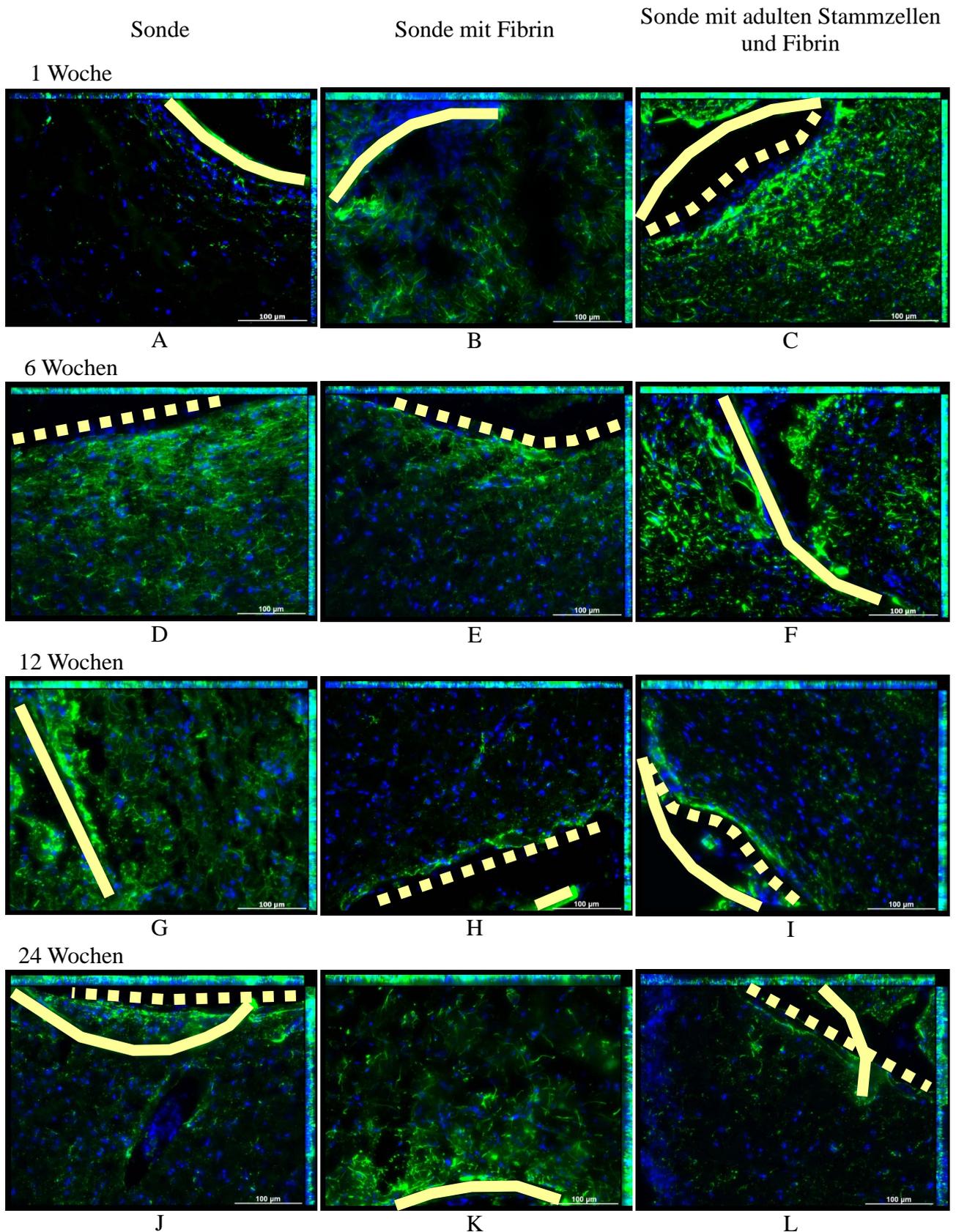


Abbildung 67: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

4.8.2.ED-1

Der Status der Entzündungsreaktion kann durch die immunhistochemische Färbung des Oberflächenantigens ED-1 (CD68) bestimmt werden, da dieses im Gehirn exklusiv von Mikroglia-Zellen synthetisiert wird.

Für den Cortex (Abbildung 68) war in allen drei Gruppen nach einer Woche (A,B,C) eine Infiltration im Wundareal durch gefärbte Zellen aus den umliegenden Gewebeabschnitten in der Peripherie ersichtlich. Nach 6 Wochen ließ sich für die unbeschichtete Sonde (D) und die Fibrin-beschichtete Sonde (E) im Wundsaum und auf dem Implantat eine homogene Anreicherung dieser Zellen feststellen, wohingegen die Zell-besiedelten Präparate (F) nur einzelne Cluster dieser Zellen im Wundsaum aufzeigten. Nach 12 Wochen war dieser Zustand prinzipiell in allen Proben noch vorhanden, wobei die Proben mit unbehandelten Sonden (G) vornehmlich eine Akkumulation auf der Sonde anzeigten und in den Proben mit Fibrin-beschichteten Sonden (H) die meisten Zellen in der Frontlinie liegen, wie der Vergleich mit der GFAP-Färbung (Abb. H) zeigt. Die Proben der Stammzell-besiedelten Sonden (I) wiesen nach 12 Wochen ebenso einige gefärbte Zellen in der Frontlinie auf, wobei jedoch deren Anzahl, im Vergleich zu Fibrin-beschichteten Sonden, geringer ist. Nach 24 Wochen wurde nur noch bei den unbehandelten Sonden (J) eine deutliche Menge ED-1-positiver Zellen im Wundbereich festgestellt, wohingegen in den Proben der Fibrin-beschichteten Sonde (K) nur noch ein kleines Cluster positiver Zellen in der Frontlinie detektiert werden konnte. Für Stammzell-besiedelte Sonden wurde in allen Proben keine Färbung für ED-1 nach 24 Wochen identifiziert, welche eindeutig einer Zelle zugeordnet werden konnte.

Im Thalamus (Abbildung 69) wurde für unbehandelte Sonden nach einer Woche eine mäßige Aktivierung von Mikroglia-Zellen um das Implantat beobachtet, wohingegen eine starke, weiter reichende Färbung dieser Zellen für diesen Implantat-Typ nach sechs Wochen (D) sichtbar war. Nach zwölf Wochen (G) erschienen die ED-1-gefärbten Zellen als Teil des Belts stark gefärbt in dieser Gruppe, waren jedoch nach 24 Wochen (J) in allen Proben der Gruppe fast nicht mehr zu detektieren. Für Fibrin-beschichtete Sonden lässt sich keine echte Anreicherung vor dem Implantat im Zeitverlauf feststellen, jedoch konnten noch nach zwölf Wochen (H) in der Frontlinie einige positive Zellen beobachtet werden. Am Ende der Untersuchung, nach 24 Wochen (K), waren für die Fibrin-beschichteten Sonden nur noch auf dem Implantat positive Zellen zu finden.

Die maximale Anreicherung von Mikroglia-Zellen vor dem Implantat, vergleichbar mit dem Zustand der unbehandelte Sonde nach 6 Wochen (D), zeigte sich in der Gruppe mit

Stammzell-besiedelten Sonden bereits nach einer Woche (C). Bereits nach sechs Wochen (F) waren fast nur noch ED-1-positive Zellen in dieser Gruppe auf und vor dem Implantat zu finden, während in den beiden anderen Gruppen die meisten Zellen in der Läsionsperipherie für dieses Antigen positiv waren. Nach zwölf Wochen (I) wurden in der Gruppe der Stammzell-besiedelten Sonden nur noch positive Zellen auf dem Implantat detektiert und nach 24 Wochen (L) wurde in den Proben nur eine Zelle im Implantationskanal nachgewiesen.

Im Hypothalamus (Abbildung 70) wurden nach einer Woche in allen drei Gruppen (A,B,C) einige ED-1-positive Zellen beobachtet, welche im Gewebe direkt vor dem Implantat lagen und sich über 100µm von ihm entfernt erstreckten. Nach sechs Wochen reduzierte sich der Bereich, in welchem Mikroglia-Zellen beobachtet wurden für die unbeschichtete Sonde (D) und die Fibrin-beschichtete Sonde (E) auf die sog. Frontlinie, wobei in beiden Gruppen eine sehr regelmäßige Verteilung zu beobachten war. Im Gegensatz hierzu ließen sich nach sechs Wochen für die Stammzell-besiedelten Sonden (F) die ED-1-positiven Zellen vor allem im Implantationskanal an den Enden des Implantates feststellen. Diese Präparate zeigten die meisten positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt. Nach zwölf Wochen waren für die unbehandelten Sonden (G) und die Fibrin-beschichteten Sonden (H) die Mehrzahl der Mikroglia auf oder am Implantat zu beobachten, wobei für erstere Gruppe noch einige positive Zellen im gesamten Schnitt zu sehen waren. Die Proben der Stammzell-besiedelten Sonden wiesen keine ED-1-positiven Zellen auf (I). Nach 24 Wochen wurden für die unbehandelten Sonden (J) nur einzelne Zellen in der Frontlinie detektiert. Die Proben von Fibrin-beschichteten Sonden (K) zeigten nur rudimentäre Färbungen auf dem Implantat. Ebensolche Färbungen war auch für die Gruppe der Stammzell-besiedelten Sonden (L) nach dieser Zeit in allen Proben sichtbar, wobei einige Farbe-Artefakte noch falsch-positive Zellen im Läsions-Saum anzeigen.

Cortex - ED-1

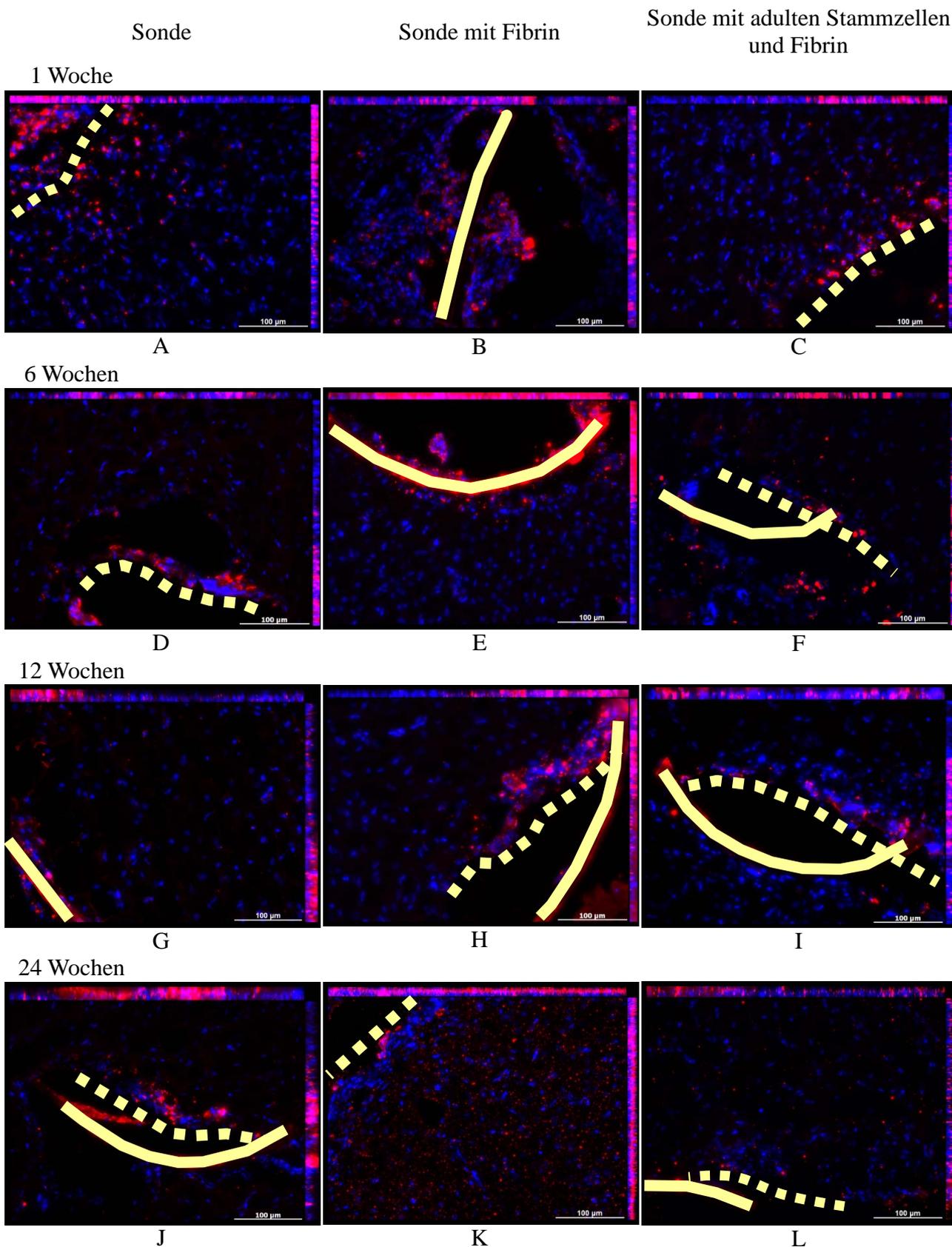


Abbildung 68: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Thalamus - ED-1

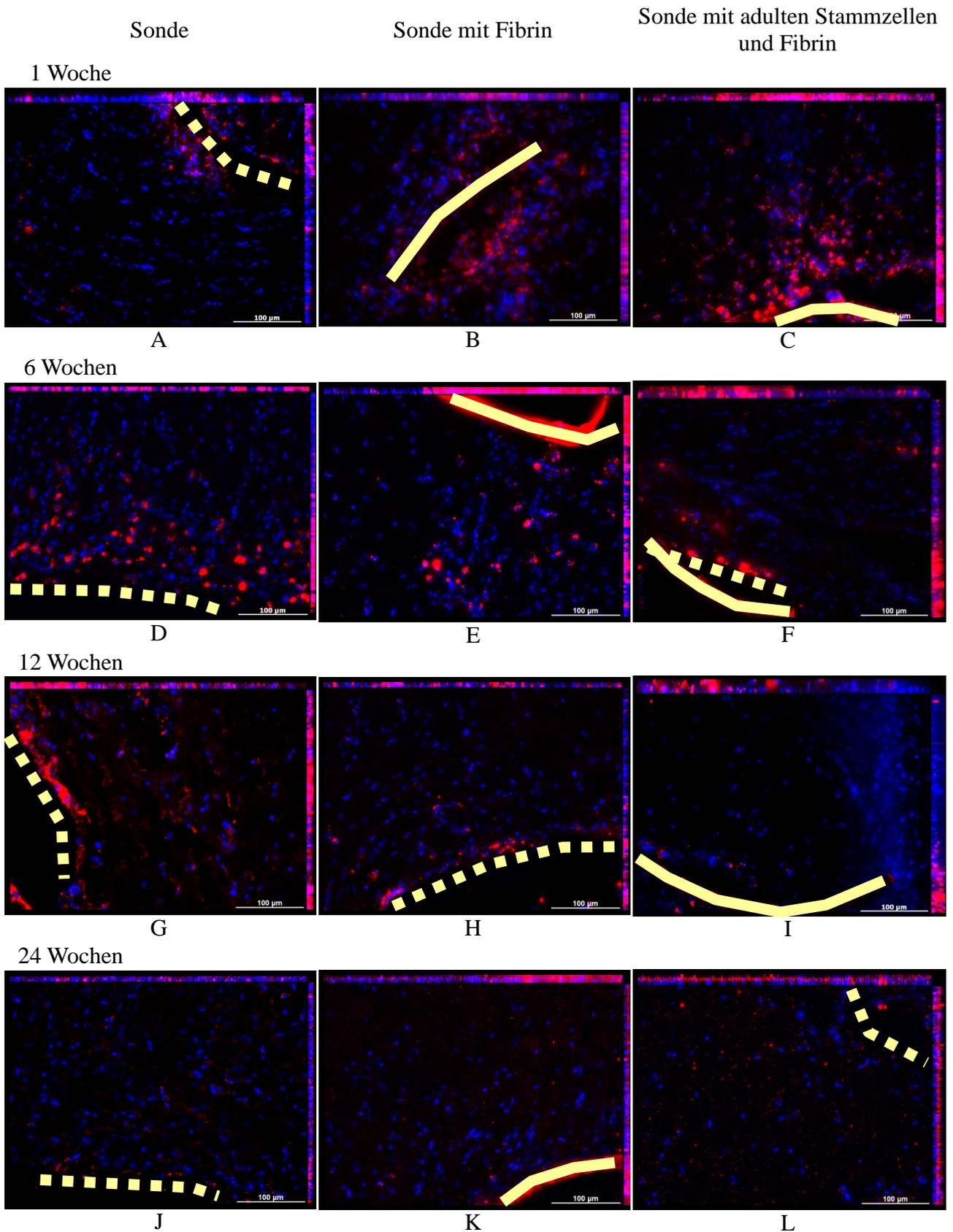


Abbildung 69: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Hypothalamus - ED-1

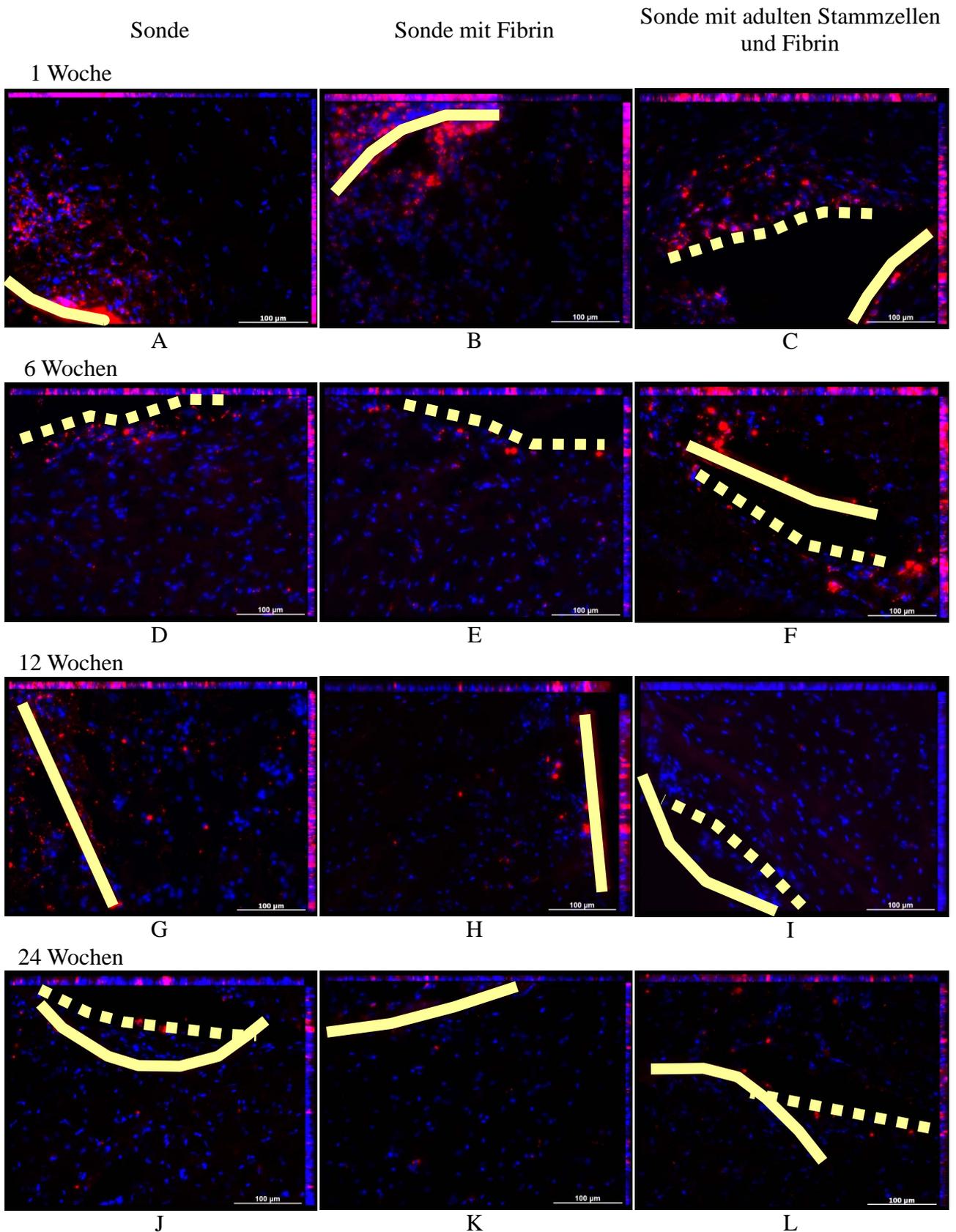


Abbildung 70: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

4.8.3.Nestin

Das Intermediär-Filament Nestin wurde in dieser Untersuchung immunhistochemisch gefärbt, um den Anteil von Vorläufer- und Stammzellen am Regenerationsprozess in der Läsion wiederzugeben.

Dabei wurde für den Cortex (Abbildung 71) nach einer Woche dieses Protein nur in den Proben mit der Stammzell-besiedelten Sonde (C) gefunden, wobei die Lokalisation streng auf den der Sonde anliegenden Zell-Saum, der leider beim Schneiden abgeschert ist, begrenzt war. Nach sechs Wochen wurden in dieser Gruppe (F) nur noch sehr wenige Zellen im Sonden-nahen Bereich positiv gefärbt während die Gruppen mit unbeschichteten Sonden und Fibrin-beschichteten Sonden Nestin-negativ blieben. Nach 12 Wochen waren in der Gruppe mit unbeschichteten Sonden (G) in großem Umkreis um die Läsion einzelne Nestin-positive Zellen in regelmäßiger Verteilung zu beobachten, wobei jedoch keine Assoziation zur Läsion deutlich wurde. Die Gruppe der Fibrin-beschichteten Sonde zeigte in der Frontlinie und näheren Implantat-Umgebung (<100µm) kleine, aber deutliche Cluster Nestin-positiver Zellen. Für die Proben der Stammzell-besiedelten Sonden (I) ließen sich zu diesem Zeitpunkt nur sporadische Einzelzellen in der Frontlinie oder nahe der Läsion nachweisen. Dieses Ergebnis trifft desweiteren für die Cortex-Proben aller drei Gruppen nach 24 Wochen zu.

Im Thalamus (Abbildung 72) wurde kein Nestin für die unbeschichteten Sonden nach einer Woche (A) nachgewiesen. Nach sechs Wochen (D) waren einzelne Zellen in der Frontlinie und rudimentär in der Peripherie zu beobachten. Nach zwölf Wochen konnte dieser Befund für die unbehandelten Sonden (G) mit eindeutigen Zellen in der Peripherie bestätigt werden. Am Ende der Versuchsdauer nach 24 Wochen waren nur noch sporadisch einzelne Nestin-positive Zellen in der Frontlinie zu erkennen (J). Für Fibrin-beschichtete Sonden wurde bereits nach einer Woche (B) eine beträchtliche Menge Nestin-positiver Zellen auf und am Implantat sowie in der Peripherie gefärbt. Nach sechs Wochen (E) waren jedoch am Implantat keine filamentär gefärbten Zellen mehr zu beobachten, sondern nur punktförmig schwach gefärbte Einzelzellen in der Frontlinie und plaque-artig stark gefärbte Zellen in der entfernten Peripherie. Die Proben dieser Gruppe nach zwölf Wochen Versuchsdauer (H) enthielten ebenfalls diese punktförmig gefärbten Zellen nahe der Sonde, jedoch ließen sich teilweise einzelne Stränge dieser Zellen, welche sich durch das gesamte Bild erstrecken, darstellen. Nach 24 Wochen waren für die Fibrin-beschichteten Sonden (K) nur noch einzelne Nestin-positive Zellen auf dem Implantat nachweisbar. Die Proben der Stammzell-besiedelten Sonden zeigten Nestin-positive Zellen nach einer Woche (C) nur in schwacher Färbintensität

und in direkter Implantat-Nähe bzw. in der Frontline. Wenige positive Zellen ließen sich entfernt vom Implantat beobachten. Nach sechs bzw. zwölf Wochen (F) war von dem schwachen Nestin positiven Saum am Implantat nur noch wenig vorhanden und einzelne punktförmige Färbungen erschienen in Implantat-Nähe. Einzelne positive Zellen konnten nach 24 Wochen für diese Gruppe (L) noch direkt vor dem Implantat sowie in der unmittelbaren Nähe detektiert werden, wobei die Färbung teilweise plaque-artig erschien.

In den Proben für den Hypothalamus (Abbildung 73) wurden für die unbehandelte Sonde nach einer Woche (A) wenige Zellen am Implantat und in dessen Peripherie beobachtet. Nach sechs Wochen (D) konnte für diese Gruppe nur ein kleines Cluster Nestin-positiver Zellen hinter der Sonde im Implantationskanal festgestellt werden. Nach zwölf (G) bzw. 24 Wochen (J) traten vorwiegend und deutlich Einzelzellen im Sichtfeld auf, welche keine Assoziation zum Implantat zeigten. Nach 12 Wochen erscheint ein Bruchstück an der Sonde als positive Färbung auf dieser. In den Gruppen mit Fibrin-beschichteten Sonden und mit Stammzell-besiedelten Sonden wurde nach einer Woche eine Vielzahl Nestin-positiver Zellen an der Läsion und in relativ großem Radius beobachtet, welche eine ausgeprägte filamentäre Färbung aufwiesen (B,C). In beiden Gruppen ließ sich nach sechs Wochen keine Nestin-synthetisierende Zelle nachweisen (E,F). Dies war ebenfalls für die Stammzell-besiedelten Sonden nach zwölf Wochen der Fall (I). Die Proben der Fibrin-beschichteten Sonden wiesen zu diesem Zeitpunkt einige punktförmig gefärbte am Läsions-Saum und in der Peripherie auf (H). Ebenfalls punktförmig waren die Nestin-Färbungen für die Proben der Fibrin-beschichteten und Stammzell-besiedelten Sonden, wobei in diesen keine Assoziation der gefärbten Zellen mit der Läsion zu erkennen war.

Cortex - Nestin

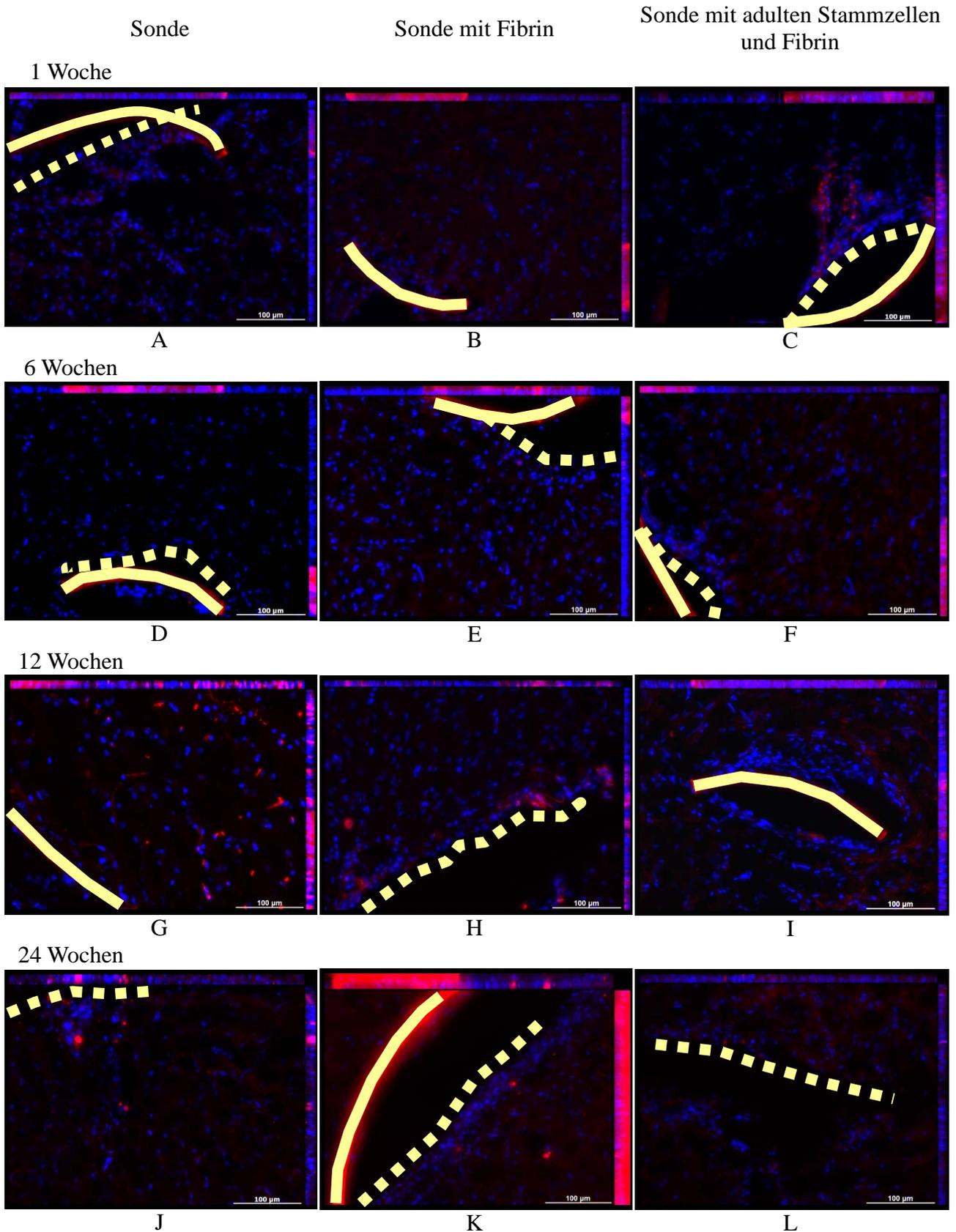


Abbildung 71: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Thalamus - Nestin

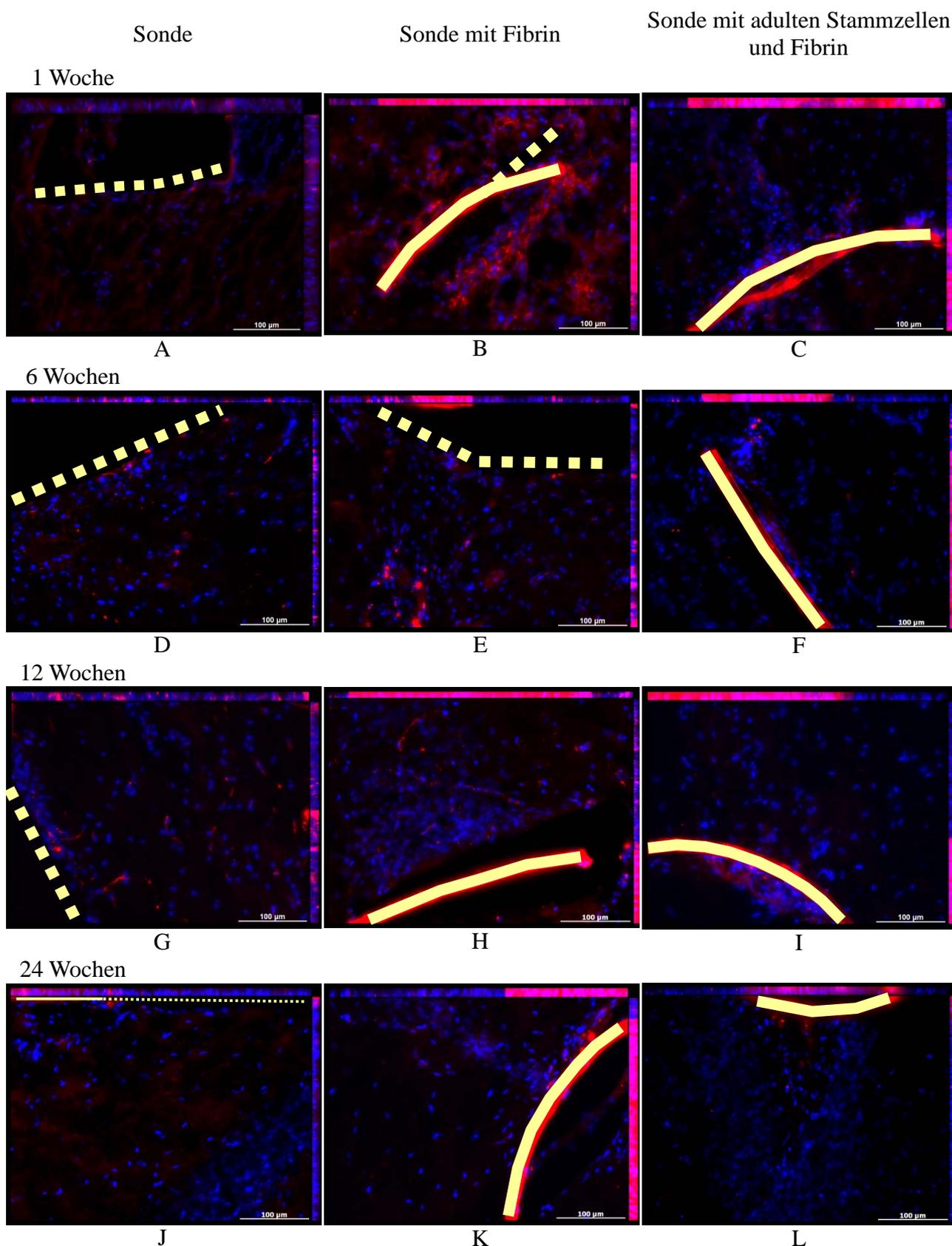


Abbildung 72: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Hypothalamus - Nestin

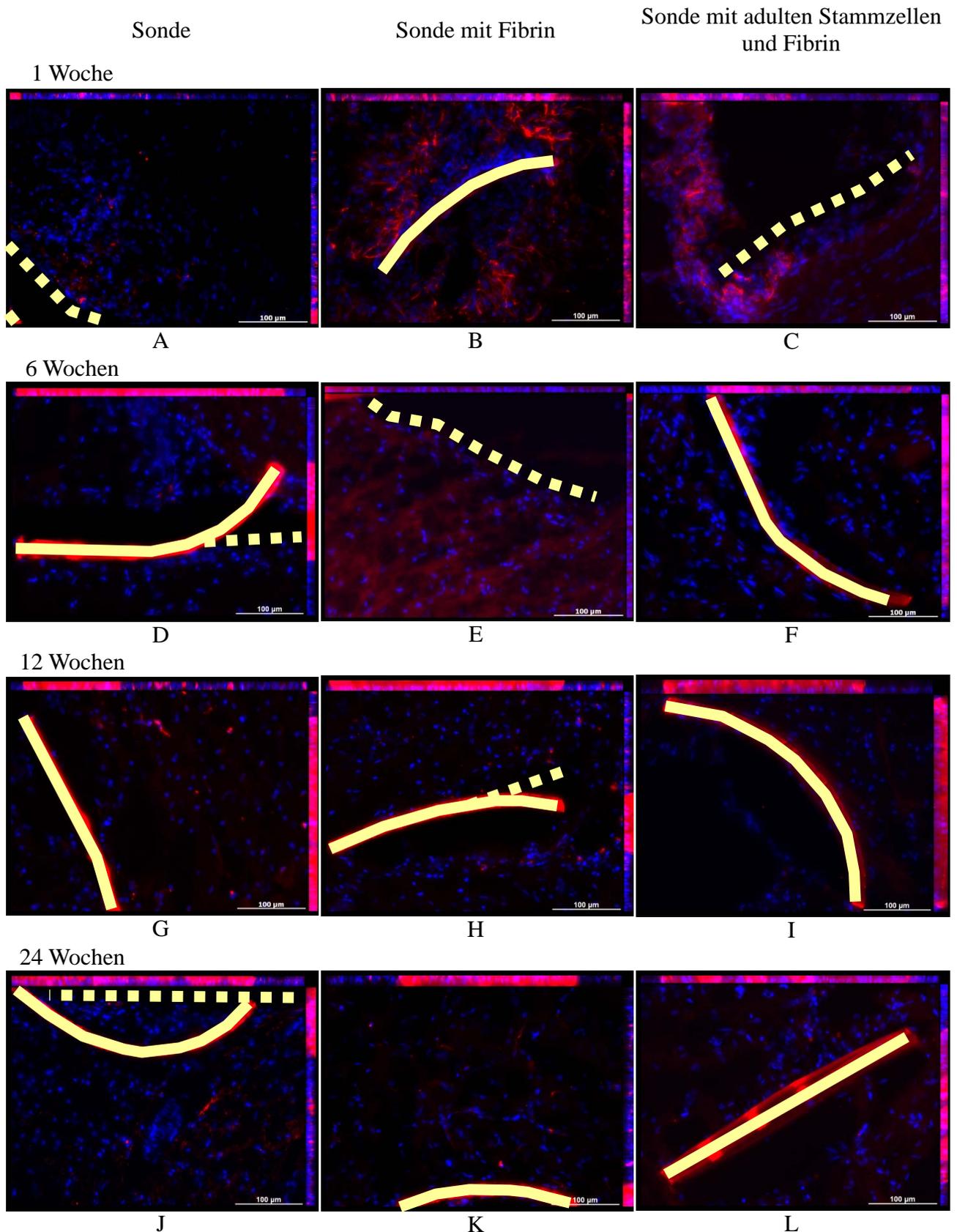


Abbildung 73: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

4.8.4. Neurofilament

Die Detektion von Neurofilamenten sollte die Verteilung von Neuronen in Relation zum Implantat wiedergeben.

