

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Holger Busse
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos

**Charakterisierung von neuronalen Stammzellen des
Hühnchens (*Gallus domesticus*) *in vitro***

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Schneider, Nina Kathrin
aus Paderborn

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. P. Young

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Holger Busse
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. P. Young

ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung von neuralen Stammzellen des Hühnchens (*Gallus domesticus*) *in vitro* Schneider, Nina Kathrin

Besonders im Hinblick auf die faszinierenden und vielfältigen therapeutischen Aussichten stehen Stammzellen im Focus moderner Forschung. Andererseits ist Stammzellforschung mit z.T. heftig diskutierten Problemen assoziiert, allen voran die ethischen Einwände. Dadurch ist das Thema der Herkunft bzw. Beziehbarkeit von Stammzellen in den Vordergrund gerückt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von neuralen Vorläufer-Zellen aus der Neuralleiste des 48h alten Hühnchenembryos als Stammzellmodell untersucht.

Ziel unserer Arbeit war zum einen, geeignete Bedingungen für die Kultivierung, Neurosphärenbildung und Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen des Hühnchens zu etablieren. Zum anderen sollte gezeigt werden, dass es sich bei dem Hühnchenmodell um ein attraktives System zur Stammzellforschung handelt.

Dafür wurden die Stammzellen aus dem embryonalen Hühnchen extrahiert und nach Supplementierung des Mediums mit NGF, NT4 oder FGF auf Proliferationsverhalten, Neurosphärenbildung und Differenzierung untersucht.

Neben der morphologischen Beurteilung der Zellen wurde auch die Expression des neuralen Stammzellmarkers Nestin, der Marker GFAP und MOSP für Astrozyten und Oligodendrozyten und schließlich des neuronalen Markers Neurofilament immunhistochemisch überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorläuferzellen des Hühnchenembryos ohne Passage über mehrere Wochen kultivierbar waren, sich dabei spontan Neurosphären als typische Kolonieform neuraler Stammzellen bildeten und alle drei Wachstumsfaktoren Differenzierung provozierten. Die Zellen exprimierten schließlich Marker für neurale Vorläuferzellen sowie für Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone.

Insgesamt bieten die neuralen Vorläuferzellen des Hühnerembryos (im Stadium 10 nach Hamburger und Hamilton) ein schnelles, preiswertes und leicht beziehbares System, um mit einfachen Methoden grundlegende Fragen in der Stammzellforschung zu untersuchen. Sie können zumindest teilweise teurere und zeitaufwendigere, vor allem aber ethisch umstrittene Forschungsmodelle ersetzen.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Was sind Stammzellen?	1
1.2	Wo kommen Stammzellen vor?	2
1.3	Neurale Stammzellen – wo, in welcher Menge und wie lange sind sie im Leben eines Organismus vorhanden?	4
1.4	Warum sind Stammzellen so begehrt?	5
1.5	Zelltherapie von neurologischen Erkrankungen	6
1.6	Ethische Diskussion und ethische Vertretbarkeit	7
1.7	Suche nach ethisch unbedenklichen Alternativen	8
1.8	Ziel dieser Arbeit	10
2	Material und Methodik	12
2.1	Präparation	12
2.1.1	Hühnchenembryonen/ Eier	12
2.1.2	Materialien und Lösungen	12
2.2	Zellkultur	12
2.2.1	Chemikalien, Kulturmedien und Puffer	12
2.2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2.3	Beschichtung der Zellkulturschalen	15
2.3	Immunhistochemische Untersuchung	15
2.3.1	Chemikalien und Lösungen	16
2.3.2	Geräte und Materialien	17
2.4	Experimentelle Methodik	17
2.4.1	Präparation der Hühnchenembryonen	17
2.4.2	Beschichtung der 24-TC-Gewebskulturplatten	17
2.4.3	Zellvereinzellung	17
2.4.4	Kultivierung der Zellen	18
2.4.5	Wachstumsfaktor-Zugabe	18
2.4.6	Immunohistochemie	18
2.4.7	Fluoreszenzmikroskopie	19
2.5	Angaben zur Statistik	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Vorbemerkung	21

3.1.1	Proliferation der Zellen	21
3.1.2	Anzahl und Größe der Neurosphären	22
3.1.3	Differenzierung und Adhärenz	22
3.1.4	Kriterien für Zelltod in der Kultur	22
3.2	Verhalten der Progenitorzellen in unterschiedlichen Kulturmedien	23
3.2.1	S4-Medium (Astrocyte Microglia Growth Medium)	23
3.2.2	Neuronal Base-Medium (Neuron Growth Medium)	24
3.2.3	Vergleich von S4- und NB-Medium	25
3.3	Verhalten der Stammzellen auf unterschiedlichen Substraten	27
3.4	Zellwachstum bei unterschiedlicher Stimulation	29
3.4.1	Konzentrations-Wirkungsverhältnis von FGF	29
3.4.2	Konzentrations-Wirkungsverhältnis von NT4	30
3.4.3	Konzentrations-Wirkungsverhältnis von NGF	31
3.4.4	Vergleich der verschiedenen Wachstumsfaktoren (10ng/ml) bezüglich der Proliferation	32
3.5	Quantitative Aspekte des Zellwachstums	33
3.5.1	Vergleich der verschiedenen WF bezüglich der NS-Anzahl	33
3.5.2	Vergleich der verschiedenen WF bezüglich der NS-Größe	36
3.6	Phänotypisierung der Zellen	38
3.6.1	Ausgangszustand der Kulturen am Tag 0	38
3.6.2	Morphologie unter Einfluss von FGF	39
3.6.3	Morphologie unter Einfluss von NT4	40
3.6.4	Morphologie unter Einfluss von NGF	42
3.6.5	Konzentrationsabhängige Zelldifferenzierung	43
3.7	Wachstumsfaktor-Entzug	44
3.8	Immunhistochemische Charakterisierung der differenzierten Zellkulturen	44
3.8.1	Voruntersuchungen	45
3.8.2	Neurofilament und Nestin	45
3.8.3	Vergleich der drei WF bezüglich des Anteils von Nestin- und NF-positiven Zellen	46
3.8.4	Glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Mouse oligodendrocyte specific protein (MOSP)	47

3.8.5	Vergleich der drei WF bezüglich des Anteils von GFAP- und MOSP-positiven Zellen	48
3.8.6	Immunhistochemische Charakterisierung von Neurosphären	48
3.8.7	Immunhistochemische Abbildungen aller drei Wachstumsfaktoren	50
4	Diskussion	57
4.1	Etablierung eines Differenzierungssystems für embryonale Hühnchenstammzellen in-vitro	57
4.1.1	Präparation	58
4.1.2	Zelldichte und Zellkontakte	58
4.1.3	Kulturmedium	50
4.1.4	Neurosphären-Bildung	60
4.1.5	Laminin und Adhärenz	61
4.1.6	Substrate	62
4.1.7	Wachstumseigenschaften der Hühnchenzellen	62
4.2	Faktorkonzentrations-Wirkungsverhältnis bzgl. des Zellwachstums	63
4.2.1	FGF in drei verschiedenen Konzentrationen	63
4.2.2	Die Neurotrophine NT4 und NGF in drei verschiedenen Konzentrationen	64
4.2.3	Vergleich der drei WF (10ng/ml) mit S4-Medium	66
4.3	Charakterisierung von Neurosphären	66
4.4	Die Korrelation zwischen Wachstumsfaktoren und Neurosphären	66
4.5	Wachstumsfaktoren und Differenzierung	69
4.5.1	Auswahl und Einsatz von WF und Differenzierungsprotokollen	69
4.5.2	Fibroblast growth factor	69
4.5.3	Neurotrophin-4	71
4.5.4	Nerve growth factor	72
4.5.5	Wachstumsfaktor-Entzug	73
4.6	Bestätigung der neuralen Differenzierung mittels Immunhistochemie	74
4.6.1	Nestin und Neurofilament – von Progenitorzellen und Neuronen	75
4.6.2	MOSP und GFAP – von Astrozyten und Oligodendrozyten	75
4.6.3	Nestin, Stammzellmarker für Säugetiere – auch ein Marker für Vogelstammzellen?	76

4.7	Nachweis, dass es sich bei den Zellen um neurale Stammzellen handelt und eine alternatives Modell zur Stammzellforschung darstellen	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Lebenslauf	87
8	Danksagung	88
9	Anhang	89
9.1	Abkürzungsverzeichnis	89
9.2	Abbildungsverzeichnis	90

1 Einleitung

1.1 Was sind Stammzellen?

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die definitionsgemäß zwei Kriterien erfüllen müssen: unbegrenzte Vermehrung durch asymmetrische Zellteilung (Stern, 1996) und das Hervorbringen von Tochterzellen, die sich zu bestimmten Zellarten differenzieren können.

An der Differenzierung sind Differenzierungsfaktoren, das genetische Programm der Zelle und die Mikroumgebung maßgeblich beteiligt.

Das heißt: Unter den richtigen Bedingungen können sich Stammzellen lebenslang zu den unterschiedlichsten Geweben, die einen Organismus ausmachen, entwickeln und als reife Zellen die charakteristische Form und spezifische Funktion des jeweiligen Gewebes aufweisen.

Man unterscheidet toti-, pluri- und multipotente Stammzellen.

Zu den totipotenten Stammzellen gehören die befruchtete Eizelle und die Blastomere bis zum 8-Zell-Stadium (Nagy und Vintersten, 2006) Aus jeder der acht Zellen kann theoretisch ein kompletter Organismus hervorgehen. Daraus erklärt sich auch ihr Name, der übersetzt soviel wie „Alleskönner“ heißt.

Aus pluripotenten Stammzellen dagegen können sich alle somatischen Gewebe und Keimlinien (Pettit et al., 2004) eines Organismus - das heißt ca. 210 verschiedenen Gewebsarten - entwickeln, jedoch kein plazentares Gewebe. Hierzu zählen die sogenannten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und kultiviert werden können (Nagy und Vintersten, 2006). Neben den vom Embryo gewonnenen Stammzellen gehören auch die von Urkeimzellen oder einem Teratokarzinom hergeleiteten SZ zu den Pluripotenten (Pera et al., 2000).

Pluripotenz kann nachgewiesen werden durch die Transfektion von Stammzellen in Blastozysten von Organismen zur Bildung von chimären Tieren. Die ES-Zelle kann dann in zahlreichen somatischen Geweben und der Keimlinie wieder gefunden werden (Pettite et al., 2004; Pain et al., 1996).

Multipotente Stammzellen können nur noch Zellen innerhalb eines der drei Keimblätter hervorbringen. Hierunter fallen die adulten Stammzellen, die im Organismus den permanente Zellverlust aufgrund von Apoptose, Verletzung und anderer Ursachen kompensieren müssen.

1.2 Wo kommen Stammzellen vor?

Es gibt drei Hauptquellen, aus denen man Stammzellen gewinnen kann: Der Embryo, fetales Nabelschnurblut und der adulte Organismus.

Embryonale Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen kann man in 4 Gruppen unterteilen. So unterscheidet man die totipotenten Stammzellen aus den Blastomeren bis zum 8-Zell-Stadium von den pluripotenten ES-Zellen, die aus der Blastozyste gewonnen werden können. Weiterhin gibt es die embryonalen Keimzellen (EG-Zellen), die aus den Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen, den sogenannten primordialen Keimzellen entstehen (Kerr et al., 2006) .

Davon zu unterscheiden sind die EC-Zellen, die ebenfalls Stammzell-Charakter besitzen und aus embryonalen Teratokarzinomen extrahiert werden.

Fetale Stammzellen

Postnatales Nabelschnurblut stellt eine weitere wertvolle Quelle für Stammzellen dar. Sie wird besonders wegen der hohen Plastizität ihrer Stammzellen geschätzt (Sanchez-Ramos, 2006). Fetale SZ werden nicht nur aus umbilikalen Blutzellen, sondern auch aus Amnion und Plazenta, Umbilikalvene und Nabelschnur-Matrix-Zellen gewonnen (Weiss und Troyer, 2006). Dies ist eine leicht zugängliche und preiswerte Quelle für multipotente Stammzellen.

Adulte Stammzellen

Eine adulte Stammzelle ist eine undifferenzierte Zelle, die lebenslang selbst replizierend ist und alle für ihren spezifischen Gewebetyp charakteristische und funktionale Zellen hervorbringen kann (Burke et al., 2007).

Im Organismus gibt es viele Regionen, wo adulte Stammzellen vorkommen. Sie wurden bisher in 20 Organen nachgewiesen.

Dabei erfüllen sie in manchen dieser Organe, wie z.B. dem Knochenmark, zeitlebens Aufgaben bei der Gewebsregeneration und –reparatur, während sie in anderen

Gewebe zeitweilig ruhen. So werden sie im Muskelgewebe nur bei starker Muskelbeanspruchung und Verletzung zur Teilung angeregt.

Obwohl die adulten Stammzellen hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion sehr unterschiedlich sind, haben sie doch eines gemeinsam: Sie alle wecken das Interesse der Wissenschaft aus den verschiedensten Gründen.

So ist beispielsweise die Identifizierung und Gewinnung adulter Stammzellen aus Pankreas und Leber im Hinblick auf die eventuelle Zelltherapie z.B. bei Diabetes mellitus und Leberversagen wissenschaftlich interessant (Kerr et al., 2006).

Die Haut und der Intestinaltrakt weisen ganz verschiedene spezifische Strukturen und Funktionen auf. Beide Standorte sind jedoch durch multipotente epitheliale Stammzellen gekennzeichnet, die für eine sich sehr rasch selbst erneuernde Oberfläche sorgen. Aktuelle Forschung beschäftigt sich daher mit den Unterschieden und Ähnlichkeiten dieser „physiologischen Nischen“ (Rizvi und Wong, 2005).

Kürzlich war das Interesse besonders an mesenchymalen Stammzellen sehr hoch, da gezeigt werden konnte, dass Zellpopulationen wie Bandscheibenknorpel, Knochen oder Zahn-assoziiertes Gewebe *in vivo* vermehrt werden konnten. So beschäftigten sich Trubiani und Kollegen mit dem Differenzierungsmechanismus von Stammzellen aus dem peridontalen Ligament und der Zahnpulpa, um deren regenerativen Effekte zukünftig nutzen zu können (Trubiani et al., 2006).

Ein anderes Beispiel für adulte Stammzellen sind die des cornealen Epithels, die am *Limbus corneae* lokalisiert sind. Dies ist u.a. interessant im Hinblick auf eine mögliche Therapie des sog. *LSCD*, dem limbalen Stammzell-Defizit (Pajoohesh-Ganji und Stepp, 2005).

Einige *in-vivo*-Studien haben angedeutet, dass adulte hämatogene Stammzellen des Knochenmarks die Fähigkeit haben, sich in Zelltypen zu differenzieren, anders als ihr Ursprungsgewebe. Diese Plastizität konnten Veyra und Kollegen bei ihren Forschungen mit Knochenmark-Stammzellen der Maus allerdings nicht bestätigen (Veyra et al., 2005).

Obwohl noch vor kurzem das Gegenteil angenommen wurde, konnten nun im ZNS der Säugetiere neurale Stammzellen gefunden werden, die für die Neurogenese verantwortlich sind. Besonders in der subventrikulären Zone der Seitenventrikel, dem Gyrus dentatus des Hippocampus, dem Kortex und Zentralkanal des Rückenmarks werden solche Regionen beschrieben (Picard-Riera et al., 2004).

Stammzellen sind außerdem die Keimzelllinien des Erwachsenen, die durch Kultivierung von Spermatogonien-Stammzellen gewonnen und kultiviert werden können und aus denen sich *in vivo* und *in vitro* alle 3 Keimblätter entwickeln (Kerr et al., 2006).

1.3 Neuronale Stammzellen – wo, in welcher Menge und wie lange sind sie im Leben eines Organismus vorhanden?

Neurogenese geschieht lebenslang in einigen Regionen im Gehirn des erwachsenen Menschen; neuronale Stammzellen kommen also im adulten ZNS vor (Eriksson et al., 1998). Schon 1990 fand man, dass Neurogenese in erwachsenen Säugern stattfindet (Kuhn et al., 1996), und auch bezüglich Primaten und Menschen tauchten erste Beweise auf (Kornack und Rakic, 1999; Rietze et al., 2003).

Neurogenese geschieht bei Säugern, Nagern und nicht-humanen Primaten im Gyrus dentatus und in der Subventrikularzone, von wo aus die Stammzellen zur granulären Zellschicht im Ammonshorn migrieren (Gould et al., 1999) bzw. zum Bulbus olfactorius wandern, wo sie sich zu Neuronen umdifferenzieren (Kornack und Rakic, 2001). Es wird geschätzt, dass ungefähr 9000 neue Neurone pro Tag im Gyrus dentatus des Nagers produziert werden. Damit machen sie ca. 3,3% aller Zellen der Körnerzellschicht (Stratum granulare) pro Monat oder 0,1% pro Tag aus. Bei nicht-humanen Primaten dagegen wird die Neurogenese-Rate auf 10mal weniger geschätzt als im Gyrus dentatus des Nagers. Weiterhin sollen beim erwachsenen Macaque-Affen mindestens 0.004% der neuronalen Population in der granulären Zellschicht neue Neurone pro Tag darstellen, d.h. 1 neues Neuron kommt auf 24.000 bereits Existierende pro Tag (Gould et al., 1999).

Neurogenese soll - allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß - auch in anderen Gebieten des adulten Gehirns auftreten, wie z.B. in der CA1-Are, dem Striatum und

dem 3. Ventrikel bei Nagern so wie im Neokortex von nicht-humanen Primaten (Rietze et al., 2003; Xu et al., 2005; Gould et al., 1999).

Im menschlichen Gehirn, so berichten Eriksson et al. (1998), fanden sich sich teilende Zellen im Gyrus dentatus; damit ergaben sich erstmals Hinweise, dass auch beim Menschen Neurogenese stattfindet.

Quinones et al. (2006) beschrieben ebenfalls, dass neurale Stammzellen während des gesamten Lebens im humanen Gehirn vorhanden sind und identifizierten SVZ-Astrozyten als solche. Die Autoren konnten jedoch keine Migration zum Bulbus olfactorius nachweisen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass eine solche beim Menschen entweder gar nicht stattfindet oder aber, dass Vorläuferzellen als individuelle Zellen wandern (Quinones et al., 2006).

1.4 Warum sind Stammzellen so begehrt?

Politiker, Journalisten, Kirchenvertreter, Patienten...es scheint so, als ob jeder über Stammzellen redet. Warum all diese Aufregung?

Weil die Reichweite ihrer Anwendungsmöglichkeiten atemberaubend erscheint!

So können wir nicht nur die Entwicklung unserer eigenen Spezies verstehen lernen und Unterschiede zu anderen Arten herausstellen (Ostrer et al., 2006), sondern wir können durch die Erforschung der menschlichen embryonalen Entwicklung auch die Entstehung von Krankheiten, Behinderungen (Kiatpongsan et al., 2006), Gendefekten und embryonalen Tumoren untersuchen. Nur so wird es eventuell möglich werden, potentielle Therapie-Strategien, die auf der menschlichen Embryologie basieren, zu entwickeln (Kerr et al., 2006).

Weiterhin ermöglichen uns Stammzellen auch die Analyse der Lokalisation und der Muster der temporären Gen-Expression im Embryo; dies ist eine entscheidende Komponente für die moderne Genom-Daten-Gewinnung und das Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Entwicklung des Embryos kontrollieren (Latham, 2006).

Stammzellforschung trägt nicht zuletzt dazu bei, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Kornack und Rakic, 1999) zu entdecken, die Anwendung bei der Gewebsregeneration und -reparatur finden (Eriksson et al., 1998). Dies wäre eine mögliche Antwort auf den chronischen Mangel an Geweben und Organen zur Transplantation und zur Therapie degenerativer Erkrankungen; sie bedeuteten evtl. ein

Ende der immunsuppressiven Therapie, wenn durch Klonierungstechniken vom Patienten selbst Stammzellen gewonnen werden könnten (Pera et al., 2000).

Das unbegrenzte Angebot von verschiedenen Zelltypen könnte weiterhin im Rahmen der Medikamenten-Forschung hilfreich sein (Paul et al., 2002).

Das neue Wissen legt uns nun die Macht - aber auch die Verantwortung - in die Hand, zu handeln oder nicht zu handeln, und läßt und die Wahl wie wir mit den potentiellen Möglichkeiten am besten umgehen.

1.5 Zelltherapie bei neurologischen Erkrankungen

Stammzellen gewinnen im Rahmen der Zell-Ersatz-Therapie zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen stetig an Bedeutung. Einige Strategien erscheinen zur Zeit besonders attraktiv bezüglich ihrer klinischen Umsetzung: So bietet sich nicht nur die Möglichkeit der Transplantation von Stammzellen (ES-Zellen) oder ihrer neuronalen Abkömmlinge an, sondern auch die Mobilisierung endogener neuraler Stammzellen des Nervensystems (Corti et al., 2004).

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich z.B. mit dem Morbus Parkinson, der durch die fortschreitende Zerstörung dopaminerger Neurone in der Substantia nigra im Mittelhirn charakterisiert ist. Es würde einen entscheidenden Therapie-Fortschritt darstellen, Dopamin-synthetisierende und -sekretierende Zellen erzeugen zu können, um diese dann in das Dopamin-erschöpfte Striatum zu verpflanzen. Voraussetzung wäre jedoch, dass eine ausreichende Anzahl an Zellen überlebt, keine Abstoßungsreaktion stattfindet und entsprechende postsynaptische Verbindungen zu striatalen Neuronen gebildet werden (Goldmann, 2005; Dunnett und Rosser, 2004; Correia et al., 2005)

Wegen bislang mangelnder Behandlungsoptionen und wegen des zunehmenden Verständnisses der axonalen Regeneration sind auch die Rückenmarksverletzungen in den Focus der Zell-Ersatz-Therapie geraten. Da diese mit dem Verlust von sowohl Neuronen als auch Glia einhergehen, muss die verletzte Stelle mit multiplen Zelltypen neu besiedelt werden. Außerdem wäre ein Substrat notwendig, das das Axonwachstum entlang der Durchtrennung leitet. Es konnte gezeigt werden, dass die Implantation von Stammzellen in den Bereich von Rückenmarksverletzungen eine Verhaltensbesserung mit sich brachte im Vergleich zu der untransplantierten Kontrollgruppe (Setoguchi et al., 2004).

Oligodendrozyten dagegen sind die Hoffnungsträger bei der Therapie der Multiplen Sklerose. Oligodendrozyten-Vorläufer können sich differenzieren und demyelinisierte Axone wieder remyelinisieren. Ein Problem dabei ist, die Zellen so zu stimulieren, dass sie zu den vielen disseminierten Entmarkungsherden wandern (Mangano und Maletic-Savatic, 2005).

Weiterhin sind Stammzellen noch bei vielen anderen neurologischen Erkrankungen potentiell einsetzbar wie z.B. beim Schlaganfall, um ischämische Gebiete neu zu besiedeln (Chang et al., 2007) oder beim neurodegenerativen Morbus Huntington (Goldman, 2005). Allerdings müssen noch viele Schlüsseltechniken erforscht werden, bevor das große Potential der Stammzellen tatsächlich klinisch genutzt werden kann.

1.6 Ethische Diskussion und ethische Vertretbarkeit

In Deutschland ist die Stammzellforschung ein besonders stark diskutiertes Thema. Die hohen Erwartungen der Mediziner treffen hier auf massive ethische Bedenken.

Besonders kritisiert wird die sogenannte verbrauchende Embryonenforschung, d.h. dass Stammzellen aus lebenden Embryonen gewonnen und zu diesem Zweck getötet werden müssen. Angeblich sei es nicht dringend notwendig, embryonale Stammzellen zu nutzen, da es alternative Quellen gäbe wie z.B. adulte Stammzellen.