Im Cortex (Abbildung 74) wurde für die Proben aller drei Gruppen nach einer Woche (A,B,C) zunächst die Implantations-bedingte Zerstörung von Neurofilament-positivem Gewebe im Vergleich zu dem homogen gefärbten restlichen Bildbereich beobachtet. In den Proben der Fibrin-beschichteten Sonden konnte zudem eine direkt vor dem Implantat befindliche Zellmenge mit sehr geringer Anfärbung für dieses Protein beobachtet werden (B). Für die Stammzell-besiedelten Sonden deutete sich vor dem Implantat ein schmaler Saum schwächer gefärbter oder ungefärbter Zellen an (C). Nach sechs Wochen sind für die unbehandelte und Fibrin-beschichtete Sonde (D und E) nur noch sehr wenige Neurofilamente im gesamten Sichtfeld der Präparate ohne Bezug zur Läsion entdeckt worden. In den Färbungen für die Stammzell-besiedelten Sonden ließ sich hingegen eine ausgeprägte graduelle Intensivierung der Neurofilament-Färbung vom Implantat ins Gewebe feststellen. In den Präparaten nach zwölf Wochen sind für die unbehandelte Sonde (G) einige positive Zellen in unmittelbarer Sondennähe und im restlichen Gewebe nachgewiesen worden. Dabei sind in Sonden-Nähe besonders starke Filamente auffällig und es liegen einige Cysten im Gewebe vor dem Implantat. Für Fibrin-beschichtete Sonden ist zu diesem Zeitpunkt (H) nur eine punktuelle Färbung vor dem Implantat zu erkennen, welche zwar graduell zunimmt, jedoch keine filamentären Strukturen aufweist, wie sie neben dem Implantat sichtbar waren. Für Stammzell-besiedelte Sonden kann zu diesem Zeitpunkt (I) ein Neurofilament-negativer, dem Implantat anliegender Saum von weniger als 50µm Stärke beobachtet werden. An diesen schließt sich ein relativ homogen punktuell und filamentär gefärbtes Gewebe an. Nach 24 Wochen konnte für die kortikalen Proben aller drei Gruppen eine filamentäre Färbung festgestellt werden, wobei für unbehandelte und Fibrin-beschichtete Sonden (J,K) eine ausgeprägte Zellakkumulation zwischen Sonde und Gewebe feststellbar war. Dies konnte für die Stammzell-besiedelten Sonden (L) nicht festgestellt werden, jedoch war hier der Bereich der ersten 100µm vor der Sonde schwächer für Neurofilament gefärbt als das Gewebe im restlichen Bildausschnitt anzeigt.

Im Thalamus (Abbildung 75) wurde für alle Proben nach einer Woche (A,B,C) erneut die Penetrations-bedingte Zerstörung des relativ homogen Neurofilament-positiven Gewebes beobachtet. Für die Fibrin-beschichtete Sonde (B) lässt sich eine reduzierte Färbung im Sonden-nahen Läsions-Saum erkennen mit anschließender verstärkter Neurofilament-Färbung

welche eine reihenartige Anordnung parallel zur Sonde aufweist. Nach sechs Wochen wird vor der unbehandelten Sonde (D) eine keilförmige dramatische Reduktion der Neurofilament-positiven Zellen bis weit ins Gewebe hinein deutlich, welche scharf abgegrenzt zu anliegendem positiven Gewebe ist. Für Fibrin-beschichtete Sonden (E) ließ sich in der Läsionsperipherie nur einzelne Cluster mit filamentären Zellen beobachten, während das restliche Gewebe nur mit punktförmigen Färbungen spärlich durchsetzt war. In Proben der Stammzell-besiedelten Sonden (F) wurden in unmittelbarer Implantat-Nähe ($<100\mu\text{m}$) einige filamentär gefärbte Zellen nachgewiesen, welche jedoch in ihrer Anzahl und Regelmäßigkeit noch nicht vergleichbar mit dem restlichen Gewebe waren. Der Implantationskanal war mit Neurofilament-negativen Zellen gefüllt. Nach zwölf Wochen liegen einige Zellen auf der Implantat-Oberfläche der unbehandelten Sonden (G). Diese sind wenig Neurofilament-positiv wobei bei positiver Färbung kurze Filamente mit verdickten Enden sichtbar sind. Im anschließenden Gewebe traten sporadisch Zellen mit gefärbten, relativ dicken Filamenten oder punktueller Färbung auf. Die Gruppe der Fibrin-beschichteten Sonden (H) ließ zu diesem Zeitpunkt im Gewebe vor dem Implantat nur weiträumig geringe filamentäre Färbung erkennen. Für Stammzell-besiedelte Sonden (I) war die Färbung von Neurofilamenten nach zwölf Wochen bereits hinter einem schmalen Bereich gering gefärbter Zellen ($\sim 50\mu\text{m}$) mit normaler Intensität zu erkennen. Wenige Filamente reichten bis an das Implantat. Nach 24 Wochen zeigten sich für die Proben unbehandelter Sonden (J) erst in relativ großer Distanz ($>100\mu\text{m}$) zum Gewebe filamentäre gefärbte Zellverbände. Zwischen diesen und dem Implantat-anliegenden negativen Zellsaum wurden vor allem punktueller Färbungen beobachtet. Die Proben Fibrin-beschichteter Sonden (K) zeigten zu diesem Zeitpunkt an der Sonde einen Neurofilament-negativen Zellsaum. Im anschließenden Gewebeabschnitt ließen sich in den dem Implantat-nächsten $100\mu\text{m}$ nur kurze Filamente detektieren, während das restliche Gewebe eine typische Neurofilament-Färbung für dieses Areal aufwies. In den Proben Stammzell-besiedelter Sonden (L) wurde zu diesem letzten Messpunkt keine Anreicherung von Zellen vor dem Implantat festgestellt und es schließt sich direkt ans Implantat ein lockerer Zellverbund mit mäßig vielen filamentär gefärbten Fasern an, welche mit zunehmender Distanz vom Implantat in ihrer Dichte zunehmen.

Im Hypothalamus (Abbildung 76) zeigten die Proben der unbehandelten Sonde nach einer Woche eine höhere Zelldichte in weiten Bereichen vor dem Implantat bei stark reduzierter Menge angefärbter Filamente verglichen zum anschließenden Gewebe. Diese Beobachtung trifft ebenso auf die Proben der Fibrin-beschichteten Sonden (B) zu, wobei weniger klare Filamente im Gewebe vorlagen bei erhöhter Färbeintensität durch punktueller Färbung. In den

Proben der Stammzell-besiedelten Sonden (C) waren Neurofilament-positive Zellen bis zur Frontlinie sichtbar, wobei deren filamentäre Färbung mit Distanz zum Implantat zunimmt. Die Frontlinie war negativ für das gesuchte Protein.

Diese Beschreibung trifft auch auf die Proben der unbehandelten Sonde nach sechs Wochen zu (D), jedoch mit einer relativ inhomogenen Verteilung von positiven Zellen über das gesamte Bild. Im Vergleich hierzu wurde in den Proben der Fibrin-beschichteten Sonden zu diesem Zeitpunkt (E) eine intensive Färbung von vielen Fasern im gesamten Gewebe beobachtet, welche bündelartig gleichmäßig verteilt sind. Diese Färbung reichte in nahezu unveränderter Weise bis an die Läsionsgrenze, welche nur von dispersen ungefärbten Zellen gebildet wird. Für die Proben der Stammzell-besiedelten Sonden (F) ließ sich eine positive Detektion des Neurofilaments bis zur Frontlinie in höchster Intensität mit teilweise punktförmiger Struktur feststellen, wobei in weiter entfernten Arealen die Signaldichte reduziert, aber, wenn vorhanden, prominent filamentär war. Die ungefärbte Frontlinie dieser Proben war in jedem Fall dünner als $20\mu\text{m}$. Nach zwölf Wochen lassen sich für die Proben der unbehandelten Sonde (G) einige Neurofilamente direkt an der Sonde feststellen, wobei sich an diese dünne Schicht ($<20\mu\text{m}$) mäßig viele, inhomogen verteilte Filamente im gesamten Gewebe anschließen. Im Gegensatz hierzu wiesen die Proben der Fibrin-beschichteten Sonde (H) eine intensive, bündelartige und homogen verteilte Färbung von Neurofilamenten im peripheren Gewebe auf. Jedoch fiel redundant eine graduelle Reduktion der Filamente und ihrer Bündel zum Implantat hin, beginnend etwa $200\mu\text{m}$ vor diesem, auf. Vor der Sonde waren fast keine Neurofilamente ersichtlich. Im Gegensatz hierzu schien die Menge der Neurofilamente bei den Stammzell-besiedelten Sonden (I) direkt vor dem Implantat sehr hoch zu sein und eine Belt-ähnliche Struktur zu bilden, hinter welcher viele homogen verteilte, intensive Neurofilament-gefärbte Cluster im Gewebe lagen. Nach 24 Wochen konnte man für die unbehandelten Sonden (J) eine vergleichsweise geringe und unregelmäßig verteilte Neurofilament-Menge in Implantatnähe feststellen. Dabei schien eine ungefärbte Frontlinie erhalten zu sein und nur unipolar vor dem Implantat eine signifikante Anzahl an Neurofilamenten vorzuliegen. Die Proben der Fibrin-beschichteten Sonden (K) und der Stammzell-besiedelten Sonden (L) wiesen deutliche Neurofilamente bis an das Implantat auf, wobei der anschließende Zellverbund für die Fibrin-beschichteten Sonden eher locker und von mäßig vielen Neurofilamenten bzw. deren Bündeln unregelmäßig durchsetzt war. Die Stammzell-besiedelten Sonden hatten ausnahmslos in ihren Proben eine hohe Dichte homogen verteilter positiver Filamente und deren Bündel in direktem Anschluss an den Läsionssaum. Eine Frontlinie war meist nicht mehr erkennbar und keine Unterschiede zwischen peripherem Gewebe und Sonden-nahe Bereichen zu sehen.

Cortex - Neurofilament

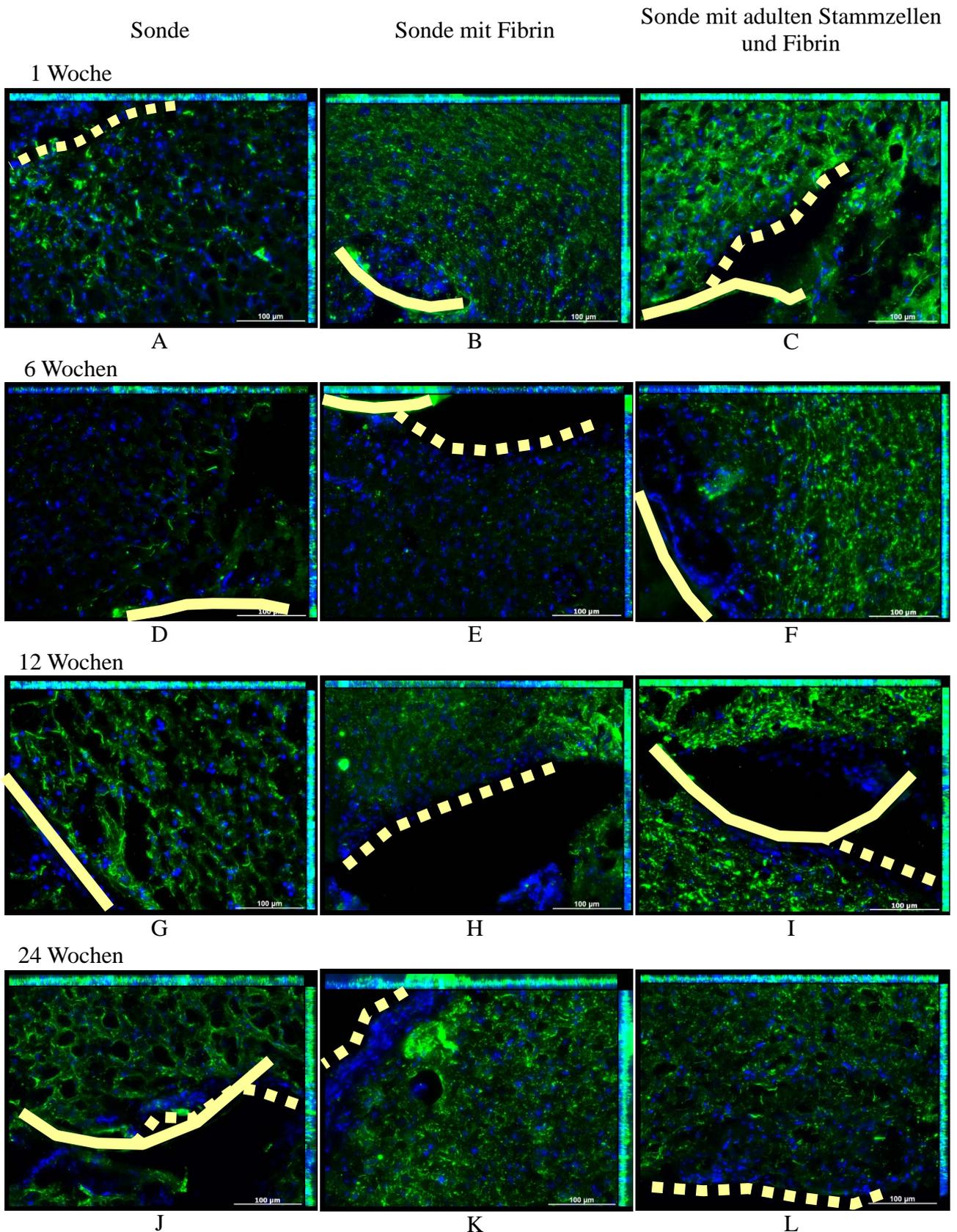


Abbildung 74: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Thalamus - Neurofilament

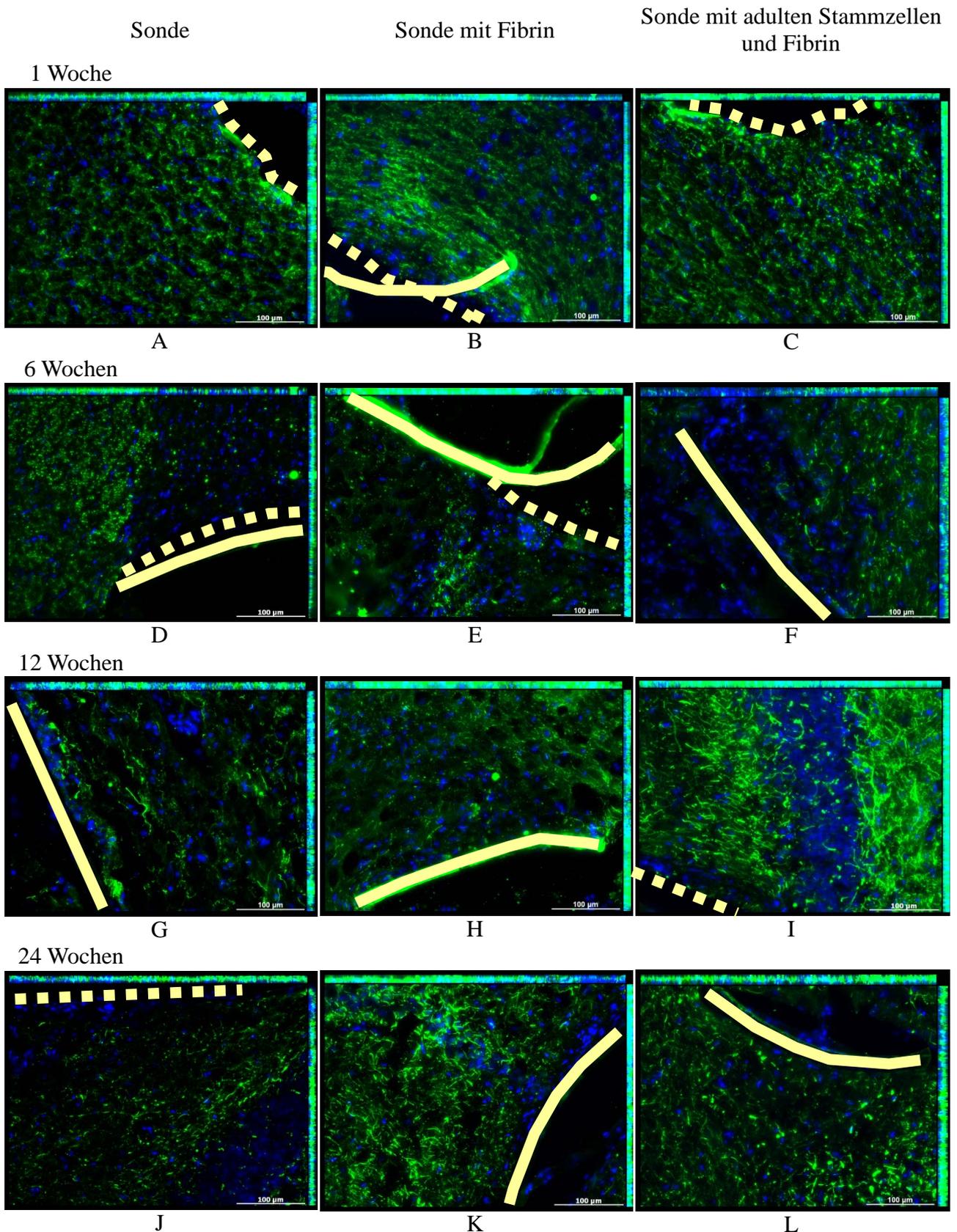


Abbildung 75: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Hypothalamus - Neurofilament

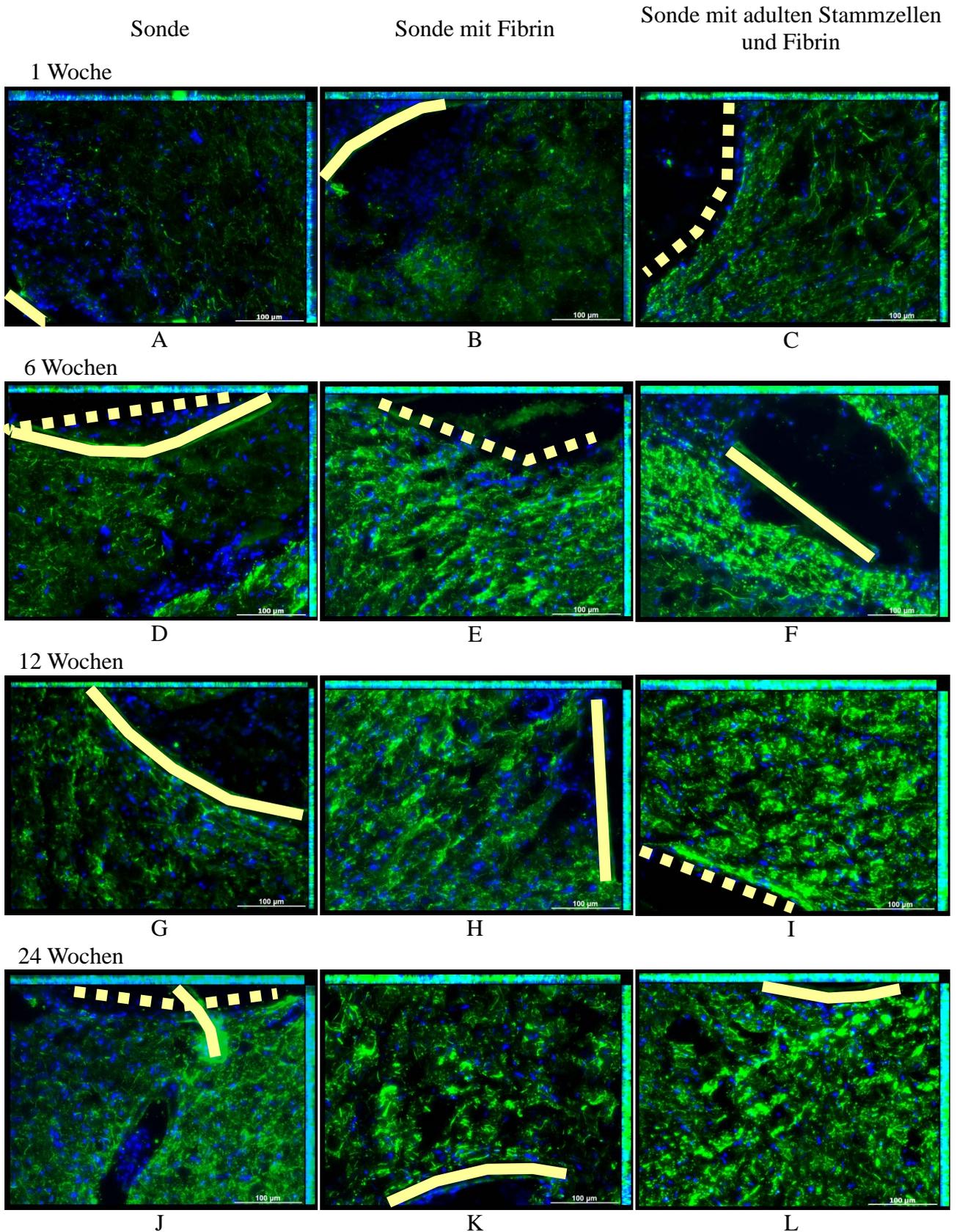


Abbildung 76: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

4.8.5. GFP

Der Nachweis von GFP in den transplantierten Zellen wurde aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Gewebes und des schnellen Ausbleichens der GFP-Fluoreszenz unter dem Mikroskop noch zusätzlich mit einer immunhistologischen Färbung gegen GFP durchgeführt (Abbildung 79). Zudem war bereits bei den in vitro-Versuchen eine unterschiedliche Intensität der GFP-Fluoreszenz in den Stammzellen aufgefallen (Abbildung 77), weshalb durch die nachträgliche Färbung das Signal von schwach fluoreszenten Zellen im Gewebe verstärkt werden sollte.

Es konnten nach einer Woche im Cortex (A) und Thalamus (B) positive Zellen in direkter Implantat-Nähe beobachtet werden. Sie befinden sich teilweise dort, wo ebenfalls eine positive Färbung für Nestin festgestellt wurde (Vgl. Abbildung 79 A mit C sowie H mit I). Desweiteren wurden im Thalamus nach zwölf (H) und 24 Wochen (K) noch positive Zellen in direkter Implantat-Nähe oder auf dem Implantat festgestellt. Im Hypothalamus konnten nach zwölf Wochen (I) noch einzelne Zellen, dem Implantat anliegend, festgestellt werden. Dies wurde auch für den Cortex nach 24 Wochen (J) beobachtet. In allen anderen Proben war keine eindeutige Zuordnung der Färbung zu den Zellen möglich.

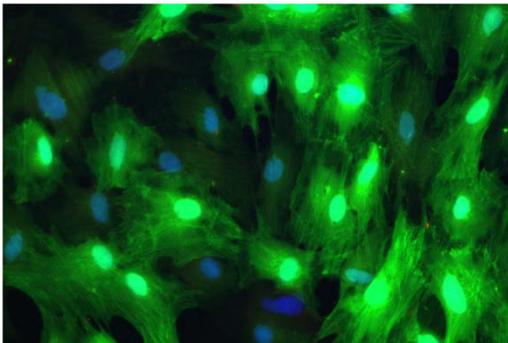
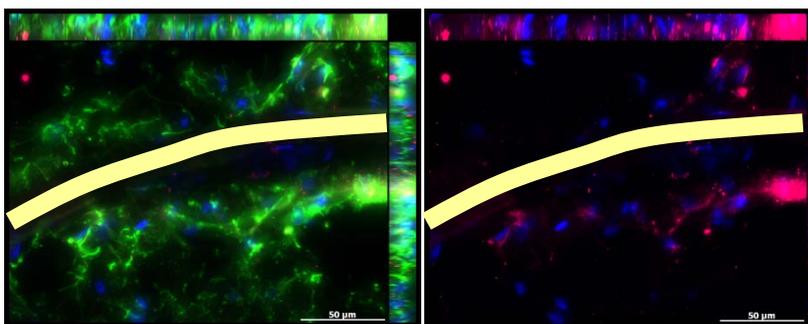


Abbildung 77: GFP-transgene pankreatische Stammzellen in der Zellkultur. Eine unterschiedlich intensive Synthese von GFP in den Zellen wurde beobachtet. (grün: intrinsische GFP-Fluoreszenz, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)

Somit konnte der grüne Fluoreszenz-Kanal zudem für die Färbungen anderer Proteine verwendet werden, da durch die zusätzliche GFP-Färbung eine Diskriminierung zwischen eventueller GFP-Fluoreszenz und anderen Färbungen möglich wurde (Abbildung 78).



A

B

Abbildung 78: Sonde nach zwölf Wochen im Thalamus. Im Grünkanal kann die GFAP-Färbung (grün) nicht von intrinsischer GFP-Fluoreszenz unterschieden werden (A). Erst die Detektion mittels GFP-Antikörper (magenta, B) ermöglicht die Zuordnung des Signals der transplantierten Zellen. (Vergrößerung: 400x).

GFP

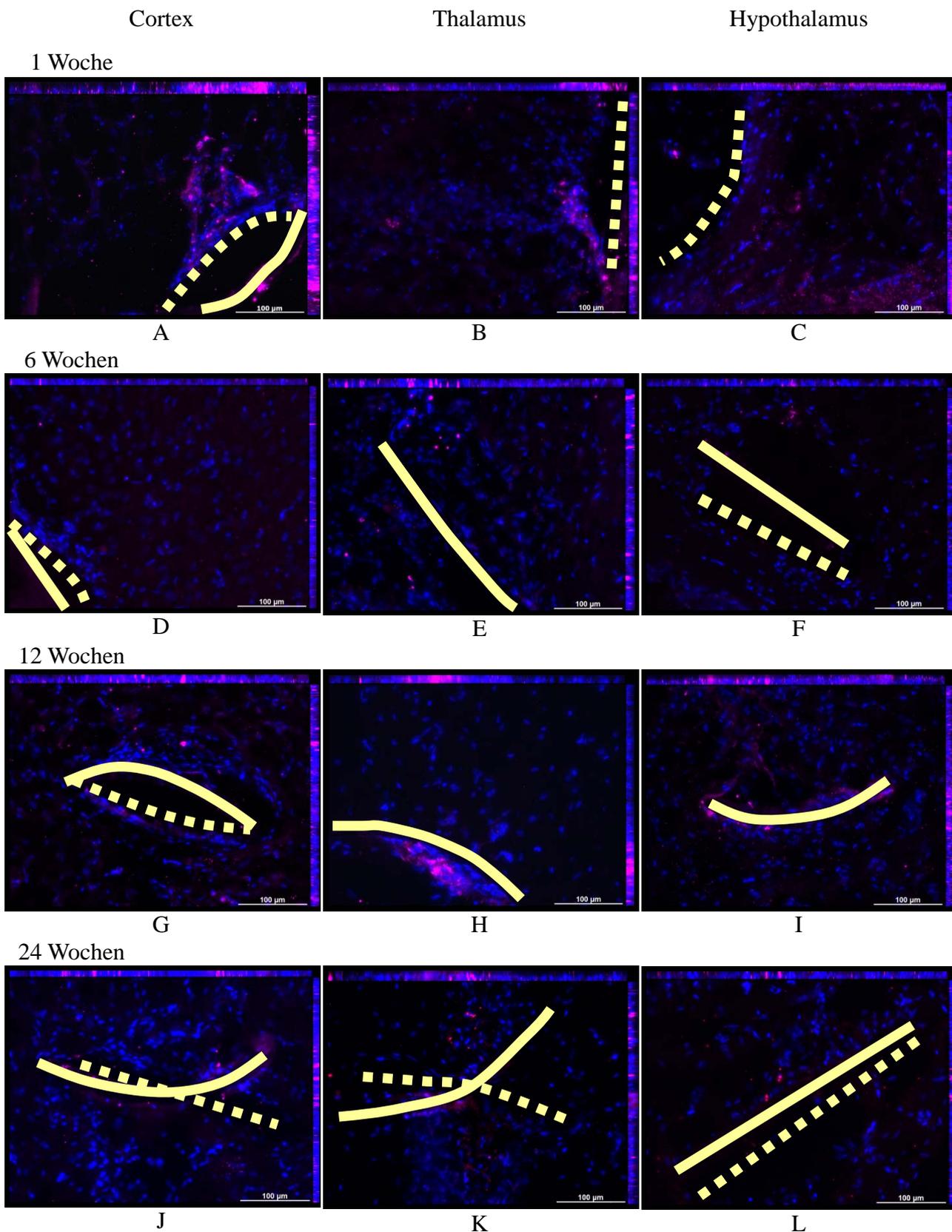


Abbildung 79: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFP-Färbung (cyan bzw. magenta) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

Bei genauerer Betrachtung der transplantierten Zellen in den verschiedenen Doppelfärbungen wurde häufig eine Lokalisation direkt vor der Sonde festgestellt (Abbildung 80 A und C). Dabei war keine Färbung für GFAP oder Neurofilament mit diesen Zellen echt kolokalisiert. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass vereinzelte Neurofilament-positive Filamente durch die Frontlinie reichten (D).

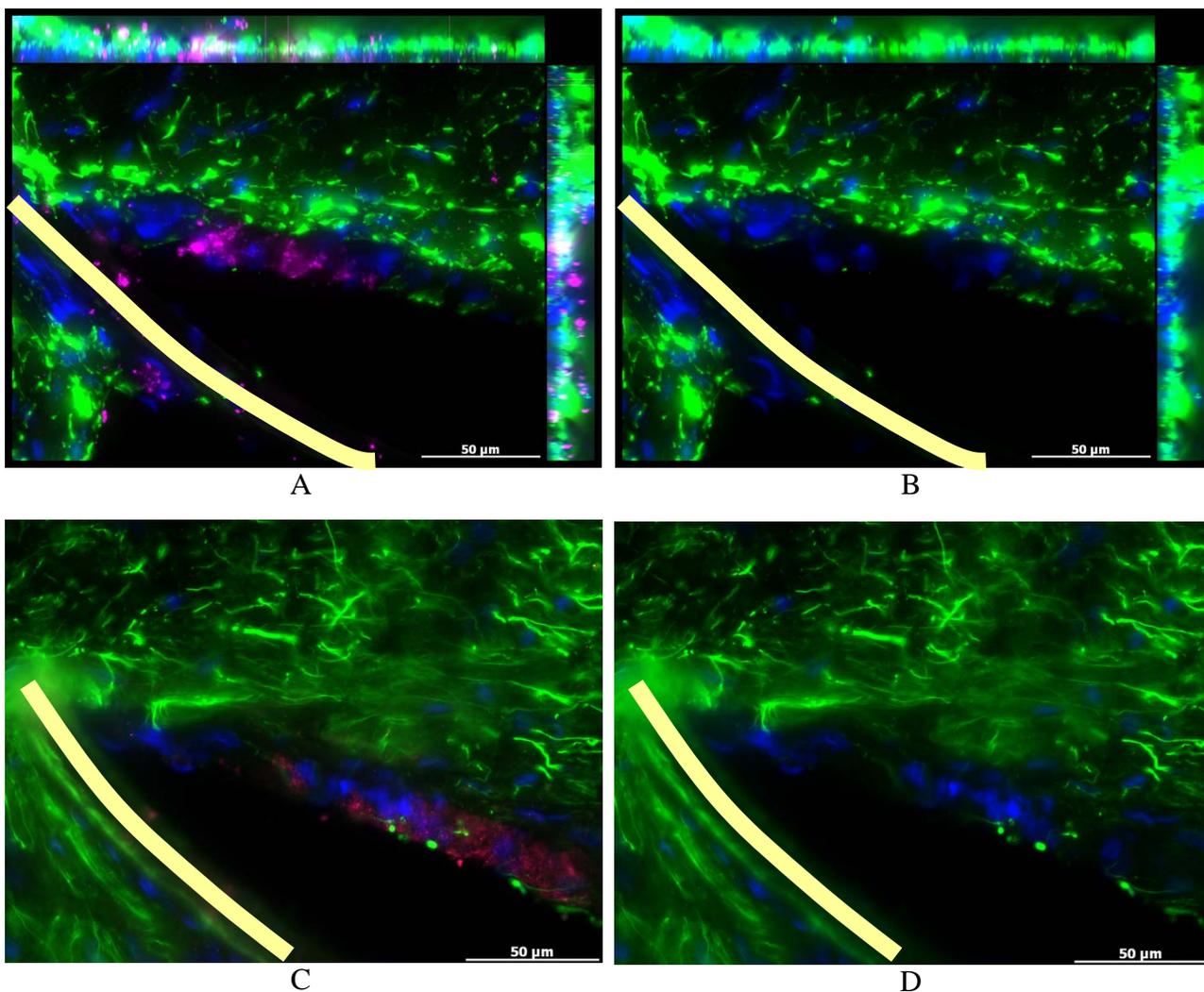


Abbildung 80: Zellbesiedelte Sonden im Thalamus nach 12 Wochen. In der Frontlinie befindliche GFP-Stammzellen (A und C, magenta) sind weder GFAP-positiv (B) noch zeigen sie filamentäre Färbungen für Neurofilamente (D) wie sie im Gewebe vorliegen. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x).

4.8.6.CSPG und O4

Extracelluläre Matrixproteine der Klasse der Chondroitinsulfat-Proteoglycane (CSPG), in diesem Fall NG2, *brain core protein*, wurden zur Darstellung von Oligodendrocyten-Vorläuferzellen in den Präparaten angefärbt. Es kann außerdem eine neurorepellente extracelluläre Matrix im Regenerationsbereich wiedergeben. O4, ein Sulfatid auf der Oberfläche differenzierter Oligodendrocyten, wurde in diesen Untersuchungen gefärbt, um den Einfluss von ausdifferenzierten Oligodendrocyten auf die Gliose wiederzugeben.

Für beide Antigene ließ sich in keiner Probe eine Korrelation zur Gliose beobachten. War CSPG gefärbt, so wurden definierte Zellen in distinkten Bereichen des Gewebes beobachtet. Selbst wenn das Implantat nahe dieser Areale lag, konnte keine Akkumulation positiver Zellen oder ein Zusammenhang zu einer reduzierten Färbung von Neurofilamenten und damit ein neurorepellenter Effekt festgestellt werden (Abbildung 81 und Abbildung 82).

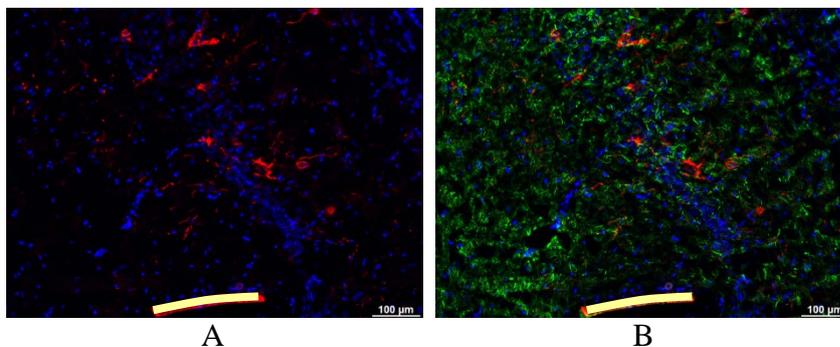


Abbildung 81: CSPG-positive Zellen (A,B; rot) sind am Implantat nicht akkumuliert und zeigen im überlagerten Bild beider Fluoreszenzkanäle (B) keine Relation zur reduzierten Neurofilament-färbung (grün) vor dem Implantat. (blau: DAPI, Vergrößerung: 100x).

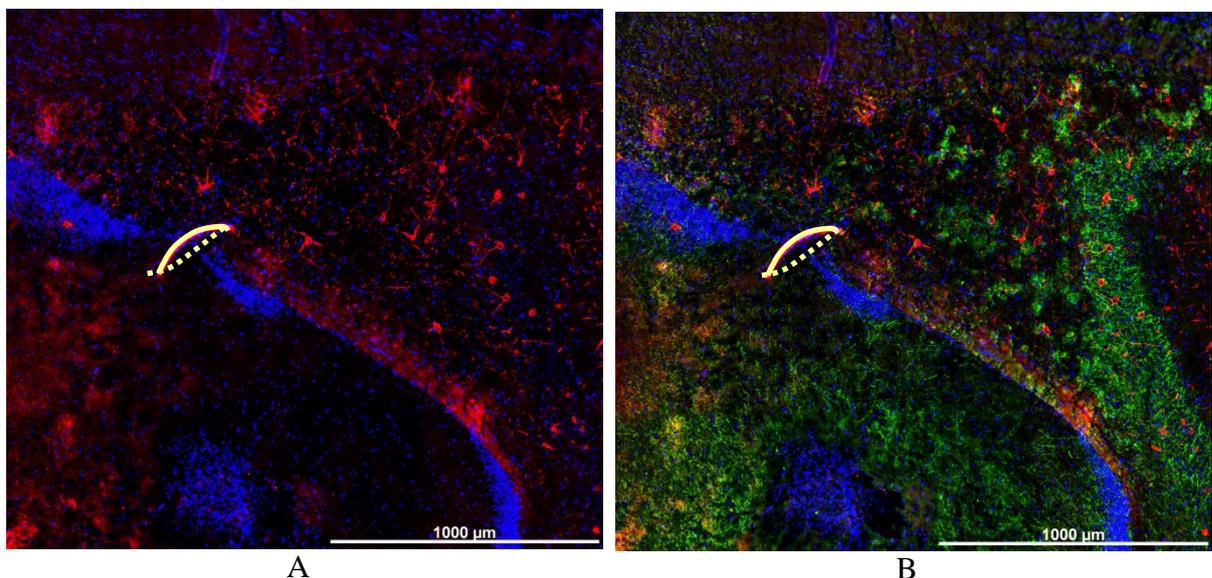


Abbildung 82: Fibrin-beschichtetes Implantat im Hypothalamus nach 24 Wochen. In einzelnen Abschnitten des Hirngewebes sind distinkte CSPG-positive Zellen (rot) zu beobachten, während andere Bereiche diffus oder ungefärbt sind (A). Es lässt sich jedoch kein Bezug der verschiedenen Färbemuster zur Implantation oder verminderter Neurofilament-Färbung (grün) herstellen (B). (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI; Vergrößerung: 100x – Mosaik).

Für O4 gelangt man zu einem ähnlichen Bild nach Betrachtung aller Proben. Die Verteilung positiver Färbung um das Implantat entsprach in jedem Fall der beobachteten Färbung im restlichen Hirnabschnitt, wenngleich diese sich in ihrer Färbintensität erheblich unterscheiden können (Abbildung 83). Es war somit durch beide Färbungen keine Relation von Oligodendrocyten zu den verschiedenen Implantat-Gruppen herstellbar.

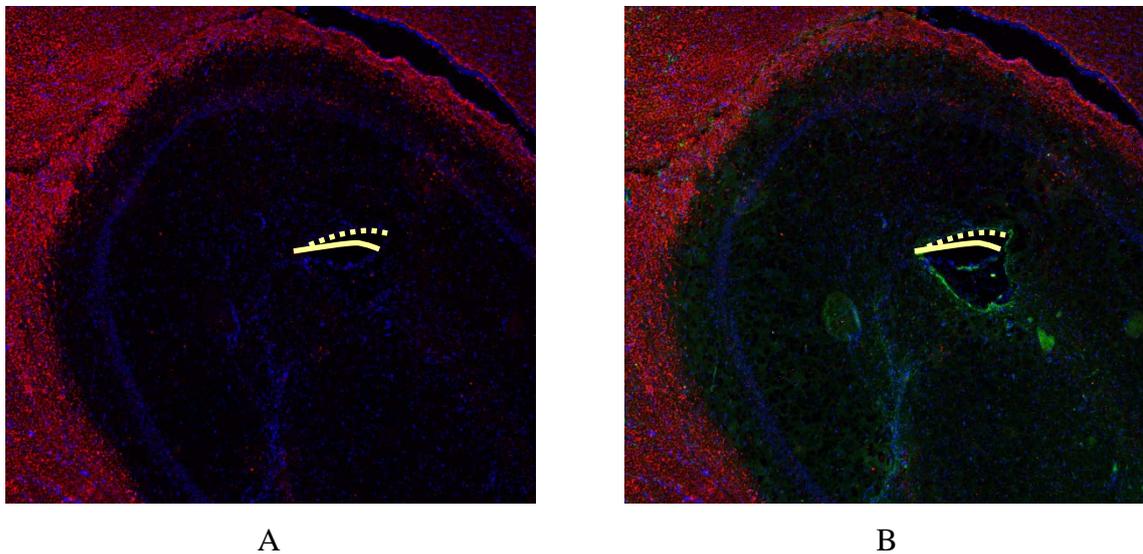


Abbildung 83: Fibrin-beschichtetes Implantat nach 12 Wochen im Thalamus. In verschiedenen Kompartimenten des Hirngewebe verhält sich die Oligodendrocyten-Färbung gegen O4 (A, rot) unterschiedlich. Es konnte keine veränderte Färbung für O4 in Zusammenhang mit der Gliose (B, grün: GFAP) gebracht werden. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 100x – Mosaix).

4.8.7. Besonderheiten während der histologischen Tierversuchsauswertung

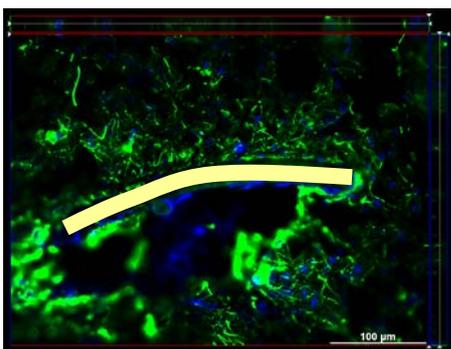


Abbildung 84: GFAP-Färbung einer Probe mit Fibrin-beschichteter Sonde nach 24 Wochen. Die GFAP-Filamente (grün) lassen sich bei Betrachtung nur einer Ebene des Präparates schlecht in ihrer Gesamtheit wiedergeben, da sie nicht parallel zur Fokusebene liegen und sich in die unscharfen darüberliegenden Bereiche erstrecken. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).

5.8.7.1. Maximale Intensitätsprojektion (MIP)

Zur Untersuchung der histologischen Präparate des Tierversuchs musste vermehrt auf die maximale Intensitätsprojektion von Bildstapeln, welche durch serielle Aufnahme über die gesamte Schnittdicke entstanden, zurückgegriffen werden (Abbildung 84). Erst hierdurch wurde es möglich filamentäre Strukturen nicht nur als punktförmige Färbung oder kurze, abgeschnittene Filamente sichtbar zu machen, sondern diese über teilweise beträchtliche Länge darzustellen. So konnte ebenfalls sehr gut zwischen einer echten punktuellen Färbung und angeschnittenen Filamenten, welche im Querschnitt sehr ähnlich erscheinen, differenziert werden.

5.8.7.2. Kontaktstelle Implantat:Gewebe

Der Saum der Läsion bzw. die Interaktionsstelle Implantat:Gewebe stellte sich über alle Präparate hinweg häufig etwas verschieden dar. Anhand einiger hochaufgelöster Beispiele sollen kurz die typischen Erscheinungsformen erläutert werden. Ein sehr typisches Beispiel für eine Frontlinie mit wenigen reaktiven Astrocyten ist in Abbildung 85 dargestellt. Dabei ist eine deutliche und dichte Zellmenge vor dem Lining, welches hier nicht ganz vollständig ist, vorgelagert. Wenige dieser Zellen sind ED-1-positiv. Es kann aufgrund der bisherigen Färbungen noch keine Aussage über den Charakter der ED-1-negativen Zellmenge gemacht werden, da sie für alle untersuchten Proteine negativ war.

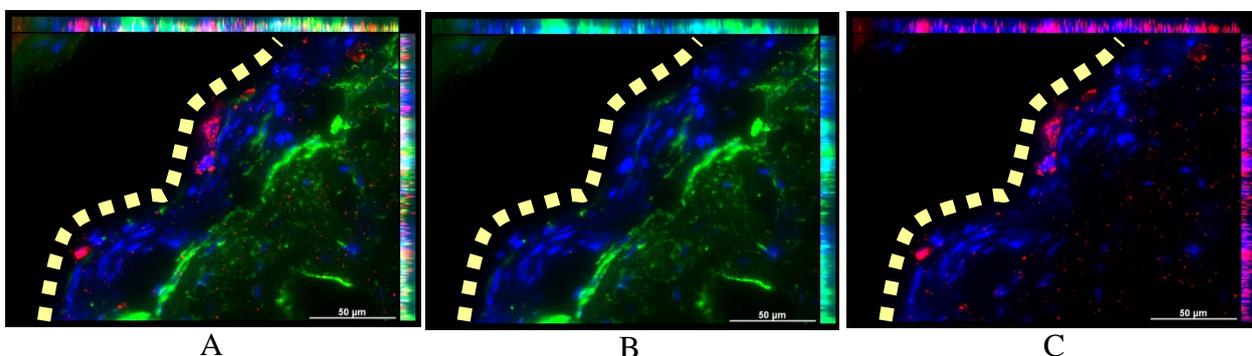


Abbildung 85: Frontlinie und Lining einer Fibrin-beschichteten Sonde nach 24 Wochen im Overlay (A). Vor dem Lining GFAP-positiver Zellen (grün, B) liegt eine dichte Zellmenge (blau: DAPI), welche nur wenige ED-1-positive Zellen (rot, C) enthält. (blau: DAPI, Vergrößerung: 400x).

Im Gegensatz zu fast allen bisherigen Publikationen war es in dieser Untersuchung möglich, die Mehrheit der Präparate so anzufertigen, dass das Implantat in ihm verblieb. Für die Affinität verschiedener Zellen zum Implantat wurden in vorangegangenen Studien jedoch auch die entfernten, rigiden Implantate immunhistochemisch gefärbt, um die Affinität von Zellen, auf dem Implantat zu clustern, darzustellen. Dies ist besonders für Mikrogliazellen interessant und konnte vereinzelt auch in den Proben dieses Versuches, wenn auch in geringer Zellmenge, beobachtet werden (Abbildung 86). Hierzu wurden auch die im Präparat befindlichen Sonden, welche sich teilweise durch die Spülprozesse vom Objektträger lösten, mikroskopiert.

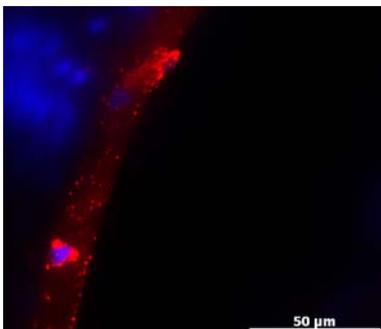


Abbildung 86: Fibrin-beschichtete Sonde nach 24 Wochen im Thalamus. Auf der Sonde befinden sich nur einzelne ED-1-positive Zellen (rot). (blau: DAPI, Vergrößerung 400x).

Es konnte so auch festgestellt werden, ob noch transplantierte Zellen der Sonde anliegen, da es in der Cy5-markierten Einzelfärbung für GFP im grünen Kanal keine störende Eigenfluoreszenz des Gewebes auf der Sonde gab. So konnte über Kolo-kalisation des GFP-Signals mit der Cy5-Färbung die Anwesenheit transplan- tierter Zellen verifiziert werden (Abbildung 87).

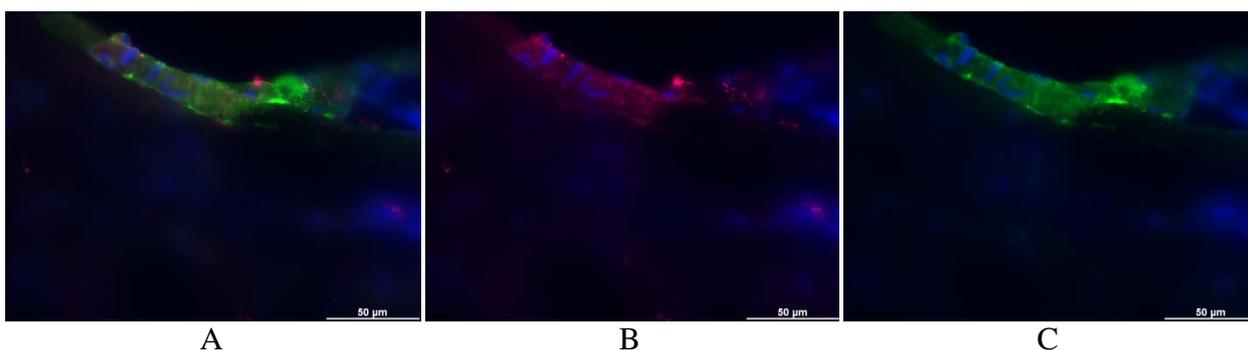


Abbildung 87: Stammzell-besiedelte Sonde nach 24 Wochen im Cortex. GFP-transgene Zellen fluoreszieren im Overlay in grün und überstrahlen die Cy5-Färbung des Primärantikörpers gegen GFP (A). In Cy5-Kanal (B) und FITC-Kanal (C) sind jedoch beide Färbungen gut voneinander zu diskriminieren. Blau: DAPI, Vergrößerung: 400x.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten flexiblen neuronalen Implantaten aus Polyimid durch vollflächige Beschichtung mit adulten glandulären Stammzellen eine biologische Oberfläche verliehen werden. Die Überprüfung der verbesserten Biokompatibilität solcher biologisierter Implantate im Tiermodell Ratte wurde abschließend im Langzeitversuch unternommen.

In einer Vielzahl klinischer Anwendungen werden nicht-biologische Fremdkörper für den dauerhaften Verbleib in den Körper eingebracht. Solche Implantate werden nach dem invasiven Eingriff vom Körper erkannt. Die langfristige Funktion der Implantate kann in diesem Zusammenhang durch mögliche immunologische Reaktionen des Körpers gefährdet sein und so wird von den jeweiligen Forschungs- und Industriezweigen ein großer Aufwand betrieben, optimale Implantate zu produzieren. Dabei steht die Biokompatibilität, also in diesem Zusammenhang die Fähigkeit des Körpers mit einem Implantat ohne Beeinträchtigung ihrer Funktionalität zu leben, im Vordergrund. Die in dieser Arbeit vorgestellte Strategie zur Biologisierung von Tiefenhirn-stimulierenden Sonden setzt sich dies ebenso zum Ziel.

Häufig erfolgt die Körperreaktion auf Fremdkörper in der kurzfristigen Phase durch eine Inflammation. In der langfristigen Phase werden die Implantate oft von Bindegewebehüllen umschlossen und somit passiviert. Diese Einkapselung stellt eine direkte Isolation des Implantates vom Körper dar und es ist für diesen dann kein störender Fremdkörper mehr vorhanden. Muss jedoch, wie im Fall von Tiefenhirn-stimulierenden Elektroden, eine elektrophysiologische Konnektivität des Implantates zum Gewebe hergestellt werden, kann durch solche Reaktionen die Funktionalität und somit der zuvor betriebene chirurgische Aufwand nichtig werden.

Eine Vielzahl von Strategien wurde und wird erforscht, um die Fremdkörper für den Körper attraktiver zu machen und somit eine ungewünschte Abstoßung zu verhindern. Dabei werden auf physikalischer, chemischer und biologischer Ebene Modifikationen getestet, welche vorwiegend dem jeweiligen Zielgewebe eine native Struktur des Fremdkörpers anbieten sollen. Aus diesem Grund werden beispielsweise im Rahmen dieses Projektes flexible Elektroden verwendet. Sie können sich mit den Mikrobewegungen des Gehirns im Liquor bewegen und somit mechanisch die Scherbelastung minimieren, im Vergleich zu rigiden, schädelfixierten Stabsonden. Neben dieser physikalischen Anpassung, orientiert an der sogenannten Match-Compliance-Hypothese, ist die Biologisierung der Implantatoberfläche zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Hierzu kann man über alle Ebenen der Biomoleküle, von kleinsten Peptiden bis hin zu ganzen Zellen bereits vielversprechende Studien in der Literatur finden. Betrachtet man die physiologischen Vorgänge im Hirngewebe während der akuten und

chronischen Phase nach der Implantation, so ist eine bemerkenswerte Komplexität an Interaktionen der einzelnen beteiligten Zelltypen ersichtlich. Somit erschien es im Rahmen dieser Arbeit erstrebenswert, eine Biologisierung der Implantate zu entwickeln, welche eine aktive Interaktion einhergehend mit akuter Anpassungsfähigkeit an die lokalen Zustände ermöglicht. Dies sollte durch die Besiedlung der Sondenoberfläche mit adulten glandulären Stammzellen erreicht werden. Sie zeichnen sich durch eine gute Plastizität und Vitalität für solche Verfahren aus. Zunächst wurde eine geeignete Stammzellpopulation über in vitro-Charakterisierung der Zellen ausgewählt.

5.1. In vitro-Untersuchungen

5.1.1. Auswahl der geeigneten Stammzellpopulation

Pankreatische und submandibulare glanduläre Stammzellen aus den exokrinen Teilen der jeweiligen Drüsengewebe wiesen für diese Fragestellung sehr geeignete Eigenschaften auf. Beide Populationen waren bereits mehrfach in der Literatur mit ausgeprägter Plastizität und Expansionsfähigkeit beschrieben (Gorjup et al., 2009; Kruse et al., 2004; Kruse et al., 2006; Rapoport et al., 2009). Die eingehende immunocytochemische Untersuchung zeigte für die pankreatischen Stammzellen ein besseres neurales Differenzierungspotential als für die Stammzellen aus der submandibularen Speicheldrüse. Im Gegensatz zu der grundlegenden Veröffentlichung von Gorjup et al. gelang es in dieser Population nicht Nestin und GFAP nachzuweisen, wohingegen die pankreatischen Stammzellen beide Proteine aufwiesen (Gorjup et al., 2009). Nestin ist ein Stammzellmarker, welcher in Stammzellen der neuronalen Gewebe detektiert wird (Wiese et al., 2004). In vielen anderen Geweben, einschließlich des Pankreas und der submandibularen Speicheldrüse ist er für Stammzellen als prominenter Marker beschrieben (Gorjup et al., 2009; Kruse et al., 2004; Kruse et al., 2006; Rapoport et al., 2009). GFAP ist ursprünglich ein Marker für Astrocyten, wurde jedoch vor allem für Nagetiere als Stammzellmarker von ZNS-Stammzellen der Subventrikularzone beschrieben (Doetsch et al., 1999; Gage, 2000; Uchida et al., 2000). Das neurale Intermediärfilament Neurofilament sowie das mesodermale Strukturprotein α -smooth muscle actin (α SMA) konnten neben dem Proliferationsmarker Ki67 in beiden Populationen gezeigt werden. Dabei war die Cytoskelettstruktur der Neurofilamente in der pankreatischen Stammzellpopulation charakteristisch. Auch eine Induktion der neuronalen Differenzierung mittels Kokultur mit Rattenhirnbiopsien zeigte keine stärkere Tendenz der submandibularen Stammzellen in die neurale Richtung zu differenzieren. Xenogene Induktionsexperimente konnten bei anderen humanen glandulären Stammzellpopulationen eine signifikante Steigerung der neuronalen Differenzierungsfähigkeit hervorrufen (Petschnik et al., 2011). Unter dem Aspekt der

bestmöglichen Integrationsfähigkeit der implantierten Zellen wurde ein konstant gutes neurales Differenzierungspotential der adulten Stammzellen als wünschenswert erachtet. Es wurde hierfür die Annahme zugrunde gelegt, dass Stammzellpopulationen, welche spontan neurale Tochterzellen hervorbringen können, teilweise Differenzierungsprozesse rekapitulieren, wie sie nativ in vivo vorliegen. Eine solche intrinsische neurale Tendenz könnte eine bessere Adaptionfähigkeit der transplantierten Zellen an neuronale Zielgewebe ermöglichen. Dies würde eine für die Regeneration potentere Stammzellpopulation, welche bestenfalls zum Ersatz verlorengegangener Zellstrukturen beitragen kann, kennzeichnen.

Diesbezüglich wurden die weiteren Arbeiten mit pankreatischen Stammzellen fortgesetzt, da aufgrund dieser frühen Ergebnisse eine bessere Erfolgsaussicht bezüglich der Integrationsfähigkeit bestand. Konsequenterweise wurde ein erweitertes Spektrum an charakteristischen Markern für eine mRNA-Untersuchung der pankreatischen Stammzellen erstellt und mittels dieser Untersuchung wurde neben der mRNA neuronaler Marker (Neurofilamente, β 3-Tubulin, Enolase) auch neurale Marker wie NCAM, MBP und S100 nachgewiesen. Ein Nachweis der GFAP-mRNA gelang nicht. Jedoch konnten die Transkripte für die Stammzellmarker c-myc, oct-4, klf-4, CD9 und Nestin gezeigt werden. Es wurden ebenso Transkripte für weitere mögliche Differenzierungsrichtungen untersucht. Die Transkripte typischer mesodermaler Proteine, wie SPP1, α SMA und PPAR γ sowie für GATA4 als endodermales Protein, illustrieren stellvertretend die konsistente Multipotenz der pankreatischen Stammzell-population. Da die bisherigen Untersuchungen für Zellen aus Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten durchgeführt wurden, kann man eine Stamm-spezifische Varianz ausschließen.

Bezüglich der stabilen neuronalen Differenzierungsfähigkeit ist zudem die immunocytochemische Untersuchung in Passagen durchgeführt worden, welche voraussichtlich zur Transplantation verwendet werden sollen. Es konnte auch in diesen Nestin, GFAP und Neurofilament detektiert werden und somit eine konstante Fähigkeit der Population, die gewünschten Tochterzellen hervorzubringen, festgestellt werden.

Weitere geplante Versuche enthielten ganze oder teilweise Wiederholungen dieser ersten Experimente in Form von Kontrollen. Zu diesem Zeitpunkt wurde also erwogen, dass zunächst die Arbeit an den nächsten, primär technischen Fragestellungen fortgesetzt wird und bei etwaigen abweichenden Beobachtungen von den bisherigen Ergebnissen, die grundsätzliche Entscheidung für die einzusetzende Zellquelle neu getroffen werden kann.

Für die experimentelle Implantation von Zellen in vivo ist es sinnvoll das Schicksal der eingebrachten Zellen in post-mortem-Untersuchungen zu evaluieren. Hierfür muss man not-

wendigerweise die applizierten Zellen von den residenten Zellen diskriminieren können. Führt man solche Experimente xenogen durch, kann man aufgrund genetischer Unterschiede beide Herkünfte über in-situ-Hybridisierung darstellen. Will man zur Reduktion immunologischer Effekte allogene oder gar syngene arbeiten, gestaltet sich die Aufklärung des Zellschicksals der transplantierten Zellen schwieriger. Beispielsweise kann man die zu transplantierende Population mit genetischen Vektoren transformieren, welche Reportergene unter Promotoren konstitutiv aktiver Gene, sog. Haushaltsgene, exprimieren. Für einige adulte Stammzellpopulationen konnten mit dieser Methode gute Erfolge über Lipofektion und Elektroporation bereits erreicht werden (Helledie et al., 2008; Wang et al., 2009). Die Transfektion wurde mit einem pEGFP-N1 Plasmid unternommen. Durch Elektroporation wurde dieses Plasmid in Zellsuspensionen pankreatischer Stammzellen eingeschleust. Daraufhin exprimierten die Zellen unter dem CMV-Promotor das Protein EGFP und fluoreszierten grün. Jedoch schien diese Expression unter Selektion mit G418 nicht zu einer zufriedenstellenden Effizienz der Markierung in der Gesamtpopulation zu führen. Es nahm unter Expansion der Population bei gleichzeitiger G418-Gabe die Anzahl der nicht-fluoreszenten Zellen nicht ab, welche also die G418-Gabe überlebten und somit auch das Plasmid mit der Kanamycin/Neomycin-Resistenz enthielten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der CMV-Promotor in pankreatischen Stammzellen reguliert wird und somit die Expression des EGFPs erlischt. Ein hierfür in Frage kommender Mechanismus wurde bereits für embryonale Stammzellen beschrieben (Meilinger et al., 2009). Alternative Möglichkeiten zur Zellmarkierung wurden nun angestrebt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine langfristig stabile Markierung mit minimalem Einfluss auf die Stammzellen angestrebt. Hierfür liegen zunächst gängige Markierungen durch Interkalation von Farbstoffen in die DNA nahe, wie sie beispielsweise mit Bromdesoxyuridin (BrdU) oder Hoechst stattfinden kann. Diese Substanzen haben allerdings den Nachteil, dass sich ihre zelluläre Konzentration und somit Detektierbarkeit durch Zellteilung verringert und somit Tochterzellen der transplantierten Stammzellen wahrscheinlich nicht mehr identifizierbar sind. Zudem interkalieren sie in die DNA, was für eine doch relativ sensible Zellpopulation, wie es Stammzellen aufgrund ihrer Plastizität sind, ein unnötiges Risiko der Selektion oder Entartung über längere Zeit birgt (Davidson and Horn, 1974). Neben den transienten interkalierenden Farbstoffen kann man alternativ auch Farbstoffe in das Zellsoma einführen. Da sie aufgrund des verhältnismäßig größeren Zellkompartimentes in einer größeren Menge vorliegen können, wäre das Detektionslimit durch Zellteilung theoretisch nicht so schnell unterschritten. Jedoch ist bei der Auswahl solcher Farbstoffe ebenso auf einen möglichen Einfluss des Zellstoffwechsels zu achten, um eine Veränderung der Stammzellen zu vermeiden. Ähnlich wie bei GFP kann man

hierbei andere fluoreszente Proteine evolutiv entfernter Organismen verwenden. Es wurde ein rot fluoreszierendes Protein aus *Epicoccum nigrum* getestet, welches als kommerzielles Produkt LavaCell vertrieben wird. Laut Hersteller-Angaben handelt es sich hierbei um ein kleines, nicht-toxisches, Wasser-lösliches Molekül, welches die Zellmembran passiert und im Inneren der Zellen freie Aminogruppen bindet, wodurch Zellmembranen und -organellen markiert werden. Die Zellen nahmen dieses gut auf und zeigten eine entsprechend rote Fluoreszenz. Leider schien es jedoch einen ausgeprägten Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu haben, da sich nach Markierung schnell eine abnorme Morphologie vieler Zellen zeigte. Somit konnte auch diese Substanz nicht ohne eine absehbare Veränderung der Stammzellen verwendet werden. Letztendlich wurde der wohl fundamentalste Weg beschränkte markierte pankreatische Stammzellen mit möglichst konstanten Eigenschaften zu gewinnen – die Isolation dieser Zellen aus EGFP-transgenen Ratten, welche durch Nukleus-Transfer generiert wurden. Hierbei stand der besondere Vorteil im Vordergrund, dass die so generierten Tiere bereits eine vollständige Embryonalentwicklung durchlaufen haben, welche abnorme Stammzellcharakteristika aufgrund des Transgens relativ unwahrscheinlich macht. Die EGFP-transgenen Zellen wurden anschließend in verschiedenen Passagen mit Immunocytochemie und RT-PCR charakterisiert. Dabei wurde immunocytochemisch eine Übereinstimmung mit den bisher verwendeten Markern gefunden und das Spektrum noch um weitere endo- und mesodermale Marker erweitert, welche ebenso positive Resultat zeigten und somit grundlegend die Multipotenz bestätigten. Die RT-PCR wurde auf ein etwas reduziertes Spektrum beschränkt, welches jedoch in seiner Gesamtaussage wie bereits zuvor die Multipotenz validiert. Dabei konnte durch Nachweis von GATA4 und von-Willebrandt-Faktor das endodermale Potential verifiziert werden. Die relativ große Anzahl Troponin I-positiver Zellen in der immunocytochemischen Untersuchung, bestätigt das bereits durch α SMA angezeigte mesodermale Potential. Nucleostemin, als Telomer-stabilisierender Faktor, weist auf die Proliferationskontrolle früher Stamm-/Vorläuferzellen hin und wurde in der Majorität der Zellen nachgewiesen. Dies korreliert mit der durch Ki67 angezeigten guten Proliferationsaktivität. Um einen Hinweis auf eine mögliche Tumorigenität der Population zu erhalten wurde der Endothelial Growth factor receptor gefärbt, welcher in entarteten Populationen hochreguliert ist. Da jedoch dieses Protein nur in sehr wenigen Fällen detektiert wurde, entsprechend einer zufälligen Verteilung in einer spontan differenzierenden Stammzellpopulation, kann die gute Proliferationsaktivität nicht mit einer malignen Entartung der Population in Verbindung gebracht werden. Zur Unterstützung dieser Annahme sollten weiterführend Chromosomenanalysen durchgeführt werden. Somit konnte durch das erweiterte Spektrum der immunocytochemischen Färbung das zuvor festgelegte Subset zur standard-

mäßigen Überwachung der Zellcharakteristika, bestehend aus Nestin, GFAP, Neurofilament und α SMA validiert werden. Die neuronalen Marker GFAP und Neurofilament blieben im standardmäßigen Panel enthalten, da jederzeit die Aufrechterhaltung der neuronalen Differenzierungsfähigkeit sichergestellt werden muss. Stellvertretend für die weiteren, Multipotenz-anzeigenden Marker wurde zukünftig nur noch α SMA als Indikator mitgeführt. Der Stammzellmarker Nestin wurde ebenfalls repräsentativ für weitere Stammzellmarker mitgeführt. Bezüglich der mRNA-Analyse mit RT-PCR wurden Nestin, GFAP, Neurofilament und α SMA ebenfalls als Standard untersucht, jedoch erweiterte sich das Spektrum um transkriptionell regulierte Stammzell- und Differenzierungsmarker um genügend Hinweise auf eine mögliche Verschiebung der Differenzierungsneigung über das Genexpressionsprofil zu erhalten. Es wurde um die neuronalen Marker β 3-Tubulin und Enolase, um den mesodermalen Marker PPAR γ sowie den endodermalen Marker GATA4 erweitert. Für die Stammzell-Marker wurde neben Nestin ebenfalls CD9 und oct4 untersucht. Dieses, im Vergleich zur ersten Charakterisierung reduzierte Spektrum an Markern genügte in diesem Zusammenhang zur Identifikation von möglichen Veränderungen der Stammzell-Charakteristika in zukünftigen Experimenten, da es Änderungen in der Plastizität der Zellen wiedergeben kann.

Nachdem nun also eine Möglichkeit zur Verfolgung der transplantierten Zellen durch Isolation von pankreatischen Stammzellen aus EGFP-transgenen Wistar-Ratten gefunden wurde, konnte mit der Untersuchung von den Implantat-Materialien als Wachstumsoberfläche begonnen werden. Zunächst wurde die Adhärenz und Proliferation der Zellen auf den verschiedenen Polyimiden untersucht. Dabei kam sowohl die transgene als auch nicht-transgene Population der vorangegangenen Untersuchungen zum Einsatz, um unterschiedliche Eigenschaften beider auszuschließen. Es wurden Polyimide aus zwei verschiedenen Produktionsstrecken getestet, um eventuelle Unterschiede im Herstellungsprozess, der in beiden Fällen laut Herstellerangaben erfolgte, auszuschließen. Im Vergleich zur konventionell verwendeten Zellkulturplastik ist ein Polyimid ein Kunststoff der durch Spin-Coating auf einen Wafer lackiert und dann in verschiedenen Schritten ausgehärtet wird. Somit besitzt er im Vergleich zu Polystyrol-, Polyester- oder Polypropylen-basierten Zellkulturoberflächen eine fibrilläre Ultrastruktur, welche den Zellen als Wachstumsoberfläche zur Verfügung steht. Zum Einsatz kamen PI2731 und PI2555 von DuPont. Beide standen in Form von abziehbaren Folien auf Wafern zur Verfügung und diese Folien wurden mit Vakuum-Silikon in die Zellkulturplastik eingeklebt. In allen Fällen war eine gute Adhärenz und Proliferation der pankreatischen Stammzellen auf den Proben zu verzeichnen. Ob die Stammzellen dennoch ihre Differenzierungsfähigkeit erhalten, war zu diesem Zeitpunkt vollkommen unklar. Engler et al. zeigten 2006 für

mesenchymale Stammzellen einen Einfluss der Matrix-Elastizität auf die Differenzierungsneigung (Engler et al., 2006).

Dabei führte die Kultivierung auf weichen Polyacrylamidgelen zur verstärkten neuronalen Differenzierung. Mit zunehmender Matrix-Steifheit wurde die myogene und auf den steifsten Gelen die osteogene Differenzierungsrichtung bevorzugt vorgefunden. Für das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Setting war keine Prognose solcher Art möglich, da die Folien per se relativ flexibel waren, wie es die Elektroden später auch sein sollten. Durch die notwendige Befestigung auf dem Boden von normalen Zellkultur-Schalen ist jedoch eine Kontraktionsfähigkeit durch aufgewachsene Zellen limitiert. Somit konnte nicht prognostiziert werden, ob die pankreatischen Stammzellen durch diese Bedingungen in eine bestimmte Differenzierungsrichtung driften würden. Betrachtet man jedoch die bisherigen Kultivierungsbedingungen, bei denen die pankreatischen Stammzellen auf planaren, steifen Zellkulturplastiken bereits ein gutes neuronales Differenzierungspotential aufwiesen, so waren die Bedingungen der Polyimid-Testung in jedem Fall mit einer höheren, jedoch undefinierbaren Elastizität verbunden, was gemäß Engler et al. tendenziell zu einer verbesserten neuronalen Differenzierung führen könnte. Dies wäre im Zusammenhang mit dem geplanten späteren Einsatz der pankreatischen Stammzellen eher wünschenswert als hinderlich gewesen. Tatsächlich blieb jedoch die neurale Differenzierungsfähigkeit von diesem Umstand nahezu unbeeinflusst. Die Immunocytochemie und RT-PCR der auf Polyimid gewachsenen Zellen zeigte keine Veränderung der jeweiligen Proben im Vergleich zu den normal kultivierten Kontrollen. Dies mag an der Tatsache liegen, dass in den Polyimid-Folien-Kulturen auch Zellen neben der Folie auf der normalen Zellkulturplastik wuchsen und somit durch parakrine Effekte eine normale Differenzierungsfähigkeit auf den Folien aufrecht erhalten wurde. Prinzipiell ist dieses Ergebnis akzeptabel für eine spätere in vivo Applikation, da bereits die Stammzellquelle nach einer guten neuronalen Differenzierungsfähigkeit gewählt wurde. Nichtsdestotrotz wurde in den folgenden Experimenten die mögliche neurale Induktion durch parakrine und Matrix-basierte Stimulation genauer analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob es sinnvoll ist, die pankreatischen Stammzellen schon vor der Implantation zu präkonditionierten und ob dadurch eine Anreicherung Nestin-positiver Zellen erfolgen kann, wie es bereits für humane Populationen dieser Stammzellquelle gezeigt wurde (Petschnik et al., 2011). Dadurch wäre eine Implantation von neuro-affinen, vorstimulierten Stammzellen möglich.