Befürworter argumentieren dagegen mit der ethischen Pflicht, die Bekämpfung von Krankheiten bestmöglich voranzutreiben (DFG, 2001) und dem Recht auf freie Forschung (Zentrale Ethikkommission der Bundesärztekammer, 2002). ES-Zellen seien eine unverzichtbare Forschungsgrundlage, ohne die Deutschland sich im internationalen Wettbewerb nicht behaupten könne (DFG, 2002).

Während frühe embryonale Zellen bis zum 8-Zell-Stadium wegen ihrer Totipotenz noch unter das Embryonenschutzgesetz von 1990 fallen, waren die pluripotenten Stammzellen aus der Blastozyste bis Juni 2002 nicht rechtlich erfasst (Deutscher Bundestag, 1990).

Seit Einführung des Stammzellgesetzes ist es in Deutschland nun verboten, embryonale Stammzellen zu gewinnen, einzuführen oder mit ihnen zu arbeiten; Verstöße werden mit Geldbußen oder sogar Freiheitsstrafen bis zu drei Jahren geahndet. Allerdings wurden Ausnahmeregelungen geschaffen, um das Recht auf freie Forschung zu gewährleisten; so können durchaus Stammzellen zu Forschungszwecken eingeführt werden, wenn sie vor dem 1. Januar 2002 gewonnen

wurden, das Prinzip der Überzähligkeit gewährleistet und die wissenschaftliche Notwendigkeit ausreichend begründet werden kann (Deutscher Bundestag, 2002).

Dass das ethische Problem der Stammzellforschung aber noch immer nicht ausreichend geklärt ist, zeigt die uneinheitliche Regulierung in Europa. So ist es in Großbritannien erlaubt, Embryonen für die Forschung *in vitro* herzustellen (Richards, 2000), während dieses in Frankreich durch das „Loi N° 94-654“ grundsätzlich verboten ist (Louet, 2001). In den USA existiert kein Verbot bezüglich Herstellung und Nutzung embryonaler Stammzellen, allerdings findet keine Finanzierung aus Bundesmitteln statt (National Institutes of Health USA, 2000).

1.7 Suche nach ethisch unbedenklichen Alternativen

Auf der Suche nach ethisch unbedenklichen Alternativen stoßen wir auf eine Vielzahl von Möglichkeiten:

Mensch vs. Tier

Obwohl sich aus ethischer Sicht die Gewinnung von nicht-humanen Stammzellen anbietet, sind solche in der Forschung nicht immer brauchbar. So sind tierische Stammzellmodelle mit den humanen (und auch untereinander) oft nicht vergleichbar. Der Phänotyp humaner Stammzellen ähnelt z.B. ES-Zellen des Affen, unterscheidet sich jedoch grundlegend von denen der Maus (Pera et al., 2000). Außerdem treffen wir auch hier auf ethische Probleme bezüglich tierexperimenteller Regulierungen.

ES-Zellen vs. Vorläuferzellen

Pluripotente embryonale Stammzellen sind mit ihrem großen Potential zu mannigfachen Transformationen und ihrer Komplexität von Signalen den Vorläuferzellen nicht immer überlegen, deren Differenzierung evtl. leichter zu lenken ist, die aber wiederum in ihrer Expansions-Kapazität eingeschränkt sein könnten. So sind Vorläuferzellen weniger immunogen als ES-Zellen und eignen sich daher besser für Xenografts (Temple, 2001).

Embryonale vs. fetale vs. adulte Stammzellen

Erwachsene Stammzellen können beide Probleme, das ethische und das immunologische, umgehen, ihre Verformbarkeit und Expansionskapazität muß jedoch erst noch ergründet werden. Besonders wegen potentieller Autografts vom Patienten

selbst und damit Vermeidung eines Spender-Problems sind sie sehr in Diskussion. Immerhin werden sie schon seit über 40 Jahren z.B. als Knochenmarkstransplantat nach Strahlentherapie oder zur Regeneration von Haut nach Verbrennungen erfolgreich eingesetzt. In Bezug auf Reinheit, Sicherheit vor Tumorbildung und Immunverträglichkeit sind sie besser geeignet als ES-Zellen.

Fetale Stammzellen aus Nabelschnurblut schließlich sind Vorläufer des hämatopoetischen Systems, allerdings ist ihre Fähigkeit, sich zu anderen Geweben zu transformieren, sehr begrenzt (Stoltz et al., 2006).

Derzeit zeigen sich außerdem Probleme bezüglich des Nutzens von adulten Stammzellen auf. So ist es schwer, adulte Stammzellen zu identifizieren, da sie lediglich einen Anteil von 0,1–0,5% aufweisen und von spezialisierten Zellen nur sehr schwer zu unterscheiden und zu extrahieren sind. Ausserdem sind nur wenige *in-vitro*-Systeme zu ihrer Manipulation etabliert. Und schließlich verstehen wir noch sehr wenig von den Mechanismen, nach denen adulte Stammzellen innerhalb ihrer physiologischen Umgebung reguliert werden (Rizvi und Wong, 2005).

„Frische“ Stammzellen vs. immortale Zell-Linien

Das Expansionspotential ist bei Stammzellen vieler Spezies sehr limitiert. Dieses Problem kann durch Immortalisierung von Zelllinien gelöst werden. Allerdings ist ihr Differenzierungspotential eingeschränkt und die Gefahr von Chromosomenaberrationen und Tumorbildung ist groß.

ES – EG – EC

Keimzelltumoren entwickeln sich aus Ovar, Testis und extragonadalen Keimzellen. Tumorstammzellen behalten daher die meisten Eigenschaften von Keimzellen. Sie können sich zu Seminomen bzw. Dysgerminomen oder zu pluripotenten Stammzellen entwickeln, die dann Teratome bzw. Teratokarzinome erzeugen können (Damjanov, 2004).

Wenn Tumorstammzellen in die Blastozyste injiziert werden und sich damit in embryonaler Umgebung befinden, verlieren sie ihre Malignität und tragen zur Entwicklung der Blastozyste bei.

Allerdings haben die embryonalen Krebs-Stammzellen ihre Grenzen: Sie enthalten oft chromosomale Abnormalitäten und Ihre Fähigkeit, sich in multiple Gewebe zu differenzieren, ist beschränkt.

Des Weiteren gibt es die EG-Zellen, die Ähnlichkeit mit ES-Zellen aufweisen, sich jedoch in der Expression einiger Gene von diesen unterscheiden (National Institute of Health USA, 2000).

Zusammenfassend kann man zum jetzigen Zeitpunkt aus naturwissenschaftlicher Sicht keine begründete Einschätzung liefern, die einer der hier aufgeführten Alternativen den Vorrang vor anderen einräumen könnte.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, ein Stammzell-Modell vorzustellen, das die ethischen Probleme sowie tierexperimentelle Maßregelungen umgeht und durch einige Besonderheiten hervorsteicht. So sind embryonale Hühnchen-Stammzellen eine sehr preiswerte und leicht beziehbare Quelle von embryonalen Vorläuferzellen.

Der Hühner-Embryo, ein Hauptmodell in der Entwicklungsbiologie, hat zu entscheidenden Konzepten der Genetik, Virologie, Krebs- und Zellbiologie beigetragen (Damjanov, 2004). Der Vogel-Embryo, in seiner in-sich-geschlossenen kalzifizierten Eierschale, ist leicht zugänglich und bietet sich geradezu zur direkten Manipulation an. Das befruchtete Ei selbst könnte man als totipotente Stammzelle betrachten, da die folgende Zellteilung alle somatischen Zellen des sich entwickelnden Organismus sowie die Keimzellen hervorbringt (Stern, 2005).

Trotz vieler Vorteile haben sich nur relativ wenige Laboratorien in den letzten Jahren mit Vogel-Stammzellen beschäftigt, nicht zuletzt, um transgene Vögel zu erzeugen.

Es soll nun gezeigt werden, dass das Vogel-Modell als eine gute Alternative zu Forschungszwecken genutzt werden kann, da die Gewinnung, Kultivierung und Induktion der Stammzellen zur Differenzierung leicht praktikabel ist.

Wir haben dazu konkret vier Hauptziele verfolgt:

Zunächst sollte ein möglichst optimales Kultursystem für die neuralen Vorläuferzellen aus den 48h-alten Hühnchenembryonen etabliert werden. Hierbei wurden nicht nur die speziellen Bedürfnisse der Zellen berücksichtigt, sondern es musste auch auf die Erfordernisse der geplanten Versuchsvorhaben eingegangen werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Zellen. Dabei wurden die Zellen und Neurosphären stetig qualitativ und quantitativ analysiert, um ihr Verhalten sowohl unter „normalen“ Kulturbedingungen, als auch unter Einfluss der Wachstumsfaktoren zu erfassen und vergleichen zu können.

Danach wurde in einem dritten Schritt die Differenzierbarkeit und damit das Ansprechen der Zellen auf verschiedene Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorkonzentrationen getestet. Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden dokumentiert und immunhistochemisch die verschiedenen Phänotypen bestimmt, um ihr Mengenverhältnis zueinander unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen erfassen zu können.

Zuletzt sollte deutlich gemacht werden, dass es sich bei den Hühnchenstammzellen um ein attraktives Alternativmodell handelt, das sich sowohl zur Erforschung von grundlegenden Fragen der Stammzellforschung als auch im Speziellen zur Entwicklung von Stammzelltherapien von z.B. Nervenschäden eignet.

2 Material und Methodik

2.1. Präparation

2.1.1 Hühnchenembryonen/ Eier

Die Eier wurden vom Gut Axerfeld, Josef Brinkschulte, Im Gettrup 1 in 48308 Senden bezogen. Es handelte sich um braune Hühnereier der Rasse Lohmann braun klassik. Die Gefiederfarbe der Hennen ist stets weiß, während die Hähne von brauner Farbe sind.

2.1.2 Materialien und Lösungen

Kanüle (1,2mm x 40mm)		Mikrolance
Schere	Augenschere, gerade	Medicon
Pinzetten	Uhrmacherpinzette	Greiner
Stereomikroskop	Stemi 2000	Zeiss
Wärmebrutschrank		Ehret
Tinte		Pelikan
Phosphat buffered saline (PBS) 0,1%		PAA
	137 mM NaCl	
	3mM KCL	
	10mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	3 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	

2.2. Zellkultur

2.2.1 Chemikalien, Kulturmedien und Puffer

S4-Medium:

Serumfreies Medium auf der Basis von Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM) nach Needham, et al 1987. Das Medium wird von der Firma Promocell (Heidelberg) als Astrocyte Microglia Growth Medium produziert. Nach Zugabe der separat gelieferten Komponenten BSA, Fettsäuren, Insulin und Cholera toxin ergibt sich folgende Zusammensetzung des Kulturmediums:

Glukose	3,50g/l	MoO ₃	0,14µg/l
---------	---------	------------------	----------

- Material und Methodik -

Hepes	3,57g/l	ZnSO ₄ x H ₂ O	0,29µg/l
Insulin	5mg/l	<u>Aminosäuren:</u>	
Choleratoxin	0,01mg/l	L-Alanin	3,6mg/ml
Putreszin	8mg/l	L-Asparagin	4,0mg/ml
Na ₂ SeO ₃	4,3µg/l	L-Asparaginsäure	4,0mg/ml
<u>BSA/ Fettsäuren:</u>		L-Glutaminsäure	4,0mg/ml
Rinderserumalbumin	792mg/l	L-Prolin	4,3mg/ml
Linolsäure	1,51mg/l	<u>Vitamine:</u>	
Linolensäure	1mg/l	Vitamin C	1mg/ml
<u>Spurenelemente:</u>		MgCl ₃ x 6 H ₂ O	40mg/ml
CrCl ₃ x 6 H ₂ O	0,27µg/l	Biotin	0,024mg/ml
CUS ₄ x 5 H ₂ O	0,25µg/l	DL-α-Liponsäure	0,12mg/ml
MnSO ₄	0,15µl/l	Vitamin B ₁₂	1,35mg/ml

Neuronal-Base-Medium without L-Glutamine:

Serumfreies Medium für die Kultivierung neuronaler Zellen ohne „astrocyte feeder layer“. Das Medium wird von der Firma PAA produziert und ist wie folgt zusammengesetzt:

pH	7,0-7,5
CO ₂ -Konzentration	5,0%
Osmolarität	220-240 mOsmol/kg

anorganische Salze:

Calciumchlorid	200mg/l	L-Serin	42mg/l
Eisen(III)Nitrat	0,1mg/l	L-Threonin	95mg/l
Kaliumchlorid	400mg/l	L-Thyptophan	16mg/l
Magnesiumchlorid	77,3mg/l	L-Tyrosin	72mg/l
Natriumchlorid	3000mg/l	L-Valin	94mg/l
Na-Dihydrogenphosphat	125mg/l	<u>Vitamine</u>	
Na-Hydrogenphosphat	2200mg/l	Cholin-Chlorid	4mg/l

Aminosäuren

L-Alanin	2mg/l	Myo-Inositol	7,2mg/l
L-Arginin	84mg/l	Nikotinsäure	4mg/l
		Phanthothensäure	4mg/l

L-Asparagin	0,38mg/l	Pyridoxal	4mg/l
L-Cystin	1,21mg/l	Riboflavin	0,4mg/l
Glycin	30mg/l	Thiamin	4mg/l
L-Histidin	42mg/l	Vitamin B ₁₂	0,34mg/l
L-Isoleucin	105mg/l		
L-Leucin	105mg/l	<u>andere Komponenten</u>	
L-Lysin	146mg/l	D-Glukose	4500mg/l
L-Methionin	30mg/l	HEPES	2600mg/l
L-Phenylalanin	66mg/l	Phenol Rot	8,1mg/l
L-Prolin	7,76mg/l	Natriumpyruvat	25mg/l

Lösungen Zellkultur:

Penicillin/ Streptomycin Sigma

Enzyme:

DNase I, 0,1% Roche

Papain (60mg/ml) Sigma

Dissoziationsansatz:

Phosphat buffered saline (PBS) 100µL Gibco

Papain gelöst in PBS (12U/ml), 10µL Fluka

Bovine serum albumin, (BSA), 0,1% Sigma

DNase I, 0,1% Roche

Wachstumsfaktoren:

Nerve Growth Factor Sigma
 25S, from Mouse sub-
 maxillary glands

Neurotrophin-4 Sigma
 human, recombinant

Fibroblast growth factor Biotrend
 human recombinant

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte

Zellbrutschrank Heraeus
 Modell BB 6060,
 individuelle Gaszufuhr
 von O₂ und CO₂

Pipetten Eppendorf
 10µl, 100µl, 1000µl

Sterilbank	Biohit	Helios
Zentrifuge:	Biofuge 13	Heraeus
Stereomikroskop	SV6	Zeiss
Okulare	Netzmikrometer 10x10/5; 10 Zeiss Strichkreuzmikrometer 10:100	
Kamera	Nikon E4500, 4.0 Megapixel	Nikon

Verbrauchsmaterial:

24-TC-Gewebskulturplatte	Cellstar	Greiner
Lumox Multiwell 24		Greiner

2.2.3 Beschichtung der Zellkulturschalen

Substrate zum Beschichten der Kulturschalen:

Poly-D-Lysin	200-400 kDa	Sima
Laminin-1	from EHS-sarcoma-mouse	Roche

Hank's buffered salt solution, pH 7.5; HBSS:

NaCl	8000mg/l	PAA
KCl	400mg/l	
KH ₂ PO ₄	60mg/l	
Na ₂ HPO ₄	48mg/l	
Glucose	1000mg/l	
NaHCO ₃	350mg/l	
Phenolrot	10mg/l	

2.3. Immunhistochemische Untersuchung

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

Fixierlösung

Paraformaldehyd (PFA), 4%	Fluka
---------------------------	-------

Blockierungslösung:

Foetales Kälberserum (FCS), Gold, 10%	PAA
---------------------------------------	-----

Sonstige Lösungen:

PBS 0,1%	137mM NaCl 3mM KCL 10mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 3 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	PAA
Methanol		Fluka
Triton X-100, 0,1%		Sigma
 <u>Eindeckmedium</u>		
Dapi		Hoechst
Mowiol 4-88		Hoechst
 <u>Erst-Antikörper</u>		
Anti-GFAP, Rabbit, IgG	1:100	Sigma
Anti-MOSP, Mouse, IgM	1:100	Chemicon
Anti-Nestin, Rabbit, IgG	1:200	Chemicon
Anti-NF-200, Mouse, IgG	1:400	Sigma
 <u>Fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper</u>		
FITC, goat-anti-mouse IGM	1: 100	Jackson
TRITC, goat-anti-rabbit IgG	1:400	Sigma
TRITC, goat-anti-rabbit IgG	1:400	Sigma
FITC, goat-Anti-mouse IgG, Cy-2	1:200	Jackson
 2.3.2 Geräte und Materialien		
Cytospin		Thermo Shandon
Cytospin Funnels		Themo Shandom
AxioVision, 4.5		Zeiss
Adobe Photoshop 7.0		
Fluoreszenzfilter	395 bis 440nm 450 490 510 560	Zeiss
Fluoreszenz-Photomikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Objektträger		Engelbrecht

2.4 Experimentelle Methodik

2.4.1 Präparation der Hühnchen-Embryonen

Jeweils 40 Eier wurden bei 37°C für 48 Stunden im Wärmebrutschrank der Firma Ehret inkubiert. Die Hühnchenembryonen entwickelten sich in dieser Zeit bis ins Stadium 10 nach Hamburger und Hamilton.

Nach Bekleben einer Längsseite des Eies mit Tesafilm wurde mittels einer Mikrolance-3-Kanüle (1,2mm x 40mm) und einer 10ml-Spritze ein Loch in die Eierschale gestochen und 5ml Eiweiß abgesaugt. Daraufhin wurde mit Hilfe einer Nagelschere ein „Deckel“ in die Eierschale geschnitten und abgeklappt. Unter dem Stereomikroskop Stemi 2000 von Zeiss konnte bei 1,6facher Vergrößerung mittels einer Insulinspritze Tinte (Verdünnung 200 μ l in 2ml PBS) unter den Embryo gespritzt werden, so dass dieser besser sichtbar wurde. Unter Benutzung zweier Präparier-Pinzetten wurde die Eihaut eröffnet und der Kopf des Embryos abgeknipst und aufgefangen. Die Embryoköpfe wurden in einem 500 μ l-Eppendorf-Cup mit 100 μ l PBS gesammelt.

2.4.2 Beschichtung der 24-TC-Gewebekulturplatten

Die Kultivierung erfolgte in beschichteten Petripermschalen.

Zur sterilen Doppelbeschichtung der Petripermschalen wurden zunächst jeweils zwei Vertiefungen der verwandten Lumox 24er Petriperm-Multiwells am Vortag mit 25 μ l Poly-D-Lysin in 475 μ l HBSS befüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Abnahme der Lysinlösung und dreimaligem Waschen mit HBSS-Puffer erfolgte die Beschichtung mit 500 μ l Laminin in HBSS-Puffer für 1-2h bei 37°C. Die Lamininlösung wurde erst kurz vor dem Aufbringen der explantierten Stammzellen auf den beschichteten Membranboden aus den Petripermschalen entfernt.

2.4.3 Zellvereinzellung

Die 100 μ l PBS-Zell-Lösung wurde in 200 μ l Papapin (15U/ml) pipettiert und 1ml PBS + DNase 0,1% zugegeben, mehrmals durchmischt und 10min bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank B6060 der Firma Heraeus inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μ l BSA gestoppt und der Ansatz 2min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Zellkultur wurde noch einmal mit 1ml PBS gewaschen und zentrifugiert, bevor das Pellet in 200 μ l Nährmedium (S4-Medium/ Neuronal-Base-Medium/ +/- GF) wieder gelöst und je 100 μ l in die zwei Vertiefungen des beschichteten 24-well-plates mit jeweils weiteren 300 μ l Nährmedium kultiviert wurde.

Aus einer einer Zellsuspension wurden jeweils zwei Kulturen hergestellt um später die Immunhistochemie mit vier Antikörpern in vergleichbaren Zellkulturen durchführen zu können.

2.4.4 Kultivierung der Zellen

Die Zellkulturen wurden im Zellkulturbrutschrank Modell BB 6060 inkubiert. Zweimal pro Woche wurden 100 μ l des entsprechenden Nährmediums hinzugefügt.

Ein Entzug des Wachstumsfaktors stellte sich als nachteilig heraus und wurde daher nicht mehr durchgeführt.

Es erfolgten regelmäßige Dokumentationen des Zellkulturwachstums (jeweils montags, mittwochs und freitags) unter dem Stereomikroskop SV6. Die Zellen wurden unter zu Hilfenahme des Strichkreuz-Okulars (10:100) und des Netz-Mikrometer-Okulars (10x10/5) von Zeiss bei 400facher Vergrößerung, die Anzahl der Neurosphären bei 100facher und die Durchmesser der Neurosphären bei 200facher Vergrößerung ausgezählt bzw. gemessen.

Die Differenzierung der Zellen wurde durch regelmäßiges Fotografieren mit einer Nikon E4500 dokumentiert.

Diejenigen Kulturen, die sich in zufriedenstellender Weise differenziert hatten, wurden für die Immunhistochemie vorbereitet. Die restlichen Kulturen wurden zu Zählzwecken weiter kultiviert und beobachtet.

2.4.5. Wachstumsfaktor-Zugabe

Die drei Wachstumsfaktoren FGF, NT4 und NGF wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen zu den Zellkulturen zugegeben. Dazu wurden sie direkt in S4-Medium in die gewünschte Konzentration gebracht und den Zellen als Nährmedium am Tag der Eier-Präparation zugeführt. Die untersuchten Wachstumsfaktor-Konzentrationen waren jeweils 100ng/ml, 50ng/ml und 10ng/ml. Die weitere Nährmedium-Zugabe zu den Zellen erfolgte dann alle zwei bis drei Tage mit dem ursprünglich eingesetzten Nährmedium mit der entsprechenden Wachstumsfaktor-Konzentration.

2.4.6 Immunhistochemie

Am 6. bzw. 11. Tag waren die Zellen so weit differenziert, dass die Antikörperfärbung durchgeführt werden konnte. Dazu wurden die Zellen direkt in der Vertiefung der Gewebeskulturplatte angefärbt. Weiterhin wurden jeweils zwei Kulturen, die aus

derselben Ursprungssuspension stammten, behandelt, um Platz für alle vier Antikörper zu gewährleisten.

Zunächst wurde der Überstand des Mediums abpipetiert. Nachdem die Zellen dann zehn Minuten in 4%igem Paraformaldehyd fixiert worden waren, erfolgte ein einmaliges Waschen mit 500 μ l PBS. Anstatt 10-minütiger Zugabe von Methanol - so hatte sich im Verlauf der Arbeit herausgestellt - tolerierten die Zellen TritonX 0,1% für 2 Minuten auf Eis besser, welches dann sofort mit 10% FCS abgelöscht wurde. Das FCS verblieb auf den Zellen bei Raumtemperatur $\frac{1}{2}$ Stunde, bevor schließlich die folgenden AK aufgetragen wurden:

- a) 5 μ l GFAP, Sigma, G9269, Rabbit, 1:100 + 1 μ l MOSP IgM, Chemicon, MAB328, Mouse, 1: 1000 in 500 μ l FCS
- b) 3 μ l Nestin, Chemicon, AB5922, Rabbit, 1:200 + 1,5 μ l NF-200, Sigma, N5389, Mouse, 1:400 in 600 μ l FCS

Nachdem die AK über Nacht bei 4°C einwirken konnten, erfolgte am folgenden Tag eine 10 minütige Waschung mit 500 μ l PBS, bevor die Gegenantikörper auf die Zellen gegeben wurden.

Dabei handelte es sich um:

- a) 4 μ l FITC, goat-anti-mouse IGM, Jackson 115 095 075, 1: 100 + 1 μ l TRITC, goat-anti-rabbit, Sima T6778, 1:400 in 400 μ l FCS
- b) 1 μ l TRITC, goat-anti-rabbit, Sigma, T6778. 1:400 + 2 μ l FITC, goat-Anti-Mouse IgG, Jackson Cy-2 115 226 062, 1:200 in 400 μ l FCS

Diese vier Gegenantikörper verblieben mindestens 1 Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf den Zellen. Danach konnte nach einer erneuten Waschung in PBS der Petriperm-Boden aus dem Well herausgeschnitten werden und auf einen mit einem Tropfen Dapi-Moviol betupften Objektträger gegeben werden. Auf die Petriperm-Stückchen wurde noch einmal Dapi-Moviol gegeben, um den nun folgenden Deckgläschen, die zur Vermeidung von Luftbläschen langsam abgesenkt wurden, eine besseren Haftung zu geben.

Die fertigen Präparate wurden in einem Präparatmäppchen bei 4°C im Kühlschrank bis zur Begutachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop aufbewahrt.

2.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die immunhistochemisch behandelten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot von Zeiss und mit Hilfe von AxioVision 4.5 fotografiert.

Die Bilder wurden bezüglich Farbe, Helligkeit und Kontrast unter Benutzung von Adobe Photoshop Version 7.0. optimiert, doppelt gefärbte Bilder bzw. Zellen wurden mit Hilfe vom AxioVision Version 4.5 übereinander gelegt.

2.5 Angaben zur Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulations- und Statistikprogramms Microsoft Excel Version 11.0.

Bei den angegebenen Daten handelt es sich um Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen.

Angegebene Prozentwerte sind immer als Teil der Gesamtmenge zu verstehen.

Mit dem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben wurde geprüft, ob signifikante Mittelwertunterschiede vorlagen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Die signifikanten Testergebnisse werden im Text gesondert erwähnt.

Graphisch wurden die Ergebnisse als Balkendiagramme mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkung

Alle im Text und in den Abbildungen angegebenen Werte beziehen sich – wenn nicht anders angegeben – auf mindestens drei unabhängige Experimente.

Es wurden jeweils mehrere Zellkulturen unter verschiedenen Bedingungen angelegt, die zum besseren Verständnis im Folgenden alphabetisch benannt werden:

A. S4

B. NB

C. NGF 10ng/ml

F. FGF 10ng/ml

I. NT4 10ng/ml

D. NGF 50ng/ml

G. FGF 50ng/ml

J. NT4 50ng/ml

E. NGF 100ng/ml

H. FGF 100ng/ml

K. NT4 100ng/ml

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen auf die Zellkulturen zu beschreiben. Dazu erfolgte die Bewertung immer mit Hilfe der gleichen Parameter, die im Folgenden kurz erläutert werden.

3.1.1 Proliferation der Zellen

In regelmäßigen Abständen wurde die Zelldichte und somit das Wachstumsverhalten der Kulturen bestimmt. Hierzu fand an den Tagen 0, 2, 5, 7, 9 usw. eine Auszählung der Zellen bei 400facher Vergrößerung unter Benutzung des Netzmikrometer-Okulars (10x10/5) statt. Die Anzahl an Zellen wurde pro 0,038mm² angegeben. Es konnten so Verdopplungszeiten und das Wachstumsverhalten der Kulturen bestimmt werden.

Es galt zu vergleichen, wie die Proliferation der Zellen in den zwei getesteten Medien differierte und wie eine Zugabe der drei verschiedenen Wachstumsfaktoren die Proliferation beeinflusst. Außerdem sollte festgestellt werden, wie verschiedene Konzentrationen eines Wachstumsfaktors das Zellwachstum beeinflussten. Schließlich sollte noch auf die Auswirkung eines Wachstumsfaktorentzugs auf die Zellen eingegangen werden.

3.1.2 Anzahl und Größe der Neurosphären

Die für neurale Stammzellen typische Neurosphären-Bildung wurde ein Tag nach der Präparation beobachtet. Es wurde zur Objektivierung die durchschnittliche NS-Größe bei 200facher Vergrößerung unter Verwendung des Strichkreuzmikrometer-Okulars (10:100) gemessen, wobei 1 Messpunkt auf der Messskala 50µm entspricht. Mittels des Netzmikrometer-Okulars (10x10/5; 10) wurde bei 100facher Vergrößerung die Anzahl der Neurosphären pro 1,52mm² ausgezählt.

3.1.3 Differenzierung und Adhärenz

Die Morphologie und Adhärenz der Zellen wurden täglich beobachtet und photographisch mit der Nikon E4500 dokumentiert. Weiterhin wurde nach durchschnittlich 6 Tagen der Kultivierung eine Immunhistologie derjenigen Zellkulturen durchgeführt, die sich in zufriedenstellender Weise differenziert hatten.

Hierbei wurde nochmal die Adhärenz der Zellen bei den zahlreichen Wasch- und Färbungsvorgängen unter Beweis gestellt und ihre Differenzierung im Fluoreszenz-Photomikroskops (Axiophot, AxioVision 4.5) begutachtet. Die Anzahl der Neurosphären und Zellen konnte hier ebenfalls mit Hilfe des Netzmikrometer-Okulars ausgezählt werden.

3.1.4 Kriterien für Zelltod in der Kultur

Abhängig von den verschiedenen Einflussfaktoren trat nach einer bestimmten Zeit zunehmend Apoptose ein. Da dieser Zeitpunkt quantitativ erfasst werden sollte, mussten Kriterien festgelegt werden, wann eine Kultur als „sterbend“ zu bewerten war. Sobald eine der im Folgenden aufgeführten Kriterien mit Hilfe des Stereomikroskops SV6 beobachtet wurde, konnte dieser Zeitpunkt notiert und als Vergleichsparameter herangezogen werden.

Dazu muss allerdings angemerkt werden, dass bei vorherigen Versuchen zum Zelltod in undifferenzierten Kulturen noch nach acht Wochen über 80% der Einzelzellen im Alife-Dead-Assay als vital befunden wurden und daher die hier benutzte Einschätzung eher auf die Neurosphären als zentrale Struktur der Differenzierung zutrifft und nicht den tatsächlichen Zustand der Kultur bezüglich ihrer „Vitalität“ beschreibt.

Kriterien für stärker einsetzenden Zelltod waren zum einen das Stagnieren oder sogar die Abnahme der Zellzahl; zum anderen wurden morphologische Parameter herangezogen. So sprachen auffällig viele Zelltrümmer und eine starke Granulierung

im überwiegenden Anteil der Zellpopulation - was sich auch in der Färbung der Zellen von rosa zu braun widerspiegelte - für vermehrt auftretende Apoptose.

Schließlich konnte die Vitalität der Neurosphären anhand ihrer Färbung festgestellt werden: Normalerweise hatten diese durch das zugesetzte Medium einen rosa Farbton mit dem typischen dunkleren Zentrum als Ort der natürlichen Apoptose-Vorgänge im Inneren der Sphären. Nach längerer Kulturzeit fanden sich jedoch zuletzt gänzlich braun-gefärbte und sehr unscharf begrenzte Zellhaufen, die ihre runde Form verloren hatten.

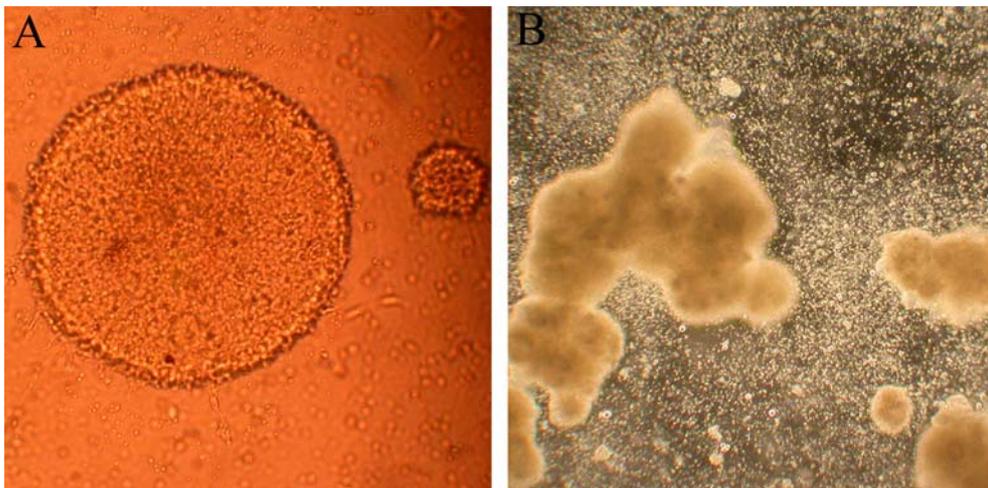


Abb 1: Vitale und apoptotische NS

Vitale runde NS sind durchsichtig und nehmen daher die Farbe des Mediums an; nur im Zentrum sind sie von bräunlicher Farbe. Apoptotische NS sind dagegen gänzlich braun gefärbt mit eher unscharfem Rand.

3.2 Verhalten der Progenitorzellen in unterschiedlichen Kulturmedien

3.2.1 S4-Medium

Die in reinem S4-Medium - einem serumfreien Medium - kultivierten Stammzellen (Ansatz A) zeigten über die gesamte Versuchsdauer eine Kolonienbildung mit mittelgroßen bis großen gewölbten Zellkugeln. Diese werden im Folgenden vereinfachend Neurosphären genannt. Am Tag der Präparation fanden sich noch keine Zellkonglomerate in der Kultur. In den folgenden Tagen fingen die Zellen an, Neurosphären zu bilden und schon am 2. Tag konnte eine Anzahl von $4,7 \pm 1,5$ beobachtet werden. Sie waren durchschnittlich $0,6 \pm 0,3 \times 50\mu\text{m}$ groß. Am 5. Tag fanden sich im Durchschnitt $3,3 \pm 0,6$ Neurosphären pro ausgezählter Fläche mit einer mittleren Größe von $1,8 \pm 0,8 \times 50\mu\text{m}$. Nach dem 5. Tag stagnierte die Zahl der

NS bei durchschnittlich 4 ± 0 und bei einer Größe, die nie mehr als $1,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ betrug. In den darauffolgenden 15 Tagen trat keine weitere signifikante Veränderung mehr auf.

Während die NS anfänglich eine rosa Farbe aufwiesen, färbten sie sich im Laufe der Zeit vom Inneren her immer mehr zu bräunlichen Ansammlungen apoptotischer Zellen und Debris. Dies geschah unter Kulturbedingungen mit S4-Medium nach ca. 15 Tagen. Die Zellpopulationen zeigten typisches lineares Wachstum mit einer Verdopplungszeit von $2,8 \pm 0,2$ Tagen. Auch nach 15 Tagen war noch Proliferation zu verzeichnen. Allerdings nahm die Wachstumsrate mit der Zeit ab und erreichte ein Plateau, da im Rahmen dieser Arbeit keine Passagen durchgeführt wurden.

Differenzierungsansätze konnten zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

3.2.2 Neuronal Base-Medium

In den in reinem Neuronal-Base-Medium kultivierten Stammzellen (Ansatz B) waren - wie in allen Kulturen nach Präparation - am Tag 0 keine Zellkonglomerate. Auch in diesem Medium vereinigten sich die Zellen zunächst zu Neurosphären, so dass am 2. Tag $4,3 \pm 1,2$ Sphären gezählt wurden. Ihre Anzahl nahm jedoch rapide ab. Schon am 5. Tag waren deutlich weniger NS in der Kultur zu finden (durchschnittlich $0,7 \pm 1,2$ NS). Ab dem 7. Tag waren NS nur noch in einigen Kulturen ausmachbar, d.h. im Mittel fand sich eine Anzahl von $0,3 \pm 0,6$ NS.

Die Größe der NS verhielt sich im Vergleich zu Kulturen in S4-Medium gegensätzlich. Die Sphärengröße nahm nicht zu, sondern reduzierte sich von $0,5 \pm 0,06 \mu\text{m}$ am 2. Tag zu $0,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ am 5. Tag und schließlich zu $0,13 \pm 0,2 \mu\text{m}$ am 7. Tag. Da nach dem 7. Tag keine NS mehr in Kultur waren, wurde automatisch auch ihre Größe als 0 notiert.

Das Wachstumsverhalten der Zellpopulation war im Allgemeinen negativ, d.h. die absolute Anzahl an Zellen verringerte sich. Obwohl bei einzelnen Kulturen noch bis zum 2. Tag positives Wachstum gefunden werden konnte, fiel aber üblicherweise die Zellzahl konstant mit einer Halbierungszeit von $1,9 \pm 0,6$ Tagen ab.

Dabei wurden zunehmend auch morphologische Kriterien des Zelltodes beobachtet. So war schon am 2. Tag eine zunehmende Granulation der Zellen zu beobachten und am 4. Tag waren die NS deutlich braun gefärbt.

3.2.3 Vergleich von S4- und NB-Medium

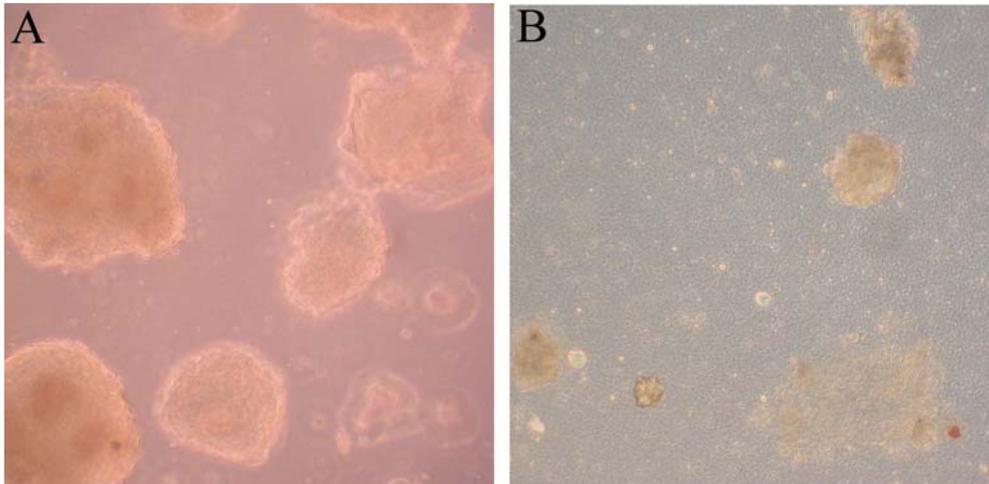


Abb. 2: Der Einfluss des Mediums auf die NS-Bildung

Vergleich der NS in A) S4- und B) Neuronal-Base-Medium am 4. Tag der Kultivierung in 200facher Vergrößerung. Die großen rosa gefärbten vitalen NS in S4-Medium unterscheiden sich deutlich von den kleineren braunen und unscharf begrenzten NS in NB-Medium.

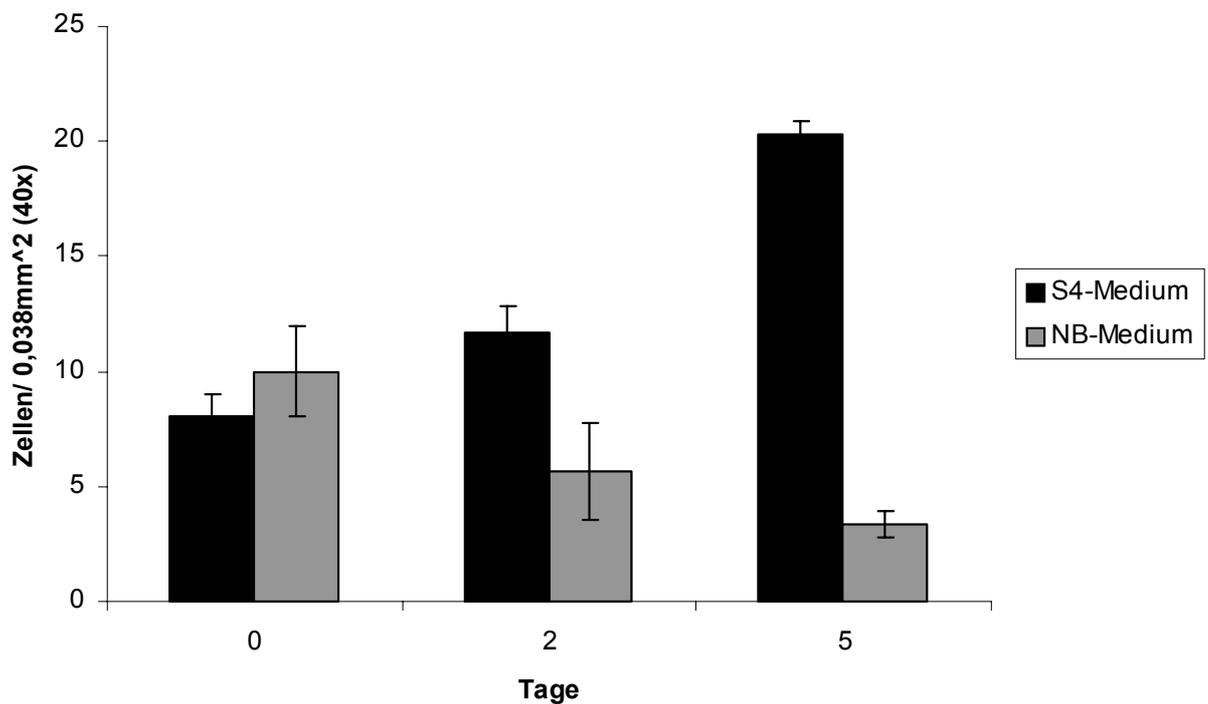


Abb. 3: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der Proliferation

Beide Zellpopulationen zeigen lineares Wachstum. Im Fall von S4-Medium ist dies positiv, während die Zellzahl in NB-Medium stetig abnimmt. Der Unterschied ist bereits am 2. Tag mit $\delta = 0,02$ signifikant.

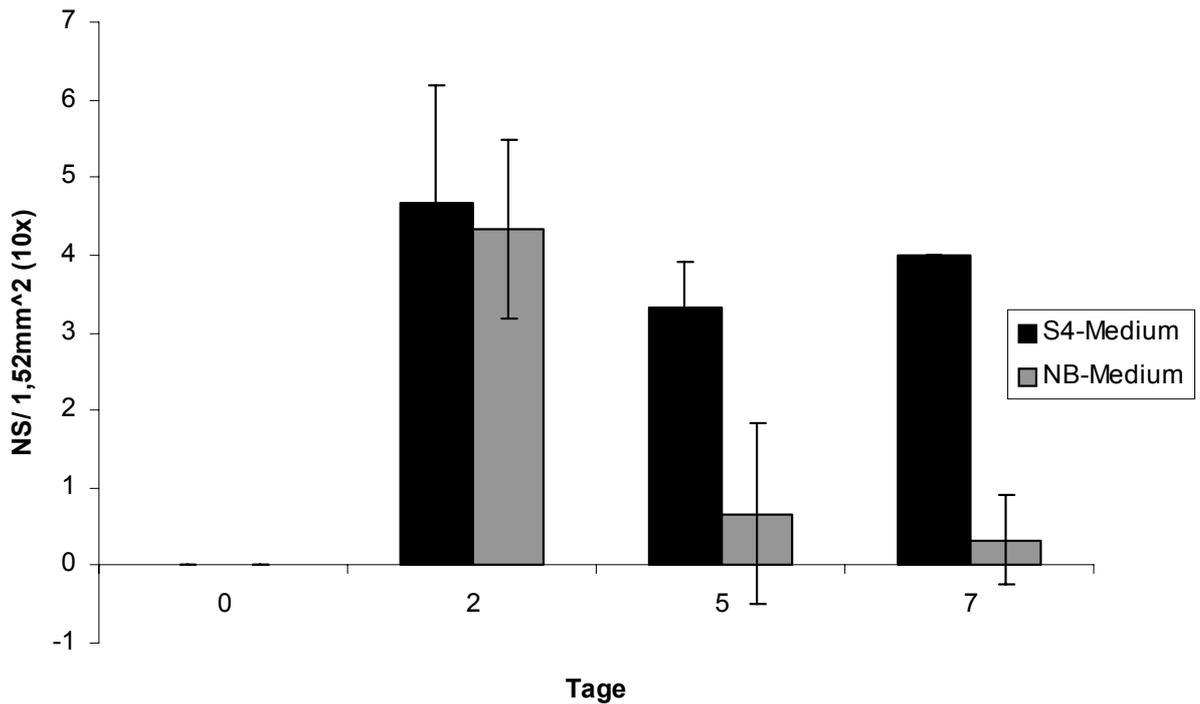


Abb. 4: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der NS-Menge

Die Menge der NS fällt unter beiden Medien, jedoch stagniert die Anzahl der NS in S4-Medium bei ca. 4 pro ausgezähltem Bereich, während in NB-Medium nach dem 9. Tag keine NS mehr gefunden werden konnten. Ab dem 5. Tag ist der Unterschied mit $\delta = 0,039$ signifikant.

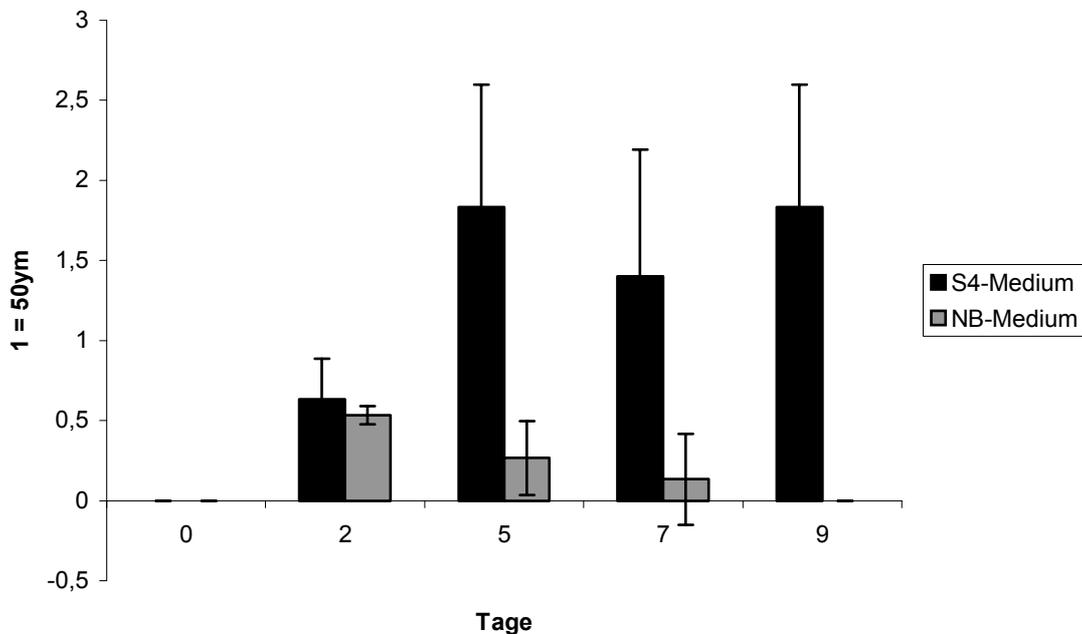


Abb. 5: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der NS-Größe

Während die NS in S4-Medium wachsen und am 9. Tag eine Größe von durchschnittlich 1,83 +/- 0,8µm erreichen, um welche sie im weiteren Verlauf schwankten, nimmt die NS-Größe in

NB-Medium kontinuierlich ab, so dass ab dem 5. Tag ein signifikanter Unterschied mit $\delta = 0,015$ zwischen den beiden Medien erkennbar ist. In NB-Medium nimmt mit der Größe gleichzeitig die Anzahl der NS ab, so dass am 9. Tag keine NS mehr in Kultur entdeckt werden konnten.