Zunächst wurden die pankreatischen Stammzellen mit Spezialmedien kultiviert, welche für neurale Stamm- und Progenitorzellen von der Industrie angeboten werden (Anhang). Da jedoch keine eine erfolgreiche Induktion in eine bestimmte Differenzierungsrichtung, z.B. durch eine homogene Hochregulation der Transkripte und Proteine zu beobachten war

(Petschnik et al., 2011), kann dieser Versuch zur neuronalen Induktion mit konventionellen Medien als nicht zielführend bewertet werden.

Im weiteren Versuch sollte mit nativ konditioniertem Medium untersucht werden, ob die Stammzellen durch eine vom Hirn abgegebene native Mischung an löslichen Faktoren zur neuronalen Differenzierung vorangetrieben werden können (Anhang). Es konnte mittels Immunocytochemie keine erhöhte neuronale Differenzierung durch die so behandelten Medien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden. Somit wurde auch dieser Versuch der neuronalen Induktion als erfolglos eingestuft.

Somit wurde eine weitere Möglichkeit zur neuronalen Induktion in Betracht gezogen, welche durch die Applikation definierter extracellulärer Matrix-Proteine erfolgen sollte. Wie bereits zuvor erwähnt, kann man Stammzellen durch die gezielte Modulation der Wachstums-umgebung eine gewünschte Differenzierungsrichtung instruieren (Engler et al., 2006; Petschnik et al., 2011). Da Zellen ihre Umgebung auch durch Zell-Matrix-Kontakt aktiv wahrnehmen, wurde nun versucht, durch Wachstum auf Laminin und in, auf und unter Fibrin eine neuronale Induktion zu erzielen (Engler et al., 2006). Laminin ist ein sehr wichtiges Molekül in der Isolation von primären neuronalen Zellpopulationen und kann in diesem Zusammenhang förderlich für die neuronale Differenzierung der Stammzellen sein (Lee et al., 2000; Yu et al., 1999). Fibrin ist ebenso eine native extrazelluläre Matrix, welche mit einigen positiven Ergebnissen bereits im ZNS eingesetzt wird. Dabei bietet es den Vorteil als zweidimensionale Beschichtung und als dreidimensionale Hydrogel-Matrix eingesetzt werden zu können (Johnson et al., 2009a; Johnson et al., 2009b; Ju et al., 2007; Yasuda et al., 2010). Dies kann von Vorteil zur Vernetzung von Zellen in dreidimensionalen Strukturen sein. Die zellulären Analysen wurden in diesem Fall auf immunocytochemische Untersuchungen beschränkt. Nach Kultivierung auf Laminin lässt sich keine Änderung der Differenzierungsfähigkeit der pankreatischen Stammzellen feststellen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Zellen über die Interaktion mit diesem extracellulären Matrix-Protein nicht neuronal induziert werden. Die Zugabe von Fibrin als Wachstums-oberfläche oder -beschichtung führte ebenfalls nicht zu einer Steigerung der neuronalen Zellmenge, wie die konstante Menge Neurofilament-positiver Zellen belegt bei gleichbleibender Menge α SMA-positiver Zellen. Bei diesem Versuch fielen jedoch besonders häufig in Clustern vorliegende Nestin- und GFAP-positive Zellen auf, welche in direktem Zell-Zell-Kontakt standen, auch wenn die Konfluenz der Population sehr gering war. Es war außerdem möglich, doppel-positive Zellen zu detektieren, weshalb GFAP für diese Population auch als Transitionsmarker angenommen werden kann, wie er auch im Hirn vorkommt, bei der Differenzierung neuronaler Stammzellen zu Progenitoren (Doetsch et al., 1999; Gage, 2000; Uchida et al., 2000). Es scheint also von den pankreatischen

Stammzellen eine teilweise Rekapitulation des nativen Differenzierungsweges möglich zu sein, wobei im Zusammenhang mit den Spezialmedien-Tests offensichtlich keine vorhersehbare, definierte Stimulation über lösliche Faktoren stattfindet und es sich vermutlich bei der beobachteten neuronalen Differenzierung um eine intrinsische Fähigkeit der Stammzellen handelt.

Dies würde die Eignung der pankreatischen Stammzellen zur Transplantation in neuronale Gewebe unterstreichen, da sie endogen bereits starke Tendenzen aufweisen Tochterzellen mit neuronalem Schicksal hervorzubringen (Doetsch et al., 1999; Gage, 2000; Uchida et al., 2000).

Der nächste Schritt zur neuronalen Induktion sollte die Kokultur mit Hirnbiopsien in *air-lift*-Kultur sein. Hierbei ist die Möglichkeit gegeben, dass die pankreatischen Stammzellen mit dem Gewebe parakrin in Interaktion treten. Für humane glanduläre Stammzellen wurde bereits eine gute Induktionsfähigkeit in diesem Aufbau beschrieben (Petschnik et al., 2011). Im Durchlicht-Mikroskop erschien nach der zweitägigen Kokultur bereits eine allgemeine Änderung der kokultivierten Populationen in Form einer Zunahme kugeliger, vermutlich apoptotischer Zellen. Dies könnte ein Hinweis auf Selektion durch das Überleben von neuropotenten Zellpopulation sein. Die Immunocytochemie jedoch ließ keinen solchen Schluss zu, da die Mengen Neurofilament-positiver oder Nestin-positiver Zellen nicht zunahm und die der α SMA-positiven Zellen ebenso wenig abnahm. Ebenso wenig änderte sich die Menge GFAP-positiver Zellen. Somit war keine Induktion nach zwei Tagen Kokultur ersichtlich. In der Annahme, dass zwar bereits eine Selektion auf neuronale Zellen stattfinden könnte, die Effektivität jedoch im Vergleich zu den humanen Populationen erst zu einem späteren Zeitpunkt eintritt, wurde die Kokultivierungsdauer auf vier Tage ausgedehnt. Jedoch änderte dies nichts am Ergebnis. Es wurde keine neuronale Induktion in der untersuchten Zellpopulation beobachtet. Möglicherweise benötigen pankreatische Stammzellen aus der Ratte neben der Stimulation mit löslichen Faktoren zudem eine geeignete Wachstumsoberfläche, die sie in einer neuronalen Differenzierung unterstützt. Es wäre, einhergehend mit der Beobachtung der Nestin-GFAP-Kluster unter Fibrin- oder Laminin-Zusatz möglich, dass dieser Extrazelluläre Matrix-Reiz allein nicht potent genug ist die pankreatischen Stammzellen in eine letztendliche Differenzierung zu treiben, jedoch das Potential hierzu erhöhen kann, wenn gleichzeitig lösliche Faktoren zur Stimulation zu Verfügung stehen. Analog zu bisher bestehenden Erkenntnissen bezüglich humaner glandulärer Stammzellen wurde sich erneut für die parakrine Stimulation per Kokultur entschieden, da sie die beeinflussenden Faktoren eher in Gänze wiedergeben kann, als die definierten aber unbekanntens Zusammensetzungen der Medienversuche und zudem eine Interaktion der Zellen mit dem Gewebe zulässt. So wurden die Stammzellen auf Laminin oder Fibrin kokultiviert und mit

den entsprechenden unstimulierten Kontrollen verglichen. Erneut zeigte sich keine neuronale Induktion. Unter keiner stimulierenden Kondition konnte eine Zunahme der Nestin-, GFAP- oder Neurofilament-positiven oder Abnahme α SMA-positiver Zellen beobachtet werden. Somit blieb nur noch ein Unterschied im Vergleich zu den bisher publizierten Daten bezüglich der humanen Zellen. Die in dieser Arbeit angefertigten Kokulturen waren allogene, also mit Rattengewebe stimulierte Rattenzellen, wohingegen die zuvor beschriebene Induktion humaner Zellen xenogen stattfand. Es wurde abschließend ein Versuch durchgeführt, in welchem die pankreatischen Stammzellen aus Ratten mit Maus-Hirn-Biopsien kokultiviert wurden, sodass eine xenogene Situation entstand. Dabei zeigten sich eine Erhöhung der GFAP- und Neurofilament-gefärbten Zellen sowie eine Veränderung der Morphologie mit vielen langgestreckten, Neuronen-ähnlichen Zellen. Diese Daten ähneln sehr der von Petschnik et al. gezeigten xenogenen Kokultur und zeigen an, dass so die Induktion auch bei pankreatischen Stammzellen der Ratte funktionieren kann.

Da die pankreatischen Stammzellen unter den bisher angewendeten Kokulturbedingungen nur unter xenogener Kultivierung eine neuronale Induktion zeigen, könnte man zunächst davon ausgehen, dass nach syngener Transplantation ins Hirngewebe keine funktionelle Integration mangels ausreichend induzierter neuraler Differenzierung stattfindet. Die erfolgreiche xenogene Kokultur jedoch weist darauf hin, dass die Induktion zu gewissen Anteilen immunologisch bedingt ist, da es zwischen verschiedenen Individuen oder Spezies zu Abstoßungsreaktionen von Geweben kommt. Als prominente Beispiele kann man hier die graft-versus-host-disease bei Organtransplantationen anführen. Solche immunologischen Abstoßungsreaktionen werden unter anderem durch sogenannte Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigene (HLA) ausgelöst, weshalb eine genaue Typisierung transplantierbarer Organe und ihrer Empfänger klinisch nötig ist (Friedman et al., 1994). Betrachtet man nun die bisherigen Beobachtungen und die allgemeine Zielsetzung vor diesem Hintergrund, entmutigt das zunächst bezüglich einer erfolgreichen, funktionellen Integration pankreatischer Stammzellen ins Gehirn auf syngemem respektive autologem Weg. Jedoch wäre eine Transplantation xenogener Zellen nicht wünschenswert, da sie eine lebenslange Immunsuppression erfordern würde. Sie ist zudem aufgrund xenogener Infektionsrisiken nicht in Deutschland zugelassen. Bei genauerer Betrachtung der Fragestellung, vor allem im Zusammenhang mit der Gewebereaktion auf den geplanten chirurgischen Eingriff wird relativ schnell ersichtlich, dass transplantierte pankreatische Stammzellen mit der Implantation in eine immunologisch stark aktivierte Region eingebracht würden. Da das Hirngewebe auf die Verletzung mit der Aktivierung phagozytierender, immunreaktiver Mikroglia und Astrocyten antwortet und dieser Vorgang normalerweise erst nach einigen Wochen abgeklungen ist, scheint ein

immunologisches Milieu für die neurale Aktivierung der pankreatischen Stammzellen in diesem speziellen Fall möglich zu sein. Da es sich hierbei jedoch um eine systemische Reaktion handelt, kann sie in voller Komplexität nicht in vitro dargestellt werden. Es bleibt nur die Anwendung in vivo, um genauere Aussagen hierzu treffen zu können. Somit wurde mit der weiteren Entwicklung fortgefahren und die Optimierung der Implantationsbedingungen für die Zellen durchgeführt. Die Differenzierung in die Zellpopulationen des Zielgewebes stellt den optimalen Fall der Geweberegeneration durch die glandulären Stammzellen dar. Für die verbesserte Implantatintegrität durch die aufgebrauchte Zellschicht wäre die Reduktion von Abstoßungsreaktionen in Form von Gliose und Inflammation bereits ein wesentlicher Fortschritt.

Bei genauerer Betrachtung des jetzt existierenden Settings fällt auf, dass die Sonden mit der Zellbesiedelung eine relativ sensible Oberfläche besitzen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Insertion bis in tiefe Hirnregionen mit langen „Gleitstrecken“ zwischen dem Gewebe verbunden ist. Somit würden die Zellen an der Spitze der Sonde, dort wo sich die Elektrodenkontakte befinden, im Tierversuch eine maximale Distanz von 8,5 mm durch das Hirngewebe geschoben. Leicht wird ersichtlich, dass durch hierbei wirkende Scherkräfte die konfluente Zellbesiedelung der Oberfläche gefährdet ist. Es ist sehr schwierig aus theoretischen Betrachtungen heraus diese möglichen Abrasionen zu kalkulieren. Somit musste ein Testsystem entwickelt werden, welches diese Informationen generieren kann (Richter et al., 2010). Dabei wurde auf relativ einfache Mechanismen zurückgegriffen, indem mittels eines Mikromanipulators eine Zell-besiedelte Polyimid-Folie zwischen Hirndummies und Hirnhemisphären gezogen wurde. Diese Versuche ergaben tatsächlich, dass es zu großflächigen Abrasionserscheinungen kommen würde, wenn die Zellen ungeschützt durch die Hirnschichten gleiten würden. Konsequenterweise musste eine Strategie entwickelt werden, welche die Stammzellschicht schützen kann und dabei deren Integrierungsfähigkeit nicht beeinträchtigt. Für die Abrasions-geschützte Implantation von Zell-haltigen Elektroden wurden in bisherigen Arbeiten die Zellen in eine Vertiefung zwischen zwei laterale Stäbe gebracht (Purcell et al., 2009). Dieser Ansatz konnte aus zwei Gründen nicht adaptiert werden. Eine derartige Kanülentopographie würde die Flexibilität der Sonde minimieren und es wäre nicht möglich die vollständige Oberfläche Abrasions-geschützt mit Stammzellen zu biologisieren.

Eine schützende Kanüle für die Implantation der flexiblen Polyimid-Implantate zu verwenden schien ungeeignet, da durch den minimalinvasiven Anspruch der Durchmesser der verursachten Läsion unnötigerweise vergrößert würde. Kanülen mit einem Innendurchmesser von mindestens 27 Gauge besitzen eine Wandstärke von etwa 80-100µm. Somit wäre der

Durchmesser des Implantationskanals von 350µm Sondenbreite auf etwa 500µm angewachsen. Zudem sollte eine Methode etabliert werden, welche es erlaubt einen Stecker an der Elektrode bereits vor Implantation zu befestigen, sodass während einer Implantation die elektrophysiologischen Messungen zur Orientierung genutzt werden könnten. Eine Kanüle, welche die Sonde umschließt, somit die Zellen schützt, würde weder eine elektrophysiologische Messung noch ein Herausziehen über die implantierte Sonde nach außen erlauben, bei gleichzeitiger Steckerverbindung. Alternativ wurden noch weitere Möglichkeiten diskutiert. Beispielsweise eine Kanüle die nach Insertion in zwei Hälften aufspreizt und somit die zellbesiedelte Sonde frei gibt. Dies würde keine elektrophysiologische Messung zulassen und eine unnötige Vergrößerung der Läsion, durch Verdrängung von Gewebe herbeiführen. Auch eine an der Spitze geschlossene Kanüle, die an ihrer Oberfläche der Länge nach mehrere Löcher besitzt wurde entworfen. Mit ihr sollte die Sonde angesaugt werden, durch einen innenliegenden Unterdruck. Nach Auskunft der Hersteller kann jedoch in eine Kanüle mit einem Durchmesser unter 500µm kein Loch mit etwa 200µm Durchmesser eingebracht werden. Es gab noch zahlreiche weitere Vorschläge, die zumeist aufgrund ihrer schlechten Herstellungsfähigkeit in dem gewünschten Maßstab scheiterten. Somit wurde eine komplett neue Idee entworfen. Es sollte eine Schutzschicht für die Stammzellen gefunden werden, die einfach und schonend applizierbar, bioresorbierbar, ZNS-freundlich und möglichst bereits klinisch zugelassen sein sollte und dabei die Stammzell-Charakteristika nicht beeinträchtigt. Das sind ziemlich viele Anforderungen für eine mögliche Lösung. Zunächst wurde das Feld auf Hydrogele eingegrenzt, da sie bereits in einigen Anwendungen zur Applikation von Stammzellen dienen. Über das Auftragsverfahren und die ZNS-Kompatibilität grenzte sich das Feld sehr schnell auf Fibrin ein. Es konnte für dieses native Hydrogel, das durch das Zusammenführen der zwei Komponenten Fibrinogen und Thrombin polymerisiert, bereits gute Einsatzfähigkeit im ZNS gezeigt werden. Dabei reduzierte es die Aktivierung von Glia-Zellen und beförderte das Einsprossen von Neuronen (Johnson et al., 2009a; Yasuda et al., 2010). Es können noch weitere Substanzen in dieses Gel eingebracht werden, falls erforderlich, da es erst durch das Mischen von Thrombin- und Fibrinogenhaltigem Medium auspolymerisiert (Johnson et al., 2009b). Nun wurde eine mögliche Fibrin-Beschichtung für die pankreatischen Stammzellen getestet. Dabei wurde wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen die Vitalität, Proliferation und Plastizität der Zellen untersucht und mit den bisherigen Beobachtungen verglichen. Es zeigte sich, dass die Zellen vital unter dem Hydrogel bleiben und einen normalen Stoffwechsel durchführen. Sie behalten überdies für die betrachteten Marker die Expression bei und es kann, anknüpfend an die vorangegangene Diskussion zum Differenzierungspotential, von einer gleichbleibenden

Plastizität ausgegangen werden. Dies ist gültig für normale Zellkulturplastik und Polyimid als Wachstumsoberfläche. In der Simulation der Scherkräfte bei Implantation blieb die einlagige Zellschicht unter der Fibrin-Schutzschicht erhalten und scherte nicht mehr ab, wie es die Kontrollen zeigten. Mit diesem Ansatz wurde also fortgefahren und eine Implantation angestrebt.

In vitro waren nun alle vorbereitenden Arbeiten abgeschlossen. Es wurde sichergestellt, dass eine geeignete Stammzellpopulation auf dem Implantatmaterial in die Zielregion des Hirns gebracht werden kann. Nimmt man eine solche Implantation in vivo vor, lässt sich jedoch schlecht prognostizieren, wie sich die Stammzellen im Gewebe verhalten. Ob eine Infiltration stattfindet oder eine Akkumulation oder gar Tumorbildung kann durch Zellkulturen allein nicht dargestellt werden. Konsequenterweise wurde ein Protokoll etabliert um diese Möglichkeiten in situ schon vor dem eigentlichen Tierversuch darzustellen. Es wurden Schnitte von Ratten und Nacktmäusen kultiviert und Stammzellen in diese eingebracht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Invasion der Zellen in das Gewebe stattfindet und die GFP-transgenen Zellen an Nestin-positiven Fasern *homen*, wie es auch native Stammzellen im Hirn tun. Somit war bereits vor dem eigentlichen Tierversuch dargestellt, dass die pankreatischen Stammzellen fähig sind, das Zielgewebe zu besiedeln. Diese Beobachtungen wurden auch gemacht, als im Hirngewebe vermeintlich schlechte Bedingungen durch starke Degeneration der Zellen vorlagen. Es stimmte somit optimistisch, dass die pankreatischen Stammzellen auch in der verhältnismäßig nekrotischen, inflammierten Läsionsumgebung überleben können.

5.2. In vivo-Untersuchungen

Die verwendeten flexiblen Sonden aus Polyimid ließen sich im Vergleich zu rigiden Sonden nicht selbständig inserieren. Es wurde zu ihrer Platzierung ein Mechanismus verwendet, welcher durch Verwendung eines dünnen Wolfram-Drahtes dem Implantationsmechanismus einer rigiden Sonde gleicht und folglich ein ähnliches initiales Trauma hervorrief. In allen untersuchten Hirnbereichen, jedoch besonders ausgeprägt in den kortikalen Präparaten, wurde ebenfalls ein Bluteintritt anhand von vorhandenen Erythrocyten festgestellt. Somit kann für die initiale Phase von ähnlichen Prozessen zur Bereinigung und Abschottung des Wundareals ausgegangen werden, wie sie bereits für rigide Sonden beschrieben wurden (Polikov et al., 2005)(Vgl. Abschnitt 2.6.).

Es muss kurz erwähnt werden, dass die Zelldichte und -art, sowie extracelluläre Matrix in den ersten 50µm vor dem Implantat zu 90% die Impedanz bestimmen. Zudem sollten für eine effektive Signalübertragung in den proximalsten 100µm Gewebe vor dem Implantat Somas von Neuronen liegen (Leach et al., 2010; McConnell et al., 2009a; Polikov et al., 2005).

Da die bisherigen Erkenntnisse zur Gliose fast ausschließlich auf der Erforschung kortikaler Implantate beruhen, soll zunächst eine vergleichende Betrachtung der hier vorliegenden Ergebnisse in dieser Hirnregion angestellt werden und dann die Ergebnisse tieferliegender Bereiche hierzu in Kontext gesetzt werden. Dies ist nötig, da nur sehr wenig oder keine Daten zur Gewebereaktion in tieferen Hirnregionen als dem Cortex existieren. Somit steht keine geeignete Referenz zur Verfügung, mit der die hier erworbenen Erkenntnisse abgeglichen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Referenz geschaffen, welche die Gewebereaktion in drei verschiedenen Hirnregionen vergleicht und deren zeitliche Veränderung über einen Langzeit-in-vivo-Test wiedergeben kann.

5.2.1. Vergleich der kortikalen Gliose:

Zunächst wurde für die unbeschichteten flexiblen Polyimid-Implantate eine wesentlich schwächere isomorphe Gliose nach einer Woche festgestellt, als es bisher für rigide Sonden beschrieben ist (Vgl. Abbildung 13 und Abbildung 88). Im weiteren Verlauf erreichte die anisomorphe Gliose innerhalb von zwölf Wochen nach der Operation ein Stadium, welches mit dem rigider Sonden nach sechs Wochen vergleichbar ist (Vgl. Abbildung 65). Dabei sei angemerkt, dass überwiegend ein diskontinuierliches und dünneres GFAP-positives Zellgeflecht vor dem Implantat sichtbar war, als es für rigide Sonden gezeigt wurde. Nach 24 Wochen hatte jedoch die Anreicherung von Astrocyten vor dem Implantat auch bei flexiblen Sonden eine Dichte erreicht, welche der nach 6 Wochen bei rigiden Sonden ähnelt, mit einem hohen Vernetzungsgrad der zellulären Ausläufer und einer keilförmigen Anordnung über einen Radius von circa 100µm. Dabei ist auffällig, dass sich in darüber hinausgehenden Bereichen nur sehr wenige aktivierte Astrocyten befinden, wohingegen die rigiden Sonden hier noch eine große Menge aktivierter Zellen aufwiesen.

Betrachtet man die Inflammation anhand der ED-1-Färbung für Mikrogliazellen, so kann diese für unbehandelte flexible Sonden als minimal, jedoch persistent bezeichnet werden. Nach Reduktion der Phagocyten aus den Einblutungen durch die Implantation, kann im weiteren Verlauf ab der sechsten Woche nur eine Frontlinie immunologisch aktiver Zellen am und vor dem Implantat beobachtet werden. Diese ist weniger stark ausgeprägt, als es bisher für rigide Sonden gezeigt wurde und es ist auch keine periphere Aktivierung oder Infiltration aktivierter Zellen zu erkennen (Vgl. Abbildung 68 und Abbildung 89) (Biran et al., 2005; Szarowski et al., 2003). Jedoch kann aufgrund ihrer anhaltenden Existenz, wenn auch in einem reduzierten Maß, von einer *frustrated phagocytosis* am Implantat ausgegangen werden (Polikov et al., 2005). Der positive Nachweis von Nestin-exprimierenden Zellen nach 12 und 24 Wochen in der Implantat-Peripherie, lässt auch in diesen späten Stadien noch eine

Remodellierung des angrenzenden Gewebes vermuten, weist jedoch gleichzeitig durch deren Abwesenheit zu den ersten beiden Zeitpunkten auf eine sehr langsame Rekrutierung dieser Zellen aus der Subventrikularzone hin, vermutlich durch ein entsprechend schwaches parakrines Signal durch eine weniger starke immunologische Aktivität im Läsionsbereich (Frisen et al., 1995). Die Erhaltung und Regeneration von Neuronen näher als 100µm am Implantat kann für die unbehandelten flexiblen Implantate nicht eindeutig festgestellt werden, da die Frontlinie keine kontinuierliche Stärke aufweist und nach 24 Wochen zwar keine echte *kill zone* aber noch immer ein leichter Gradient an Filamenten vor dem Implantat vorliegt. Die Konnektivität des elektrophysiologischen Signals in den kortikalen Arealen ließe sich wohl am besten in zukünftigen Langzeitimplantationen mit Ableitungen und evtl. Stimulationen feststellen. Die geringere und langsamere Ausprägung der anisomorphen Gliose kann mehrere Ursachen haben. Einerseits stellen flexible Sonden aufgrund ihrer Beweglichkeit keinen so starren Fremdkörper dar, wie es für rigide Sonden der Fall ist und somit wird die persistente Irritation des Gewebes am Fremdkörper reduziert. Dies korreliert mit Erkenntnissen über den Einsatz Schädel-ungebundener Sonden im Vergleich zu Schädel-fixierten (Biran et al., 2007; Leach et al., 2010; McConnell et al., 2009a). Aufgrund der in diesem Versuch verwendeten indirekten Schädel-Fixierung gepaart mit der Flexibilität der Sonde, zeigte sich bereits durch diesen rein physikalischen Lösungsansatz eine Verbesserung der Gewebe-Implantat-Interaktion.

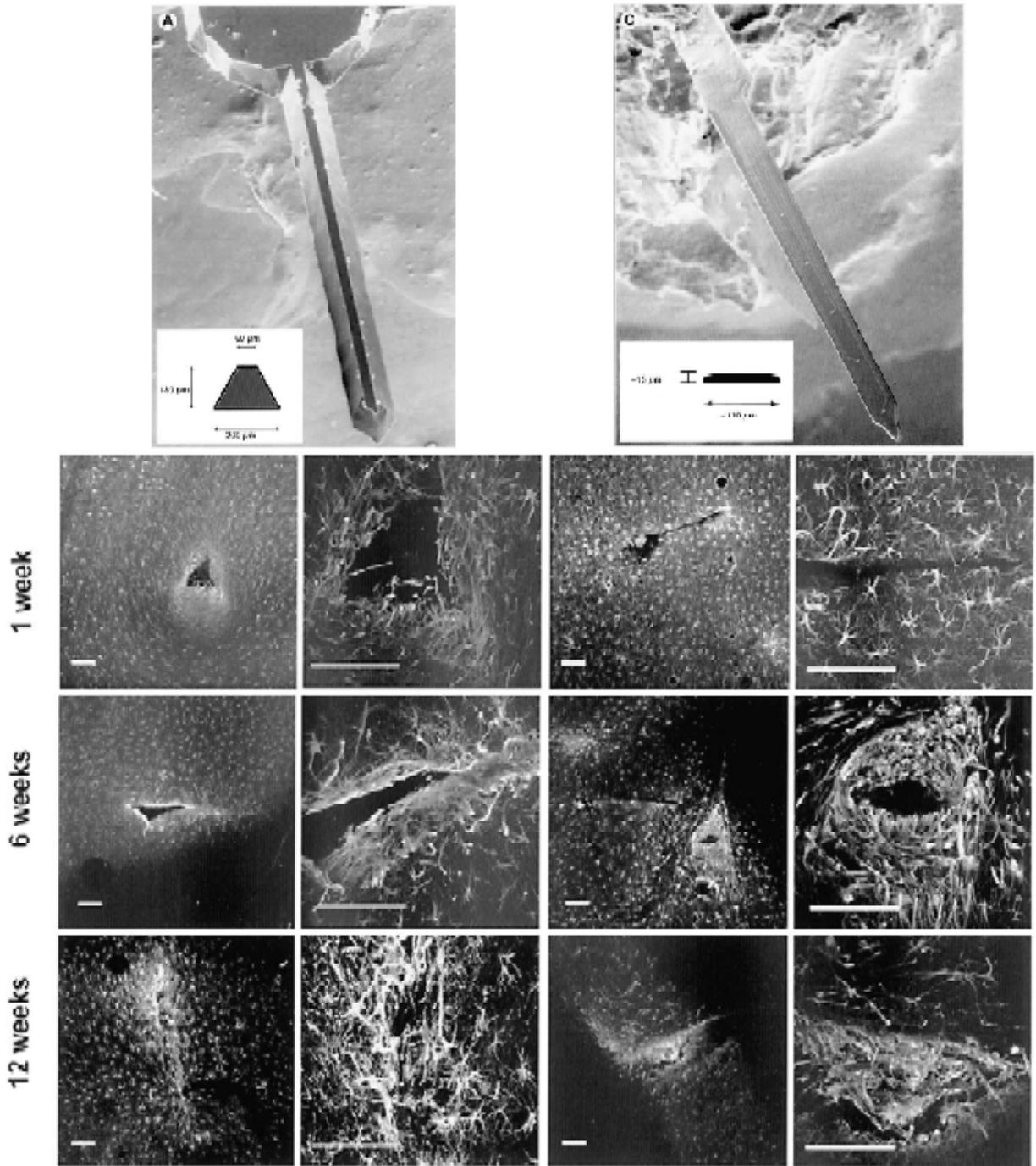


Abbildung 88: Immunhistochemische Ergebnisse zur Gewebereaktion bei rigiden Implantaten aus Silizium. Die beiden getesteten Implantate wiesen verschiedene Querschnitte auf (oben, links und rechts). Unter jedem Implantat sind die Färbungen für GFAP nach 1 Woche, 6 und 12 Wochen in einer 100x und 400x Vergrößerung dargestellt. (Maßstab: 100µm) (Szarowski et al., 2003).

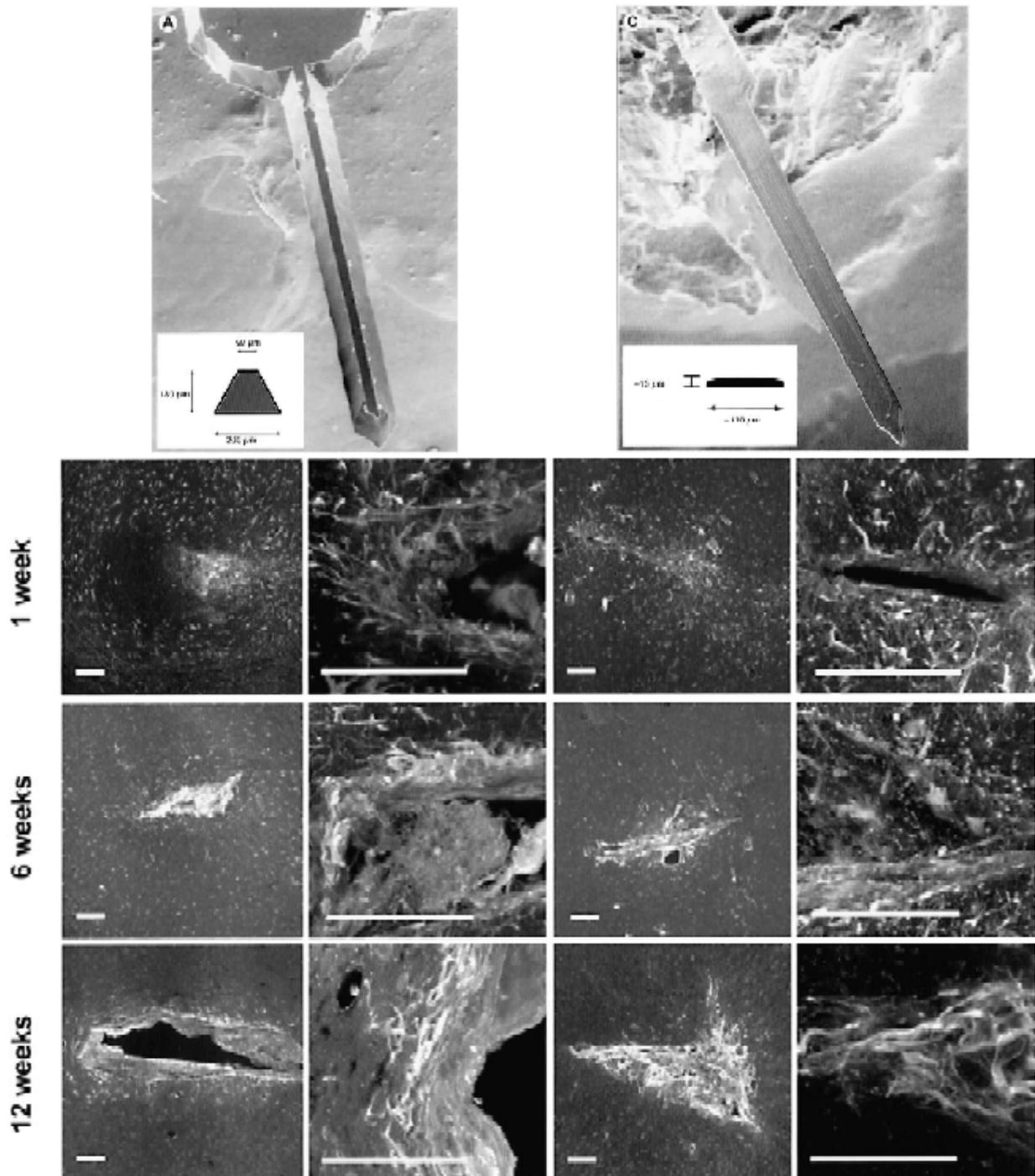


Abbildung 89: Immunhistochemische Ergebnisse zur Gewebereaktion bei rigiden Implantaten aus Silizium. Die beiden getesteten Implantate wiesen verschiedene Querschnitte auf (oben, links und rechts). Unter jedem Implantat sind die Färbungen für ED-1 nach 1 Woche, 6 und 12 Wochen in einer 100x und 400x Vergrößerung dargestellt. (Maßstab: 100µm) (Szarowski et al., 2003).

Wenn man in die Betrachtungen die Fibrin-besiedelten Sonden einbezieht, so lässt sich für diese eine deutlich schwächere Gliose im Cortex feststellen als für unbeschichtete oder gar rigide Implantate. Es konnte zu den betrachteten Zeitpunkten nur eine reduzierte anisomorphe Gliose festgestellt werden, welche die vollständige Gewebereaktion von etwa 100µm Stärke bereits nach 12 Wochen wiedergibt. Bis zur zwölften Woche etabliert sich hierbei, unter Einfluß einiger reaktiven Mikrogliazellen, eine Frontlinie vermutlich durch die Invasion und

Proliferation meningealer Fibroblasten (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005). Nach 24 Wochen ist jedoch der Anteil von Mikrogliazellen an dieser minimal, was wiederum keine *frustrated phagocytosis* anzeigt. Es liegt jedoch ein dichtes Schild aus Zellen zwischen Hirngewebe und Implantat, in welchem nach 12 und 24 Wochen nur wenige, einzelne Nestin-positive Zellen detektiert wurden. Es war mit den durchgeführten Färbungen nicht möglich die Identität dieser Zellen zu bestimmen. Naheliegend wäre die Akkumulation von meningealen Fibroblasten, welche aus den verletzten Hirnhäuten in die Läsion eingewandert sind. Fibrin scheint also für invasive Zellen ein Stimulus zu sein. Es wurde bereits für in vitro-Konditionen und das Rückenmark beschrieben, dass Fibrin die Astrocyten-Akkumulation reduziert, weshalb es als geeignete Schutzschicht ausgewählt wurde (Johnson et al., 2009a; Ju et al., 2007). Anscheinend hatte auch in dieser Studie der Hydrogelbestandteil Thrombin durch Verzögerung des Neuronensterbens einen Einfluss auf die relativ langanhaltende geringe Dichte von Neurofilamenten bis zwölf Wochen nach Implantation (McConnell et al., 2009b; Suo et al., 2003). Andererseits fördert Fibrin ebenfalls die Axon-Einsprossung, was durch die Reduktion der *kill zone* nach 24 Wochen, bis an die Frontline heran, deutlich wurde (Johnson et al., 2009a; Johnson et al., 2009b; Ju et al., 2007; Yasuda et al., 2010).