3.3 Verhalten der Stammzellen auf unterschiedlichen Substraten

Eine Auswahl an Substraten wurde auf ihre Eignung bezüglich Adhärenz und Differenzierung der Neurosphären getestet. Eine gute Adhärenz war die Voraussetzung für die Differenzierung der Zellen und wichtig, um ein ausreichendes Anhaften der Zellen während der späteren immunhistologischen Färbung zu gewährleisten. Unter den getesteten Substraten befanden sich einfache 24-TC-Kulturplatten aus Plastik (Cellstar), ein in die Vertiefung eingelegtes Glas-Deckplättchen und eine 24-Multikulturplatte mit Petriperm-Boden. Außerdem wurden alle Materialien mit und ohne Poly-D-Lysin-Laminin-Beschichtung getestet.

Ohne Laminin-Beschichtung

Bei der Kultivierung der Zellen auf TC-Plastikplatte und Petriperm ohne Laminin-Beschichtung konnte nur spärlich Differenzierung einiger am äußeren Rand gelegener Neurosphären beobachtet werden. Diese wurden jedoch durch die immunhistochemischen Arbeitsvorgänge trotz vorheriger Fixierung mit Methanol bzw. Triton-X abgewaschen. Auf nativen Glas-Deckgläschen fand dagegen keinerlei Differenzierung statt.

Mit Laminin-Beschichtung

Auf allen drei Materialien konnte nach Beschichtung Adhärenz und Differenzierung festgestellt werden. Differenzierungsunterschiede zeigten sich allerdings quantitativ und lokalisatorisch. So waren nur spärlich differenzierte Neurosphären am Rand der Deckgläschen zu finden. Ihre Anzahl nahm nach Durchführung der immunhistochemischen Färbung weiter ab.

Dagegen zeigten sich in der Plastik-TC-Kulturschale und auf Petriperm gute Ergebnisse: Die Zellen waren in der ganzen Kulturschale verteilt, gut adhärent und differenzierten sich in zufriedenstellender Weise.

Unterschiede zwischen diesen beiden laminierten Substraten wurden jedoch bei der Auswertung der immunhistologischen Bilder deutlich. So verursachten das Plastikmaterial, aber auch das Glas, eine starke Eigenfluoreszenz. Die auf Petriperm gewonnenen Fotos waren deutlich schärfer und damit bei weitem besser beurteilbar.

Zur quantitativen Erfassung der Adhärenz der Zellen auf den unterschiedlichen Substraten wurde die Anzahl der NS nach immunhistochemischer Färbung mit Hilfe des Netzmikrometers (10x10/5; 10) von Zeiss bei 100facher Vergrößerung festgestellt, d.h. die Anzahl der NS pro 1.52mm². Es wurde zum einen die Anzahl der NS insgesamt und zum anderen nur die Anzahl der differenzierten NS gezählt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass auf Glas und im Plastikwell nur diejenigen NS adhärenz waren, die sich auch tatsächlich differenziert hatten. D.h., dass die Anzahl der differenzierten NS jeweils der Gesamtanzahl pro ausgezähltem Gebiet entsprach.

Die beiden Materialien unterschieden sich jedoch insofern, als auf Glas nur durchschnittlich 0,75 +/- 0,83 NS pro 1,52mm² nach der Färbung verblieben waren, während sich im Plastikwell 5,2 +/- 0,75 NS im Feld zeigten.

Anders verhielt es sich mit den NS in Petripermschalen. Hier hafteten auch nicht differenzierte NS. Das bedeutet, dass die Anzahl der NS insgesamt die der differenzierten NS übertraf. So waren z.B. unter FGF (100ng/ml) in einem Fall 10,25 +/- 1,79 NS insgesamt gegenüber 3 +/- 1,58 differenzierten NS pro 1.53mm² zu finden.

Im Gegensatz dazu unterschied sich die Anzahl der gesamten NS (10/1,53mm² +/- 2,23) von den differenzierten (9.75/ 1,52mm² +/- 2,12) im Versuch mit FGF (10 ng/ml) nicht so signifikant, da die meisten NS sich unter dieser Konzentration sowieso differenziert hatten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Laminin-beschichteten Petriperm-Kulturschalen die beste Adhärenz der Zellen und die beste Bild-Qualität nach immunhistologischer Färbung gewährleisten; sie wurden daher für die ganze Studie verwendet.

Der T-Test zeigte durchweg Werte mit $\delta < 0,05$, d.h. der Unterschied zwischen den drei Substraten ist signifikant. Konkret ergab der T-Test für Glas/ Petriperm $\delta = 0,00055998$, für Glas/ Plastik $\delta=0,00363774$ und schließlich für Plastik/ Petriperm $\delta = 0,03581035$.

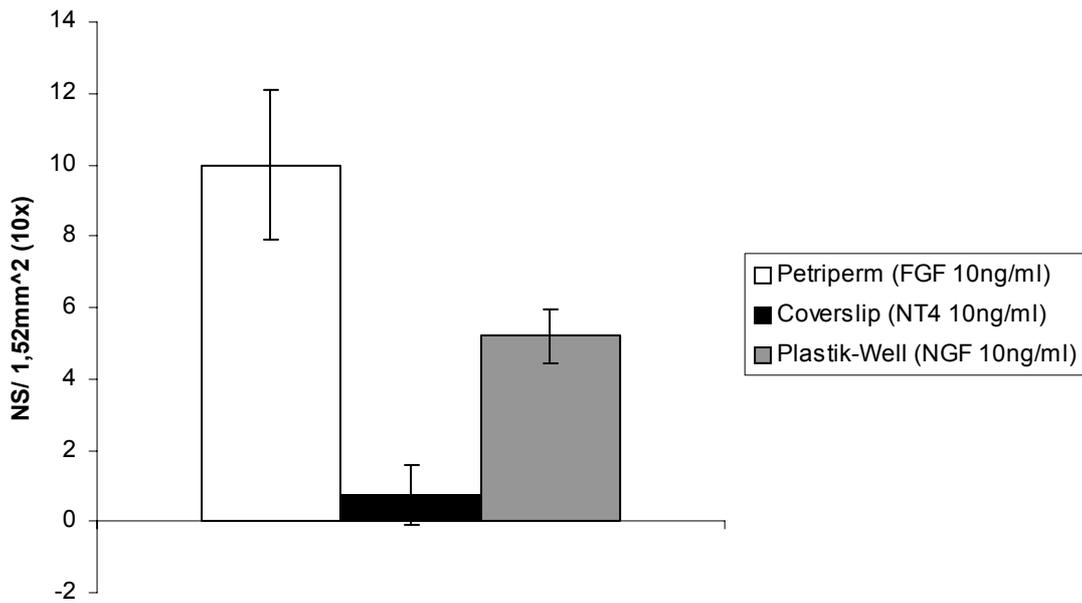


Abb. 6.: Adhäsion der Neurosphären auf verschiedenen Substraten

Die Neurosphären wurden nach Durchführung der Immunhistochemie pro 1,52mm² ausgezählt. In laminierten Petripermschalen wurde die beste Haftung erreicht, während beschichteten Deckgläschen kaum Zellen anhafteten.

3.4. Zellwachstum bei unterschiedlicher Stimulation

3.4.1 Konzentrations-Wirkungsverhältnis von FGF

Die Bestimmung der Zelldichte in Kulturen, deren S4-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von FGF angesetzt worden war, zeigte, dass die Zellkulturen, denen FGF (10ng/ml) und FGF (50ng/ml) (Ansatz G und F) zugesetzt worden war, die stärkste Proliferation mit einer Verdopplungszeit von 1,7 +/- 0,2 bzw. 0,4 Tagen aufwiesen. Erstaunlicherweise war das Zellwachstum derjenigen Kulturen mit der höchsten Wachstumsfaktorkonzentration von FGF (100ng/ml) (Ansatz H) am geringsten; die Verdopplungszeit betrug 2,5 +/- 0,3 Tagen (vom 0. bis 2. Tag), d.h. fast einen Tag länger als mit FGF (10ng/ml) und FGF (50ng/ml). Damit übertrifft die Zellkultur in ihrer Wachstumsrate kaum diejenige, die in reinem S4-Medium ohne WF kultiviert worden war. Der Unterschied im Wachstumsverhalten bzw. der Zellzahlen war am 2. Tag, so zeigte der T-Test, zwischen den Kulturen mit FGF (50ng/ml) und FGF (100ng/ml) mit $\delta = 0,04$ signifikant, während der Unterschied zwischen FGF (50ng/ml) zu FGF (10ng/ml) deutlich über dem Konfidenzintervall von $\delta = 0,05$ lag und damit keine Signifikanz aufwies. Am 5. Tag der Kultivierung nahm der Wert für Sigma zu und

damit die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Zellzahlen pro $0,038\text{mm}^2$ der Zellkulturen F, G und H ab.

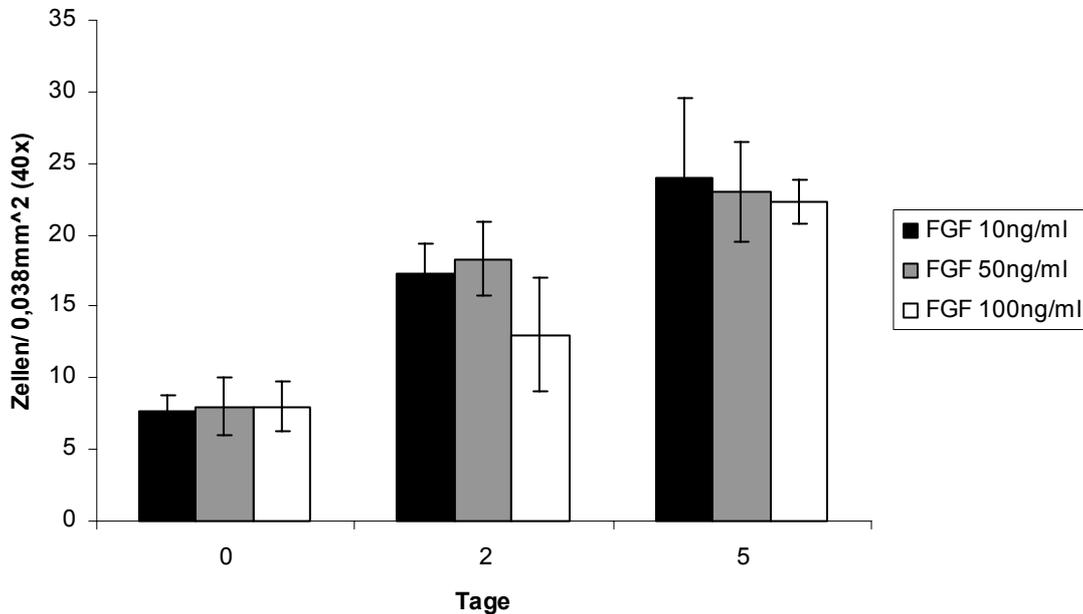


Abb. 7: FGF-Konzentrations-abhängige Proliferation

Die Kulturen mit FGF (50ng/ml) zeigten eine signifikant kürzere Verdopplungszeit als solche mit FGF (100ng/ml). FGF (10ng/ml) und FGF (50ng/ml) unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die Verdopplungszeit der Zellen dagegen kaum.

3.4.2 Konzentrations-Wirkungsverhältnis von NT4

In den Kulturen, denen NT4 in drei verschiedenen Konzentrationen zugeführt wurde, zeigten sich keine Unterschiede in der Proliferation. Alle drei Konzentrationen steigerten die Verdopplungszeit um 1,1 Tage im Vergleich zum S4-Medium. Das Balkendiagramm zeigt also, dass die Verdopplungszeit trotz unterschiedlicher Ausgangszellzahlen bei 1,6 +/- 0,2 bzw. 0,3 Tagen lag. Vom 2. zum 5. Tag wuchs die Zellpopulation (I) mit NT4 (10ng/ml) noch einmal etwas stärker als die Populationen J und K und erreichte somit - bei allerdings auch stärkster Ausgangspopulation - die höchste Zelldichte.

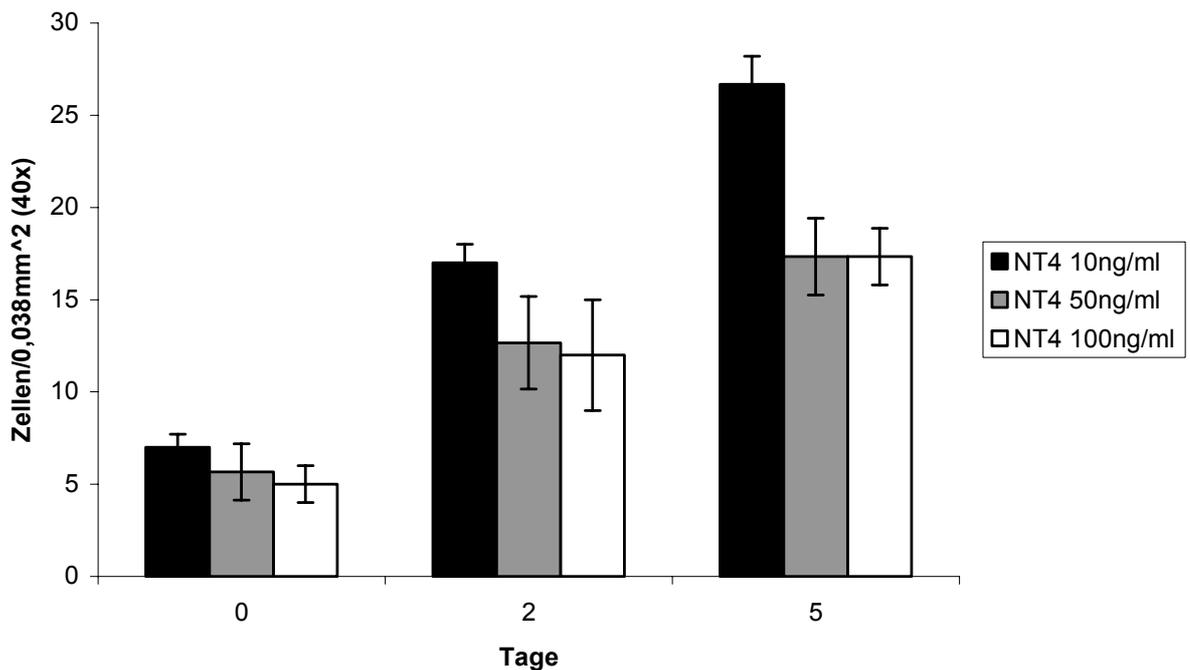


Abb. 8: NT4-Konzentrations-abhängige Proliferation

Trotz Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an NT4 unterscheiden sich die Verdopplungszeiten der drei Kulturen kaum.

3.4.3 Konzentrations-Wirkungsverhältnis von NGF

Beim Vergleich der Proliferation der Kulturen C-E (also unter Zugabe von NGF 10, 50 und 100ng/ml), fällt auf, dass NGF (10ng/ml) und NGF (50ng/ml) fast identisch stärkere Proliferation mit einer Verdopplungszeit von 1,8 +/- 0,1 bzw. 0,2 Tagen hervorrufen als die Kultur E (NGF 100ng/ml) mit 2,1 +/- 0,2 Tagen. Das Balkendiagramm scheint andere Resultate vorzutäuschen, da hier die absoluten Zellzahlen imponieren, die jedoch von der Anfangsdichte der Kulturen abhängen und damit präparationsbedingt sind. Bei Prüfung der Unterschiede im Wachstumsverhalten der drei Kulturen mit dem T-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich allerdings, dass diese nicht signifikant sind.

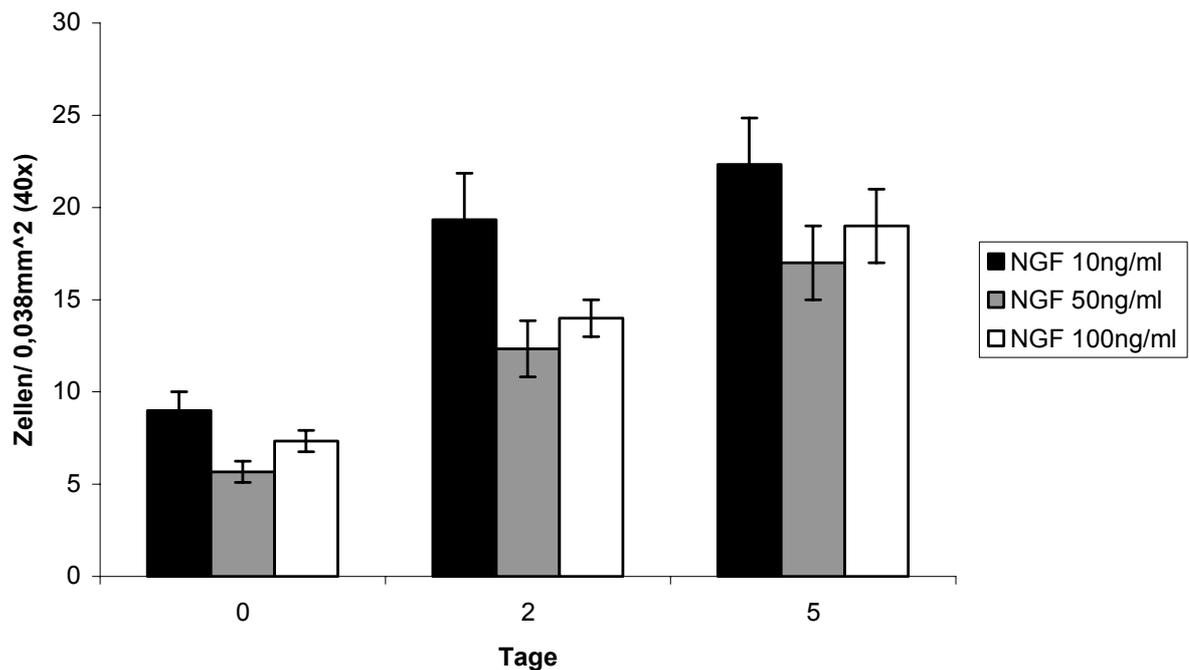


Abb. 9: NGF-Konzentrations-abhängige Proliferation

Die Kulturen mit NGF (10ng/ml) und NGF (50ng/ml) verdoppeln ihre Zellzahl schneller als diejenigen mit NGF (100ng/ml). Allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant.

3.4.4 Vergleich der verschiedenen WF (10ng/ml) bezüglich der Proliferation

Beim Vergleich der „Differenzierungskonzentration“ der drei Wachstumsfaktoren wird erkennbar, dass durch Zugabe von FGF, NT4 und NGF (10ng/ml) eine Steigerung der Proliferation gegenüber reinem S4-Medium von maximal 1,1 Tagen (im Falle von NT4) erreicht werden konnte. Die drei Faktoren zeigten ansonsten ein recht ähnliches wachstumförderndes Verhalten mit minimalen Unterschieden von jeweils 0,1 Tagen in der Verdopplungszeit der Kulturen. Dabei betrug die Verdopplungszeit der Zellen unter NT4-Einfluss (10ng/ml) im Mittel 1,6 +/- 0,2 Tage. Darauf folgte FGF mit 1,7 +/- 0,2 Tagen und schließlich erreichte NGF nur eine Verdopplungszeit von 1,8 +/- 0,1 Tagen. Diese Unterschiede zwischen den drei Wachstumsfaktoren gleicher Konzentration sind in keinem Fall signifikant.

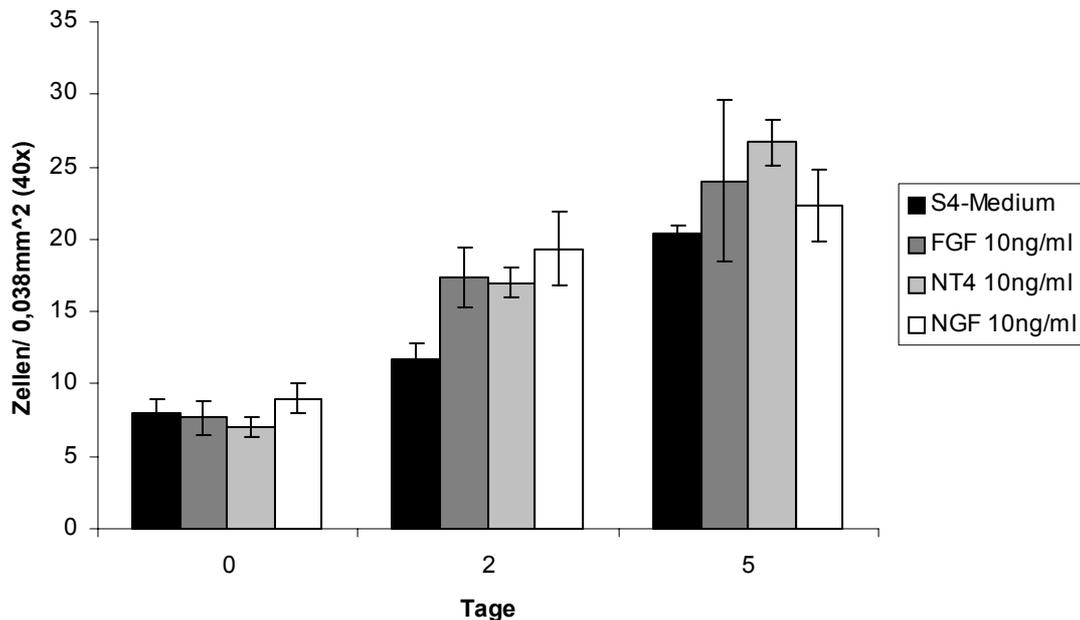


Abb. 10: Einfluss der verschiedenen WF auf die Proliferation

Zugabe einer der drei WF in einer Konzentration von 10ng/ml steigert die Zellproliferation im Vergleich zu S4-Medium allein signifikant: So ergibt sich im Falle von FGF (10ng/ml) zu S4 im T-Test $\delta = 0,004$.

3.5 Quantitative Aspekte des Zellwachstums

4.5.1 Vergleich der verschiedenen WF bezüglich der NS-Anzahl

Zunächst konnten direkt nach Präparation und Vereinzeln der Zellen natürlich keine NS ausgemacht werden. Bei der Auszählung am 2. Tag jedoch hatten sich in allen Kulturen eine ausreichende Anzahl an NS gebildet. Diese Anzahl rangierte zwischen $6,4 \pm 0,6$ (NT4 100ng/ml) bis $13,4 \pm 1,5$ (FGF 50ng/ml) Sphären pro $1,52\text{mm}^2$ bei 100facher Vergrößerung. Die drei Wachstumsfaktoren unterschieden sich hauptsächlich in der Tendenz, ob die Anzahl der NS gleich blieb, zu- oder abnahm und (wie später beschrieben) bezüglich der Größe der NS.

So zeigten alle drei Kulturen mit FGF eine Abnahme der NS-Dichte. Die NS-Menge verminderte sich dabei maximal um $6,3$ Sphären pro $1,52\text{mm}^2$ im Fall von FGF (50ng/ml). Dagegen stieg die Anzahl der NS in NGF und NT4 (10 und 100ng/ml), während sie unter NT4 und NGF (50ng/ml) fluktuierte.

Zwischen den drei WF in einer Konzentration von 10ng/ml konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge der sich bildenden NS gesehen werden; allerdings unterschieden sich ab dem 5. Tag alle drei Kulturen mit WF signifikant von den Kulturen, die nur S4-Medium enthielten. Als kleinster Unterschied fand sich demnach am 5. Tag im T-Test für unabhängige Stichproben $\delta = 0,00035$ für NGF (10ng/ml) im Vergleich zu S4-Medium.

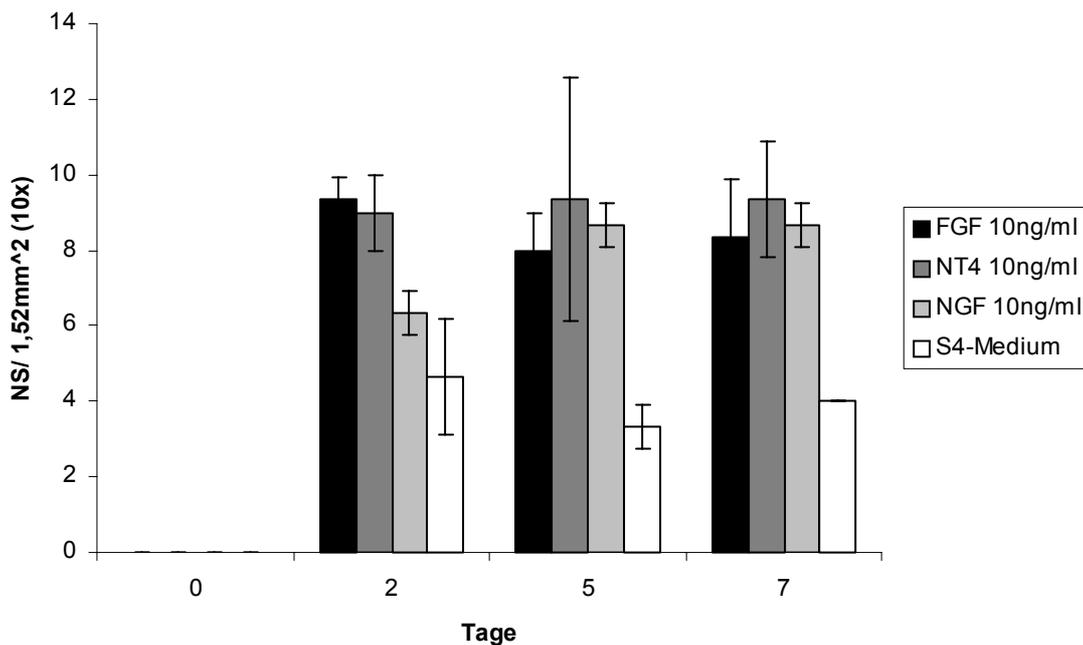


Abb. 11: Einfluss der verschiedenen WF auf die NS-Dichte

In S4-Medium entwickelten sich signifikant weniger NS als in WF-supplementiertem Medium. Am Beispiel FGF (10ng/ml) im Vergleich zu S4-Medium kann die Signifikanz des Unterschiedes gezeigt werden mit $\delta = 0,032$.

Konzentrationsabhängige Unterschiede in der Anzahl der NS waren bei keinem der drei Wachstumsfaktoren signifikant. Dennoch wurden im Falle von FGF und NT4 (10ng/ml) am 7. Tag die meisten NS gefunden, obwohl z.T. die Anzahl der NS am 2. Tag in den Kulturen mit höheren Konzentrationen an WF diese noch übertroffen hatten. Auch beim NGF zeigte die Kultur mit 10ng/ml des WF die stärkste Zunahme an NS mit $6,4 \pm 0,6$ NS am 2. Tag zu $8,7 \pm 0,6$ NS, d.h. eine Zunahme von 2,3 NS pro $1,52\text{mm}^2$ in fünf Tagen, während NGF (50ng/ml) sogar um 0,7 NS verlor und NGF (100ng/ml) nur um eine NS zunahm.

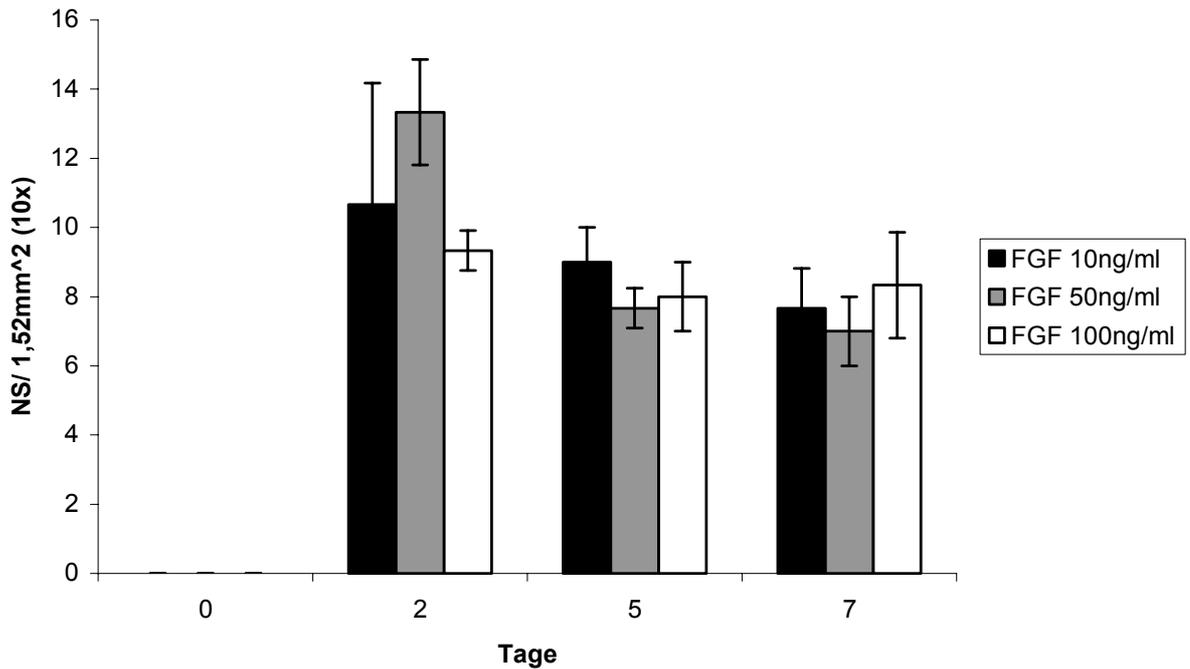


Abb. 12: FGF-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte

Der Vergleich der NS-Menge in verschiedenen FGF-Konzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede.

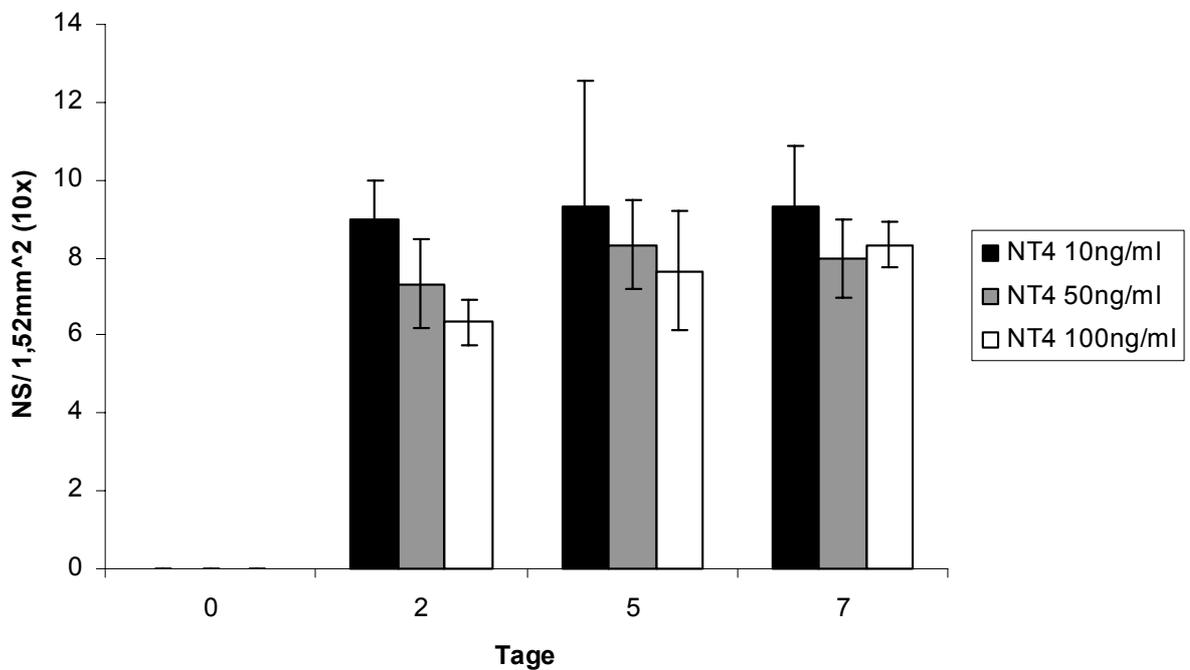


Abb. 13 NT4-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte

Auch bezüglich NT4 ergaben sich keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der NS-Menge

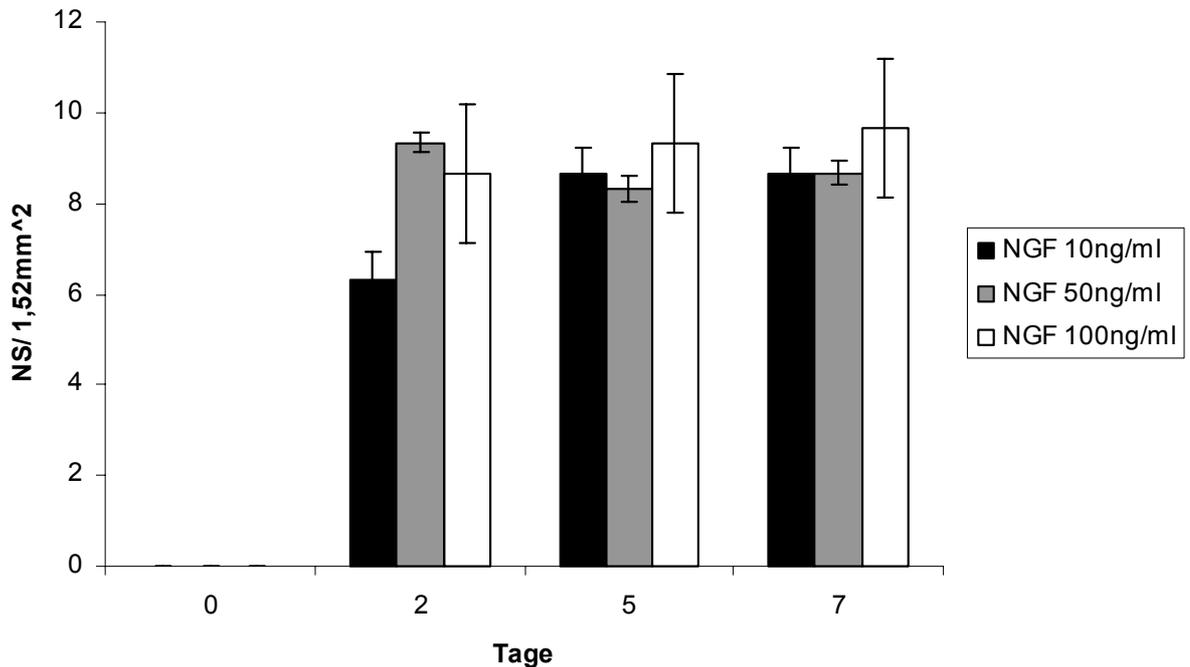


Abb. 14: NGF-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte

In Kulturen mit NGF (100ng/ml) finden sich die meisten NS am 7. Tag. NGF (10ng/ml) verzeichnet dagegen die stärkste Zunahme in der untersuchten Periode. Signifikanz wurde nicht nachgewiesen.

Auffällig war, dass sich die NS mit der Zeit in der Kulturschale umverteilten und sich bevorzugt am Rand aufhielten. Weiterhin lagerten sie sich aneinander an und schienen zu fusionieren, so dass in diesen großen Zellaggregaten mit gewölbten Rändern kaum mehr die Einzelsphären ausgemacht werden konnten.

Die Anzahl der NS blieb über die 7-Tage-Periode hinaus weitgehend konstant. Da jedoch nach einiger Zeit kein Nährmedium mehr zugeführt wurde, vereinzelt sich die Zellen wieder und die NS-Anzahl nahm ab. Andere NS verblieben als braune unscharf begrenzte Aggregate apoptotischer Zellen.

Zusammenfassend konnte bezüglich der Bildung und Dichte von NS zwischen den drei WF kein prägnanter Unterschied festgestellt werden, so dass alle drei Konzentrationen und WF für die Bildung von NS etwa gleich gut geeignet sind.

3.5.2 Vergleich der drei WF bezüglich der NS-Größe

Insgesamt wurde in allen Kulturen beobachtet, dass sich NS bildeten, so dass bereits am 2. Tag NS mit Größen von minimal $0,7 \pm 0,24 \times 50\mu\text{m}$ im Falle von S4-Medium

und maximal $1,5 \pm 0,4 \times 50\mu\text{m}$ im Falle von NT4 gefunden wurden. Hierzu muss angemerkt werden, dass in jeder Kultur sowohl größere wie auch kleinere Sphären nebeneinander existierten. Es wurden daher alle Sphären, die sich innerhalb eines Strichkreuzokularfeldes befanden, gemessen und ihre durchschnittliche Größe als Messgröße herangezogen.

In allen Kulturen (außer in NB-Medium) wuchsen die NS bis zum ca. 5.-9. Tag. Zu diesem Zeitpunkt blieben sie in ihrer Größe stabil oder fluktuierten um einen Mittelwert. Wurde das Angebot an Nährmedium oder Sauerstoff bei zu hohen Kulturdichten wegen Nicht-Durchführung von Passagen oder Abbruch der Nährstoffzugabe knapp, starben die NS und bildeten unscharfe braune Zellaggregate oder die Zellen lösten sich aus ihrem Verband, so dass später nur noch Einzelzellen gefunden werden konnten.

Im Vergleich der WF untereinander und mit S4-Medium konnte zunächst festgestellt werden, dass die NS in Medien, denen Wachstumsfaktoren - egal welcher Art und Konzentration - zugeführt worden waren, größere Durchmesser annahmen. Dieser Unterschied war im Falle von NGF und FGF (10ng/ml) am 7. Tag signifikant mit $\delta = 0,007$ bzw. $\delta = 0,05$.

Bei jedem der drei WF nahm die Größe der NS umgekehrt proportional zur Konzentration zu, wobei die Unterschiede aber nicht signifikant waren.

Beim Vergleich der drei Wachstumsfaktoren untereinander konnten, so zeigte der T-Test für unabhängige Stichproben, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Betrachtet man jedoch die einzelnen Messwerte, so war am 7. Tag NGF mit $2,8 \pm 0,3 \times 50\mu\text{m}$ -großen NS größer als FGF ($2,3 \pm 0,3 \times 50\mu\text{m}$). Die kleinsten NS fanden sich in NT4-Kulturen mit durchschnittlich $2,1 \pm 0,7 \times 50\mu\text{m}$ großen Sphären. Differenzierung (d.h. das Auswachsen von Fortsätzen) fand hauptsächlich aus den großen Sphären von mindestens $75\mu\text{m}$ bis $150\mu\text{m}$ oder größeren Sphären statt.

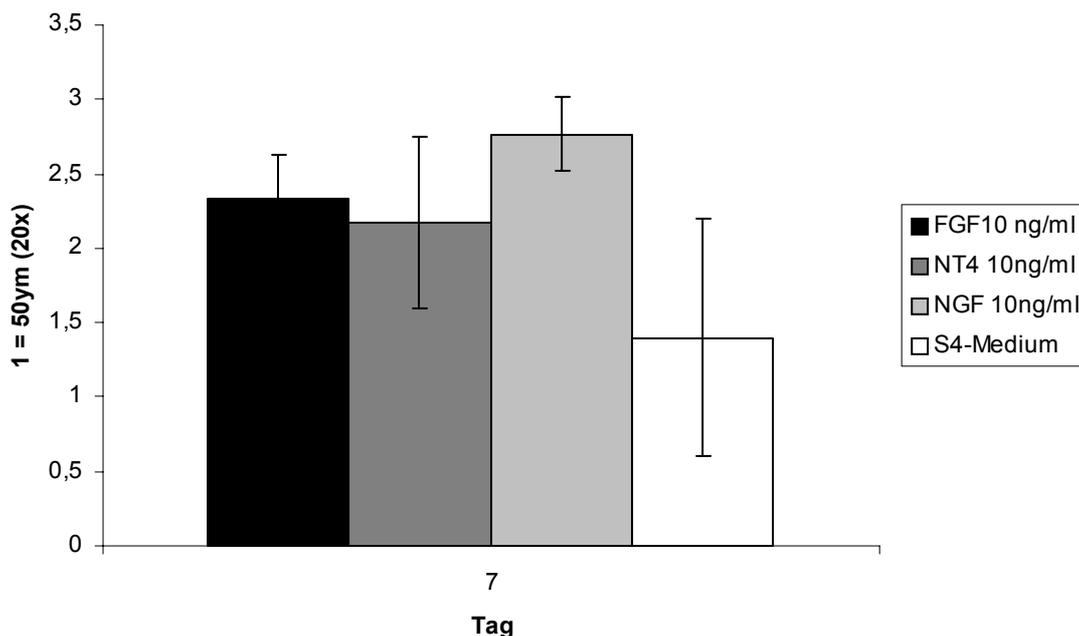


Abb. 15: Einfluss der verschiedenen WF auf die NS-Größe

Größe der NS am 7. Tag unter Einfluss von S4-Medium und den drei WF in einer Konzentration von 10ng/ml. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen NGF und S4-Medium, nicht jedoch zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren.

3.6 Phänotypisierung der Zellen

Die Beurteilung der Zellmorphologie, Dichte und Neurosphären-Bildung sowie der Differenzierungsvorgänge in den Vertiefungen der 24-TC-Zellkulturplatten erfolgte mit Hilfe des Stereomikroskops SV6 von Zeiss. Die Veränderungen der Zellmorphologie wurden mit der Nikon E450 dokumentiert und b.B. mit Photoshop Version 7.0 bearbeitet.

3.6.1 Ausgangszustand aller Kulturen am Tag 0

Zunächst konnten in allen Kulturen direkt nach Präparation runde, homogene, relativ kleine (ca. 10 μ m) Zellen beobachtet werden. Sie schwammen frei im Nährmedium herum. Nach zwei Stunden wurden erste adhärenente Einzelzellen beobachtet. Dieses Phänomen, das übrigens auch in reinem S4-Medium auftrat, verschwand allerdings bald wieder, so dass dann wieder nur noch frei-schwimmende Einzelzellen in Kultur waren. Weiterhin wurden kleine Zellkonglomerate beobachtet, deren Größe und Anzahl variierten. Diese entsprachen vermutlich eher schlecht vereinzelt Zellkonglomeraten, da sie morphologisch wenig Ähnlichkeit zu Neurosphären aufwiesen, wie sie in Publikationen beschrieben werden.

Die Anfangsdichte der Zellkulturen hing davon ab, aus wie vielen der 40 präparierten Eiern Hühnerembryo-Köpfchen gewonnen wurden. Verluste ergaben sich aus unterentwickelten Eiern oder durch Mängel bei der Eierpräparation.

3.6.2 Morphologie der Zellen unter Einfluss von FGF

Die Zellen waren direkt nach der Präparation wie oben beschrieben als runde, homogene, relativ kleine nicht-adhärente Zellen sichtbar.

Nach FGF-Zugabe (10ng/ml) zeigten die Zellen bereits nach zwei Stunden erste Veränderungen der Morphologie, da sie zu diesem Zeitpunkt adhärent wurden. In FGF (10ng/ml) wurden die Zellen - im Vergleich mit den anderen Wachstumsfaktoren - am schnellsten adhärent und ließen morphologische Veränderungen erkennen.

Konkret veränderten die Zellen sich folgendermaßen: Sie wurden adhärent und flachten somit ab. Dabei sahen sie Gliazellen sehr ähnlich.

Sie bildeten im weiteren Verlauf multiple, kleine zytoplasmatische Zellausläufer, welche den Zelldurchmesser z.T. weit übertrafen.

Als Zeichen der Vitalität fand nun auch eine Migration zu Zellhaufen statt. Diese sogenannten Neurosphären wuchsen in den folgenden Tagen bis zu 115µm und waren ebenfalls größtenteils adhärent.

Bei weiterer Stimulation mit FGF (10µl/ml) nahm sowohl der Anteil der Zellen mit dendritischen Zellausläufern als auch die Größe der Ausläufer zu.

Ab dem 1. Tag waren auch erste, sehr feine, neuronalen Ausläufern ähnliche Strukturen, sichtbar, die in den folgenden Tagen an Länge zunahmen.

Die Neurosphären schienen dabei das Zentrum des Differenzierungsgeschehens zu sein und den fibroblastenartigen Zellen aufzusitzen.

Am 5. Tag konnten zahlreiche NS mit vielen Ausäufeln über die ganze Kulturschale verteilt beobachtet werden.

In den Vertiefungen der Multiwells waren stets auch nicht-adhärente, kleine kugelige und nicht-differenzierte Einzelzellen auszumachen und ebenso fanden sich frei-flottierende NS kleineren Durchmessers, die nicht an den Differenzierungsvorgängen teilnahmen.

Die Neurosphären konnten teilweise durch Einsaugen mit der Eppendorfpipette vereinzelt werden. Nur wenige Zellen vereinigten sich jedoch danach wieder zu NS, so dass ihre Menge gering blieb.

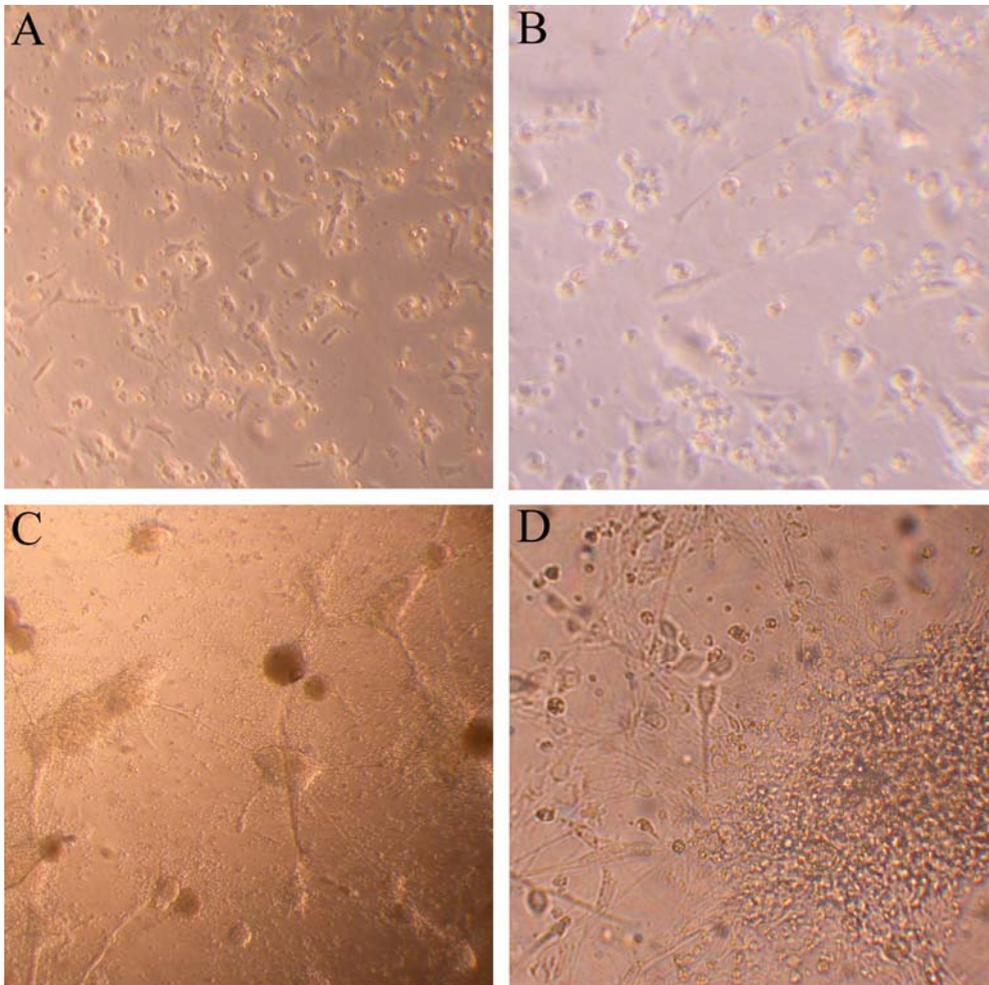


Abb. 16: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von FGF (10ng/ml)

Zellkultur unter FGF-Einfluss (10ng/ml)

- A) Tag 0 (200x): Die Zellen sind adhären, abgeflacht und zeigen kurze zytoplasmatische Ausläufer.
- B) Tag 1 (400x): Die Länge der Ausläufer nimmt zu.
- C) Tag 5 (100x): Die NS sind Ausgangspunkt der neuronalen Ausläufer und damit zentrale Strukturen der Differenzierung
- D) Tag 5 (200x): Ein verzweigtes Netzwerk feinsten Ausläufer wächst aus einer NS.