Wurde die Sonde mit Stammzellen und Fibrin beschichtet, so wurde die anisomorphe Gliose in maximaler Ausprägung nach 6 Wochen beobachtet, wobei sich bereits nach 12 Wochen eine noch schwächere Gliose vor dem Implantat beobachten ließ, als für Fibrin-beschichtete Sonden. Da jedoch in dieser Gruppe bereits nach einer Woche eine ausgeprägte isomorphe Gliose vorlag, bei etwa gleicher Menge ED-1-positiver Zellen im Vergleich zu Fibrin-beschichteten Implantaten, scheinen die aufgewachsenen Stammzellen die Remodellierung des Gewebes unter ähnlichen Aktivierungsmechanismen wie Mikrogliazellen zu beschleunigen. In zusätzlichen Versuchen wurde festgestellt, dass pankreatische Stammzellen fähig sind IL-6 zu sezernieren und über parakrine Interaktion während der Kokultur mit Hirngewebe eine IL-1-Sekretion stattfand (Daten nicht gezeigt). Beide Cytokine aktivieren die Astrocyten (Leach et al., 2010). Jedoch führt dies nicht zu einer verstärkten Gliose, sondern zum beschleunigten Ablauf der akuten Antwort, denn bereits nach zwölf Wochen sind fast keine GFAP-positiven Zellen mehr vor dem Implantat festgestellt worden und der Zustand blieb auch nach 24 Wochen erhalten. Die frühe, dem Implantat nahe Expression von Nestin kann anhand der Kolokalisation mit GFP den transplantierten Stammzellen zugeschrieben werden. Jedoch zeigt die Abwesenheit von Nestin-synthetisierenden Zellen zu späteren Zeitpunkten, dass es dann kaum Remodellierungsprozesse gibt. Somit kann die These unterstützt werden, dass die Applikation der pankreatischen Stammzellen eine instruktive Wirkung auf die gewebständigen regenerationsaktiven Zellen hat, ähnlich wie es

Stevenson et al. bereits für *pancreatic-derived pathfinder cells* bei der Regeneration von β -Zellen zeigte (Stevenson et al., 2011). Er transplantierte *pancreatic-derived pathfinder cells* in Mäuse deren β -Zellen chemisch zerstört wurden und welche folglich Diabetes entwickelten. Nur wenn die *pancreatic-derived pathfinder cells* transplantiert wurden, konnte eine Regeneration stattfinden und der Diabetes-Phänotyp revertierte. Dabei waren fast keine der transplantierten Zellen im regenerierten Gewebe zu finden und es wurde geschlussfolgert, dass sie zwar nicht Teil des Zielgewebes werden, jedoch nötig sind, dieses zu instruieren sich zu regenerieren. Dass dieser instruktive Mechanismus sehr früh wirksam ist wird nicht nur durch Nestin-Synthese und die minimal gliale Aktivierung und Einkapselung nach 12 Wochen deutlich. In allen Proben ist die Erhaltung der Neurofilamente besser als in den beiden anderen Gruppen, was möglicherweise einer schnelleren effektiven Abschottung des Wundareals vom Gewebe (Vgl. Probe zum Zeitpunkt 6 Wochen) und damit einer besseren Verhinderung kaskadierender neurotoxischer Wellen zuzuschreiben ist (Polikov et al., 2005). Jedoch war nach 24 Wochen die Dichte der Neurofilamente vor dem Implantat noch etwas geringer als in weiter entfernten Bereichen, wobei jedoch keine störende Zellakkumulation der Frontlinie zwischen Implantat und Gewebe lag, was in diesem Zusammenhang wohl die beste Konnektivität widerspiegelt. Die Akkumulation von Zellen, ob Fibroblasten, Astrocyten oder Mikroglia vor dem Implantat führt zur erhöhten Impedanz durch Minimierung vom interstitiellen Raum für den Ladungstransport. Somit sei dies als besseres Resultat für den Cortex angesehen (Leach et al., 2010; McConnell et al., 2009a; Polikov et al., 2005).

Somit kann theoretisch die nahezu fehlende gliale Narbe und Frontlinie bei gleichzeitig reduzierter Neuronendichte in den proximalen 100 μ m als besseres Ergebnis betrachtet werden als eine enge verwobene gliale Narbe mit anschließender konstanter Neuronendichte. Denn, wenn die elektrophysiologische Signalübertragung die Impedanz nicht überwinden kann, dann wird in allen anliegenden Neuronen kein Signal nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ausgelöst. Oder die Stimulationsparameter müssen so gewählt werden, dass die sensiblen Neuronen möglicherweise Schaden nehmen (Polikov et al., 2005). Diese Erkenntnisse sollten durch zukünftige funktionelle Messungen untermauert werden.

5.2.2. Beobachtungen im Thalamus

Betrachtet man die Ergebnisse im Thalamus und vergleicht beispielsweise den Zeitverlauf der Aktivierung von Astrocyten in allen drei Gruppen im Cortex, so kann prinzipiell die gleiche Tendenz der Gewebereaktion über 24 Wochen hinweg festgestellt werden. Die Gliose hat bei unbehandelten Sonden später ihr Maximum und schließt nach 24 Wochen durch einen dünnen Saum positiver Zellen die Läsion vom Gewebe ab. Bei Fibrin-beschichteten und Stammzell-

besiedelten Sonden war bereits nach einer Woche eine ausgeprägte Aktivierung feststellbar, welche bereits nach 6 Wochen die Form einer anisomorphen Gliose annahm. Diese war, im Gegensatz zum Cortex, auch nach 12 Wochen noch nicht vollständig reduziert, wobei jedoch der Großteil aktivierter Zellen weniger als 100µm vom Implantat entfernt war. Bei den Fibrin-beschichteten Proben änderte sich dieser Zustand in den letzten 12 Wochen des Versuches nicht mehr, wohingegen die Stammzell-besiedelten Sonden eine Reduktion auf eine Abschottung des Gewebes durch einen dünnen Belt anzeigten.

Die Reaktion in diesem Gewebeabschnitt, insbesondere für die Fibrin-beschichteten und Stammzell-besiedelten Proben, erscheint verstärkt bzw. verlängert, wie der Vergleich zu den kortikalen Proben, beispielsweise zum Zeitpunkt 12 Wochen, zeigt. Da es in bisherigen Studien zur Gewebereaktion im Thalamus nur wenige Daten gibt, ist ein Vergleich bzw. eine Referenzierung auf existierende Kenntnisse schwer möglich. Einzig Asaad & Eskandar bilden in einem kurzen Kommentar zum Einfluss von Adenosin im DBS-Wirkmechanismus einen coronaren Schnitt mit rigiden Elektroden, welche bis in den Thalamus reichen ab (Abbildung 90) (Asaad and Eskandar, 2008). Es ist unbekannt in welcher Hirnregion (vermutlich Bregma -3,00 bis -3,36 (Paxinos and Watson, 2007)) oder nach welcher Implantationsdauer dieses Präparat angefertigt wurde. Nichtsdestotrotz vermag es die Relation der Aktivierung von Astrocyten im Cortex und Thalamus wiederzugeben.

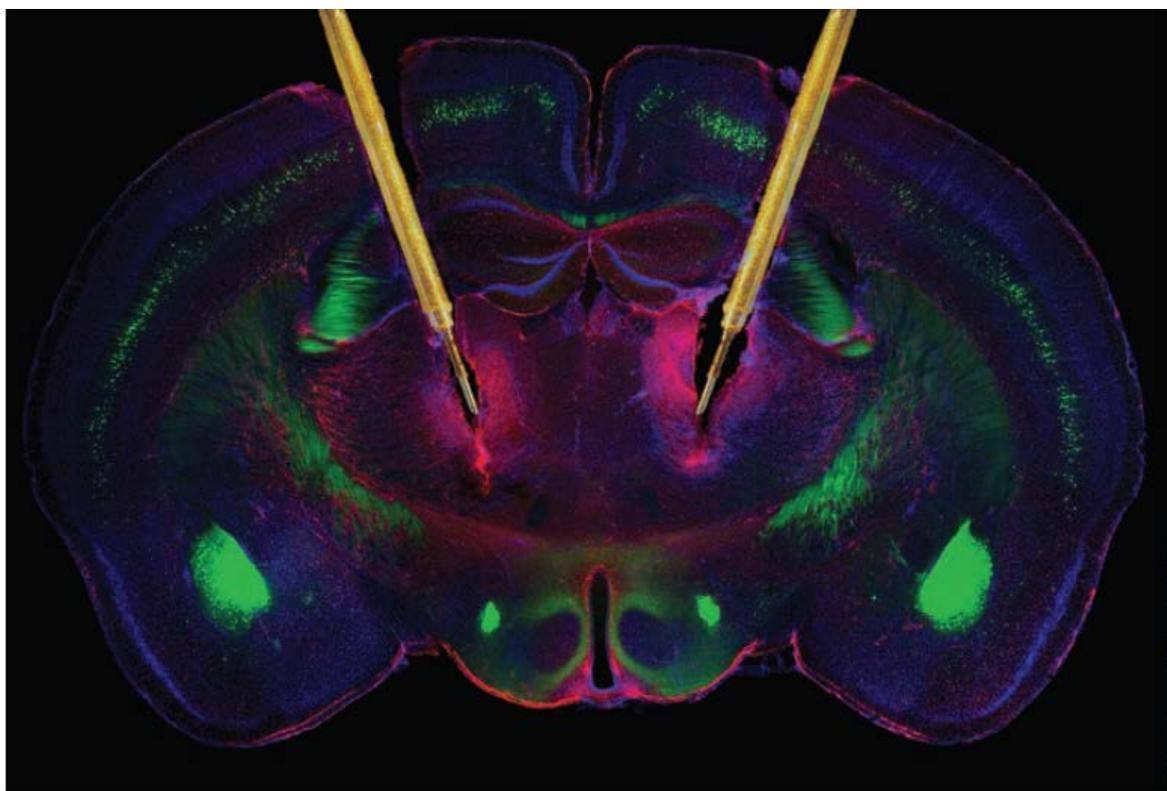


Abbildung 90: Coronerer Schnitt durch das Gehirn einer transgenen Maus mit beidseitig implantierten rigiden Elektroden im Thalamus. Grün: YFP unter Thy-1-Promotor in Axonen; Rot: Immunhistochemische Färbung gegen GFAP in Astrocyten; Blau: Zellkerne; Gelb: Elektroden. (Quelle: (Asaad and Eskandar, 2008))

Die deutlich intensivere GFAP-Färbung in diesem Präparat deutet an, dass im Thalamus scheinbar eine intrinsisch stärkere gliale Gewebereaktion vorliegt als im Cortex. Auch wenn zu berücksichtigen ist, dass bei rigiden Elektroden die Gewebereizung an der Spitze der Elektrode andersartig ist als an der Basis, muss dennoch attestiert werden, dass sich die Intensität der glialen Antwort in diesem Präparat scharf auf diese Hirnregion eingrenzen lässt und somit die anatomischen Kontexte einen Einfluss zu haben scheinen.

Wahrscheinlich ist dieser Zusammenhang auch für die flexiblen Sonden anzuwenden, da, wenn auch nicht in vergleichbarer Intensität, ein tendenziell intensiverer Ablauf der glialen Aktivierung als im Cortex beobachtet wurde. Der Verlauf der ED-1-Färbung spiegelt dies auch im Inflammationsstatus wider. Die unbeschichteten Implantate wiesen hierbei erneut die langanhaltendste Inflammation auf, wohingegen Fibrin zu einem schnelleren Abklingen der Inflammation führte. Die Stammzell-besiedelten Implantate zeigten das beste Ergebnis in diesem Aspekt, da diese Proben bereits nach zwölf Wochen keine erhöhte Menge von Mikrogliazellen mehr enthielten. Damit wird erneut eine positive Wirkung der Stammzellen auf die lokale Immunreaktion deutlich. Interessanterweise konnte auch nach zwölf und 24 Wochen ihre Existenz im Implantationsbereich gepaart mit der Nestin-Färbung festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Thalamus für Stammzellen eine gute Umgebung darstellt, was einen schnelleren Verlauf der Fremdkörperreaktion durch positive Effekte der Zellen auf das Gewebe ermöglicht. Dafür spricht zudem die Neurofilamentfärbung, welche für die Stammzell-besiedelten Implantate bereits nach zwölf Wochen eine Reduktion der neuronalen Exklusionszone vor dem Implantat von höchstens 50µm anzeigte. Dieser Zustand war mit Fibrin erst nach 24 Wochen und für unbeschichtete Implantate in vergleichbarer Weise nie erreicht.

5.2.3. Gewebereaktion im Hypothalamus

Für den Hypothalamus wird die Bewertung der Gewebereaktion in Ermangelung histologisch vergleichbarer Referenzen etwas schwieriger. Die unbehandelte Sonde wies nach 24 Monaten noch keine vollständige Reduktion der aktivierten Astrocyten vor dem Implantat auf, während die Stammzell-besiedelten Implantate bereits nach zwölf Wochen nur einen Belt von ca. 20µm Stärke anzeigten. Diese Entwicklung scheint direkt mit der Stammzell-Besiedelung zusammenzuhängen, da zwar für die Gruppe mit Fibrin-Beschichtung eine ähnliche Beobachtung nach zwölf Wochen möglich war, jedoch nach 24 Wochen wieder einige aktivierte Astrocyten vor dem Implantat lagen, während die Stammzell-besiedelten Implantate ihre dünne Isolation fast unverändert aufrecht erhielten. Bezüglich der Inflammation ergibt sich für die Gruppen ein ähnliches Bild, wie in den beiden zuvor betrachteten Hirnregionen,

wobei die Inflammation generell etwas schwächer war als im Thalamus. Dennoch ließ sich die schnellste Reduktion in den Stammzell-besiedelten Implantaten feststellen, wohingegen die unbeschichteten Sonden eine relativ langsame Reduktion der Inflammation im Hirngewebe anzeigten. Diese Aussagen korrelieren mit den Beobachtungen zum Aktivierungsstatus der Astrocyten. Anscheinend fanden in der frühesten Phase unter Fibrin-Einsatz sehr viele Remodellierungsprozesse statt, da nach einer Woche in beiden betroffenen Gruppen sehr viele Nestin-positive Zellen beobachtet wurden, welche in der sechsten Woche vollkommen abundant waren. Dabei sind vermutlich viele, aus der SVZ eingewanderte neurale Vorläuferzellen beteiligt, da auch ohne Stammzellen auf dem Implantat eine vergleichbare Menge Nestin-positiver Zellen am Implantat akkumuliert auftraten. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Exklusionszone für die Neuronen in beiden Gruppen sichtbar. Während des weiteren Versuchsverlaufes reduzierte sich die Menge der Neurofilament-positiven Ausläufer vor dem Implantat nur in der Gruppe mit Fibrin-beschichteten Implantate, jedoch ohne eine vollständige Exklusion anzuzeigen. Eine ähnliche Beobachtung mit etwas stärkerer Ausprägung war für die unbehandelten Implantate möglich. Im Gegensatz hierzu wiesen die Stammzell-besiedelten Implantate keine graduierte Reduktion der Neurofilamente im Implantat-anliegenden Gewebe auf – es wurde keine *kill zone* ausgebildet. Vermutlich haben hierfür die eingebrachten Stammzellen bereits zu Beginn des Heilungsprozesses einen signifikanten Beitrag geleistet, da die Inflammation zwar kürzer abläuft, jedoch ein Schaden gleichen Ausmaßes regeneriert werden muss, weshalb vermutlich stärkere proinflammatorische Signale benötigt werden, wie die Attraktion von Stammzellen aus der SVZ zeigte. Offensichtlich kann nur unter dem Einfluss positiver, neuroprotektiver Signale, welche durch Interaktion mit den pankreatischen Stammzellen lokal freigesetzt werden, der Verlust von Neuronen im Gliosebereich durch neurotoxische Effekte der proinflammatorischen Signalmoleküle verhindert werden. Dieses vielversprechende Ergebnis müsste als nächstes in vivo durch funktionelle Messungen überprüft werden.

Im Gegensatz zu den bisher publizierten Daten wurde ebenfalls ersichtlich, dass im Fall von flexiblen Sonden nach sechs Wochen die Gliose noch nicht beendet ist (Polikov et al., 2005). Es sind noch über einen relativ langen Zeitraum Änderungen des Gewebes, einschließlich Remodellierung von Neurofilamenten vor dem Implantat möglich.

5.2.4. Zusammenfassende Betrachtungen

Die Implantation flexibler Tiefenhirn-stimulierender Sonden führt im Vergleich zu rigiden Sonden zu einer minimierten Gewebereaktion. Ursächlich hierfür ist die bessere Fähigkeit dieser Implantate, sich mit dem Gewebe zu bewegen und somit eine minimierte physikalische

Reizung hervorzurufen.

Weitere Fortschritte in der elektrophysiologischen Konnektivität lassen sich über die Reduktion des Verlustes von Neuronen in Implantat-Nähe erzielen, indem man die Oberfläche der Implantate biologisch aktiviert. Dies kann durch eine passive Biologisierung erreicht werden, indem den Neuronen eine attraktive Matrix geboten wird, in welche regenerierende Ausläufer einsprossen können. In dieser Arbeit wurde dafür Fibrin verwendet. Es zeigte sich durch die Untersuchung, dass diese Matrix die initialen Heilungsprozesse beschleunigt, wahrscheinlich unter Verstärkung der proinflammatorischen Signalketten. Bisherige Studien verwendeten Fibrin im ZNS meist unter Einsatz von Immunsuppressiva oder -modulatoren, welche eine solche Beobachtung nicht oder nur beschränkt zulassen (Johnson et al., 2009b; Ju et al., 2007). Dabei wurde dennoch eine reduzierte Astroglieose und verbesserte Axon-Invasion festgestellt. Ähnliche Beobachtungen existierten bereits für alternative extracelluläre Matrixmoleküle, wie beispielsweise Laminin (He et al., 2006). Da jedoch für die zweite Form der biologischen Aktivierung der Implantatoberfläche ein Hydrogel als Schutzschicht nötig war, wurde Fibrin bevorzugt. Eine mögliche Beimischung weiterer neuroattraktiver extracellulärer Matrixkomponenten, wie Laminin oder Fibronectin, könnte den beobachteten Heilungsablauf noch weiter verbessern (He et al., 2006; Ju et al., 2007).

Die zweite Form der biologischen Aktivierung von Implantat-Oberflächen, welche in dieser Arbeit getestet wurde, war die Besiedlung mit glandulären Stammzellen aus pankreatischen Acini. Diese Besiedlung der Implantate bietet den einzigartigen Vorteil, dass die lebende Beschichtung in parakrine Interaktion mit dem Gewebe treten und somit aktiv auf die vorliegenden Regenerationsprozesse einwirken kann. Vielversprechende ähnliche Ansätze wurden bereits von Purcell et al. sowie für Knorpelregeneration von Luo et al. während der Durchführung dieser Arbeit publiziert. Auch in der hier vorgestellten Studie wurden mit dieser Form der Oberflächenbeschichtung die besten Ergebnisse erzielt. Dabei war eine intensive Charakterisierung dieser Zellen auf den Implantatmaterialien, die Isolation von syngenem GFP-transgenen Zellen und deren Charakterisierung, sowie die Analyse von instruktiven Effekten des Zielgewebes auf die Zellen vorausgegangen. Im anschließenden Tierversuch wurde zu authentischeren Darstellung der glialen Narbenbildung keine Immunsuppression verwendet, was durch die syngene Isolation der GFP-transgenen Zellen möglich war.

Die Untersuchung der vollständigen Gewebereaktion auf die flexiblen Implantate umfasste mehrere Aspekte, welche in der Literatur auch für rigide Sonden bisher nicht oder nur unzureichend beschrieben waren. Es handelt sich bei dem durchgeführten Tierversuch zunächst um einen Langzeit-Versuch von 24 Wochen Dauer. Bei einer angenommenen Lebensdauer des Modelltieres Ratte von zwei bis drei Jahren, wird hierbei eine angemessene Zeit die

Wirkung des Implantates und dessen Integrationsverhalten ins Gewebe untersucht. Die bisher längsten Studien, in welcher nicht nur Einzeltiere über eine längere Zeit implantiert waren, hatten eine Versuchsdauer von zwölf bzw. 16 Wochen (Leach et al., 2010; Szarowski et al., 2003; Turner et al., 1999). Wie sich herausstellte, wären zwölf Wochen Versuchsdauer nicht ausreichend, um sehr langsame Heilungsprozesse, wie etwa im Fall unbehandelter flexibler Sonden, wiederzugeben.

Als weiteren Aspekt, welcher den Kenntnisstand zur Integration Tiefenhirn-stimulierender Sonden erweitern soll, wurden alle vier wesentlichen Zelltypen des Gehirns in die Analyse einbezogen. Es fand nicht nur die Untersuchung der astroglialen Narbenbildung per GFAP-Färbung statt und die korrespondierende Untersuchung der Integrität des anliegenden neuronalen Gewebes sowie die Feststellung des Immunstatus per Nachweis von Mikroglia im Implantationsbereich (Biran et al., 2005, 2007; Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Szarowski et al., 2003; Turner et al., 1999). In dieser Untersuchung wurden erstmals auch Oligodendrocyten per O4-Färbung eingeschlossen, wobei sich jedoch keine Korrelation dieses Zelltyps zum Regenerationsprozess herstellen ließ. Ergänzend zu diesen Nachweisen wurde ebenfalls die Dichte der extracellulären Matrix bzw. die Ausprägung einer neurorepellenden Matrix per CSPG-Färbung (NG2) adressiert (Leach et al., 2010). Auch hierfür ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang herstellen, da der gesamte Gliose-Prozess, im Vergleich zu rigiden Implantaten, deutlich schwächer ablief und sehr wahrscheinlich deshalb wenig neurorepellente Matrix sezerniert wurde (Leach et al., 2010; Polikov et al., 2005; Silver and Miller, 2004).

Während der Auswertung des Tierversuches wurde ein schnelleres Abklingen der Astrocyten-Aktivierung und Inflammation beobachtet, wenn Stammzellen eingesetzt wurden. Dies gab Anlass im Rahmen weiterer experimenteller Analysen die parakrine Interaktion der pankreatischen Stammzellen mit dem Hirngewebe genauer zu untersuchen, um evtl. Zusammenhänge darzustellen. Mittels eines Wachstumsfaktor-Arrays wurden Medienproben aus Kokulturen von pankreatischen Stammzellen und Rattenhirn-Biopsien sowie die entsprechenden Kontrollen analysiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigten, dass die pankreatischen Stammzellen proinflammatorische Cytokine, welche u.a. Astrocyten aktivieren (IL-6), bereits ohne Interaktion mit Gewebe sezernieren. Dies erhalten sie in parakriner Interaktion mit Biopsien aufrecht und es wird unter diesen Bedingungen noch zusätzlich die Sekretion von IL-1 α ins Medium abgegeben. Beide Cytokine sind Bestandteil der Gewebereaktion im Gehirn nach Implantation rigider Sonden (Leach et al., 2010). Die Förderung der Gewebereaktion seitens der transplantierten Zellen scheint auf den ersten Blick kontraproduktiv zu sein. Die Ergebnisse jedoch bestätigen, dass die frühe Verstärkung der

immunogenen Aktivierung im Gewebe vorteilhaft für den Heilungsablauf ist. Ähnliche Erkenntnisse existieren bereits für die Wundheilung der Haut nach Einsatz glandulärer Stammzellen (Egana et al., 2009; Salem et al., 2009). Eine mögliche Hypothese zu dessen Erklärung wäre, dass die stärkere Aktivierung von residenten Zellen zu einer schnelleren Isolation der Läsion vom Gewebe führt und so langanhaltende toxische Kaskaden verhindert werden, welche zur redundanten Zerstörung angrenzenden Gewebes führen (s. 2.6.). Somit kann schneller eine Wundbereinigung stattfinden, da die infiltrierten Mikrogliazellen nicht permanent sterbenden Zellen und deren Debris ausgesetzt sind. Der Übergang von akuter zu chronischer Gliose wäre damit geschwächt oder gar verhindert (Leach et al., 2010). Hinsichtlich der schnelleren Reduktion der Mikroglia im Läsionsbereich existieren bereits erste vielversprechende Erkenntnisse, dass hierdurch ebenfalls das Voranschreiten des Morbus Parkinson reduziert werden kann (L'Episcopo et al., 2011). Es sei zudem angemerkt, dass der Cytokin-Array nicht das komplette Spektrum aller möglichen interagierenden Substanzen abdeckt und wahrscheinlich noch einige weitere positive Faktoren von den Stammzellen sezerniert werden.

Für die Ausbildung des dünnen GFAP-positiven Belts direkt vor dem Implantat, als bester erreichter Zustand in diesem Versuch lässt sich feststellen, dass dieser in gleicher Weise an anderen Stellen des Implantationskanals auftrat. Wird eine Läsion ins Gewebe gesetzt, so muss diese vom Gewebe begrenzt werden, egal ob sich ein Fremdkörper darin befindet oder nicht. Da sich diese sehr dünne Lage GFAP-positiver Zellen nach 12 Wochen meist unter 50µm Dicke ausgebildet hat, stellt sie in diesem Zusammenhang eine erfolgreiche Reduktion der Gewebereaktion dar (McConnell et al., 2009a). Liegen direkt hinter diesem Belt dann zusätzlich noch gut vernetzte Neuronen, so wie es für die Stammzell-besiedelten Sonden bereits nach 12 Wochen der Fall war, sollte eine gute Konnektivität zum Implantat möglich sein (Biran et al., 2005; McConnell et al., 2009b). Diese Aussage wird nicht zuletzt dadurch ermöglicht, dass, im Gegensatz zu den bisherigen Publikationen, die Gewebereaktion nicht nur in kortikalen Bereichen untersucht wurde, sondern tatsächlich in der eigentlichen Zielregion des Implantates – dem Hypothalamus. Wie sich in den Ergebnissen zeigte, treten tatsächlich Unterschiede in den verschiedenen Hirnregionen zu Tage.

5.3. Fazit

Die elektrophysiologische Konnektivität von Implantaten im ZNS wird von drei verschiedenen Faktoren beeinflusst (He et al., 2006):

- 1) Eine chemisch inhibierende Umgebung für neurale Ausläufer im regenerierenden Gewebe.
- 2) Eine Erhöhung der Distanz zwischen Ableitungspunkt und nächstem Neuron.
- 3) Eine Isolation der Sonde von umgebenden Neuronen durch Gliose, welche die Impedanz erhöht.

Alle drei Ansatzpunkte wurden zur Verbesserung der Biokompatibilität in dieser Arbeit verfolgt und durch eine einzigartige Kombination von Implantat-Modifikationen überwunden. Dabei war die Reduktion der glialen Narbenbildung, welche durch Astrocyten-Aktivierung, Influx inflammatorischer Microgliazellen und graduellem Verlust neuronaler Ausläufer gekennzeichnet ist, das Hauptziel der Forschungsarbeit. Durch grundlegende Anpassung der Implantate an ein biokompatibles Optimum ist es gelungen, für flexible Tiefenhirnstimulierende Implantate erstmalig in einem Langzeitversuch die erfolgreiche histologische Integration in ihrer Zielregion zu zeigen. Durch passive Biologisierung der Implantate mit dem Hydrogel Fibrin wurde eine attraktive Matrix für das Einsprossen von Neuronen präsentiert. Jedoch hatte die aktive Biologisierung mit syngenem pankreatischen Stammzellen einen noch stärkeren positiven Effekt, da sie noch besser zur Beschleunigung der Geweberegeneration beitrugen und zu einer besseren Aufrechterhaltung des anliegenden neuronalen Gewebes beitrug. Es wurde in keinem Fall eine chemisch inhibierende Umgebung für einsprossende Neurone festgestellt und die Erhöhung der Distanz zwischen Ableitungspunkt und Neuronen konnte ebenso wie die Einkapselung des Implantates auf ein Minimum beschränkt werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse sollen in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

5.4. Ausblick:

5.4.1. Grundlagenforschung:

Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Gliose und des Einflusses der glandulären Stammzellen auf diese, sind weitere immunhistochemische Färbungen sinnvoll. Beispielsweise kann die Distanz der neuronalen Somas über eine NeuN-Färbung dargestellt werden. Die Integrität der Synapsen könnte z.B. durch eine Färbung gegen Synaptophysin festgestellt werden. Es wären außerdem viele weitere Färbungen interessant, um den Verlauf und die Einflüsse auf die Gliose noch genauer zu klären, beispielsweise für weitere extracelluläre Matrixmoleküle, welche den Vernetzungsgrad der Astrocyten genauer darstellen könnten. Sehr interessant wäre auch die Identität der eingewanderten, bisher ungefärbten Zellen durch Immunhistochemie festzustellen. Es bleiben also noch einige Optionen hier das molekulare Verständnis zu erweitern.

Zur Detektion der Stammzellen könnten im weiteren Verlauf auch die Arbeiten im Bereich der in situ-Hybridisierung intensiviert werden, sodass über genetische Detektion des GFP-Gens die bisherigen immunhistochemischen Ergebnisse validiert werden.

Eine höhere Auflösung der Gewebeantwort kann ebenfalls durch weitere immunhistochemische Färbungen für andere Hirnbereiche und zu weiteren Zeitpunkten der Gliose erreicht werden, sodass sich Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen noch besser herauskristallisieren lassen und ein besseres Verständnis für die beobachteten Effekte generiert werden kann. Dies würde den Überblick über die Gliose-Abläufe erheblich erweitern.

5.4.2. Anwendungsorientierte Forschung:

Für die Applikation der hier beschriebenen Ergebnisse, wäre es sinnvoll einige Methoden noch weiter zu entwickeln. Sicherlich kann die Implantationsmethode noch besser an die Notwendigkeiten adaptiert werden. Ein wichtiger Focus sollte hier auf die Reduktion der Invasivität gelegt werden, wobei eine deutliche Verringerung des Durchmessers vom Implantationskanal erreicht werden sollte. Einhergehend mit der Arbeit an diesem Aspekt, wäre eine Reduktion der Torsion des Implantates erstrebenswert, womit eine genauere Platzierung erreicht werden kann. Dabei sollte die Einführhilfe auf diese Ansprüche genau angepasst werden.

Im Hinblick auf den erfolgreichen Einsatz syngener oder autologer Stammzellen aus glandulären Geweben in der humanen Anwendung, wäre der Einsatz einfacher zugänglicher Stammzellpopulationen aus glandulären Geweben erstrebenswert, wie beispielsweise aus

Speichel- oder Schweißdrüsen (Danner et al., 2012; Egana et al., 2009). Diese müssten zuvor durch einen ähnlichen Tierversuch auf ihre Eignung überprüft werden.

Als nächsten Schritt sollte jedoch die Funktionalität der Sonde durch Ableitungen und evtl. Stimulation in vivo festgestellt werden, was eine mögliche Validierung der beobachteten Reduktion der Gliose beinhaltet und die wahrhaftige Überprüfung dieses Konzeptes darstellt. Dabei muss jedoch der Zeitpunkt, an welchem mit der Stimulation begonnen wird, sorgfältig ausgewählt werden bzw. hierzu ein eigenständiges Projekt initiiert werden.

6. Referenzen

- Andlin-Sobocki, P., Jonsson, B., Wittchen, H.U., and Olesen, J. (2005). Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol 12 Suppl 1*, 1-27.
- Asaad, W., and Eskandar, E. (2008). The movers and shakers of deep brain stimulation. *Nat Med 14*, 17-19.
- Benabid, A.L., Chabardes, S., Mitrofanis, J., and Pollak, P. (2009). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol 8*, 67-81.
- Biran, R., Martin, D.C., and Tresco, P.A. (2005). Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Exp Neurol 195*, 115-126.
- Biran, R., Martin, D.C., and Tresco, P.A. (2007). The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull. *J Biomed Mater Res A 82*, 169-178.
- Bjorklund, A., and Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci 3*, 537-544.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., *et al.* (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A 99*, 2344-2349.
- Bjornsson, C.S., Oh, S.J., Al-Kofahi, Y.A., Lim, Y.J., Smith, K.L., Turner, J.N., De, S., Roysam, B., Shain, W., and Kim, S.J. (2006). Effects of insertion conditions on tissue strain and vascular damage during neuroprosthetic device insertion. *J Neural Eng 3*, 196-207.
- Bulmer, J.N., Morrison, L., and Johnson, P.M. (1988). Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *J Reprod Immunol 14*, 291-302.
- Choi, Y., Ta, M., Atouf, F., and Lumelsky, N. (2004). Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells 22*, 1070-1084.
- Cipriani, S., Bonini, D., Marchina, E., Balgkouranidou, I., Caimi, L., Grassi Zucconi, G., and Barlati, S. (2007). Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol Int 31*, 845-850.
- Cullen, D.K., A, R.P., Doorish, J.F., Smith, D.H., and Pfister, B.J. (2008). Developing a tissue-engineered neural-electrical relay using encapsulated neuronal constructs on conducting polymer fibers. *J Neural Eng 5*, 374-384.
- Danner, S., Kajahn, J., Geismann, C., Klink, E., and Kruse, C. (2007). Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod 13*, 11-20.
- Danner, S., Kajahn, J., Kruse, C. (2007). Glanduläre Stammzellen - Eine neue Quelle für Zellersatz-Therapien? *Zeitschrift für Regenerative Medizin*, 28-31.
- Danner, S., Kremer, M., Petschnik, A.E., Nagel, S., Zhang, Z., Hopfner, U., Reckhenrich, A.K., Weber, C., Schenck, T.L., Becker, T., *et al.* (2012). The Use of Human Sweat Gland-Derived Stem Cells for Enhancing Vascularization during Dermal Regeneration. *J Invest Dermatol*.
- Davidson, R.L., and Horn, D. (1974). Reversible "transformation" of bromodeoxyuridine-dependent cells by bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A 71*, 3338-3342.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell 97*, 703-716.
- Domowicz, M., Li, H., Hennig, A., Henry, J., Vertel, B.M., and Schwartz, N.B. (1995). The biochemically and immunologically distinct CSPG of notochord is a product of the aggrecan gene. *Dev Biol 171*, 655-664.

- Egana, J.T., Danner, S., Kremer, M., Rapoport, D.H., Lohmeyer, J.A., Dye, J.F., Hopfner, U., Lavandro, S., Kruse, C., and Machens, H.G. (2009). The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials* 30, 5918-5926.
- Ende, N., and Chen, R. (2002). Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med* 33, 173-180.
- Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8, 203-214.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Fedoroff, S., Houle, J., and Kalnins, V.I. (1982). Intermediate filaments and neural cell differentiation. *Int J Neurol* 16-17, 30-45.
- Friedman, D.F., Kwittken, P., Cizman, B., Argyris, E., Kearns, J., Yang, S.Y., Zmijewski, C., Bunin, N., Douglas, S.D., and Monos, D. (1994). DNA-based HLA typing of nonhematopoietic tissue used to select the marrow transplant donor for successful treatment of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1, 590-596.
- Frisen, J., Johansson, C.B., Torok, C., Risling, M., and Lendahl, U. (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131, 453-464.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T.H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C., *et al.* (2009). Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur J Cell Biol* 88, 409-421.
- Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.
- Hakamata, Y., Tahara, K., Uchida, H., Sakuma, Y., Nakamura, M., Kume, A., Murakami, T., Takahashi, M., Takahashi, R., Hirabayashi, M., *et al.* (2001). Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 779-785.
- He, W., McConnell, G.C., and Bellamkonda, R.V. (2006). Nanoscale laminin coating modulates cortical scarring response around implanted silicon microelectrode arrays. *J Neural Eng* 3, 316-326.
- Heaton, M.B., and Swanson, D.J. (1988). The influence of laminin on the initial differentiation of cultured neural tube neurons. *J Neurosci Res* 19, 212-218.
- Helledie, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2008). A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17, 837-848.
- Hemm, S., and Wardell, K. (2010). Stereotactic implantation of deep brain stimulation electrodes: a review of technical systems, methods and emerging tools. *Med Biol Eng Comput* 48, 611-624.
- Ho, W., Tawil, B., Dunn, J.C., and Wu, B.M. (2006). The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 12, 1587-1595.
- Itosaka, H., Kuroda, S., Shichinohe, H., Yasuda, H., Yano, S., Kamei, S., Kawamura, R., Hida, K., and Iwasaki, Y. (2009). Fibrin matrix provides a suitable scaffold for bone marrow stromal cells transplanted into injured spinal cord: a novel material for CNS tissue engineering. *Neuropathology* 29, 248-257.
- Jahroudi, N., and Lynch, D.C. (1994). Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol Cell Biol* 14, 999-1008.
- Johnson, P.J., Parker, S.R., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2009a). Fibrin-based tissue engineering scaffolds enhance neural fiber sprouting and delay the accumulation of

- reactive astrocytes at the lesion in a subacute model of spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A* 92, 152-163.
- Johnson, P.J., Tatara, A., Shiu, A., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2009b). Controlled release of neurotrophin-3 and platelet derived growth factor from fibrin scaffolds containing neural progenitor cells enhances survival and differentiation into neurons in a subacute model of SCI. *Cell Transplant*.
- Ju, Y.E., Janmey, P.A., McCormick, M.E., Sawyer, E.S., and Flanagan, L.A. (2007). Enhanced neurite growth from mammalian neurons in three-dimensional salmon fibrin gels. *Biomaterials* 28, 2097-2108.
- Kam, L., Shain, W., Turner, J.N., and Bizios, R. (2002). Selective adhesion of astrocytes to surfaces modified with immobilized peptides. *Biomaterials* 23, 511-515.
- Kandel, E., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4/e edn (McGraw-Hill Companies).
- Kruse, C., Birth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A., and Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 79, 1617-1624.
- Kruse, C., Danner, S., and Rapoport, D.H. (2008). Current Stem Cell Technology: Limitations and Realistic Expectations. *Engineering in Life Sciences* 8, 13-18.
- Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A.E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D.H., and Wedel, T. (2006). Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 188, 503-517.
- L'Episcopo, F., Tirollo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Impagnatiello, F., and Marchetti, B. (2011). Switching the microglial harmful phenotype promotes lifelong restoration of substantia nigra dopaminergic neurons from inflammatory neurodegeneration in aged mice. *Rejuvenation Res* 14, 411-424.
- Leach, J.B., Achyuta, A.K., and Murthy, S.K. Bridging the Divide between Neuroprosthetic Design, Tissue Engineering and Neurobiology. *Front Neuroengineering* 2, 18.
- Leach, J.B., Achyuta, A.K., and Murthy, S.K. (2010). Bridging the Divide between Neuroprosthetic Design, Tissue Engineering and Neurobiology. *Front Neuroeng* 2, 18.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18, 675-679.
- Lenington, J.B., Yang, Z., and Conover, J.C. (2003). Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 99.
- Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2006). Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441, 1094-1096.
- Lledo, P.M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179-193.
- Mackenzie, R. (2011). Must Family/Carers Look after Strangers? Post-DBS Identity Changes and Related Conflicts Of Interest. *Front Integr Neurosci* 5, 12.
- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., and Gerson, S.L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176, 57-66.
- Marin, C., and Fernandez, E. (2010). Biocompatibility of intracortical microelectrodes: current status and future prospects. *Front Neuroeng* 3, 8.
- Martinez-Ramos, C., Lainez, S., Sancho, F., Garcia Esparza, M.A., Planells-Cases, R., Garcia Verdugo, J.M., Gomez Ribelles, J.L., Salmeron Sanchez, M., Monleon Pradas, M., Barcia, J.A., *et al.* (2008). Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A* 14, 1365-1375.
- McConnell, G.C., Butera, R.J., and Bellamkonda, R.V. (2009a). Bioimpedance modeling to monitor astrocytic response to chronically implanted electrodes. *J Neural Eng* 6, 055005.