3.6.3 Morphologie der Zellen unter NT4-Einfluß

Am Tag 0 (d.h. direkt nach der Präparation der Zellen) unterschieden sich die Zellen unter Einfluss von NT4 (10ng/ml) bezüglich ihrer Ausgangs-Morphologie nicht von der anderer Kulturen.

Am 1. Tag wurden die Zellen bereits adhärent und bildeten erste Ausläufer bzw. änderten ihre Form im Vergleich zu den frei im Medium schwimmenden runden Zellen. Die Fortsätze ähnelten verzweigten Gliazellen im Gegensatz zu den unter FGF (10ng/ml) eher unverzweigten fibroblastenartigen Zellen. Außerdem waren sie länger und breiter als diejenigen in FGF und schienen auch untereinander stärker vernetzt und mit den Neurosphären in Kontakt zu stehen.

Weiterhin hatten sich einige Zellen zu NS versammelt.

Am 2. und 3. Tag nahm die Anzahl und Größe der NS zu und es wurden vereinzelt Verbindungen zwischen diesen beobachtet. Die Dichte der gliaartigen Zellen verringerte sich dagegen.

Ab dem 6. Tag konnten nun zahlreiche Neurosphären beobachtet werden, von denen einige die typischen (sie zirkulär umgebenden) Ausläufer entwickelt hatten. Diese variierten sehr in ihrer Stärke: Einige waren sehr fein, verzweigt und ähnelten neuronalen Zellfortsätzen, andere wiederum hatten größere Durchmesser, wie sie bei Gliazellen gefunden werden.

Eine Besonderheit, die nur die Zellen unter NT4-Einfluss aufwiesen, war der sehr geradlinige und strahlenförmige Charakter der Ausläufer. Außerdem führte NT4 zur vermehrten Bildung von Ausläufern pro NS.

Die Anzahl an NS mit Fortsätzen und die Länge der Auswüchse nahm bis zum 11. Tag zu. Erst jetzt entsprach die Kultur mit NT4 mengenmäßig der Differenzierung, wie sie in FGF und NGF beobachtet worden war.

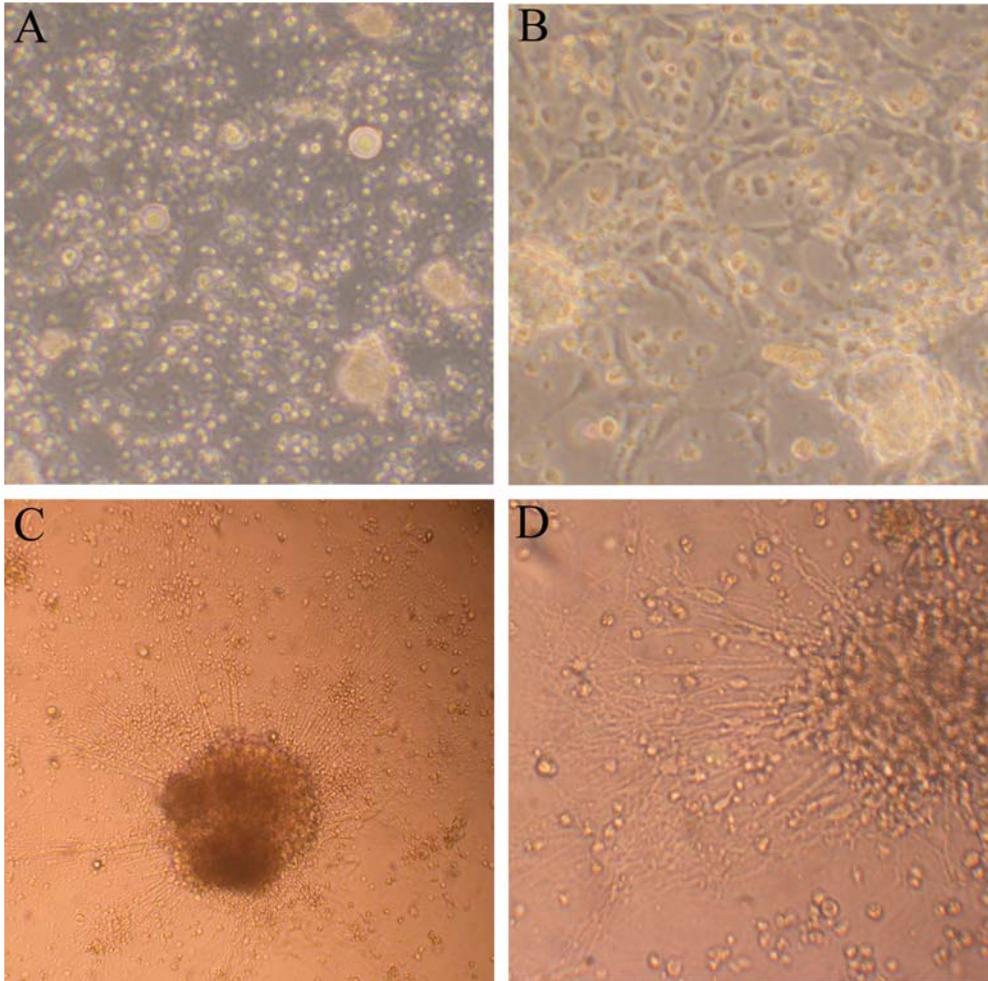


Abb. 17: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von NT4 (10ng/ml)

Zellkultur nach Zugabe von NT4 (10ng/ml)

- A) Tag 0 (200x): Direkt nach der Kultivierung flottieren monophase, runde Einzellzelle und kleine NS frei im Nährmedium.
- B) Tag 1 (400x): Die Zellen werden adhären und ähneln Gliazellen mit verzweigten Fortsätzen.
- C) Tag 11 (400x): NS sind zirkulär von langen dünnen Ausläufern umgeben.
- D) Tag 11 (100x): Die neuronalen Ausläufer bilden ein feines Netzwerk um die NS.

3.6.4 Morphologie der Zellen unter NGF-Einfluss

Zellen, die mit NGF (10ng/ml) kultiviert worden waren, entwickelten am 1. Tag ebenfalls die ersten verzweigten Gliazell-ähnlichen Zellausläufer. Diese traten in der gesamten Kulturschale verteilt auf, waren jedoch nicht so dicht wie diejenigen der NT4-Kultur. In den folgenden 2 Tagen rarifizierten sich die Gliazell-ähnlichen Strukturen, wuchsen dafür aber in Länge und Breite. Die Zellen migrierten zu stetig größer werdenden Neurosphären, die durch ihre Ausläufer miteinander in Verbindung zu stehen schienen. Am 5. Tag waren bei 400-facher Vergrößerung auch erste dünne Neuron-ähnliche Strukturen zu erkennen. Am 6.Tag schließlich imponierten einzelne

große Neurosphären mit langen Glia-ähnlichen Ausläufern und wenigen hauchdünnen Axon-artigen Ausläufern. Die Ausläuferdichte war im Vergleich zu den NS in NT4 insgesamt geringer und insbesondere die Menge an dünnen neuronartigen Ausläufern war sehr gering.

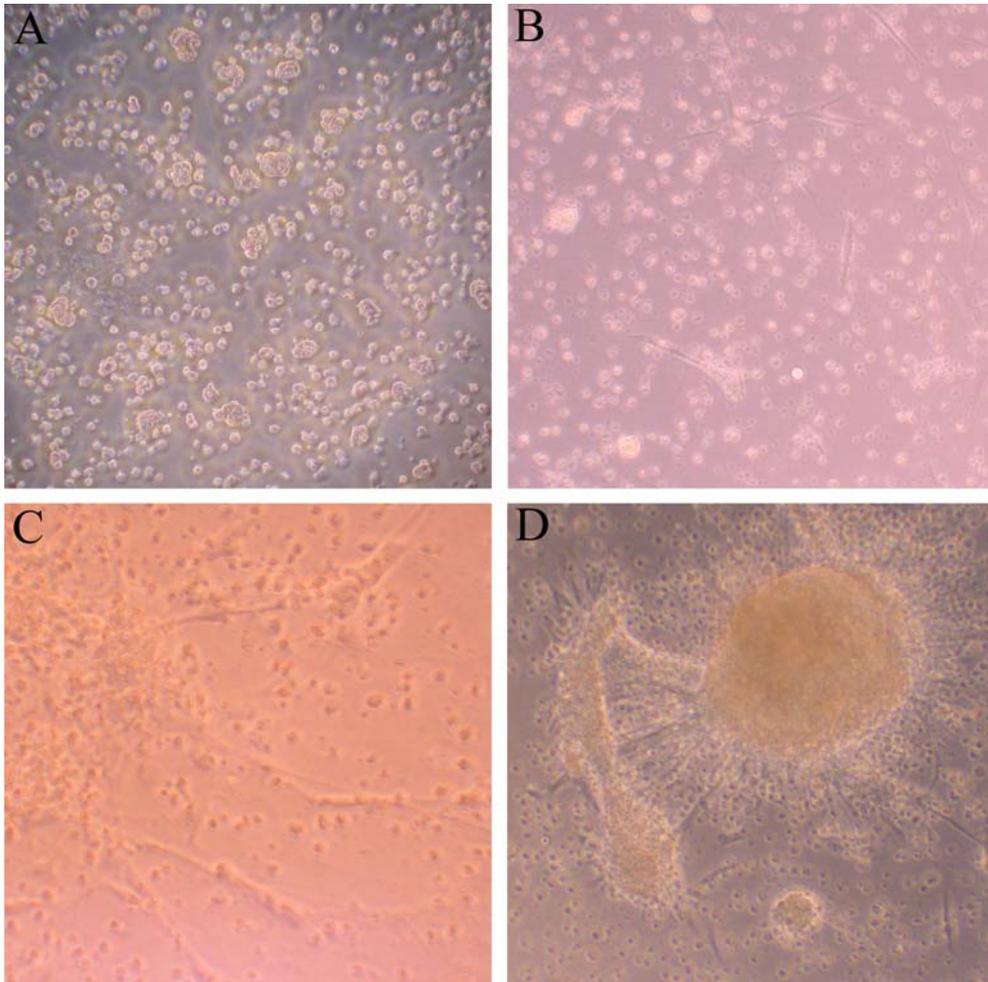


Abb. 18: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von NGF (10ng/ml)

Zellkultur mit NGF (10ng/ml)

- A) Tag 0 (200x): Die monomorphen, runden Eizellen und kleine NS sind direkt nach Kultivierung noch nicht adhären.
- B) Tag 2 (200x): Unter NGF war ein geringerer Anteil an Zellen adhären und nahm morphologisch ein glia-ähnliches Aussehen an.
- C) Tag 6 (200x): Aus den NS wachsen gliaartige und neuronale Ausläufer, allerdings spärlicher als es unter FGF und NT4 der Fall war.
- D) Tag 6 (400x): Die Ausläufer stehen oft mit mehreren NS in Kontakt und scheinen diese zu verbinden.

3.6.5 Konzentrationsabhängige Zelldifferenzierung

Die Zellen, deren Kulturmedium mit Wachstumsfaktoren in Konzentrationen von 50ng/ml bzw. 100ng/ml supplementiert wurde (Ansatz J, K, D,E und G,H), zeigten

nicht oder nur vereinzelt die Ausbildung von gliaartigen Zellen. Differenzierung der NS, wie sie unter WF in einer Konzentration von 10ng/ml gesehen wurde, konnte gar nicht oder nur in sehr wenigen NS beobachtet werden, die sich am Rande des *Wells* aufhielten. Es wuchsen weiterhin nur wenige und kurze Ausläufer. Ein immunhistochemisches Färben lohnte sich auf Grund der hohen Verlustrate der sowieso wenig adhärennten NS nicht.

3.7 Wachstumsfaktor-Entzug

Der Versuch eines Wachstumsfaktor-Entzuges schlug fehl. Das Zentrifugieren und Entfernen des Ursprungs-Mediums schadete den Zellen. Jegliche initiale Differenzierung war nach der Zentrifugation verschwunden und konnte auch nach mehreren Tagen Kultivierung nicht mehr provoziert werden. Stattdessen war die Anzahl an Neurosphären stark erniedrigt und es wurden zunehmend braune Neurosphären, Zellen und Zelltrümmer beobachtet.

Es wurde daraufhin ein „quasi-Entzug“ durch Verdünnung versucht. Dabei wurden die Zellen initial mit Wachstumsfaktor supplementiertem S4-Medium kultiviert, erhielten aber bei weiterer Nährmediumgabe nur S4-Medium. Die Ergebnisse unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen einer konsequenten Weitergabe des Wachstumsfaktor-supplementierten Mediums.

3.8 Immunhistochemische Charakterisierung der differenzierten Zellkulturen

Ab dem ca. 6. bzw. 11. Tag waren die Zellkulturen in ihrer Differenzierung so weit fortgeschritten, dass sich eine immunhistochemische Färbung anbot.

Nach Inkubation mit jeweils 2 primären Antikörpern (NF200 und Nestin bzw. GFAP und MOSP) und entsprechenden sekundären Antikörpern wurden die Petriperm-Kulturböden auf Objekträgern mit Dapi-Moviol fixiert und mit Hilfe des Photomikroskopes (Axiophot, AxioVision 4.5) unter Verwendung der Fluoreszenzeinrichtung untersucht. Zusätzlich wurden dieselben Bildausschnitte auch lichtmikroskopisch fotografiert.

Nach dem maximal 11. Tag wurde keine immunzytochemische Färbung der Zellen gegen die vier Oberflächenmarker mehr durchgeführt.

Einzelzellen, die typischerweise rund um die NS auftreten, konnten recht gut bildlich dargestellt und quantitativ erfasst werden.

Schwieriger war dies bei den NS selbst: Durch die starke Fluoreszenz (da zum einen eine große Anzahl an Zellen zusammengeballt war, zum anderen wegen des apoptotischen Zentrums) war trotz Software-gestützter Auswertung der Fotos bei den stark angefärbten Neurosphären eine Differenzierung der verschiedene Farbaspekte schwierig. So können nur grobe Aussagen über die NS selbst gemacht werden, während Zahlenangaben bei nur weniger dicht mit differenzierten Zellen besiedelten Gebieten rund um die NS möglich waren.

3.8.1 Voruntersuchungen

Um eine unspezifische Bindung der primären und sekundären Antikörper ausschließen zu können, sollten undifferenzierte Zellen als Negativkontrolle angefärbt und differenzierte Zellkulturen nur mit dem sekundären Antikörper markiert werden. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte bei der alleinig mit sekundären Antikörpern durchgeführten Färbung keinerlei Fluoreszenz. Eine unspezifische Bindung der sekundären Antikörper konnte daher ausgeschlossen werden.

Eine Färbung von undifferenzierten Zellen konnte nicht durchgeführt werden, da diese nicht adhären waren. So konnte eine unspezifische Bindung der primären Antikörper nicht ausgeschlossen werden.

Da sich aber die differenzierten Zellen nicht für alle AK gleich anfärbten, sondern ein bestimmter Prozentsatz z.B. nicht Nestin-positiv wurde, ist eine unspezifische Bindung der primären AK jedoch recht unwahrscheinlich.

Weiterhin wurden 48h alte Hühnerembryozellen innerhalb anderer Projekte unseres Institutes mit Hilfe von Cytopsin auf Objektträger fixiert und mit AK gegen u.a. Map 2, Nestin, GFAP und β -Tubulin gefärbt. Hier zeigte sich, dass undifferenzierte Zellen nur zu jeweils 2% auf MAP2 und β -Tubulin als Marker für Axone ansprachen, während rund 80% Nestin-positiv waren und immerhin 50% der Zellen AK gegen GFAP banden.

3.8.2 Neurofilament und Nestin

Nahezu alle untersuchten Zellen zeigten eine deutliche grüne Fluoreszenz und waren damit positiv bezüglich Neurofilament, einem Intermediär-Filament Typ 4, das vermehrt in Axonen gefunden werden kann. Das Phänomen, dass fast alle Zellen auf dem Objektträger grün gefärbt waren, konnte an dem annähernden Übereinstimmen der Anzahl an Dapi-Kernen mit den grün fluoreszierenden Zellen quantitativ bestimmt werden. Dass heißt, es befanden sich keine undifferenzierten Zellen (die ja auch

gewöhnlich nicht adhärent waren) auf dem Objekträger. Dieses Ergebnis wurde durch die Nativbilder bestätigt.

Die Anzahl der NF-positiven Zellen wurde nun (pro Bildabschnitt) ausgezählt. Dabei waren die blau gefärbten DAPI Kerne hilfreich, um die Einzelzellen besser voneinander unterscheiden zu können.

Zusammen mit NF wurde auch auf Nestin gefärbt. Auch die Anzahl der Nestin-positiven Zellen wurde im jeweils selben Bildausschnitt gezählt.

Da durchweg weniger Zellen Nestin-positiv waren als NF-positiv, wurde ihre Anzahl als Prozentzahl von der NF-positiven Zellzahl ausgedrückt, so dass im folgenden beschrieben werden kann, wie viele der NF-positiven Zellen negativ für Nestin geworden waren und damit eine vollständig Differenzierung vollzogen hatten.

3.8.3 Vergleich der drei WF bezüglich des Anteils von Nestin- und NF-positiven Zellen

In allen drei Zellkulturen, NGF, FGF und NT4 (10ng/ml) zeigte sich Differenzierung zu Neuronen. Dies konnte morphologisch als auch immunhistochemisch durch die Färbung mit NF-200 nachgewiesen werden. Dabei waren die NF-200-positiven Zellen in allen drei Ansätzen (C, F, I) zu ähnlichen Prozentanteilen Nestin-positiv. Ermittelt man die Differenz, dann ergibt sich der Anteil der Zellen, die nicht mehr positiv auf Nestin waren und damit vollständig die Differenzierung vollzogen hatten.

Dies waren konkret 27,4% +/- 3,3 für FGF (10ng/ml), 32,3% +/- 5,0 für NT4 (10ng/ml) und 30,7% +/- 2,0 für NGF (10ng/ml). Der T-Test für unabhängige Stichproben zeigte, dass diese Unterschiede minimal und somit nicht signifikant waren. Das bedeutet, dass alle drei Wachstumsfaktoren in gleichem Maße Differenzierung zu Neuronen hervorrufen konnten.

Der Unterschied an Nestin-positiven zu Nestin-negativen Zellen ist jedoch hinreichend signifikant mit $\delta = 0,003$ am Beispiel von NT4 (10ng/ml).

Allerdings gab es bezüglich des Zeitpunktes der vollen Differenzierung Unterschiede zwischen den drei Wachstumsfaktoren. Während FGF und NGF (10ng/ml) schon nach 5 bzw. 6 +/- 1 Tagen in Kultur ein Bild ausgeprägter Differenzierung boten, dauerte es in NT4 (10ng/ml) 11 +/- 1 Tage.

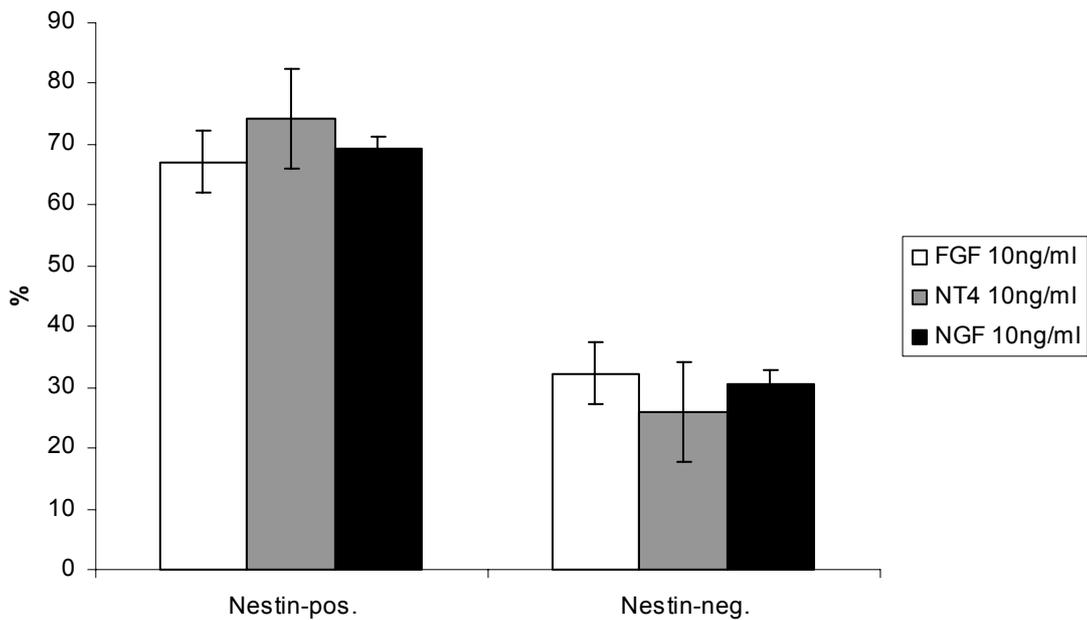


Abb. 19: Prozentualer Anteil der Nestin-positiven Zellen in NF-positiven Zellen nach Einfluss verschiedener WF

In allen drei Fällen sind ca. 25-30% der NF-positiven Zellen für den neuronalen Vorläuferzell-Marker Nestin negativ.

3.8.4 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Mouse specific oligodendrocyte protein (MOSP)

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden die Zellen auch mit AK gegen MOSP und GFAP angefärbt, fotografiert und ausgezählt.

Durch den gesamten Versuch hindurch fanden sich grundsätzlich mehr GFAP-positive als MOSP-positive Zellen. Dabei waren bis auf wenige Ausnahmen alle grün gefärbten (MOSP) Zellen gleichzeitig auch rot (GFAP), so dass im Folgenden die Anzahl an MOSP-positiven Zellen als ein prozentualer Anteil der GFAP positiven Zellen ausgedrückt werden konnte.

Unter dem Aspekt, dass in vorherigen Experimenten bei undifferenzierten NS bereits ein großer Anteil der undifferenzierten Zellen GFAP-positiv war, könnte man die Auswertung nach demselben Prinzip vornehmen wie schon bei den NF-200 positiven Zellen im Verhältnis zu den Nestin-positiven Zellen, nämlich mit der Erwartung, dass Zellen während der Differenzierung für MOSP positiv werden bzw. evtl. auch wieder die Oligodendrozyten-Eigenschaften verlieren (s. Diskussion).

3.8.5 Vergleich der drei WF bezüglich des Anteils von GFAP- und MOSP-positiven Zellen

Konkret zeigte sich in unserem Modell, dass in der Kultur mit FGF (10ng/ml) am häufigsten Zellen den Oberflächenmarker für Oligodendrozyten trugen, nämlich 66,0% +/- 10,3. Darauf folgte NT4 (10ng/ml) (53,6% +/- 9,8), und der kleinste Anteil an MOSP-positiven Zellen fand sich bei mit NGF (10ng/ml) kultivierten Zellen mit nur 43,1% +/- 1,95. Dabei konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden, auch nicht im Vergleich von FGF mit NGF ($\delta = 0,052$). Das heißt, dass alle drei WF in etwa gleichem Maße Differenzierung von Oligodendrozyten-Marker-positiven Zellen provozierten.

Es konnte nicht bestimmt werden, welcher Anteil an Zellen für GFAP positiv war im Vergleich mit nicht-anfärbbaren Zellen, da überwiegend Zellen adhären und damit Immunhistochemie-geeignet waren, die sich differenziert hatten und damit immunhistochemisch gegen die Antikörper positiv waren.

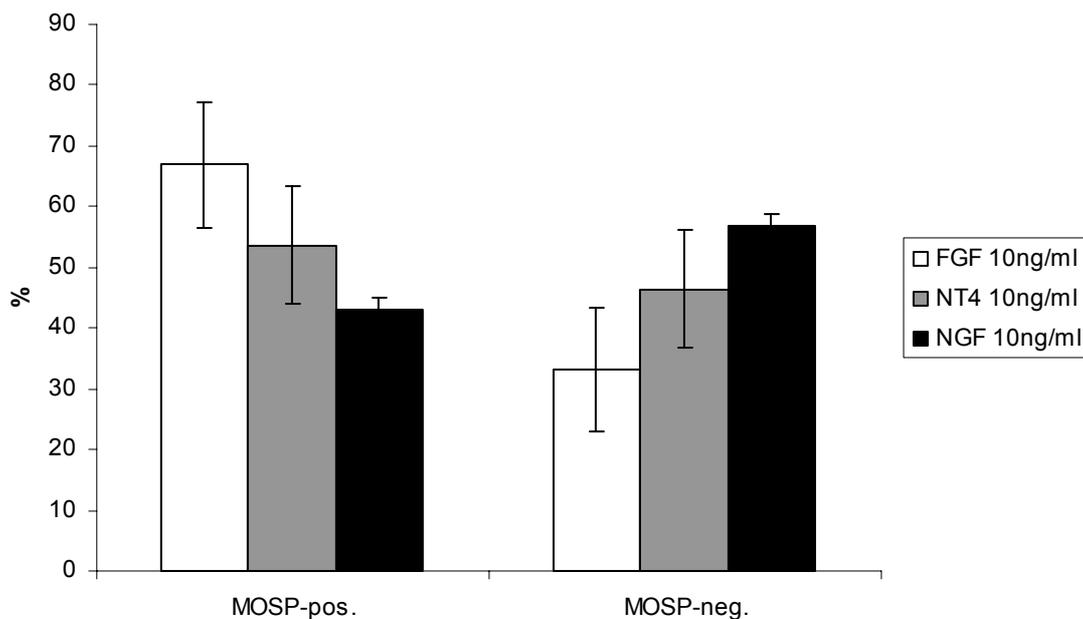


Abb. 20: Anteil MOSP-positiver Zellen von GFAP-positiven nach Einfluss verschiedener WF

Zwischen den drei WF konnte kein signifikanter Unterschied im Anteil von MOSP-positiven Zellen gefunden werden. Nur im Falle von NGF übersteigt der Anteil MOSP-negativer Zellen den der -positiven.

3.8.6 Immunhistochemische Charakterisierung von Neurosphären

Obwohl der Anteil der Nestin-positiven Zellen im Umfeld der Neurosphären (d.h. der Hauptlokalisierung der Differenzierung) dem Anteil der NF-positiven unterlegen war, war ihr Anteil in den NS selbst groß. NS allgemein stellten sich in der Immunfluoreszenz als

natürlicherweise runde Gebilde dar, deren Zentrum ungefärbt blieb. Um diese schwarzen ungefärbten Zentren bildete sich dann ein breiter Ring von positiv gefärbten Zellen (als undifferenzierte Vorstufen, aber auch als schon mehr differenzierte Zellen) aus denen dann - aus der NS herauswachsend - die Differenzierung bzw. das Auswachsen von z.B. Axonen und Gliazellfortsätzen stattfindet.

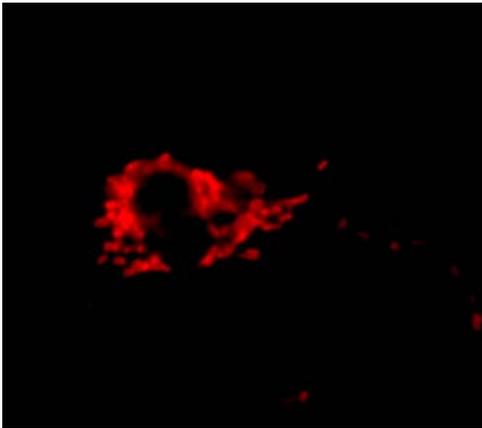


Abb. 21: NS immunhistochemisch

Kultur mit FGF (10ng/ml) nach immunhistochemischer Markierung am 5. Tag.
Das Zentrum der NS bleibt in der Immunhistochemie ungefärbt, drum herum befindet sich ein Nestin-positiver Randwall.

Betrachtete man die Antikörper-Färbung der Zellpopulationen im Gesamten (inklusive der NS), konnte festgestellt werden, dass der größte Anteil der Zellen für Nestin positiv war, dicht gefolgt von NF-200. Der Anteil der GFAP-positiven Zellen war deutlich kleiner, überstieg aber den der MOSP-positiven.

3.8.7 Immunhistochemische Abbildungen aller drei Wachstumsfaktoren

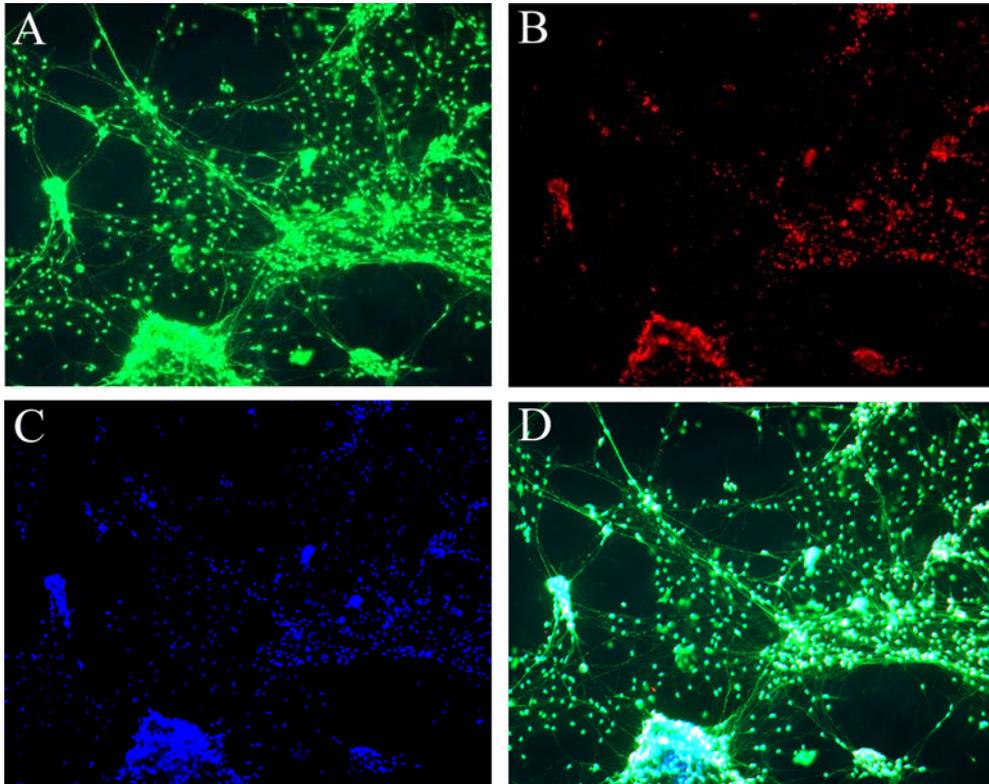


Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF

FGF (10ng/ml), 5. Tag, 100fache Vergrößerung

- A) Neurofilament: Die Zellen und ihre Ausläufer, die sich mit Hilfe von FGF differenzierten, sind deutlich positiv für NF.
- B) Nestin: Nicht mehr alle Zellen sind Nestin-positiv, nachdem sie sich differenziert haben.
- C) DAPI: Die mit DAPI markierten Kerne helfen bei der Auszählung der NF- bzw. Nestin-positiven Kerne.
- D) Überlagerung: Die Überlagerung von NF- und Nestin-positiven Zellen zeigt, dass 27,4% \pm 3,3 der NF-positiven Zellen nicht mehr durch Nestin markiert werden.

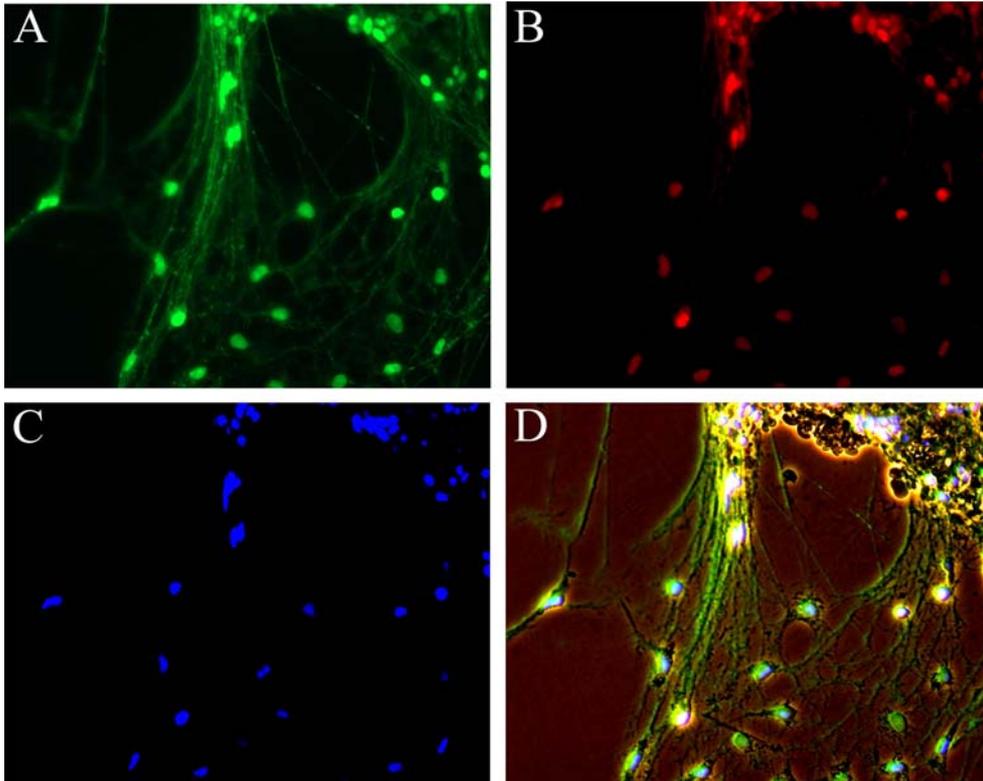


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF

FGF (10ng/ml), Tag 5, 400fache Vergrößerung

- A) Neurofilament: NF färbt nicht nur die Zellkörper, sondern auch ihre Fortsätze an. Dies spricht für eine neuronale Differenzierung.
- B) Nestin: Die Nestin-AK markieren nur Zellkörper aber keine Fortsätze.
- C) DAPI: Durch die Markierung der Kerne mit DAPI wird ersichtlich, dass NF- und Nestin-AK die Zellen spezifisch markieren. Die NF-positive Fortsätze haben dagegen kein DAPI-positiv gefärbtes Korrelat, da sie keinen Zellkern besitzen.
- D) Überlagerung: Das Übereinanderlegen der drei AK-Markierungen zeigt, dass manche NF-positiven Zellen nicht mehr von AK gegen den Stammzellmarker Nestin markiert werden.

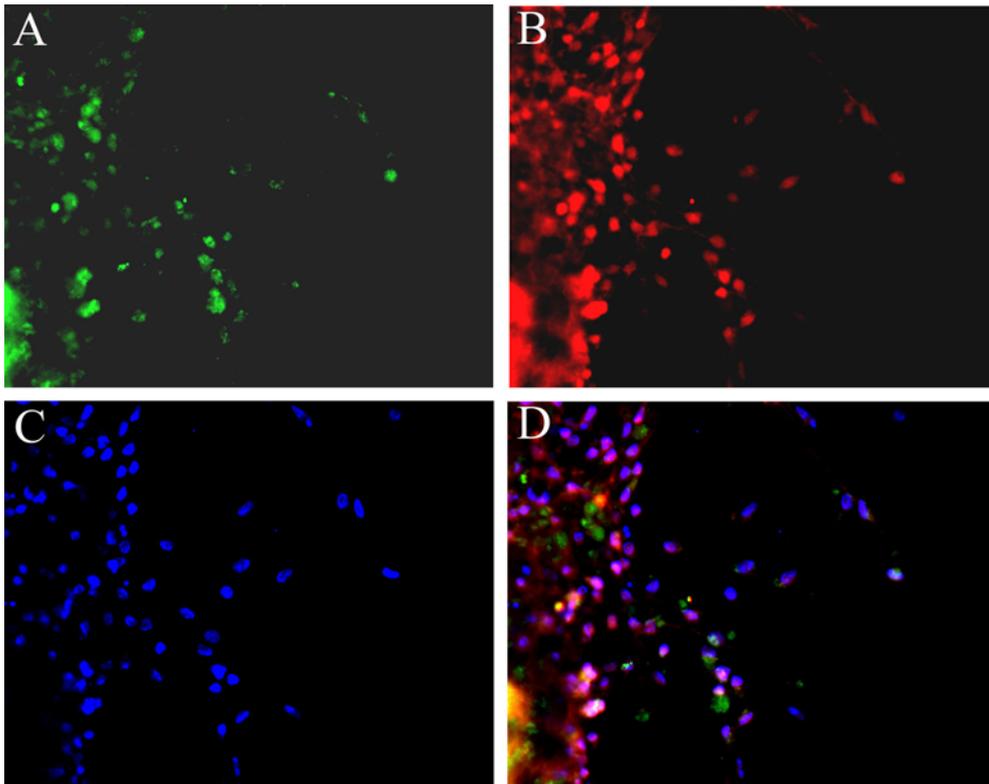


Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF

FGF (10ng/ml), Tag 5, 400fache Vergrößerung

- A) MOSP: Der Zellanteil, der Oberflächenantigene typisch für Oligodendrozyten aufweist, ist geringer als der GFAP-positiver Zellen.
- B) GFAP: Fast alle Zellen werden durch AK gegen den Astrozyten-spezifischen Oberflächenmarker markiert.
- C) DAPI: Die DAPI-markierten Kerne zeigen, dass die AK gegen MOSP und GFAP tatsächlich spezifisch die Zellen markieren.
- D) Überlagerung: Beim Übereinanderlegen der drei immunhistochemischen Bilder wird deutlich, dass ca. 66,0% +/- 10,3% der GFAP-positiven Zellen auch für MOSP positiv sind.

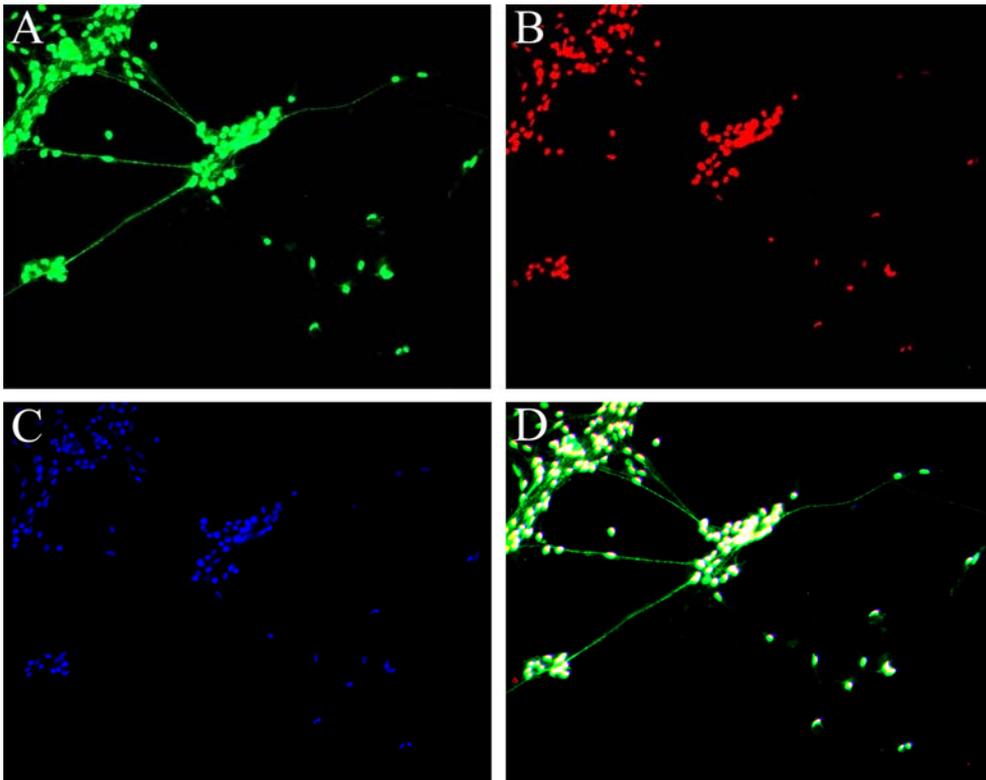


Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NT4

NT4 (10ng/ml), 200fache Vergrößerung, Tag 11

- A) Neurofilament: NF markiert spezifisch die Fortsätze aus den sich (unter NT4) differenzierten Zellen. Die Ausläufer verbinden oft zwei Neurospären miteinander.
- B) Nestin: Im Fall von NT4 ist ein großer Anteil der Zellen nach Differenzierung immer noch Nestin-positiv.
- C) DAPI: Die DAPI-gefärbten Zellkerne stimmen mit den NF- und Nestin-markierten Zellen überein.
- D) Überlagerung: 32,3% +/- 5,0 der NF-positiven Zellen sind zusätzlich Nestin-positiv, nachdem sie sich unter NT4 differenziert haben.

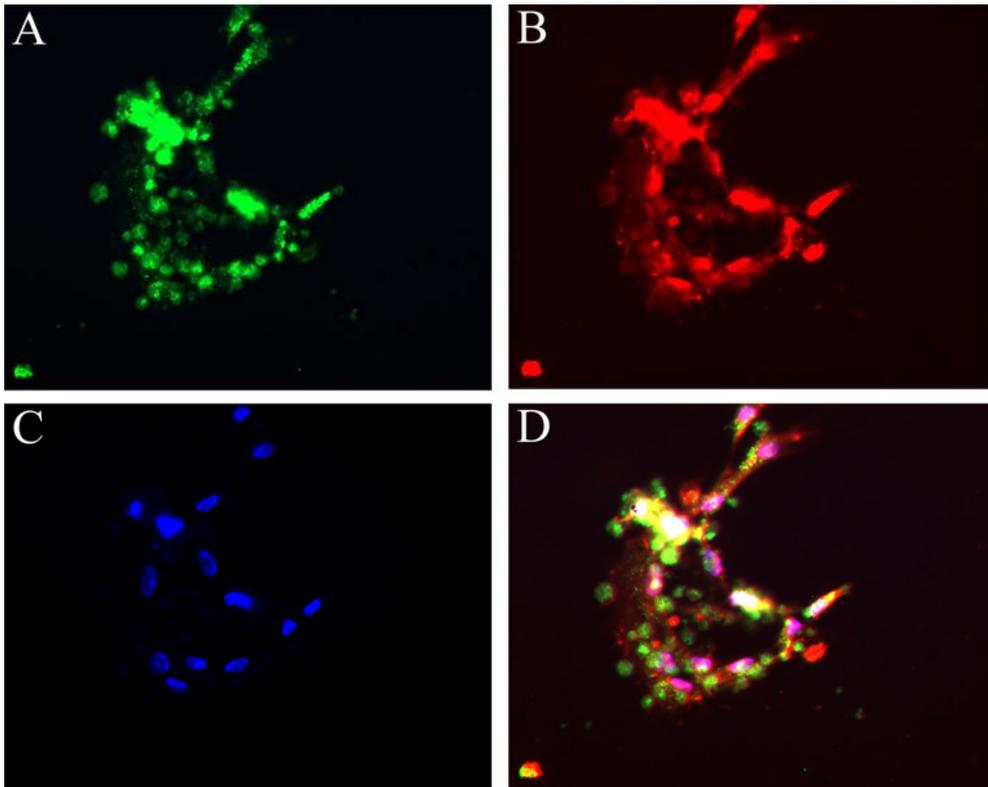


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NT4

NT4 (10ng/ml), 400fache Vergrößerung, Tag 11

- A) MOSP: Auch nach Differenzierung unter Zusatz von NT4 wird ein Teil der Zellen durch MOSP-AK markiert.
- B) GFAP: Wie bei FGF und NGF ist auch unter NT4 der Anteil GFAP-positiver Zellen größer als der Anteil MOSP-positiver Zellen.
- C) DAPI: Durch DAPI-gefärbte Zellkerne erleichtern das Zählen der oft dicht beieinander liegenden GFAP- bzw. MOSP-positiven Zellen.
- D) Überlagerung: 53,6% \pm 9,8 der Zellen sind nach Differenzierung unter NT4 sowohl für GFAP- als auch MOSP-positiv.