- McConnell, G.C., Rees, H.D., Levey, A.I., Gutekunst, C.A., Gross, R.E., and Bellamkonda, R.V. (2009b). Implanted neural electrodes cause chronic, local inflammation that is correlated with local neurodegeneration. *J Neural Eng* 6, 56003.
- Meilinger, D., Fellingner, K., Bultmann, S., Rothbauer, U., Bonapace, I.M., Klinkert, W.E., Spada, F., and Leonhardt, H. (2009). Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep* 10, 1259-1264.
- Mendez-Otero, R., Zaverucha-do-Valle, C., Gubert, F., Freitas, G.R., and Santiago, M.F. (2005). Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Braz J Med Biol Res* 38, 1553-1559.
- Mercanzini, A., Colin, P., Bensadoun, J.C., Bertsch, A., and Renaud, P. (2009). In vivo electrical impedance spectroscopy of tissue reaction to microelectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* 56, 1909-1918.
- Mothe, A.J., Kulbatski, I., van Bendegem, R.L., Lee, L., Kobayashi, E., Keating, A., and Tator, C.H. (2005). Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking transplanted neural stem/progenitor cells. *J Histochem Cytochem* 53, 1215-1226.
- Nikkhah, G., Piroth, T. (2009). Stammzellbasierte Therapien für das Gehirn: Anforderungen und Herausforderungen. *Regenerative Medizin*, 51-56.
- Nomura, J., Maruyama, M., Katano, M., Kato, H., Zhang, J., Masui, S., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Nishimoto, M., and Okuda, A. (2009). Differential Requirement for Nucleostemin in Embryonic Stem Cell and Neural Stem Cell Viability. *Stem Cells* 27, 1066-1076.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). The rat brain in stereotactic coordinates, Vol 6 (Elsevier).
- Petschnik, A.E., Fell, B., Tiede, S., Habermann, J.K., Pries, R., Kruse, C., and Danner, S. (2011). A novel xenogeneic co-culture system to examine neuronal differentiation capability of various adult human stem cells. *PLoS ONE* 6, e24944.
- Petschnik, A.E., Klatte, J.E., Evers, L.H., Kruse, C., Paus, R., and Danner, S. (2009). Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol*.
- Pisati, F., Bossolasco, P., Meregalli, M., Cova, L., Belicchi, M., Gavina, M., Marchesi, C., Calzarossa, C., Soligo, D., Lambertenghi-Delilieri, G., *et al.* (2007). Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. *Cell Transplant* 16, 41-55.
- Pizzolato, G., and Mandat, T. (2012). Deep brain stimulation for movement disorders. *Front Integr Neurosci* 6, 2.
- Polikov, V.S., Tresco, P.A., and Reichert, W.M. (2005). Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 148, 1-18.
- Purcell, E.K., Seymour, J.P., Yandamuri, S., and Kipke, D.R. (2009). In vivo evaluation of a neural stem cell-seeded prosthesis. *J Neural Eng* 6, 026005.
- Rao, S.S., and Winter, J.O. (2009). Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroengineering* 2, 6.
- Rapoport, D.H., Schicktanz, S., Gurleyik, E., Zuhlke, C., and Kruse, C. (2009). Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Ann Anat* 191, 446-458.
- Richter, A., Kruse, C., Hofmann, U.G., and Danner, S. (2010). Applying controlled shear stress on cell covered microprobes. *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering - de Gruyter* 55, 4.
- Richter, A., Kruse, C., Moser, A., Hofmann, U.G., and Danner, S. (2011). Cellular modulation of polymeric device surfaces: promise of adult stem cells for neuroprosthetics. *Frontiers in Neuroscience* 5.
- Rojas, A., Schachterle, W., Xu, S.M., and Black, B.L. (2009). An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse *Gata4* gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Dev Dyn* 238, 2588-2598.

- Rousche, P.J., Pellinen, D.S., Pivin, D.P., Jr., Williams, J.C., Vetter, R.J., and Kipke, D.R. (2001). Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability. *IEEE Trans Biomed Eng* 48, 361-371.
- Rubehn, B., Bosman, C., Oostenveld, R., Fries, P., and Stieglitz, T. (2009). A MEMS-based flexible multichannel ECoG-electrode array. *J Neural Eng* 6, 036003.
- Rubehn, B., and Stieglitz, T. In vitro evaluation of the long-term stability of polyimide as a material for neural implants. *Biomaterials* 31, 3449-3458.
- Rubehn, B., and Stieglitz, T. (2010). In vitro evaluation of the long-term stability of polyimide as a material for neural implants. *Biomaterials* 31, 3449-3458.
- Saint-Jeannet, J.P., Thiery, J.P., and Kotliansky, V.E. (1994). Effect of an inhibitory mutant of the FGF receptor on mesoderm-derived alpha-smooth muscle actin-expressing cells in *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 164, 374-382.
- Salem, H., Ciba, P., Rapoport, D.H., Egana, J.T., Reithmayer, K., Kadry, M., Machens, H.G., and Kruse, C. (2009). The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration. *Biomaterials* 30, 789-796.
- Sasse, S., Brand, N.J., Kyprianou, P., Dhoot, G.K., Wade, R., Arai, M., Periasamy, M., Yacoub, M.H., and Barton, P.J. (1993). Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure. *Circ Res* 72, 932-938.
- Scheffler, B., Walton, N.M., Lin, D.D., Goetz, A.K., Enikolopov, G., Roper, S.N., and Steindler, D.A. (2005). Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9353-9358.
- Schiefer, T.K., Matsumoto, J.Y., and Lee, K.H. (2011). Moving forward: advances in the treatment of movement disorders with deep brain stimulation. *Front Integr Neurosci* 5, 69.
- Schlapfer, T.E., and Bewernick, B.H. (2009). Deep brain stimulation for psychiatric disorders -state of the art. *Adv Tech Stand Neurosurg* 34, 37-57.
- Schruers, K., Koning, K., Luermans, J., Haack, M.J., and Griez, E. (2005). Obsessive-compulsive disorder: a critical review of therapeutic perspectives. *Acta Psychiatr Scand* 111, 261-271.
- Seaberg, R.M., Smukler, S.R., Kieffer, T.J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M.B., Korbitt, G., and van der Kooy, D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22, 1115-1124.
- Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5, 146-156.
- Spataro, L., Dilgen, J., Retterer, S., Spence, A.J., Isaacson, M., Turner, J.N., and Shain, W. (2005). Dexamethasone treatment reduces astroglia responses to inserted neuroprosthetic devices in rat neocortex. *Exp Neurol* 194, 289-300.
- Stevenson, K., Chen, D., MacIntyre, A., McGlynn, L.M., Montague, P., Charif, R., Subramaniam, M., George, W.D., Payne, A.P., Davies, R.W., *et al.* (2011). Pancreatic-derived pathfinder cells enable regeneration of critically damaged adult pancreatic tissue and completely reverse streptozotocin-induced diabetes. *Rejuvenation Res* 14, 163-171.
- Stieglitz, T., and Meyer, J.U. (1999). Implantable microsystems. Polyimide-based neuroprostheses for interfacing nerves. *Medical device technology* 10, 28-30.
- Suo, Z., Wu, M., Citron, B.A., Palazzo, R.E., and Festoff, B.W. (2003). Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem* 278, 37681-37689.
- Szarowski, D.H., Andersen, M.D., Retterer, S., Spence, A.J., Isaacson, M., Craighead, H.G., Turner, J.N., and Shain, W. (2003). Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Res* 983, 23-35.
- Szuts, D., Eresh, S., and Bienz, M. (1998). Functional intertwining of Dpp and EGFR signaling during *Drosophila* endoderm induction. *Genes Dev* 12, 2022-2035.

- Tang, Y., Yasuhara, T., Hara, K., Matsukawa, N., Maki, M., Yu, G., Xu, L., Hess, D.C., and Borlongan, C.V. (2007). Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. *Cell Transplant* 16, 159-169.
- Turner, J.N., Shain, W., Szarowski, D.H., Andersen, M., Martins, S., Isaacson, M., and Craighead, H. (1999). Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants. *Exp Neurol* 156, 33-49.
- Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C.M., Piper, K., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2003). Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. *Stem Cells* 21, 598-609.
- Turnpenny, L., Spalluto, C.M., Perrett, R.M., O'Shea, M., Hanley, K.P., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2006). Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells* 24, 212-220.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Wang, Y.H., Ho, M.L., Chang, J.K., Chu, H.C., Lai, S.C., and Wang, G.J. (2009). Microporation is a valuable transfection method for gene expression in human adipose tissue-derived stem cells. *Mol Ther* 17, 302-308.
- Ward, H.E., Hwynn, N., and Okun, M.S. (2010). Update on deep brain stimulation for neuropsychiatric disorders. *Neurobiol Dis* 38, 346-353.
- Warrington, A.E., and Pfeiffer, S.E. (1992). Proliferation and differentiation of O4+ oligodendrocytes in postnatal rat cerebellum: analysis in unfixed tissue slices using anti-glycolipid antibodies. *J Neurosci Res* 33, 338-353.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R., and Wobus, A.M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61, 2510-2522.
- Williams, D.F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29, 2941-2953.
- Wilson, C.J., Beverlin, B., 2nd, and Netoff, T. (2011). Chaotic desynchronization as the therapeutic mechanism of deep brain stimulation. *Front Syst Neurosci* 5, 50.
- Yasuda, H., Kuroda, S., Shichinohe, H., Kamei, S., Kawamura, R., and Iwasaki, Y. (2010). Effect of biodegradable fibrin scaffold on survival, migration, and differentiation of transplanted bone marrow stromal cells after cortical injury in rats. *J Neurosurg* 112, 336-344.
- Yasuhara, T., Matsukawa, N., Hara, K., Yu, G., Xu, L., Maki, M., Kim, S.U., and Borlongan, C.V. (2006). Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 26, 12497-12511.
- Yu, X., Dillon, G.P., and Bellamkonda, R.B. (1999). A laminin and nerve growth factor-laden three-dimensional scaffold for enhanced neurite extension. *Tissue Eng* 5, 291-304.
- Zhong, Y., and Bellamkonda, R.V. (2008). Biomaterials for the central nervous system. *J R Soc Interface* 5, 957-975.
- Zhu, Q., Yasumoto, H., and Tsai, R.Y. (2006). Nucleostemin delays cellular senescence and negatively regulates TRF1 protein stability. *Mol Cell Biol* 26, 9279-9290.
- Zietlow, R., Lane, E.L., Dunnett, S.B., and Rosser, A.E. (2008). Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res* 331, 301-322.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Verteilung der Kosten für Erkrankungen des Hirns in Europa im Jahr 2004. Der Graph (links) verdeutlicht die absoluten Werte (rechts) als Kosten pro Patient. Die psychomotorischen Erkrankungen mit den höchsten Kosten sind Parkinson und Epilepsie. (Andlin-Sobocki et al., 2005). - 3 -
- Abbildung 2: Schematische Gliederung des humanen Gehirns in die sieben wesentlichen Abschnitte. Das Rückenmark (Spinal cord) geht in die Medulla oblongata (Medulla) und anschließend in die Pons über. Zu dieser hat das Cerebellum eine enge Verknüpfung. Der Pons schließt sich das Mittelhirn (Midbrain) an. Anterior vor diesem befindet sich das Diencephalon mit Thalamus und Hypothalamus. Es wird umschlossen von den cerebralen Hemisphären, welche über das Corpus callosum verbunden sind. (Aus: Eric Kandel: Principles of neural science. 2000) - 4 -
- Abbildung 3: Schema einer charakteristischen Neuron-Morphologie (A). Im Hirngewebe erscheint dieser Zelltyp vornehmlich durch ein filigranes Geflecht seiner filamentären Ausläufer (B; grün: Neurofilament, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x) - 6 -
- Abbildung 4: Astrocyten im Hirngewebe. In regelmäßiger Verteilung sind stern-förmige Zellen mit verschiedenen langen Ausläufern im Hirngewebe zu finden (grün: GFAP, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 6 -
- Abbildung 5: Mikroglia-Zellen (rot) in einer Läsion. Die gewebständigen Immunzellen wandern im Fall einer Verletzung an die betroffene Stelle und bereinigen sie von Zell-Trümmern. (rot: ED-1, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x) - 7 -
- Abbildung 6: Nestin-positive residente Vorläufer- bzw. Stammzellen im Gehirn. (rot: Nestin, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x)..... - 7 -
- Abbildung 7: Schema-tische Darstellung der Basalganglien im Hirn. Putamen und Nucleus caudatus (lila) werden auch als Striatum zusammengefasst. Der Globus Pallidus (orange) wird in einen medianen und lateralen Anteil gegliedert. Zwischen Thalamus (hellblau) und Substantia nigra (grün) liegt der Subthalamische Nucleus (blau). (Quelle: <http://www.acceleratedcu> - 9 -
- Abbildung 8: Intakter cortico-striatal-pallidaler Regelkreis (links) im Vergleich zur reduzierten nigro-striatalen dopaminergen Signal-leitung bei Morbus Parkinson. (Quelle:(Bjorklund and Lindvall, 2000)..... - 9 -
- Abbildung 9: Gegenüberstellung der gesunden dopaminergen Synapsen-übertragung (links) zum dysfunktionalen Zustand bei Morbus Parkinson. Neben externen Faktoren, wie aktivierter Mikroglia oder toxischen Einflüssen sind auch genetische Faktoren eine Ursache für die molekulare Ausprägung von Morbus Parkinson. (Quelle: <http://www.cellsignal.com>) . - 10 -
- Abbildung 10: Röntgenbild von Tiefenhirn-stimulierenden Implantaten im Hirn (links). Schema der vollständigen Implantation mit subcutanen Kabeln und Schrittmacher (rechts). (Quelle: (Benabid et al., 2009; Schiefer et al., 2011) - 11 -
- Abbildung 11: Spitzen der Implantate Model 3387 (links) und 3389 (rechts) von der Firma Medtronic Corporation. (Bildquelle: Medtronic) - 13 -

Abbildung 12: Polyimid-Elektrode mit Leitungen und Kontakten aus Platin für Versuche im Rattenmodell. Hersteller: IMTEK, Freiburg, Deutschland.	- 14 -
Abbildung 13: Stratifizierung zellulärer Immunreaktivität vor dem Implantat (oranger Strich links) nach 4 Wochen in vivo. Zelltypische Marker wurden immunfluoreszent gefärbt und zeigen Microglia/Macrophagen (ED-1, rot), Astrocyten (GFAP, grün), neuronale Soma (NeuN, blau) und Neurofilamente (lila). (Quelle: Biran et al., 2005)	- 17 -
Abbildung 14: Schema zum experimentellen Ablauf der Isolation, Kultivierung und Charakterisierung adulter pankreatischer Stammzellen. (Kruse et al., 2004)	- 24 -
Abbildung 15: Polyimid-beschichteter 5-Zoll-Waver in passendem Kunststoffträger. Polyimid ist eine homogene Kunststoffschicht, welche als Lack auf die Waver-Fläche gesponnen wird und dann einen gleichmässigen Film bildet.	- 37 -
Abbildung 16: Aufbau eines Kokultur-Experimentes. In einer 6well-Platte hängen Einsätze mit Hirn-Biopsien. Sie liegen am Boden des Einsatzes auf einer Nylonmembran. Zwischen dieser und dem zellbewachsenen Deckgläschen am Boden des wells befindet sich Medium, welches sich beide biologischen Proben teilen.....	- 37 -
Abbildung 17: Plasmidkarte des pEGFP-N1-Plasmides.	- 39 -
Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf eines RealTime PCR-Durchgangs. Zunächst denaturieren die Proben bei 95°C für 5:00min (1). Anschließend erfolgten 45 Zyklen aus Annealing, Elongation, Denaturierung (2 und 3). Nach einem finalen Zyklus (4 und 5) werden die Proben 20:00 min langsam aufgewärmt zur Schmelzpunktbestimmung(6). Nach der abschließenden Denaturierung (7) verblieben sie gekühlt bei 4°C (8) bis zur Entnahme.	- 42 -
Abbildung 19: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die exponentielle Amplifikation von Neurofilament-cDNA (leichte Kette) über die Zyklen. Die exponentielle Zunahme der Amplikons beginnt etwa ab Zyklus 24 (rote Linie). Die Templat-freien Kontrollen zeigen keine Amplifikation (bleiben unter roter Linie).....	- 42 -
Abbildung 20: Schmelzkurve der Amplikons aus der RealTime PCR von Abbildung 20. Die Änderung der Fluoreszenzintensität (y-Achse) ist am Schmelzpunkt (x-Achse) durch Freisetzen von SYBR-Green am stärksten.	- 43 -
Abbildung 21: Prinzip einer Kapillargelelektrophoretischen Analyse. In der gelgefüllten Kapillare trennen sich die Nucleinsäuren größenabhängig zwischen Anode und Kathode auf. Durch Bestrahlung kann der interkalierte Farbstoff Ethidiumbromid vor einem Detektor angeregt werden. Die Laufstrecke wird mit dem Signal von der Software korreliert und als Gelbild ausgegeben.....	- 44 -
Abbildung 22: Zeitschema der Messpunkte vom Tierversuch in Relation zum Ablauf der experimentellen Vorarbeit und der Gliose.	- 49 -
Abbildung 23: Aufsicht auf das stereotaktisch eingespannte Versuchstier mit eröffneter Kopfhaut. Die Schlaufen des Nahtmaterials (blau) werden am Rahmen festgeklebt.	- 52 -
Abbildung 24: Aufsicht auf die stereotaktische Trepanation des Schädels. Das 0,9mm weite Bohrloch liegt entsprechend der stereotaktischen Koordinaten 2,6mm rechts neben Sutura sagittalis.	- 53 -
Abbildung 25: Aufsicht auf das Operationsfeld mit eingesetztem Agarose-Block.	- 53 -

Abbildung 26: Aufsicht auf das Operationsfeld nach Entfernen des Agarose-Blocks. Das Implantat stellte sich parallel zur Insertionsnadel auf.	- 54 -
Abbildung 27: Seitliche Aufsicht auf das Operationsfeld nach Insertion des Implantates ins Agarose-Gel.....	- 54 -
Abbildung 28: Seitliche Ansicht des Operationsfeldes mit fixiertem Sondenkopf auf dem Schädel. Aus dem Bohrloch (blauer Pfeil) ragt der unfixierte Implantatschaft (grüner Pfeil). Erst der Kopf des Implantates (roter Pfeil) ist mit dem Schädel fest verbunden.	- 55 -
Abbildung 29: Aufsicht auf die Anatomie des Rattenschädels (Quelle: (Paxinos and Watson, 2007).....	- 56 -
Abbildung 30: Schematische Darstellung der gewonnen Probenbereiche (gelb) entlang der Trajektorie (rot). (Modifiziert nach (Paxinos and Watson, 2007)	- 57 -
Abbildung 31: Schema des Implantationsareals (links) im Vergleich zu einer Übersichtsaufnahme eines Präparates aus dem Tierversuch. Vor dem Implantat (gelb) liegt das Zielareal für die Stimulation (schraffiert). Hinter dem Implantat befindet sich der mehr oder wenige große Implantationskanal (hellgrau). Im histologischen Schnitt ist die ursprünglich Lage des Implantates (rote Linie) mit einer gelben gepunkteten Linie eingezeichnet. (blau: DAPI, grün: Neurofilament, Vergrößerung: 100x Mosaix).....	- 59 -
Abbildung 32: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Lining an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).	- 60 -
Abbildung 33: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Lining und davor liegenden Frontlinie an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).....	- 60 -
Abbildung 34: Schematische Darstellung des Hirngewebes vor dem Implantat mit einem Belt an der Kontaktfläche von Implantat:Hirngewebe (blau: Neurone, grün: Astrocyten, gelb: Implantat).	- 60 -
Abbildung 35: Immunocytochemischer Vergleich pankreatischer und submandibularer Stammzellen aus der Ratte. Das jeweils detektierte Protein in der entsprechenden Farbe steht zwischen beiden Populationen. (blau: DAPI; Vergrößerung 100x).....	- 62 -
Abbildung 36: Ergebnisse der immunfluoreszenten Färbung für Neurofilament in Proben von submandibularen Stammzellen aus dem Kokultur-Experiment. Die Kontrolle (links) ist ohne Primärantikörper gefärbt. Stimulierte Zellen (mitte) wurden mit Rattenhirnbiopsien kokultiviert, synthetisierten jedoch kein Neurofilament. Unter den Zellen, welche in normalem Medium kultiviert wurden (unstimuliert, rechts), waren einige, welche Neurofilament synthetisierten.	- 63 -
Abbildung 37: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptom von pankreatischen Stammzellen. Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. Die unterste Bande ist der Alignment-Marker bei 15bp.	- 64 -
Abbildung 38: Immunocytochemische Färbungen pankreatischer Stammzellen für Nestin, GFAP und Neurofilament (NF) in Passage 18. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x).....	- 64 -
Abbildung 39: Verlauf des Transfektionsexperimentes anhand von drei repräsentativen	

Bildern. 22 Stunden nach der Transfektion sind einige fluoreszente Zellen in der Population vorhanden gewesen (links). Weitere zwei Tage später wurde mit der Selektion auf G418 begonnen (mittig). Nach drei Tagen unter Selektionsbedingungen nahm jedoch die Anzahl der nichtfluoreszenten Zellen nicht ab (rechts). (Masstab: 50µm; Vergrößerung: 100x)..... - 65 -

Abbildung 40: Pankreatische Stammzellen nach der LavaCell-Markierung. (Vergrößerung: 200x)..... - 66 -

Abbildung 41: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen. Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. - 67 -

Abbildung 42: Immunocytochemische Analyse der GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen. Die beobachteten Proteine sind in den Bildern aufgetragen und nach Keimblättern geordnet. Die oberste Reihe zeigt den Stammzellmarker Nestin und die Proliferationsmarker Ki67 und Nucleostemin an. In der zweiten Reihe sind die endodermalen Proteine GATA4, EGFR und VWF dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt die ektodermalen Proteine Neurofilament und GFAP. Darunter die mesodermalen Marker αSMA und Troponin I. Die Kontrolle enthielt keinen Primärantikörper. - 68 -

Abbildung 43: Polyimid-Sonden mit Stammzellen bewachsen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 100x (links); 200x (rechts)). - 69 -

Abbildung 44: Phalloidin-gefärbte Zellen auf Polyimid-Sonden. (blau:DAPI; Vergrößerung v.l.n.r.: 50x; 200x, 200x)..... - 69 -

Abbildung 45: Immunfluoreszenter Vergleich pankreatischer Stammzellen auf Polyimid (mittig) und Gold (rechts) zur Zellkulturplastik (links). (blau:DAPI; Masstab: 50µm; Vergrößerung: 400x)..... - 70 -

Abbildung 46: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und Polyimid (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. Die unterste Bande ist der Alignment-Marker bei 15 bp. - 71 -

Abbildung 47: Immunfluoreszenter Vergleich pankreatischer Stammzellen auf dem zweiten Polyimid (rechts) zur Zellkulturplastik (links). (blau:DAPI; Masstab: 50µm; Vergrößerung: 400x)..... - 72 -

Abbildung 48: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und dem zweiten Polyimid (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet..... - 72 -

Abbildung 49: Vergleichende Immunfluoreszenz für pankreatische Stammzellen auf Laminin-beschichteten und unbeschichteten Deckgläschen (Glas) oder Polyimid-Streifen (PI). Es wurden die Proteine Nestin, GFAP, αSMA und Neurofilament (NF) detektiert. (Vergrößerung: 200x)..... - 75 -

Abbildung 50: Vergleichende Immunfluoreszenz für pankreatische Stammzellen auf, unter und in Fibrin gewachsen. Es wurden die Proteine Nestin, GFAP, αSMA und Neurofilament (NF) detektiert. (Vergrößerung: 200x)..... - 77 -

- Abbildung 51: Nestin- und GFAP-Färbung für pankreatische Stammzellen auf und in Fibrin gewachsen. Es wird eine räumliche Nähe der Zellen in den Clustern beobachtet, sowie teilweise doppelt positive Zellen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x)..... - 78 -
- Abbildung 52: Nestin- und GFAP-Färbung für pankreatische Stammzellen auf Laminin gewachsen. Es wird in diesen Präparaten ebenfalls eine räumliche Nähe der Zellen in den Clustern beobachtet, sowie teilweise doppelt positive Zellen. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x)..... - 79 -
- Abbildung 53: Immunfluoreszente Analyse pankreatischer Stammzellen für α SMA und Neurofilament (NF) nach zwei und vier Tagen unter Kokultur mit Hirnbiopsien aus Ratten. Als Kontrolle (ohne Kokultureinfluss) sind die Zellen nach Tag 2 (d2) abgebildet. Es wurde keine neurale Induktion beobachtet..... - 80 -
- Abbildung 54: Immunfluoreszente Untersuchung von pankreatischen Stammzellen gewachsen auf Laminin- oder Fibrin-beschichteten Deckgläschen unter Kokultur (Koku) mit dazugehörigen Kontrollen ohne Kokultur-Einfluss. Untersucht wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament(NF). (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x)..... - 82 -
- Abbildung 55: Immunfluoreszente Untersuchung pankreatischer Stammzellen nach xenogener Kokultur für zwei Tage im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne Kokultureinfluss). Untersucht wurden die Proteine GFAP, α SMA, Neurofilament (NF) und Ki67. (blau: DAPI; Vergrößerung: 200x)..... - 83 -
- Abbildung 56: Aufbau der Zugversuch-Aparatur am Mikromanipulator. Die chirurgische Klemme wurde an den Mikromanipulatorarm geklebt und auf einen Winkel von 45° eingestellt..... - 84 -
- Abbildung 57: Schematischer Aufbau des Zugversuches. In der Petrischale wird der Agarose-Dummy platziert, zwischen welchem sich die Zellbesiedelte Polyimid-Folie befindet. In flüssigem Millieu wird unter Zug durch den Mikromanipulator der Scherstress auf der Zellbesiedelten Folie simuliert. (Richter et al., 2010)..... - 85 -
- Abbildung 58: Ergebnisse des Scherstress-Tests mit Hirn-Dummy (oben) und Hirn-Hemisphären (unten). Vor dem Scherstress (Zug) sind die Polyimid-Folien konfluent mit pankreatischen Stammzellen besiedelt (links). Wird Scherstress auf sie ausgeübt, schält sich ohne Schutz ein Großteil des Zellrasens ab (mittig), was mit einer Fibrin-Schutzschicht verhindert werden kann (rechts). (blau: DAPI, Vergrößerung: 100x)..... - 86 -
- Abbildung 59: Graphische Darstellung der vergleichenden Metabolismus-Analyse durch Bestimmung des Glucose- und Lactat-Gehaltes im Medium. Die Glucosewerte (Punkt) sind mit ihren korrespondierenden Lactat-Werten (Dreieck) über sieben Tage Dauer aufgetragen. (Richter et al., 2011) - 88 -
- Abbildung 60: Fluoresceindiacetat (FDA)-Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen auf Zellkulturplastik ohne (links) und mit Fibrinbeschichtung (rechts). (Vergrößerung: 100x)- 88 -
- Abbildung 61: Kapillargelelektrophoretische Darstellung der Amplikons aus der Untersuchung des Transkriptoms von pankreatischen Stammzellen auf Zellkulturplastik (oben) und Polyimid ohne (mittig) und mit Fibrinbeschichtung (unten). Die jeweiligen Namen der untersuchten Amplikons wurden darunter den jeweiligen Kapillaren zugeordnet. (Richter et al., 2011) - 89 -
- Abbildung 62: Vergleichende immunfluoreszente Analyse der Proteinexpression

pankreatischer Stammzellen auf Zellkulturplastik (links), Polyimid (mittig) und Fibrin-beschichtetem Polyimid (rechts). Untersucht wurden die Proteine Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament (NF) und Ki67. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x) - 91 -

Abbildung 63: Mikroskopische Beobachtungen der Integration GFP-transgener pankreatischer Stammzellen in kultivierte Hirnschnitte. Für Hirnschnitte aus Ratten in 10%DMEM (links) und 20%DMEM (mittig) wurden bereits innerhalb von drei und fünf Tagen transgene Zellen beobachtet, welche ins Gewebe migrieren. Auch in Hirnschnitten von Nacktmäusen über einen langen Zeitraum von 22 Tagen in 10%DMEM (rechts) fand dies statt. - 93 -

Abbildung 64: Immunfluoreszente Färbung von Stammzellen im Hirnschnitt. Die residenten Stammzellen (oben, Einzelbild) sind Nestin positiv und lokalisieren an Nestin-positiven Fasern im Gewebe. Die GFP-transgenen pankreatischen Stammzellen (unten, Reihe) lokalisieren an den gleichen Strukturen. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 94 -

Abbildung 65: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 98 -

Abbildung 66: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 99 -

Abbildung 67: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFAP-Färbung (grün) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 100 -

Abbildung 68: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 103 -

Abbildung 69: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 104 -

Abbildung 70: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die ED-1-Färbung (rot) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts)

sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 105 -

Abbildung 71: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 108 -

Abbildung 72: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 109 -

Abbildung 73: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Nestin-Färbung (rot) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 110 -

Abbildung 74: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Cortex. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 114 -

Abbildung 75: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Thalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 115 -

Abbildung 76: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die Neurofilament-Färbung (grün) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 116 -

Abbildung 78: Sonde nach zwölf Wochen im Thalamus. Im Grünkanal kann die GFAP-Färbung (grün) nicht von intrinsischer GFP-Fluoreszenz unterschieden werden (A). Erst die Detektion mittels GFP-Antikörper (magenta, B) ermöglicht die Zuordnung des Signals der transplantierten Zellen. (Vergrößerung: 400x). - 117 -

Abbildung 77: GFP-transgene pankreatische Stammzellen in der Zellkultur. Eine unterschiedlich intensive Synthese von GFP in den Zellen wurde beobachtet. (grün: intrinsische GFP-Fluoreszenz, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x) - 117 -

Abbildung 79: Exemplarische Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse des Tierversuchs für die GFP-Färbung (cyan bzw. magenta) im Hypothalamus. Die Proben für die unbehandelte Sonde (links), Fibrin-beschichtete Sonde (mittig) und Stammzell-besiedelte Sonde (rechts) sind für die Zeitpunkte 1 Woche, 6, 12 und 24 Wochen gegenübergestellt. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..... - 118 -

Abbildung 80: Zellbesiedelte Sonden im Thalamus nach 12 Wochen. In der Frontlinie befindliche GFP-Stammzellen (A und C, magenta) sind weder GFAP-positiv (B) noch zeigen sie filamentäre Färbungen für Neurofilamente (D) wie sie im Gewebe vorliegen. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI, Vergrößerung: 400x)..... - 119 -

Abbildung 81: CSPG-positive Zellen (A,B; rot) sind am Implantat nicht akkumuliert und zeigen im überlagerten Bild beider Fluoreszenz-kanäle (B) keine Relation zur reduzierten Neurofilament-färbung (grün) vor dem Implantat. (blau: DAPI, Vergrößerung: 100x).... - 120 -

Abbildung 82: Fibrin-beschichtetes Implantat im Hypothalamus nach 24 Wochen. In einzelnen Abschnitten des Hirngewebes sind distinkte CSPG-positive Zellen (rot) zu beobachten, während andere Bereiche diffus oder ungefärbt sind (A). Es lässt sich jedoch kein Bezug der verschiedenen Färbemuster zur Implantation oder verminderter Neurofilament-Färbung (grün) herstellen (B). (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau: DAPI; Vergrößerung: 100x – Mosaix)..... - 120 -

Abbildung 83: Fibrin-beschichtetes Implantat nach 12 Wochen im Thalamus. In verschiedenen Kompartimenten des Hirngewebe verhält sich die Oligodendrocyten-Färbung gegen O4 (A, rot) unterschiedlich. Es konnte keine veränderte Färbung für O4 in Zusammenhang mit der Gliose (B, grün: GFAP) gebracht werden. (gelbe gestrichelte Linie: ursprüngliche Position des Implantates, gelbe durchgängige Linie: tatsächliche Position des Implantates, blau:DAPI, Vergrößerung: 100x – Mosaix)..... - 121 -

Abbildung 85: Frontlinie und Lining einer Fibrin-beschichteten Sonde nach 24 Wochen im Overlay (A). Vor dem Lining GFAP-positiver Zellen (grün, B) liegt eine dichte Zellmenge (blau: DAPI), welche nur wenige ED-1-positive Zellen (rot, C) enthält. (blau: DAPI, Vergrößerung: 400x)..... - 122 -

Abbildung 84: GFAP-Färbung einer Probe mit Fibrin-beschichteter Sonde nach 24 Wochen. Die GFAP-Filamente (grün) lassen sich bei Betrachtung nur einer Ebene des Präparates schlecht in ihrer Gesamtheit wiedergeben, da sie nicht parallel zur Fokusebene liegen und sich in die unscharfen darüberliegenden Bereiche erstrecken. (blau: DAPI, Vergrößerung: 200x)..- 122 -

Abbildung 86: Fibrin-beschichtete Sonde nach 24 Wochen im Thalamus. Auf der Sonde befinden sich nur einzelne ED-1-positive Zellen (rot). (blau: DAPI, Vergrößerung 400x). - 123 -

Abbildung 87: Stammzell-besiedelte Sonde nach 24 Wochen im Cortex. GFP-transgene Zellen fluoreszieren im Overlay in grün und überstrahlen die Cy5-Färbung des Primärantikörpers gegen GFP (A). In Cy5-Kanal (B) und FITC-Kanal (C) sind jedoch beide Färbungen gut voneinander zu diskriminieren. Blau:DAPI, Vergrößerung: 400x. - 123 -

Abbildung 88: Immunhistochemische Ergebnisse zur Gewebereaktion bei rigiden Implantaten aus Silizium. Die beiden getesteten Implantate wiesen verschiedene Querschnitte auf (oben,

- links und rechts). Unter jedem Implantat sind die Färbungen für GFAP nach 1 Woche, 6 und 12 Wochen in einer 100x und 400x Vergrößerung dargestellt. (Maßstab: 100µm) (Szarowski et al., 2003). - 139 -
- Abbildung 89: Immunhistochemische Ergebnisse zur Gewebereaktion bei rigiden Implantaten aus Silizium. Die beiden getesteten Implantate wiesen verschiedene Querschnitte auf (oben, links und rechts). Unter jedem Implantat sind die Färbungen für ED-1 nach 1 Woche, 6 und 12 Wochen in einer 100x und 400x Vergrößerung dargestellt. (Maßstab: 100µm) (Szarowski et al., 2003). - 140 -
- Abbildung 90: Coronarer Schnitt durch das Gehirn einer transgenen Maus mit beidseitig implantierten rigiden Elektroden im Thalamus. Grün: YFP unter Thy-1-Promotor in Axonen; Rot: Immunhistochemische Färbung gegen GFAP in Astrocyten; Blau: Zellkerne; Gelb: Elektroden. (Quelle: (Asaad and Eskandar, 2008) - 143 -
- Abbildung 91: Wachstumskurven pankreatischer Stammzellen in neuronalen Spezialmedien über 8 Tage. Der obere Graph enthält alle Medien von Invitrogen (1-4) im Vergleich zur Kontrolle (10). Der untere Graph alle Medien von Lonza (5-9) im Vergleich zur Kontrolle (10). - 172 -
- Abbildung 92: Repräsentative Bilder aus dem Vitalitätstest für die neuronalen Spezialmedien. Fluoresceindiacetat färbt lebende Zellen grün. Propidiumiodid färbt tote Zellen rot. (Vergrößerung 100x). - 173 -
- Abbildung 93: Graphische Darstellung aus der Quantifizierung der Vitalitätsuntersuchung mittels Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid. - 174 -
- Abbildung 94: Immunfluoreszenz-Untersuchung zur Differenzierung von pankreatischen Stammzellen in neuronalen Spezialmedien. Alle Medienansätze werden für die Kombinationen Nestin+GFAP (obere Reihe), α SMA+Neurofilament (mittlere Reihe) und β 3-Tubulin+Ki67 (untere Reihe) verglichen. - 175 -
- Abbildung 95: Quantifizierung der RealTime PCR für die Kultivierung pankreatischer Stammzellen in neuronalen Spezialmedien. Jedes Diagramm zeigt die Expression einer mRNA (NF_1, Tubb3, SMA, Nestin, Ki67) zum Haushaltsgen β -Aktin für die einzelnen Medienansätze. Darunter ist der jeweilige Ausschnitt einer Kapillargelelektrophoretischen Auftrennung für die Amplikons abgebildet. - 177 -
- Abbildung 96: Immunfluoreszenz-Analyse zur neuronalen Induktion pankreatischer Stammzellen durch Kultivierung mit konditionierten Medien. Die konditionierten Medien (kondMedium) sind den jeweiligen Kontrollen gegenübergestellt für die Färbungen gegen Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament (NF). - 179 -

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Medikamente mit Bezeichnung, Abkürzung und Hersteller.....	- 27 -
Tabelle 2: Auflistung verwendeter Kits mit zugehörigen Herstellerangaben.....	- 28 -
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmittel einschließlich Hersteller.....	- 28 -
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte einschließlich Hersteller	- 29 -
Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Software und deren Quelle.....	- 29 -
Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten Primer in Form von validierten QuantiTectAssays der Firma QIAGEN, Deutschland.	- 30 -
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primärantikörper nach Zielprotein mit zugehörigem Quellspezies, Verdünnung, Hersteller und Gewebespezifität)	- 31 -
Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Isotypkontrollen. Die Konzentration wurde entsprechend der höchsten verwendeten Antikörperkonzentration im jeweiligen Farbe-Panel eingestellt.....	- 32 -
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Sekundär-Antikörper nach Zielorganismus und Konjugat, mit zugehörigem Ursprungsorganismus, Verdünnung und Hersteller.	- 32 -
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des immunhistochemischen Färbepanels für vier serielle Schnitte einer Hirnregion auf einem Objektträger.....	- 58 -
Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des Belichtungsschemas für die immunfluoreszente Detektion der Proteine in den Proben des Tierversuchs. Zeitangaben in Millisekunden (ms)....	- 58 -
Tabelle 12: Übersicht über die Komposition der neuro-induktiven Spezialmedien.....	- 169 -
Tabelle 13: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von unbehandelte Sonden nach Woche 1 und 6.....	- 180 -
Tabelle 14: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von unbehandelte Sonden nach Woche 12 und 24.....	- 181 -
Tabelle 15: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Fibrin-beschichteten Sonden nach Woche 1 und 6.....	- 182 -
Tabelle 16: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Fibrin-beschichteten Sonden nach Woche 12 und 24.....	- 183 -
Tabelle 17: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Zell-besiedelten Sonden nach Woche 1 und 6.....	- 184 -
Tabelle 18: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Zell-besiedelten Sonden nach Woche 12 und 24.....	- 185 -

7.3. Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD9	<i>Cluster of Differentiation Antigen 9</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
NF	Neurofilament
NF-L	Neurofilament leichte Kette
NF-M	Neurofilament mittelschwere Kette
NF-H	Neurofilament schwere Kette
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	Propidiumiodid
RT	Reverse Transkriptase
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.4. Induzierbarkeit mittels konventioneller Spezialmedien

Für die Untersuchung von neuro-induktiven Effekten serumfreier kommerzieller Spezialmedien wurden folgende Stocklösungen angefertigt und bei 4°C gelagert. Die Komponenten der einzelnen Spezialmedien wurden von Invitrogen (Medium 1-4) oder Lonza (Medium 5-9) bezogen.

Tabelle 12: Übersicht über die Komposition der neuro-induktiven Spezialmedien.

Medium Nr.	Basis Medium	V _{Medium}	Zusätze	V _{Zusätze}	V _{gesamt}
1	Neurobasal A	65 ml			65 ml
2	Neurobasal A	63,7 ml	B27	1,3 ml	65 ml
3	Neurobasal A	63,7 ml	StemPro Neuronal	1,3 ml	65 ml
4	Neurobasal A	62,4 ml	B27 + StemPro Neuronal	1,3 ml + 1,3 ml	65 ml
<i>1-4: allen Ansätzen wurde L-Glutamin 2mM zugesetzt</i>					
5	NPBM	65 ml			65 ml
6	NPMM diff	63,58 ml	NSF-1 G/A	1,29 ml 0,129 ml	65 ml
7	NPMM growth + diff	63,32 ml	NSF-1 G/A hFGF hEGF	1,29 ml 0,129 ml 0,129 ml 0,129 ml	65 ml
8	PNGM	62,99 ml	NSF-1 L-Glu G/A	1,29 ml 0,65 ml 0,065 ml	65 ml
9	PNGM-A	64,36 ml	PA OA	0,48 ml 0,16 ml	65 ml
10	DMEM	58,5 ml	FKS	6,5 ml	65 ml

In den vorangegangenen Versuchen wurde Polyimid als Wachstumsoberfläche für die pankreatischen Stammzellen untersucht. Durch ihre hohe Plastizität verfügen Stammzellen über ein relativ breites Spektrum an Reaktionen auf veränderte Kultivierungsparameter – meist in Form von verstärkten oder reduzierten Fähigkeiten bestimmte Differenzierungsrichtungen einzuschlagen (Engler et al., 2006). Neben der angebotenen Wachstumsoberfläche gehört zu diesen Kultivierungsparametern auch die Komposition des angebotenen Mediums. Es existieren bereits eine Vielzahl konventioneller Spezialmedien für eine Vielzahl von Zelltypen, da nun einmal jeder Zelltyp - insbesondere, wenn er nicht über die Plastizität von Stammzellen verfügt – ganz besondere Anforderungen an sein Milieu stellt. Nun kann man sich die gute Definierbarkeit von diesen Medien auch insofern zu Nutze

machen, als dass man versucht durch gezielte Mixturen aus Medien und Wachstumsfaktoren die Zellen in bestimmte Differenzierungsrichtungen zu "schicken". In den folgenden Analysen wurde untersucht, ob konventionelle neuronale Spezialmedien die intrinsisch gute neuronale Differenzierung der pankreatischen Stammzellen verstärken kann. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob die Zellen in diesen Medien noch proliferieren oder überleben, auch wenn es sich mehrheitlich um serumfreie Medien handelt. Da jedoch definierte Wachstumsfaktoren zugefügt waren, wäre eine Selektion auf eine responsible Subpopulation möglich, welche dann möglicherweise weiterhin mitotisch aktiv ist. Zudem wurde die neurale Differenzierung durch Analysen der typischen Proteine und mRNAs analog zu vorangegangenen Untersuchungen wiederholt. Hierbei sollte bei erfolgreicher neuraler Induktion eine Erhöhung von neuronalen Proteinen und/oder mRNAs detektierbar sein.

Die verschiedenen Medien wurden in einer einfach verblindeten Untersuchung eingesetzt, um eine gute Objektivität zu gewährleisten. Die genaue Formulierung der verschiedenen Medien kann dem Abschnitt 4.2.2.8. entnommen werden. Der Einfachheit halber sollen in diesem Abschnitt die Akronyme der Medien als Benennung beibehalten werden.

Zunächst erfolgte ein Proliferations- und Vitalitätstest, um auf routinemäßiger Zellkulturebene Einflüsse der Medien auf die Zellen feststellen zu können. Es wurde eine Wachstumskurve von je drei identischen Proben über eine Dauer von 8 Tagen aufgezeichnet (Abbildung 91). Die Einsaatzellzahl lag bei 8.500 Zellen pro Quadratzentimeter und nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gespült und mit serumfreiem DMEM überschichtet, um Einflüsse durch Wachstumsfaktoren im fötalen Kälberserum zu reduzieren. Weitere 24 Stunden später wurde das jeweilige Test-Medium nach kurzem Spülen mit PBS hinzugegeben.

Es konnte beobachtet werden, dass in den Ansätzen 2, 3, 8, 9 und 10 noch bis zum ersten Tag eine geringe Proliferation stattfand. Eine geringe Abnahme der Zellzahl zu diesem Zeitpunkt wurde für die Medien 1 und 4 verzeichnet. In den Medien 5, 6 und 7 verringerte sich die Zellzahl hingegen stärker, über den Bereich der Standardabweichungen hinaus. Am zweiten Tag verringerte sich die Zellzahl in allen Proben stark. Da auch die Kontrolle mit dem standardmäßig eingesetzten Kultivierungsmedium DMEM mit 10%(v/v) FKS (Medium 10) dieselbe Tendenz aufweist, scheint es sich hierbei eine populationspezifische Entwicklung zu handeln. Die Form der meisten Wachstumskurven bis zu diesem Tag legt nahe, dass bis zum Tag 1 die noch ablaufenden Proliferationen beendet werden und die Adaption der gesamten Population an das neue Milieu erst am Tag 2 abgeschlossen ist. In den folgenden drei Tagen kann in den meisten Spezialmedien eine Proliferation beobachtet werden, die zur Zunahme der Zellmenge, bis etwa auf das Niveau zu Beginn des Versuches, führt. Nur die Medien 5, 6 und 9 blieben mit ihrer Zellzahl auch an diesem Messpunkt relativ konstant im Vergleich zu

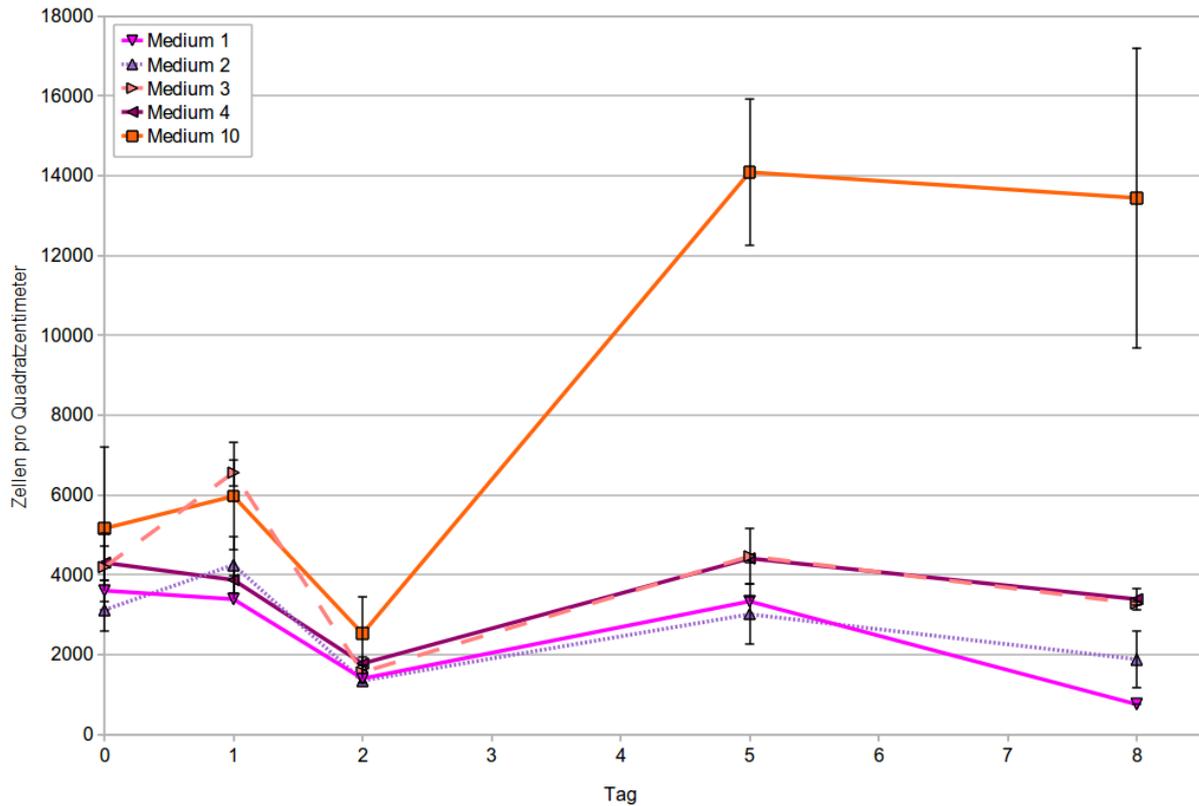
Tag 2. Die Kontrolle (Medium 10) hingegen zeigt eine exponentielle Zunahme der Zellzahl auf ca. 14.000 Zellen pro Quadratcentimeter. Zum Vergleich weisen die Spezialmedien zu diesem Zeitpunkt höchstens 6.200 Zellen (Medium 7) auf. Alle weiteren Spezialmedien zeigten in den folgenden drei Tagen keine weitere Zunahme der Zellzahl, sondern mehrheitlich eine Reduktion. Die Kontrolle verblieb auf ihrem Niveau vom fünften Tag und zeigte somit eine stabile lag-Phase an, unter Erhalt der Population durch Proliferation und dadurch Ersatz seneszenten, sterbender Zellen.

Die Wachstumskurven geben Aufschluss über das Proliferationsverhalten der gesamten Population, jedoch nicht über die Vitalität der adhärenen Zellen. Auch nicht-proliferierende Zellen können vital und funktionell sein, was beispielsweise für ausdifferenzierte Zellen der Fall ist. Um einen Einblick in die Vitalität der Zellen zu erhalten, wurde mit den Reserveproben an Tag 8 eine FDA-PI-Färbung durchgeführt. Hierbei ist für jede Probe für vier randomisierte Bilder eine Quantifizierung der lebenden, metabolisierenden Zellen (grün) und der adhärenen toten Zellen (rote Zellkerne) durchgeführt worden (Abbildung 92 und Abbildung 93).

Da die Auswertung dieser Färbung durch das Absaugen toter Zellen im Überstand während des Färbeprozess keine Aussage über die Anzahl aller toter Zellen in der Population liefern kann, muss diese Fehlerquelle durch die zusätzliche Bewertung der Konfluenz zumindest teilweise kompensiert werden. Die Quantifizierung ergab eine relativ große Anzahl toter Zellen nach acht Tagen Kultivierung in Medium 1, 5, 6 und 9. Zusätzlich waren in diesen Medien relativ wenige vitale Zellen zu beobachten, die im Vergleich zu den anderen Medien sehr wenig konfluent waren. Eine deutlich höhere Konfluenz einhergehend mit weniger toten Zellen in der Quantifizierung zeigten die Medienkompositionen 2 und 4.

Für Medium 3 muss diese Aussage differenzierter getroffen werden. In diesem Ansatz war eine höhere Konfluenz als in Medium 2 und 4 zu beobachten, jedoch ist der Anteil kugelförmiger Zellen wesentlich erhöht. Bei dieser Morphologie ist es schwer zu bewerten, ob die Zellen vital sind, da sie eine erhöhte Eigenfluoreszenz durch ihre Kugelform aufweisen. Offensichtlich sind sie nicht tot, da keine rote Kernfärbung durch das Propidiumiodid zu beobachten war. Jedoch ist ein solches kugelförmiges Stadium typisch für Zellen, die sich gerade in Teilung befinden oder abkugeln und sterben. Welcher dieser Zustände vorliegt, kann diese Untersuchung nicht auflösen, da es in jedem Fall nur Momentaufnahmen der Populationen sind. Jedoch kann in Hinblick auf die spätere Anwendung, der konfluenten Bedeckung von DBS-Elektroden, dieser Zustand als nichtkonfluent deklariert werden. Ein vergleichbares Ergebnis zeigten die Zellen unter Kultivierung mit Medium 8.

Wachstumskurve pankreatischer Stammzellen der Ratte
in verschiedenen neuronalen Spezialmedien



Wachstumskurve pankreatischer Stammzellen der Ratte
in verschiedenen neuronalen Spezialmedien

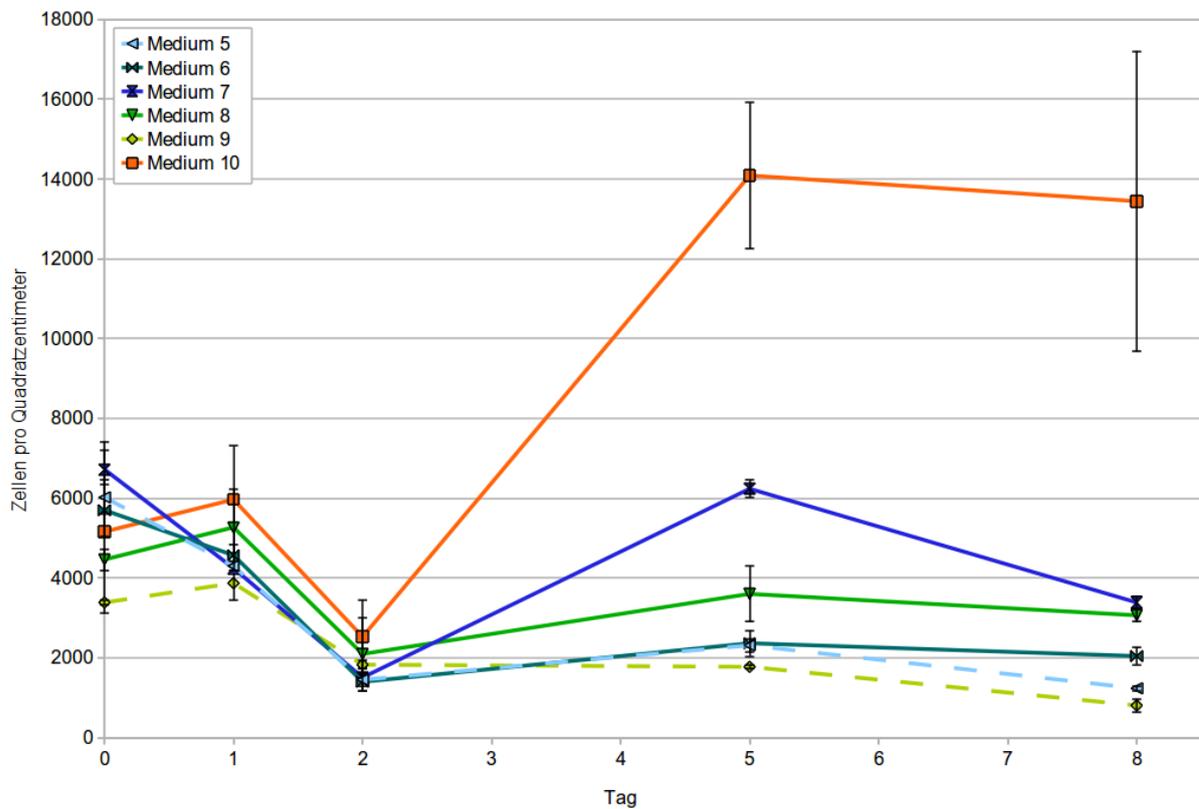


Abbildung 91: Wachstumskurven pankreatischer Stammzellen in neuronalen Spezialmedien über 8 Tage. Der obere Graph enthält alle Medien von Invitrogen (1-4) im Vergleich zur Kontrolle (10). Der untere Graph alle Medien von Lonza (5-9) im Vergleich zur Kontrolle (10).

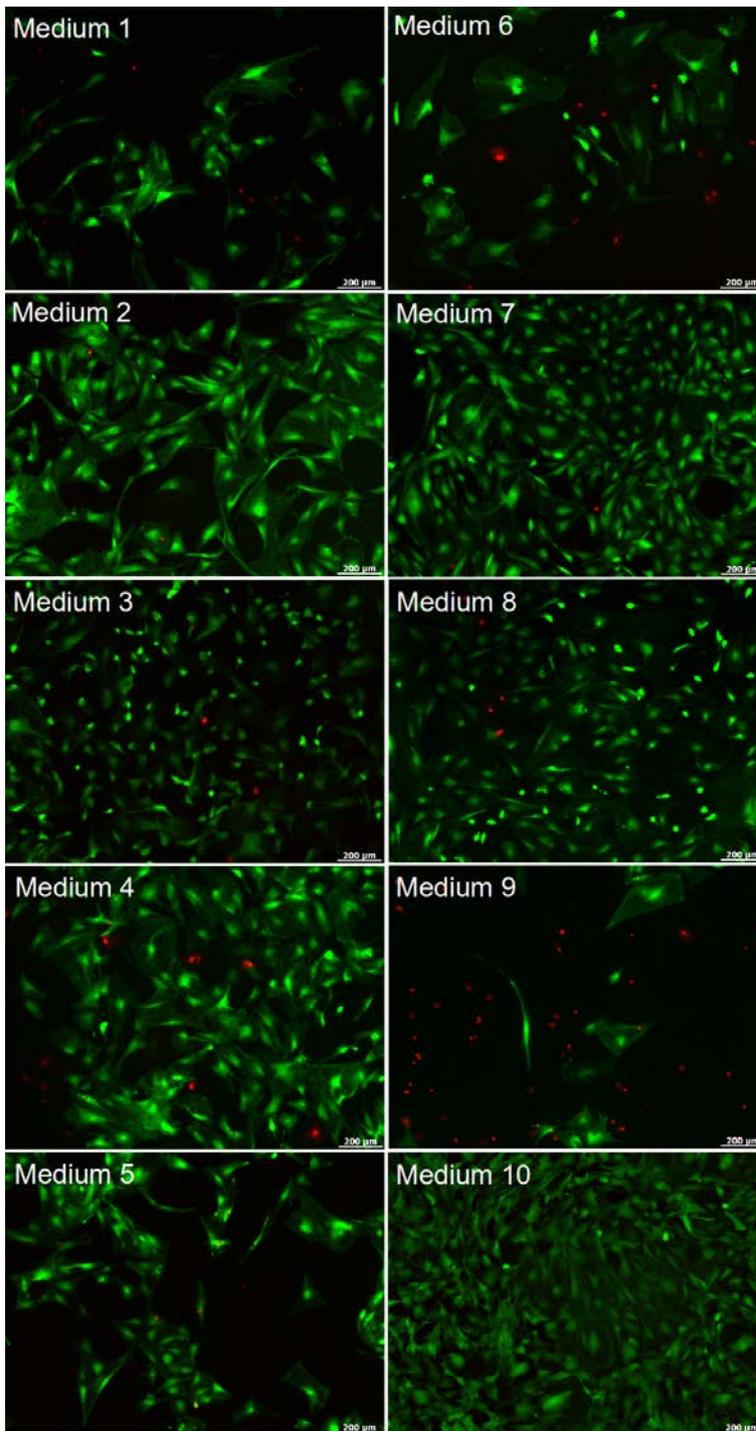


Abbildung 92: Repräsentative Bilder aus dem Vitalitätstest für die neuronalen Spezialmedien. Fluoresceindiacetat färbt lebende Zellen grün. Propidiumiodid färbt tote Zellen rot. (Vergrößerung 100x).

Im Vergleich zur Kultivierung mit dem normalen Zellkulturmedium (Medium 10), welches vollständige Konfluenz und minimale Mengen toter Zellen enthielt, zeichnete sich in diesem Versuch Medium 7 durch die beste Vitalität unter den Spezialmedien und der größten flächigen Zellbedeckung aus.

Korrelierend zu den bisherigen Zellcharakterisierungen wurde nun die Analyse-Ebene für diese Kultivierungsbedingungen vertieft. Es konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass eine starke Selektion auf eine kleine Subpopulation von Zellen der gesamten pankreatischen Stammzellpopulation stattfindet. Sollte diese Tochterzellen mit einem verstärkten neuronalen Potential hervorbringen, würde dies in einer fokussierten Zellcharakterisierung zutage treten. Es wurden folglich immuncytochemische Untersuchungen und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

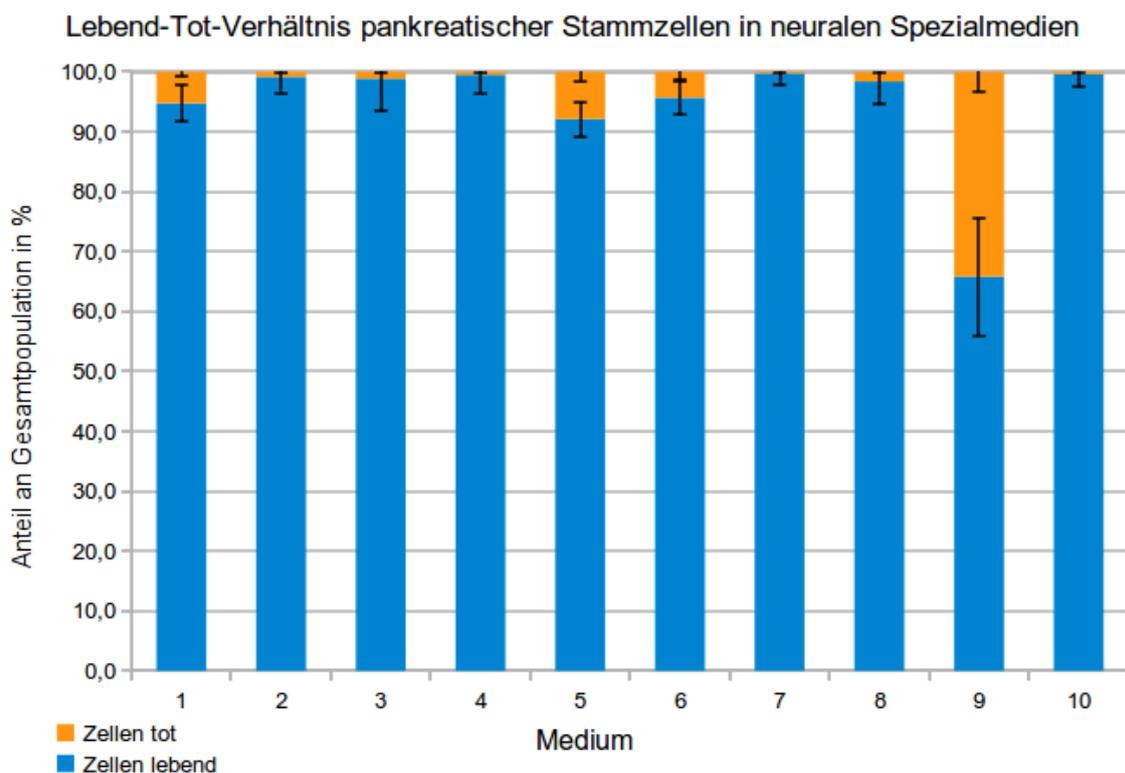


Abbildung 93: Graphische Darstellung aus der Quantifizierung der Vitalitätsuntersuchung mittels Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid.

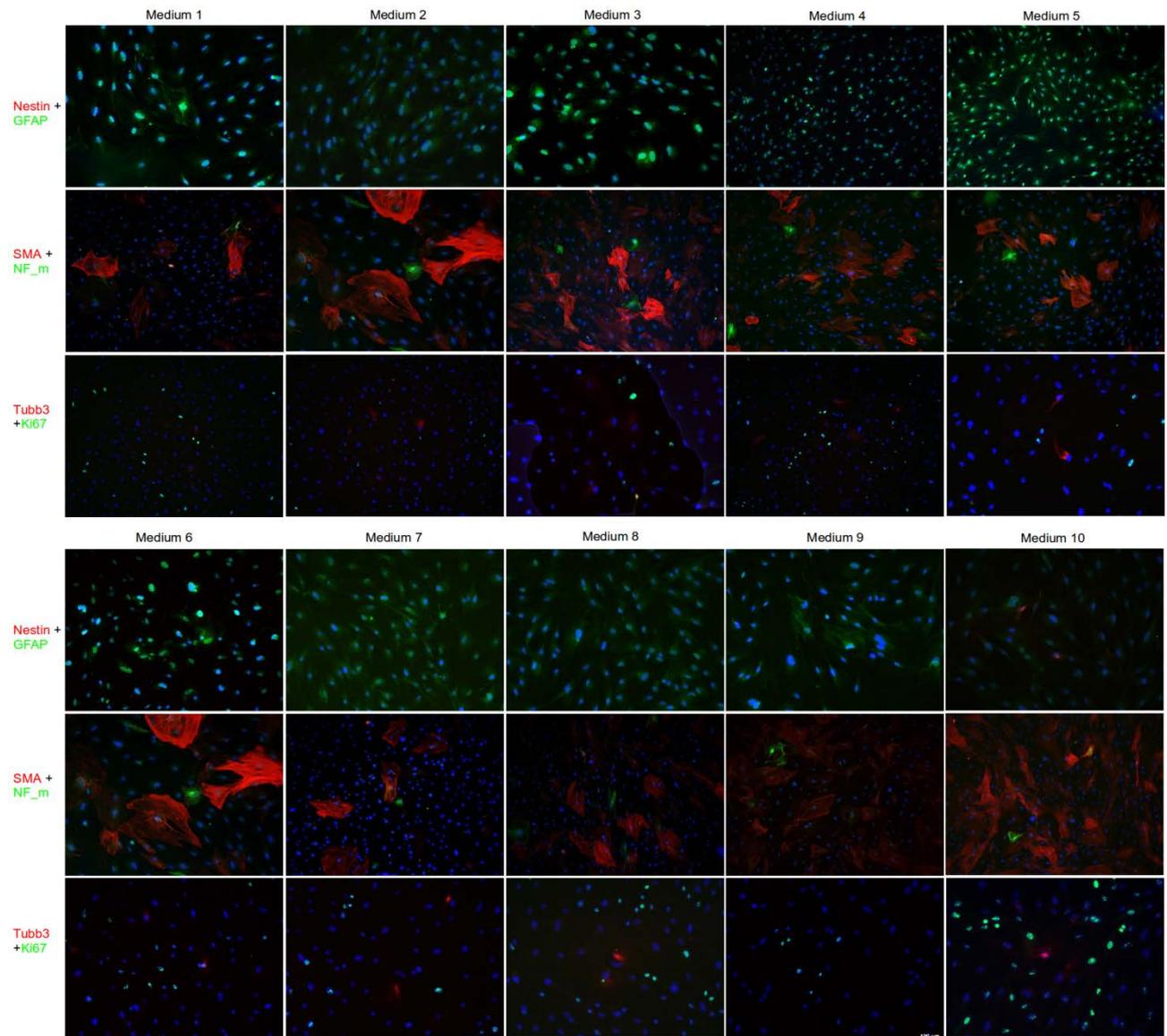


Abbildung 94: Immunfluoreszenz-Untersuchung zur Differenzierung von pankreatischen Stammzellen in neuronalen Spezialmedien. Alle Medienansätze werden für die Kombinationen Nestin+GFAP (obere Reihe), α SMA+Neurofilament (mittlere Reihe) und β 3-Tubulin+Ki67 (untere Reihe) verglichen.

Die immunocytochemische Untersuchung zeigte keine Nestin-positiven Zellen in den Spezialmedien (Abbildung 94). Der zufriedenstellende Nachweis von GFAP gelang ebenso nicht. Viele Zellen erscheinen falsch-positiv grün, jedoch ohne filamentäre Strukturen damit anzuzeigen. α SMA war in allen Proben vorhanden und zeigte keine Unterschiede zum normalen Zellkulturmedium. Selbiges gilt für Neurofilamente. Für β 3-Tubulin wurden unter allen Konditionen ebenfalls einige positive Zellen detektiert. Die Menge Ki67-positiver Zellen schwankt erwartungsgemäß zwischen den Proben. Unter normalen Zellkulturbedingungen ist eine relativ häufige Färbung offensichtlich. Die Population in den Medien 2, 3, 5, 6 und 9 zeigen verhältnismäßig wenig positive Zellen für den Marker. Dies trifft ebenso für Medium 7 zu. Die Proben unter Einfluss von Medium 1, 4 und 8 hingegen enthalten scheinbar mehr Ki67 positive Zellen. Es wurde in keinem Fall eine Kolo-

von Ki67 mit β 3-Tubulin festgestellt.

Die Immunocytochemie zeigte für diese Proben also keine offensichtliche Steigerung der neuronalen Differenzierung. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion über den Zeitraum von acht Tagen noch nicht ausreichend vorangeschritten ist, um eine veränderte Proteinsynthese zu beobachten. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen der mRNA-Produktion und damit einer möglichen veränderten Genexpression angeschlossen. Die zugrundegelegte Hypothese umfasste bei erfolgreicher neuronaler Induktion eine erhöhte Menge mRNA neuronaler Transkripte (Neurofilament mittelschwere Kette, β 3-Tubulin) bei gleichzeitiger Reduktion der Menge nicht-neuronaler Transkripte (α SMA), sowie der für Ki-67. Der Stammzellmarker Nestin könnte durch Reduktion der zugehörigen mRNA eine zunehmende Ausdifferenzierung der Zellen anzeigen.

Betrachtet man die Ergebnisse der RT-PCR mit ihrer quantitativen Auswertung, so ist auffällig, dass die Medien 1, 2, 3 und 6 keine Erhöhung, sondern eher eine Verminderung der neuronalen Neurofilament- (mittelschwere Kette) und β 3-Tubulin-Transkripte sowie für den Stammzellmarker Nestin zeigen (Abbildung 95). Selbiges gilt für α SMA und Ki67. Die Zellen, die mit Medium 4 kultiviert waren, sind über alle diese Marker betrachtet die der Kontrolle am ähnlichsten exprimierende Population. Für die Probe der Kultur mit Medium 5 ließ sich feststellen, dass sie recht viel Neurofilament- und Ki67-mRNA enthielt, jedoch die Transkripte von β 3-Tubulin sowie Nestin in geringerer Menge vorlagen. Die α SMA-mRNA war quantitativ fast abundant. Die Genexpression für Zellen unter Einfluss von Medium 7 weist prominent mRNA für Neurofilament und Nestin auf, normale Mengen von Ki67-mRNA und eine reduzierte Menge Transkripte für β 3-Tubulin- und α SMA. Wurde Medium D zur Kultivierung der pankreatischen Stammzellen verwendet, so konnte mehr mRNA für Neurofilament detektiert werden. Es waren in diesem Ansatz die Mengen von mRNA für Nestin mit denen der Kontrolle vergleichbar.

Die mRNA von α SMA, β 3-Tubulin und Ki67 war im Vergleich zur Kontrolle in geringeren Mengen vorhanden. Im Gegensatz hierzu waren die mRNAs von Neurofilament, α SMA und Ki67 der Zellen in Medium E, bezogen auf die Kontrolle in erhöhter Menge zu finden. Die Menge Nestin-mRNA entsprach für diesen Ansatz etwa der der Kontrolle und die Werte für β 3-Tubulin-mRNA lagen unter denen der Kontrolle.

Betrachtet man die Gesamtheit der Ergebnisse aus der RT-PCR-Untersuchung kann man nicht, wie erwünscht, eine übereinstimmende Tendenz zu neuronaler Differenzierung im mRNA-Profil der untersuchten Proben feststellen.

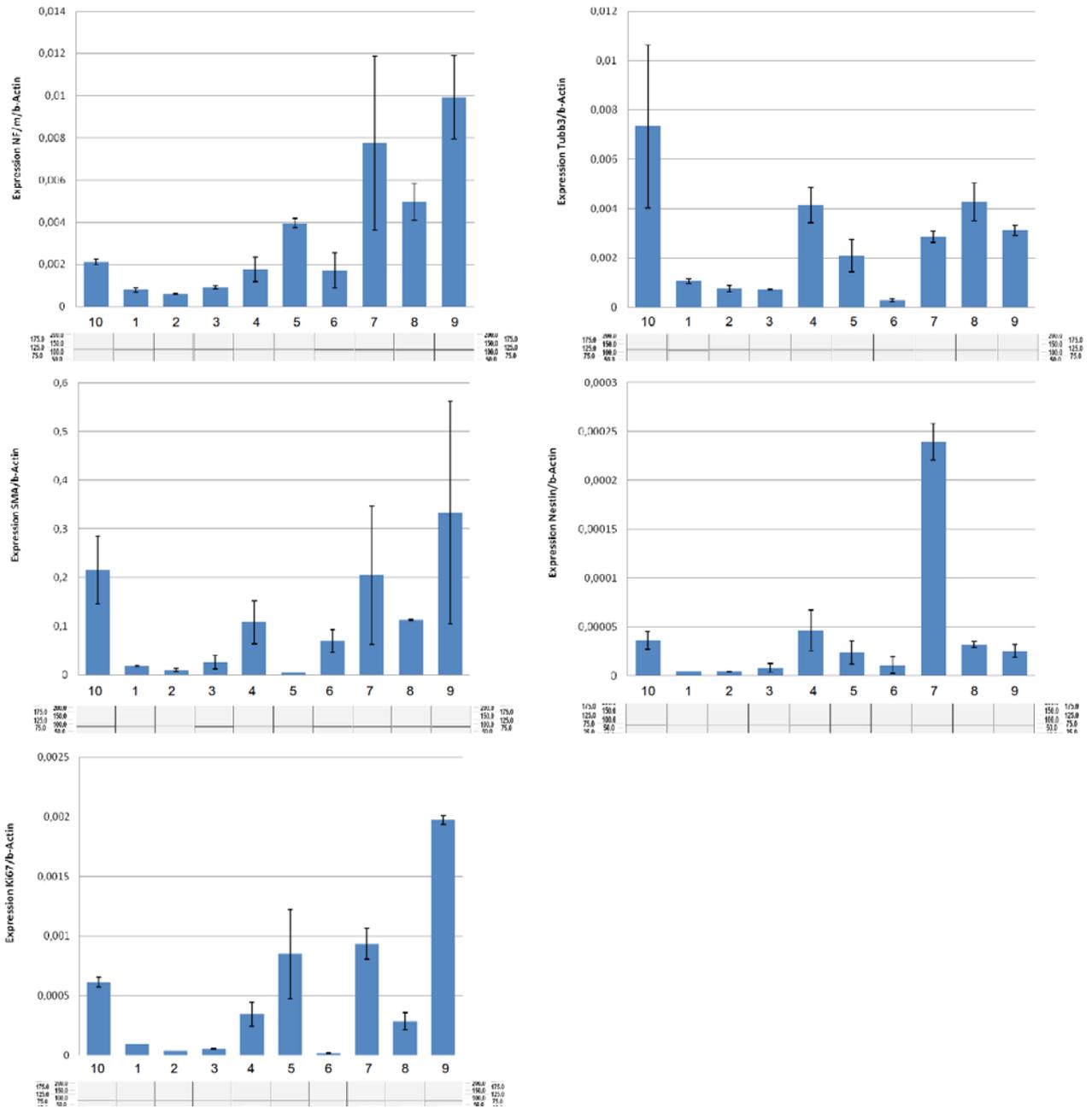


Abbildung 95: Quantifizierung der RealTime PCR für die Kultivierung pankreatischer Stammzellen in neuronalen Spezialmedien. Jedes Diagramm zeigt die Expression einer mRNA (NF_1, Tubb3, SMA, Nestin, Ki67) zum Haushaltsgen β -Aktin für die einzelnen Medienansätze. Darunter ist der jeweilige Ausschnitt einer Kapillargelelektrophoretischen Auftrennung für die Amplikons abgebildet.

Es ist eine zu große Varianz zwischen den einzelnen Ansätzen vorhanden, welche nur eine teilweise Erhöhung für einzelne gewünschte mRNAs zeigen, um von einer konsistenten neuronalen Differenzierung unter einer der verschiedenen Bedingungen zu sprechen. In den Kontext mit den vorangegangenen Untersuchungen zu diesen Medien gesetzt, ergab sich mit dieser Strategie kein erfolgversprechendes Bild für eine Anwendung im Rahmen dieser Arbeit. Es wurde folglich nach anderen Methoden gesucht, die neuronale Induktion der pankreatischen Stammzellen voranzutreiben.

7.5. Induktion neuraler Differenzierung mit konditionierten Medien

Zur Induktion definierter Differenzierungsrichtungen können lösliche Faktoren aus dem Zielgewebe eingesetzt werden. Dies ist einerseits durch definierte Kompositionen an Cytokinen und Hormonen möglich. Da hierbei jedoch schwer die Komplexität der Mischung an löslichen Botenstoffen eines vollständigen Gewebes erreicht werden kann, wurde für folgenden Versuch die zweite Möglichkeit der Induktion von pankreatischen Stammzellen unter Einfluss von löslichen Botenstoffen gewählt – die Stimulation mit konditionierten Medien. Hierzu wurden Biopsien des Zielgewebes, in diesem Fall Hirnbiopsien aus Ratten, mit Medium im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden simultan inkubierte Medien ohne Gewebe eingesetzt.

Für die Herstellung konditionierter Medien wurden 20ml Zellkultur-Medium mit Hitzeinaktiviertem FKS in eine große Zellkulturflasche (150 cm²) gegeben. Nach Entnahme vom Gehirn aus dem Tier wurden das Gewebe wie bei der Kokultur in 2x2 mm große Stücke geschnitten und in der Flasche für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,44 µm gefiltert, um keine kontaminierenden Mikroorganismen den Zellen zuzuführen. Nun konnte das konditionierte Medium auf die konfluent gewachsenen Zellen gegeben werden.

Es wurde in diesen Versuchen DMEM mit 10% und 20% Volumenanteil fötalem Kälberserum verwendet. Zur Untersuchung der mit konditioniertem Medium stimulierten Populationen pankreatischer Stammzellen fand erneut eine Immunocytochemie-Untersuchung der bereits zuvor verwendeten Marker statt (Abbildung 96). In allen Ansätzen sind sowohl für Nestin als auch für GFAP nur wenige positive Zellen beobachtet worden. Unter 10% DMEM vermindert sich die Anzahl der αSMA-positiven Zellen, jedoch ebenfalls die der Neurofilament-positiven Zellen. Für 20% DMEM ließ sich kaum eine Veränderung bezüglich dieser Marker feststellen. Auffällig jedoch war das sehr abnorme Färbemuster der Zellen, welche für die neuronalen Marker positiv waren. Sie schienen, im Vergleich zu den αSMA-positiven Zellen, keine filamentären Strukturen zu enthalten. Insgesamt konnte mit dieser Untersuchung keine erfolgreiche Induktion in die neuronale Differenzierungsrichtung festgestellt werden. Es ist jedoch möglich, dass dies auf fehlender parakriner Interaktion der pankreatischen Stammzellen mit den Biopsien beruht, da in diesem Versuch das Cytokin- bzw. Hormonmilieu zeitlich und örtlich unabhängig voneinander entstand. Ob eine Kopplung beider Prozesse, mit der Möglichkeit zur parakrinen Interaktion, eine bessere Induktion herbeiführen kann, sollten die folgenden Kokultorexperimente zeigen.

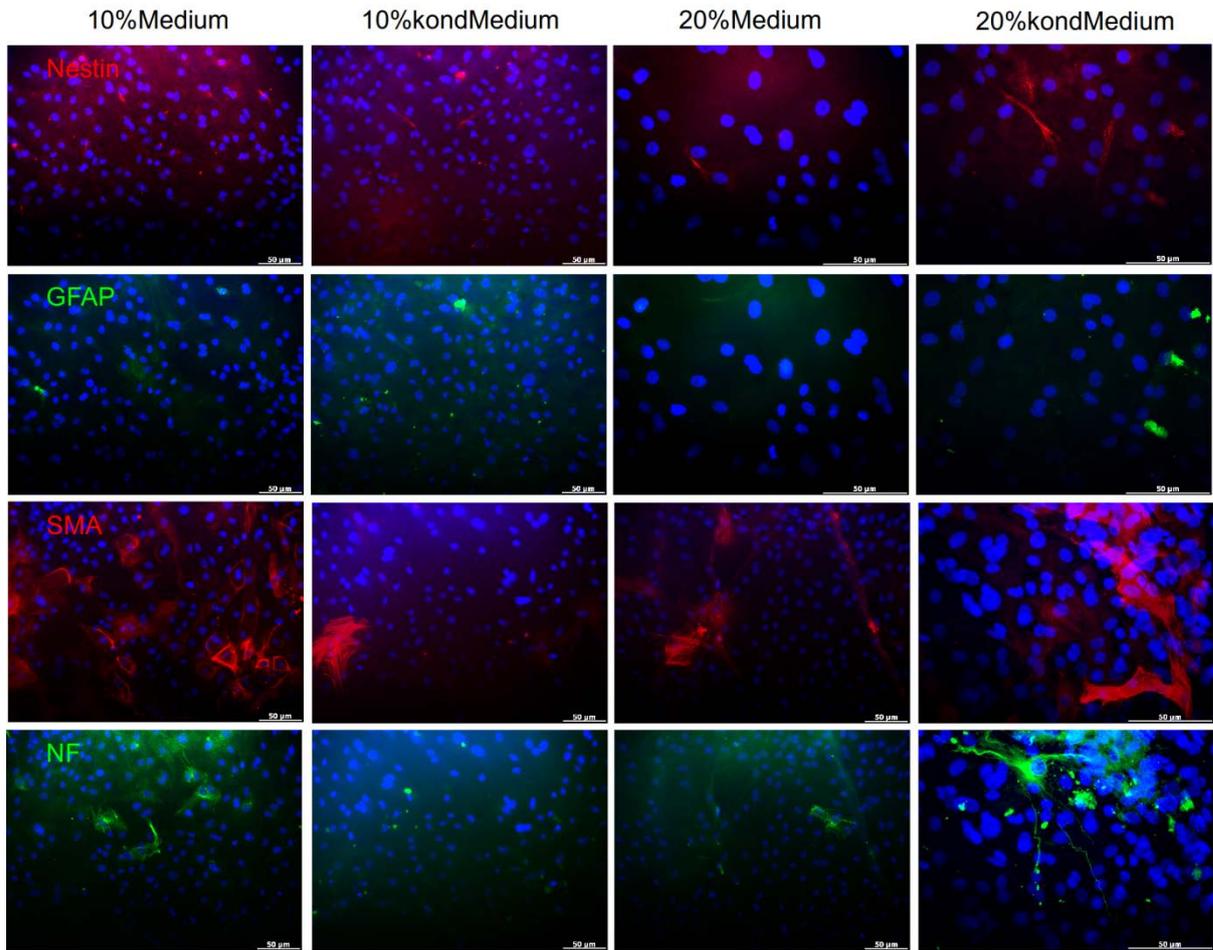


Abbildung 96: Immunfluoreszenzanalyse zur neuronalen Induktion pankreatischer Stammzellen durch Kultivierung mit konditionierten Medien. Die konditionierten Medien (kondMedium) sind den jeweiligen Kontrollen gegenübergestellt für die Färbungen gegen Nestin, GFAP, α SMA, Neurofilament (NF).

7.6. Auswertungstabellen des Tierversuches

Tabelle 13: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von unbehandelte Sonden nach Woche 1 und 6.

Gruppe	unbehandelte Sonde																					
Woche	1																					
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus											
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																						
eindeutig							negativ							negativ	x					x		wenige Zellen an Sonde und in Peripherie
GFAP						x	x						x	x				x		x	x	wenig Aktivierung vor Sonde Einzelzellen
eindeutig							kaum Aktivierung							kaum Aktivierung wenige Zellen peripher								
Lining																						
Belt																						
CSPG													x	nicht in Relation zur Sonde							x	nicht in Relation zur Sonde
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																						
NF						x	x						x	x								x
eindeutig							in Läsion Zellen zerstört sonst weiträumig positive Färbung						x	x	Gewebe positiv bis vor Sonde negativ wo Läsion ist							Gewebe positiv starke Akku mit wenig Fil.
Gradient																						
GFAP-Ausschluß	x	x																				
ED-1						x	x									x	x					x
viel							viele Zellen an Insertion in Peripherie Gradient															viele Zellen in Läsion und in Peripherie
wenig																						
Gradient																						
unipolare Infiltration																						
O4													x	nicht in Relation zur Sonde							x	nicht in Relation zur Sonde
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																						
GFP							negativ							negativ								negativ
eindeutig																						
+GFAP																						
+Nestin																						
Woche	6																					
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus											
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																						
eindeutig							negativ		x			(x)	schön in Frontlinie						x			ein Cluster in I-Kanal
GFAP						x	x				x	x	x				x		x	x		starke Aktivierung weitreichend
eindeutig							100µm vor Sonde leichte Aktivierung															
Lining																						
Belt																						
CSPG													x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																						
NF							x						x	x								x
eindeutig							insgesamt wenig gefärbt ein paar Zellen schön filamentär an Sonde nicht						x	x	Gewebe positiv klar abgegrenzter Bereich vor Sonde schwach gefärbt (Keil)						x	Gewebe positiv (inhomogen) Gradient in Filamenten Frontlinie negativ
Gradient																						
GFAP-Ausschluß																						
ED-1		x	x																			x
viel							an/auf Sonde Zellen wenig in Peripherie															nur in Frontlinie relativ viele
wenig																						
Gradient																						
unipolare Infiltration																						
O4													x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																						
GFP							negativ							negativ								negativ
eindeutig																						
+GFAP																						
+Nestin																						

Tabelle 14: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von unbehandelte Sonden nach Woche 12 und 24.

Gruppe	unbehandelte Sonde						Thalamus						Hypothalamus					
Woche	12																	
Region	Cortex						Thalamus						Hypothalamus					
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie
Nestin																		
eindeutig					x	x		x			x							x
	Einzelzellen peripher schön						in Peripherie singuläre Z.						einzelne Zellen in Peripherie					
GFAP																		
eindeutig			x	x	x				x	x	x					x		x
Lining																		
Belt								x										
	isomorph starke Aktivierung weitreichend						anisomorph starke Aktivierung weitreichend starker Belt						viel Aktivierung vor Sonde mässig viel in Peripherie					
CSPG																		
eindeutig						x						x						x
gleichmässig																		
	nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde					
NF																		
eindeutig	x	x			x	x	x				x	x	x	x				x
Gradient																		
GFAP-Ausschluß																		
	schöne Filamentäre Zellen bis vor Sonde, große Cysten, vor Sonde Dystrophie(?)						Gewebe positiv, tw. kurze Fil. an sonde kurze, dicke Filamente oft punktuelle Färbung in Gewebe						bis Sonde Filamente (<20µm) in Peri relativ geringe Dichte und inhomogen					
ED-1																		
viel									x									
wenig	x	x								x			x	x				x
Gradient																		
unipolare Infiltration																		
	an/auf Sonde Akkumulation						stark gefärbt in Belt wenige in Peripherie						v.a. auf/an Sonde einzeln in Peripherie					
O4																		
eindeutig						x						x						x
gleichmässig																		
	nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde					
GFP																		
eindeutig																		
+GFAP																		
+Nestin																		
	negativ						negativ						negativ					
Woche	24																	
Region	Cortex						Thalamus						Hypothalamus					
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie
Nestin																		
eindeutig		x				x		x										x
	einzelne Zellen gefärbt						einzeln in Frontlinie						einzelne Zellen in Peripherie					
GFAP																		
eindeutig			x	x	x						x	x				x		x
Lining																		
Belt								x								x		
	anisomorph Gliose max 100µm dichter Zellverband						wenig Aktivierung fast nur noch Belt						starker Belt einige Zellen assoziiert wenig in Peripherie					
CSPG																		
eindeutig						x						x						x
gleichmässig																		
	nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde					
NF																		
eindeutig					x	x					x	x						x
Gradient																		
GFAP-Ausschluß		x												x				
	Gewebe gefärbt vor Sonde negative Frontlinie						Gewebe positiv , aber große Lücke vor Sonde (> 100µm) dazwischen punktuelle Färbung						unipolare Zellmenge positiv unregelmässige Färbung vor Sonde Gradient Frontlinie negativ					
ED-1																		
viel																		
wenig	x	x					x				x		x					
Gradient																		
unipolare Infiltration																		
	vor Sonde einige Zellen						sehr wenige in Proben						Einzelzellen in Frontlinie					
O4																		
eindeutig						x						x						x
gleichmässig																		
	nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde						nicht in Relation zur Sonde					
GFP																		
eindeutig																		
+GFAP																		
+Nestin																		
	negativ						negativ						negativ					

Tabelle 15: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Fibrin-beschichteten Sonden nach Woche 1 und 6.

Gruppe	Fibrin-beschichtete Sonde																						
Woche	1																						
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus												
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		
Nestin																							
eindeutig							negativ	x					x		x						x		
	viele positive Zellen um Sonde							starke Färbung um Läsion															
GFAP																							
eindeutig						x	x				x		x	x				x			x	x	
Lining							im Gewebe positiv																
Belt							keine Gliose																
	lockere und geringe Aktivierung peripher, Lining beginnt (?)							lockere periphere Aktivierung weitreichend															
CSPG																							
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde															x	
gleichmässig														x								nicht in Relation zur Sonde	
NF																							
eindeutig							x	x						x	x							x	x
Gradient		x	x				Gewebe positiv, weniger Zellen vor Sonde															Gewebe positiv	
GFAP-Ausschluß	x						Läsion negativ															starke Zellakku (negativ)	
	viele punktuelle Färbungen							viele Zellen an Insertion vor Sonde parallel Anordnung							viele Zellen an Insertion Peripherie gering								
ED-1																							
viel					x	x	viele Zellen an Insertion in Peripherie Gradient					x				x	x				x		
wenig													x									viele Zellen in Läsion peripher weniger	
Gradient						x																	
unipolare Infiltration																							
O4																							
eindeutig							x							x								x	
gleichmässig							nicht in Relation zur Sonde															nicht in Relation zur Sonde	
GFP																							
eindeutig							negativ															negativ	
+GFAP																							
+Nestin																							
Woche	6																						
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus												
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		
Nestin																							
eindeutig							negativ						x									Eigenfluoreszenz negativ,	
	punktförmig in Frontlinie, fast nur in Peripherie (plaque)							dispers im Gewebe															
GFAP																							
eindeutig				x		x	x				x		x	x				x			x	x	
Lining							Lining beginnt, dahinter einzelne Zellen aktiviert															Lining und assoziierte positive Zellen wenig in Peripherie	
Belt																							
	weitreichende + max. Aktivierung Lining							dispers im Gewebe							wenige in Frontlinie selten auf Sonde								
CSPG																							
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde															x	
gleichmässig														x								nicht in Relation zur Sonde	
NF																							
eindeutig							x						x	x				x			x	x	
Gradient							generell wenig Zellen															starke Färbung bis Frontlinie	
GFAP-Ausschluß																						kleine Cysten	
	Bündel sichtbar							einzelne Cluster in Peripherie Gewebe punktuell gefärbt							Bündel sichtbar								
ED-1																							
viel	x	x					an/auf Sonde Zellen Peripherie negativ																
wenig																							
Gradient																							
unipolare Infiltration																							
O4																							
eindeutig							x							x								x	
gleichmässig							nicht in Relation zur Sonde															nicht in Relation zur Sonde	
GFP																							
eindeutig							negativ															negativ	
+GFAP																							
+Nestin																							

Tabelle 16: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Fibrin-beschichteten Sonden nach Woche 12 und 24.

Gruppe	Fibrin-beschichtete Sonde																						
Woche	12																						
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus												
	auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe
Nestin																							
eindeutig			x	x					x	x				x									x
	kleine Cluster, schön								punktförmig nahe Sonde Strang in Peripherie								punktförmige Zellen an Saum + peripher						
GFAP																							
eindeutig						x	x				x		x	x					x			x	x
Lining					x						x								x				
Belt																							
	lockeres Lining								Lining								lockeres Lining						
	fast keine Aktivierung								reduzierte Aktivierung								wenig Aktivierung						
	dahinter								<100µm								peripher						
CSPG																							
eindeutig							x								x								x
gleichmässig	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde						
NF																							
eindeutig						x	x		x		x			x	x							x	x
Gradient																				x			
GFAP-Ausschluß	x	x		x		x																	
	dort wo viel GFAP, wenig Färbung (punktförmig), graduell zunehmend								wenig filamentäre Färbung im gesamten Bereich								Gewebe positiv (Bündel) Gradient vor Sonde (200µm) an Sonde keine pos. Z.						
ED-1																							
viel		x	x																				
wenig										x				x									
Gradient																x	x						
unipolare Infiltration																							
	ausgeprägte Frontlinie								wenige in Gewebe und an Frontlinie								fast nur an/auf Sonde in Peripherie nicht eindeutig						
O4																							
eindeutig							x								x								x
gleichmässig	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde						
GFP																							
eindeutig																							
+GFAP																							
+Nestin																							
	negativ								negativ								negativ						
Woche	24																						
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus												
	auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontlinie	in Gliose	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe
Nestin																							
eindeutig				x		x		x															x
	einzelne Zellen positiv								diffus in Peripherie einzelne Z. auf Sonde								punktförmige Färbung in Peripherie						
GFAP																							
eindeutig						x	x							x	x					x		x	x
Lining					x	x								x					x				
Belt																							
	Lining und Frontlinie								Lining und Aktivierung								Lining un einige assoziierte Zellen						
	min. Aktivierung								locker, weitreichend								graduelle Reduktion						
CSPG																							
eindeutig							x								x								x
gleichmässig	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde						
NF																							
eindeutig						x	x							x	x		x	x	x			x	x
Gradient																							
GFAP-Ausschluß								x	x														
	gefärbtes Gewebe								Gewebe positiv								Färbung bis zum Implantat						
	starke Frontlinie negativ								Reduktion vor Sonde (100µm)								lockerer Verband im Gewebe						
	evtl. Gradient in Gliose								negativer Saum vor Sonde								mässig viele Zellen gefärbt						
ED-1																							
viel																							
wenig			x					x													x	x	
Gradient																							
unipolare Infiltration																							
	ein Cluster positiv								wenn vorhanden, dann nur auf Sonde								keine eindeutige Z. schwache Signale						
O4																							
eindeutig							x								x								x
gleichmässig	nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde								nicht in Relation zur Sonde						
GFP																							
eindeutig																							
+GFAP																							
+Nestin																							
	negativ								negativ								negativ						

Tabelle 17: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Zell-besiedelten Sonden nach Woche 1 und 6.

Gruppe	Zell-besiedelte Sonde																							
Woche	1																							
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus													
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																								
eindeutig	x	x			x			dort wo GFP+	x	x				x		schwach vor/an Sonde	x					x		schöne Anhäufung positiver Z. nahe Sonde
GFAP								isomorph								isomorph								anisomorph
eindeutig				x		x	x	starke Aktivierung			x		x	x	starke Aktivierung				x		x	x	starke Aktivierung	
Lining															weitreichend				x				graduelle reduziert	
Belt																							Lining (?)	
CSPG																								
eindeutig								nicht in Relation zur Sonde							nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																								
NF																								
eindeutig						x	x	Gewebe positiv						x	x	Gewebe positiv						x	x	Gewebe positiv bis Frontlinie
Gradient				x				dort wo GFAP + an Sonde								Läsion negativ						x		Gradient in Filamenten
GFAP-Ausschluß	x	x						schwächer										x						
ED-1																								
viel					x			viele Zellen an Insertion	x	x				x	viel in Insertion		x	x					viele in/an Läsion	
wenig								in Peripherie Gradient							Gradient in Peripherie							x	wenig in Peripherie	
Gradient						x							x											
unipolare Infiltration																								
O4																								
eindeutig							x	nicht in Relation zur Sonde							nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																								
GFP																								
eindeutig		x						dort wo Nestin im Saum liegt	x						dort wo Nestin im Saum liegt									nicht eindeutig
+GFAP																								
+Nestin	x								x															
Woche	6																							
Region	Cortex					Thalamus					Hypothalamus													
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																								
eindeutig		x	x					einzelne Zellen vor Sonde		x				x	punktförmig in Peripherie									negativ
GFAP																								
eindeutig				x		x	x	anisomorph			x		x	x	starke Aktivierung				x		x	x		Belt und starke
Lining								max. Aktivierung							graduell abnehmend								Aktivierung	
Belt				x				bis 200 µm Radius							kein Belt o. Lining				x				weitreichend	
CSPG																								
eindeutig								nicht in Relation zur Sonde							nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																								
NF																								
eindeutig						x	x	Gewebe positiv, je näher						x	x	I-Kanal: viele negative Z.						x	x	Distanz (<20µm)
Gradient					x			am Implantat, desto							Gewebe positiv aber <100µm								intensive Färbung bis Frontlinie	
GFAP-Ausschluß	x	x						schwächer							vor Implantat filamentäre Z.								tw. Punktuell, wo filamentär	
															in niedriger Dichte			x					schwächer (entfernt von Sonde)	
ED-1																								
viel																								
wenig	x	x						einzelne Cluster an Läsion	x	x				x	ein Paar vor/an Sonde		x				x	x	Cluster in I-Kanal ,	
Gradient															wenig in Peripherie								einzelne in Peripherie	
unipolare Infiltration																							oder an Sonde(Ende)	
O4																								
eindeutig							x	nicht in Relation zur Sonde							nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde
gleichmässig																								
GFP																								
eindeutig								nicht eindeutig							nicht eindeutig									nicht eindeutig
+GFAP																								
+Nestin																								

Tabelle 18: Auswertungstabelle des Tierversuches für die Proben von Zell-besiedelten Sonden nach Woche 12 und 24.

Gruppe	Zell-besiedelte Sonde																							
Woche	12																							
Region	Cortex						Thalamus						Hypothalamus											
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																								
eindeutig	x	x					Einzelzellen nahe Sonde	x						x	in Peripherie wenig schöner Saum wo GFP								negativ	
GFAP																								
eindeutig			x		x		nur Lining			x		x	x	einzelne Zellen aktiviert								x	Belt	
Lining			x				wenig Aktivierung							in Peripherie hinter Belt									wenig punktierte Z. peripher	
Belt							max. 30µm			x				davor wenige negative Z.				x						
CSPG																								
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde							nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde	
gleichmässig																								
NF																								
eindeutig						x	scharf abgegrenzter Saum	x					x	homogene Färbung ab 50µm			x	x		x	x		homogene Färbung bis Sonde	
Gradient							negativ an Implantat (< 50µm)							hinter schmaler Exklusion an I									an Sonde scheinbar Belt	
GFAP-Ausschluß	x	x					tw. Gewebe punktiert gefärbt							wenig Filamente an Sonde									Zellcluster sichtbar (?)	
ED-1																								
viel																								
wenig	x	x					wenige, einzelne Zellen	x						nur Zellen auf Sonde									negativ	
Gradient							an Sonde							oder in direktem Kontakt										
unipolare Infiltration																								
O4																								
eindeutig						x	nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde	
gleichmässig																								
GFP																								
eindeutig							nicht eindeutig	x						dort wo Nestin-Saum ist			x						einzelne Zellen an Sonde	
+GFAP																								
+Nestin								x																
Woche	24																							
Region	Cortex						Thalamus						Hypothalamus											
	auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe		auf Sonde	an Sonde	in Frontline	in Glöse	in I-Kanal	in Peripherie	in Gewebe	
Nestin																								
eindeutig		x				x	wenige Einzelzellen positiv	x					x	an/nahe Sonde (Plaques)								x	punktuell gefärbt aber keine Relation zu Sonde	
GFAP																								
eindeutig							Lining nur an Enden						x	wenig aktivierte Zellen								x	Belt	
Lining							min. Aktivierung							einzelnen hinter									wenig Z. peripher	
Belt			x				wenig in Gewebe			x				Belt (dünn)				x					punktförmig gefärbt	
CSPG																								
eindeutig							nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde	
gleichmässig																								
NF																								
eindeutig						x	Gewebe positiv						x	bis direkt vor Sonde positiv			x	x	x		x	x	Färbung bis zur Sonde	
Gradient						x	Gradient vor Sonde							Gradient mit zunehmender									Gewebe homogen stark gefärbt	
GFAP-Ausschluß							(ca. 100µm)							Dichte									Bündel bis vor Sonde	
ED-1																								
viel																								
wenig							nicht ansprechbar				x			eine Zelle in I-Kanal			x				x		schwache, kristalline	
Gradient														sonst viel Hintergrund									Färbung (Artefakt ?)	
unipolare Infiltration																								keine Z. eindeutig
O4																								
eindeutig						x	nicht in Relation zur Sonde						x	nicht in Relation zur Sonde								x	nicht in Relation zur Sonde	
gleichmässig																								
GFP																								
eindeutig		x					an Sonde wenig Zellen	x						auf Sonde									nicht eindeutig	
+GFAP																								
+Nestin																								

7.7. Wissenschaftliche Publikationen

Richter, A., Kruse, C., Moser, A., Hofmann, U.G., and Danner, S. (2011). Cellular modulation of polymeric device surfaces: promise of adult stem cells for neuroprosthetics. *Frontiers in Neuroscience* 5.

Bader, A., Lorenz, K., Richter, A., Scheffler, K., Kern, L., Ebert, S., Giri, S., Behrens, M., Dornseifer, U., Macchiarini, P., *et al.* (2011). Interactive role of trauma cytokines and erythropoietin and their therapeutic potential for acute and chronic wounds. *Rejuvenation Res* 14, 57-66.

Kongressbeiträge:

P. Klimach, A. Richter, S. Danner, C. Kruse, V. Tronnier, U.G. Hofmann (2012) Automated image analysis of immunohistochemical stained brain slices after long term polyimide brain implants; 46th annual conference of the German Society for Biomedical Engineering - BMT 2012 - Reguläre Beiträge; in press as 4 pages in *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering - de Gruyter*

S Löffler, Y Xie, P Klimach, A Richter, T Stieglitz, U G Hofmann (2012) Long term in vivo stability and frequency response of polyimide based flexible array probes; 46th annual conference of the German Society for Biomedical Engineering - BMT 2012 - Reguläre Beiträge; in press as 4 pages in *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering - de Gruyter*

Richter, A., Kruse, C., Hofmann, U., and Danner, S. (2009). Cell-based improvement of neural prosthetic device. *Tissue Engineering Part A* (2009) 15, 675-737, DOI:10.1089/ten.tea.2009.1500|2009

Richter, A., Loeffler, S., Moser, A., Kruse, C., Hofmann, U., and Danner, S. |(2009) Improvement of neural prosthetic devices using adult pancreatic stem cells. *Biomaterialien* (2009) 10, 104; ISSN:1616-0177|2009

Richter, A., Kruse, C., Hofmann, U.G., and Danner, S. (2010). Applying controlled shear stress on cell covered microprobes. *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering - de Gruyter* 55, 4.

Richter et al. (2011); Organotypic brain slice cultures can be used to simulate transplantation studies in vitro. *Biomed Tech* 2011; 56 (Suppl. 1).

7.8. Diplomurkunde

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Naturwissenschaftliche Fakultät

Diplom

Frau Anja Richter

geboren am 30. November 1981 in Dresden

hat am 17. März 2008 die Diplomprüfung im Studiengang

Biologie

der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg bestanden.

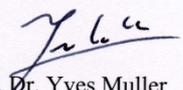
Auf Grund dieser Prüfung wird hiermit der akademische Grad

Diplom-Biologin Univ.

(abgekürzte Schreibweise: Dipl.-Biol. Univ.)

verliehen.

Der Vorsitzende
des Prüfungsausschusses


Prof. Dr. Yves Muller

Erlangen, 5. Juni 2008



7.9. Diplomzeugnis

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Naturwissenschaftliche Fakultät
Prüfungszeugnis

Frau Anja Richter

geboren am 30. November 1981 in Dresden
hat am 17. März 2008 die

Diplomhauptprüfung im Studiengang Biologie

abgeschlossen.

Die einzelnen Prüfungsleistungen wurden wie folgt bewertet:

Diplomarbeit: „Effekte von Erythropoetin auf primäre Fibroblasten dermalen Herkunft“	1,0 = sehr gut
Entwicklungsbiologie Prüfer: Prof. Dr. Büning	1,7 = gut
Genetik Prüfer: Prof. Dr. Winkler	2,7 = befriedigend
Biotechnik Prüfer: Prof. Dr. Müller	1,7 = gut
Immunologie Prüfer: Prof. Dr. Jäck	1,3 = sehr gut

Gesamtnote: 1,5 = sehr gut

Erlangen, 5. Juni 2008



Der Vorsitzende
des Prüfungsausschusses


Prof. Dr. Yves Müller

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Charli Kruse und Prof. Ulrich Hofmann für die Möglichkeit ein solch spannendes und herausforderndes Thema im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeiten zu dürfen. Ihre nahezu kompromisslose Unterstützung während der Durchführung, sowie ihre kontinuierlichen Anregungen bei Problemstellungen und Fortschritten suchen ihresgleichen.

Frau Dr. Sandra Danner bin ich besonderem Dank verpflichtet, da ihre außerordentliche Unterstützung bei allen erdenklichen Fragestellungen, sowie ihre herzliche und ehrliche Art weit über die Selbstverständlichkeiten einer Arbeitsgruppenleiterin hinausgehen. Ihre wohlwollende Kritik stieß nicht immer sofort auf offene Ohren, führte aber in jedem Fall zu einer Einsicht.

Herrn Prof. Moser und Herrn Prof. Tronnier gilt mein Dank in der Durchführung und Unterstützung der Tierversuche und bei neurologischen bzw. neurochirurgischen Fragestellungen.

Prof. Thomas Stieglitz und seinem Team danke ich für die Bereitstellung der Implantate.

Meinen Kollegen Dr. Anett Schumacher und Yijing Xie sowie den Tierpflegern der Universität zu Lübeck möchte ich für die tolle Zusammenarbeit bei der Durchführung der Tierversuche danken.

Ein weiterer besonderer Dank gebührt Emma Braun, die mit ihren exzellenten Fähigkeiten und ihrer Ruhe eine essentielle Unterstützung in der Durchführung der Tierversuchs-Analyse war.

Außerdem gilt mein Dank meinem Neuro-Team mit Benjamin Fell, Martina Elsner und Mariessa Stademann, welche unermüdlich mit mir die noch so kniffligsten Experimente durchführten und mir viel Freude bereitet haben.

Unserer Arbeitsgruppe auch ein herzliches Dankeschön für ihr großes Verständnis, wenn ich mal wieder im „Freak-Modus“ unterwegs war und für die vielen spannenden und lustigen Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, welche jederzeit meinen Kopf aufrichteten, wenn er nicht mehr nach vorn sah.

Meinem Bruder danke ich für die unzähligen beruhigenden Worte und hilfreichen Ratschläge.

Schließlich gilt ein besonderer Dank Friedrich Kohlmann, für seine grenzenlose Unterstützung und Geduld.