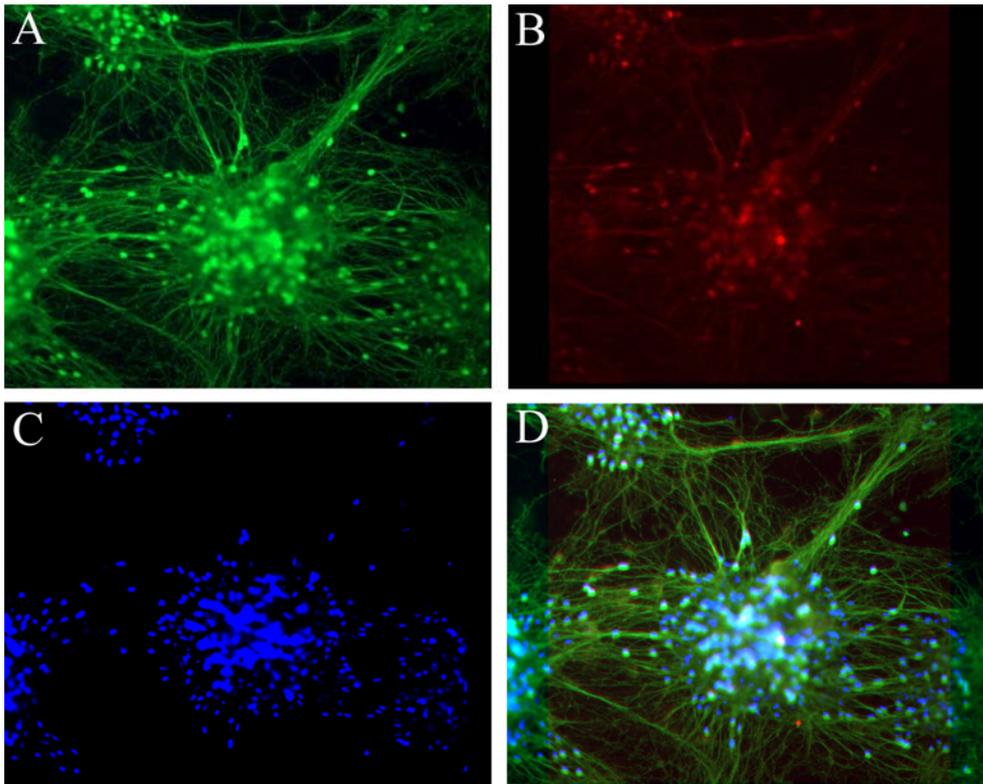


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NGF

NGF (10ng/ml), Tag 5, 200fache Vergrößerung

- A) Neurofilament: Die NS selbst enthält NF-positive Zellen. Aus ihr heraus wachsen für den Axon-Marker NF positive Fortsätze.
- B) Nestin: Im Zentrum der NS sind die Nestin-positive Vorläuferzellen am dichtesten und werden zur Peripherie hin immer weniger.
- C) DAPI: Die hohe Dichte der DAPI-gefärbten Kerne im Zentrum erklärt sich durch den kugelförmigen Aufbau der NS.
- D) Überlagerung: Die Zellen in der Peripherie der NS sind stärker differenziert als die Zellen im Zentrum und verlieren den für Stammzellen typischen Oberflächenmarker.

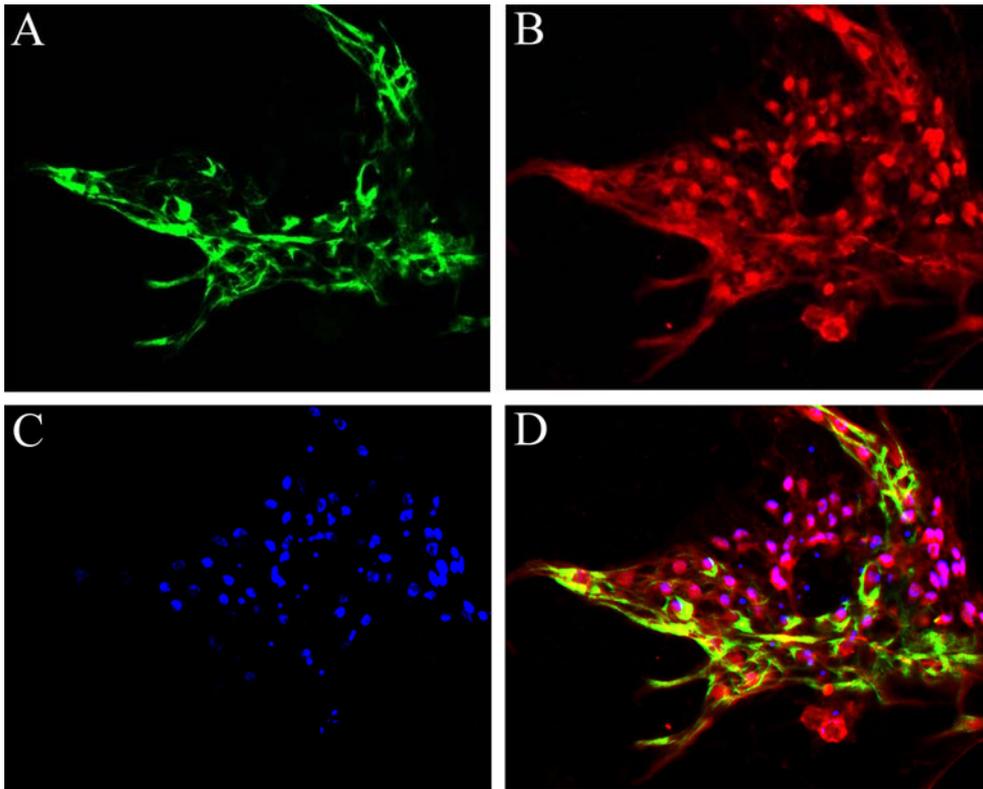


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NGF

NGF (10ng/ml), 400fache Vergrößerung, Tag 6

- A) MOSP: Auch die Zellen, die sich nach Zugabe von NGF differenzierten, wurden z.T. positiv für den Oligodendrozytenmarker MOSP.
- B) GFAP: Fast alle Zellen waren nach Differenzierung unter NGF GFAP-positiv.
- C) DAPI: DAPI bindet an die DNA im Zellkern. Anhand der sichtbar gemachten Zellkerne können die Einzelzellen besser voneinander unterschieden und gezählt werden.
- D) Überlagerung: NGF zeigte den kleinsten Anteil an MOSP-positiven Zellen im Vergleich zu FGF. Er beträgt 43,1% +/- 1,95

4 Diskussion

Im Rahmen der Stammzellforschung werden Forschungsmodelle gefordert, die bezüglich ihrer Praktikabilität, Effektivität, ethischen Vertretbarkeit und Finanzierbarkeit hohen Ansprüchen gerecht werden müssen. Daher besteht großer Bedarf an der Entwicklung und Validierung von Alternativmodellen besonders für die Forschung mit menschlichen Embryonen.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell wurde versucht, die Forderungen nach einem preiswerten, leicht praktikablen und von jeglicher ethischen Problematik und sogar von tierexperimentellen Maßregelungen freiem Modell zu erfüllen. Es sollte gezeigt werden, dass mit Hühnchenstammzellen durchaus Fragen zur Kultivierung, Neurosphären-Bildung und Differenzierung von Stammzellen abgeklärt werden können.

4.1 Etablierung eines Differenzierungssystems für embryonale Hühnchenstammzellen *in-vitro*

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Wachstum und die Differenzierung von Hühnchenvorläuferzellen untersucht, um durch Optimierung der Kulturbedingungen für die empfindlichen embryonalen Vorläuferzellen ein geeignetes Kultursystem und dessen Stabilisierung zu erreichen.

Es wurden bereits zahlreiche Differenzierungsprotokolle für Stammzellen der verschiedensten Spezies publiziert. So auch für Stammzellen aus dem Huhn (Petitte et al., 2004). Jedoch unterscheiden sich diese z.T. sehr, je nachdem, welchen Ursprungs die Stammzellen waren und wofür sie genutzt werden sollten. Für Petitte et al. war z.B. das Hauptziel die Erzeugung von chimären Hühnern und bei den Zellen handelte es sich um pluripotente Stammzellen, die vom Stadium-X-Blastoderm gewonnen wurden. Für das hier vorgestellte Modell von Vorläuferzellen, die sich nach der von mir gesichteten Literatur von allen früher verwandten Zellen unterscheiden, mussten also die Kulturbedingungen neu etabliert bzw. angepasst werden.

Im Rahmen früherer Untersuchungen unseres Institutes über die neuralen Vorläuferzellen des 48 Stunden alten Hühnchens urden bereits die grundlegenden Kulturerfordernisse der Zellen ausgetestet und ein Kultursystem entwickelt und

optimiert (Charalambous et al., 2007). In dieser Arbeit wird daher nur auf Veränderungen und Erweiterungen dieses Kultursystems eingegangen, die sich durch die hier verwandten Untersuchungsmethoden und Ansprüche an die Zellkulturen ergaben.

So mussten optimale Bedingungen für die Differenzierungsversuche geschaffen werden hinsichtlich Kulturmedium, Zelldichte, Oberflächenbeschaffenheit der Kulturschalen und natürlich Auswahl und Konzentration der Wachstumsfaktoren, die Proliferation und Differenzierung provozieren sollten.

4.1.1 Präparation

Ein wichtiger Aspekt der Forschung mit Stammzellen und Vorläuferzellen ist die Frage, woher diese Zellen bezogen bzw. wie sie gewonnen werden können. Dies ist mitunter eine der problematischsten und meist diskutierten Herausforderungen der Stammzellforschung.

Wir haben mit dem Hühnchenmodell einen Weg gefunden, preiswert, leicht praktikabel und ethisch unbedenklich reichlich neurale Vorläuferzellen herzustellen.

Dieser Vorteil soll im Rahmen dieser Arbeit im Auge behalten werden. Da die Etablierung des Präparationsprotokolls jedoch Gegenstand einer vorhergehenden Arbeit war, wird nicht weiter darauf eingegangen, sondern auf die grundlegende Vorgängerarbeit verwiesen (Charalambous et al., 2007).

4.1.2 Zelldichte und Zellkontakte

Caldwell et al. zeigten, dass besonders dem Zellkontakt während der Differenzierung in Kombination mit der WF-Administration eine bedeutsame Rolle zukommt (Caldwell und Xiaolin, 2001).

Auch in unserer Arbeit schien es von großer Wichtigkeit zu sein, genügend Zellen in einem *well* zu kultivieren. Nur wenn die Zellen dicht beieinander lagen, bildeten sich ausreichend NS und nur dann kam es überhaupt zur Differenzierung. Konkret bedeutete dies, dass die Präparate von mindestens 20 Eiern in eine Vertiefung gegeben werden mussten (dies entspricht ungefähr 10^5 - 10^6 Zellen pro Vertiefung eines *24-well-plates*), um zufriedenstellende Resultate zu erzielen.

Andernfalls zeigten sich keinerlei NS, die Einzelzellen wurden nie adhärent und demzufolge kam es auch zu keiner Differenzierung.

Die hier gemachte Beobachtung, dass die Einzelzellen (aber auch die Zellaggregate im Ganzen durch Zellausläufer) immer Kontakt zueinander suchten, unterstreicht die

Wichtigkeit des Zell-Zell-Kontaktes für die neuronalen Vorläuferzellen, auf den in so vielen Arbeiten hingewiesen wird.

Die Dichte der Zellen und der Medienwechsel spielen jedoch nicht nur wegen der Zellkontakte eine entscheidende Rolle, sondern ebenso wegen der Produktion zelleigener Metabolite. Diese nehmen auf das Gedeihen der Zellen Einfluss und müssen in ausreichend konzentrierter Menge vorliegen (Caldwell et al., 1991).

4.1.3 Kulturmedium

Dass Kulturmedien einen entscheidenden Einfluss auf Überleben, Proliferation, Adhäsion und Differenzierung von Zellen nehmen, ist bekannt (Tang und Tannen, 1994).

Bei unserer Untersuchung wurden zwei serumfreie Medien miteinander verglichen.

Da mit Serum aufgrund seiner undefinierten Zusammensetzung eine vollständige Standardisierung der Kulturbedingungen für die Zellen nicht möglich ist, wurde angestrebt, auf Serum als Bestandteil des Kulturmediums zu verzichten. Humane embryonale Stammzellen wurden schon früher ohne Zugabe von Serum erfolgreich kultiviert und zeigten Differenzierung (Pick et al., 2007). Auch im hier vorgestellten Modell wurde dies ohne jeden Serum-Einsatz erreicht. Das ist insofern nicht erstaunlich, da festgestellt wurde, dass im Serum enthaltene Stoffe dafür verantwortlich und sogar notwendig sind, Stammzellen in ihrem undifferenzierten Zustand zu halten (Yamane et al., 2005).

Bei den hier eingesetzten serumfreien Medien handelte es sich um S4-Medium und Neuronal-Base-Medium. Es sollte abgeklärt werden, ob ein aufwendiges Medium mit vielen Zusätzen (das einerseits ein besseres Wachstum der empfindlichen Zellen gewährleistet, aber andererseits auch viele Variablen in das System bringt, die Einfluss auf die Differenzierung der Zellen nehmen könnten) einem schlichten Medium überlegen ist.

Es zeigte sich mit S4-Medium wie erwartet ein sehr gutes Wachstum der Zellen. Das ist durch die vielen Stoffzusätze mit für unsere Zwecke positiven Effekten zu erklären.

Einer von ihnen ist das Cholera-toxin, ein Spindelgift, das die Ausbildung der Spindel während der Mitose verhindert und so besonders auf Gliazellen proliferationshemmend wirkt. Auf diese Weise unterstützt Cholera-toxin das Wachstum von Neuronen, indem übermäßige Proliferation von Astrozyten und anderen Gliazellen im *well* unterdrückt

wird und so mehr „Raum“ für die Neurone bleibt. Dieser positive Effekt konnte auch in anderen Arbeiten festgestellt werden (Tian et al., 2005).

Allerdings musste nun der Einfluss des Mediums bezüglich des Anteils an Neuronen und Gliazellen in den Differenzierungsversuchen berücksichtigt werden.

Weiterhin enthält S4-Medium viele für das Wachstum von Neuronen wichtige Zusätze wie Insulin, Fettsäuren u.a..

Dem gegenüber enthält Neuronal-Base-Medium keine besonderen Zusätze. Bezüglich der Einfachheit und Standardisierung der Kulturbedingungen wäre das zunächst erwünscht gewesen, brachte aber keine Erfolge bei der Kultivierung der Zellen. Zellen im Neuronal-Base-Medium vereinigten sich zwar zunächst zu NS, aber schon ab dem 2. Tag nahm die Anzahl und Größe der NS wieder ab und die Zellen lösten sich aus den Zellaggregaten zu Einzelzellen. Demzufolge konnte auch keine Differenzierung erwartet werden. Im weiteren Verlauf der Studie wurde somit S4-Medium verwandt.

4.1.4 Neurosphären-Bildung

Dreidimensionale Zellaggregate haben zahlreiche Vorteile und sind daher beim „*tissue engineering*“ gegenüber *Zell-Layern* bevorzugt. So ist z.B. bekannt, dass Zellen in Sphären höhere Proliferationsraten zeigen als Einzelzellen, da sie sich in drei Dimensionen ausbreiten können. Außerdem soll ihre Differenzierung der *in-situ* Situation näher kommen. Nicht zuletzt ist ein guter Zell-Zell-Kontakt (wie schon beschrieben) vorteilhaft bzw. notwendig.

Es gibt daher zahlreiche mehr oder weniger aufwendige Kulturmethoden und andere Bemühungen, um dissoziierte Einzelzellen dazu zu bewegen, Zellaggregate zu bilden, wie z.B. sich drehende Kulturflaschen oder die *hanging-drop* Methode (Layer et al., 2002).

Darüber hinaus müssen aber auch die Zellen, unabhängig von den sie umgebenden Kulturbedingungen, bestimmte Fähigkeiten mitbringen. Um dreidimensionale Aggregate zu bilden, seien dies nun Neurosphären oder *Embryoid Bodies*, müssen sie sich vermehren, sich räumlich sortieren und selbst organisieren können.

In dem hier vorgestellten Modell vereinigten sich die Zellen spontan innerhalb der ersten zwei Tage zu Zellaggregaten. Der Nachweis dieser Fähigkeit erlaubte es uns somit, ein einfaches Kulturverfahren beizubehalten.

Damit ergibt sich also ein weiterer Vorteil des Hühnchensystems als Modell zur Stammzellforschung und beweist sein Potential, was auch Layer et al. zeigen konnten. Sie hoben hervor, dass die Vogelretina eines der besten Modelle sei, um aus völlig dissoziierter embryonaler Vogelretina Sphären zu gewinnen, die mehr oder weniger den kompletten retinalen Schichtenaufbau wiederherstellen und somit ein optimales Modell für die Erforschung des Prinzips der neuronalen Schichten-Formation sind (Layer et al., 2002).

4.1.5 Laminin und Adhärenz

Wenn eine NS adhärenz wird, flacht sie in der Peripherie ab, so dass die Zellen *Monolayer* bilden und somit Kontakt zum Substrat haben und zytoplasmatische Ausläufer bilden können (Bez et al., 2003).

In unserem Experiment konnten nur am Rand der NS Differenzierung bzw. Auswüchse aus den NS beobachtet werden und dies auch nur dann, wenn der Zellkultur ein Substrat angeboten wurde, das Adhärenz zuließ. Damit ist zu erklären, warum unsere Zellen so große Unterschiede im Differenzierungsverhalten zeigten, je nachdem ob sie auf Glas, Plastikmaterial oder in Petripermschalen kultiviert wurden (bzw. ob diese laminiert waren oder nicht).

Es zeigte sich, dass die Zellen am besten auf laminiertem Petriperm wuchsen.

Diese Beobachtung wird von Caldwell et al. bekräftigt, die in ihren Differenzierungsversuchen mit Stammzellen ebenfalls auf Laminin die beste Haftung erreichen konnten (Caldwell und Xaolin, 2001). Ihre Arbeitsgruppe testete die Adhäsion von NS auf verschiedenen Substraten, u.a. Merosin, Fibronectin und Laminin. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Laminin die beste Adhäsion zeigte, und daher wurde in allen ihren Experimenten auch Laminin verwendet.

Wie durch die Auszählung von Neurosphären auf laminierten und - im Vergleich dazu - auf nicht laminierten Substraten festgestellt werden konnte, wurde die Adhärenz der Neurosphären durch vorheriges Aufbringen von Poly-D-Lysin und Laminin auch während aller immunhistochemischen Färbeschritte gewährleistet. Außerdem verbesserte sich die Differenzierungsfähigkeit der Zellen deutlich.

Nicht umsonst wurde Laminin als ein Faktor beschrieben, der das Wachstum von Axonen fördert und diese stabilisiert (Tang und Tannen, 1994).

4.1.6 Substrate

Wie schon beschrieben, wurden drei verschiedene Substrate hinsichtlich Adhärenz und Differenzierung getestet. Dabei stellte sich Petriperm als das geeignetste für unser Modell dar, während ein Glasdeckgläschen wie erwartet die schlechtesten bzw. keine Resultate erbrachte.

Es gibt allerdings auch Beispiele, bei denen neurale Zellen vom Striatum der embryonalen Ratte durchaus auf Glas adhären wurden, sich differenzierten und immunhistochemisch ohne Verluste gefärbt werden konnten (Cattaneo und McKay, 1990).

Die Verwendung von Petriperm wirkte sich in unserem Fall sehr positiv auf das Wachstum und die Differenzierung der Hühnchenzellen aus, was vermutlich u.a. an der Luftdurchlässigkeit des Materials liegt.

NS sind hochdynamische Strukturen mit verschiedenen radiären Gradienten bezüglich Proliferation und Apoptose. Während im Inneren der NS vermehrt Apoptose stattfindet, nimmt zum Rand hin die Zahl der vitalen Zellen zu, und so konnten in anderen Studien über NS hier vermehrt mitotische Figuren beobachtet werden. Je größer eine NS nun wird, desto mehr Nekrose entsteht in ihrem inneren Kern durch unzureichende Ernährung. Die Zytoarchitektur der NS bedingt also, dass ihre Vitalität stark von der Verfügbarkeit von Sauerstoff, Nährstoffen und der Möglichkeit der Elimination ihrer katabolen Stoffwechselprodukte abhängt (Bez et al., 2003). Dieser Anspruch an die äußeren Kulturbedingungen wird zumindest bezüglich des Sauerstoffangebotes in Petripermschalen am besten gewährleistet.

Hinsichtlich des Nährmediums hat sich herauskristallisiert, dass der Rhythmus einer zweimal wöchentlichen Nährmedium-Zugabe in einer Menge von 100µl gerade richtig war, um einerseits dem hohen Bedarf der NS an Nährmedium zu gewährleisten und um auf der anderen Seite die Zelldichte nicht zu stark zu verringern, da dies - wie oben beschrieben - eine grundlegende Bedeutung bei der Bildung von NS hat.

4.1.7 Wachstums-Eigenschaften der Hühnchenzellen

Die Zellen des 48 Stunden alten Hühnchenembryos zeigten ein lineares Wachstumsverhalten. Da es sich hier um keine immortalen Zelllinien handelt und auch keine Passagen durchgeführt wurden, nahm die Wachstumsrate nach einigen Wochen ab und erreichte ein Plateau. Dies ist durch Mangel an Platz, Nährstoffen und

Sauerstoff der sich vermehrenden Zellen bei gleich bleibender Kulturschalenvertiefung zu erklären.

Die Verdopplungszeit betrug in reinem S4-Medium ohne WF im Durchschnitt 2,7 +/- 2 Tage. In dieser Zeit bildeten sie NS, die an Anzahl und Größe zunahmten und sich bei bestimmten Werten einpendelten.

Die Zugabe von Wachstumsfaktoren erhöhte die Proliferationsrate in allen Fällen.

Es konnte beobachtet werden, dass nach zwei Stunden die Einzelzellen adhären wurden, jedoch schon am nächsten Tag nur frei schwimmende Zellen gesehen werden konnten. Dies ist vermutlich die Folge der vielen verschiedenen Zelltypen, die bei Präparation, Vereinzeln und Kultivierung eines ganzen Hühnerkopfes in der Kultur auftraten. Auf Grund von nicht selektiven Kulturbedingungen und bei einem Medium, das nur den relativ anspruchslosen Bedürfnissen von unentwickelten Vorläuferzellen gerecht wurde, überlebten diese evtl. schon in ihrer Differenzierung fortgeschrittenen Zelltypen nicht, so dass schließlich eine relativ homogene Kultur neuronaler Vorläuferzellen vorlag.

4.2. Faktorkonzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich des Zellwachstums

4.2.1 Konzentrations-Wachstumsverhältnis von FGF 10, 50 und 100ng/ml

Viele Arbeitsgruppen etablierten Kulturbedingungen für ES-Zellen, bei denen FGF rein zur Proliferation der Zellen genutzt wurde und als einer der am stärksten mitogen wirkenden Wachstumsfaktoren beschrieben wird (Okabe et al., 1996).

Riaz et al. verfeinerten ihr Kulturprotokoll, indem sie zunächst ein Expansionsmedium mit FGF einsetzten und erst später Differenzierungsversuche unternahmten, indem sie das Expansionsmedium entfernten und neues Medium mit den relevanten WF zusetzten (Riaz et al., 2004). Erst dessen Entzug führte zur Differenzierung der humanen Vorläuferzellen. Dabei hatten FGF-Mengen von 5 bis 50ng gleiche proliferative Effekte, eine Dosis unter 1ng /ml erwies sich dagegen als zu schwach.

Beim Vergleich der Proliferationsraten von Kulturen, denen verschiedenen Konzentrationen an FGF zugeführt worden waren, zeigten unsere Ergebnisse ebenfalls, dass es für die Steigerung der Proliferation nicht so wichtig ist, eine genau definierte Konzentration an Wachstumsfaktoren anzubieten. Jede Dosis zwischen 10 und 50ng/ml FGF erwies sich als „optimale Konzentration“ für eine gute Proliferation. Mit einer (hohen) Konzentration von 100ng/ml dagegen war eine weitere Zunahme des Wachstums der Zellpopulation nicht zu erzielen; sie zeigte nach wie vor eine

Verdopplungszeit von 2,5 +/- 0,3 Tagen (Tag 2 auf 5) im Vergleich zu S4-Medium alleine mit 2,7 +/- 0,2 Tagen.

Da eine FGF-Konzentration von 10ng/ml sich als optimal für die Differenzierung der Zellen erwies und gleichzeitig hinsichtlich der Proliferation keine signifikanten Unterschiede zu FGF (50ng/ml) zeigte, bewerteten wir es als die geeignetste Konzentration für unser Hühnchenmodell.

Dieses Ergebnis bestätigen andere Arbeitsgruppen nicht nur für das Mausmodell (Glaser et al., 2005), sondern auch für Differenzierungsversuche mit humanen neuronalen Vorläuferzellen (Schmandth et al., 2005).

Ab dem 5. Tag konnten (anders als am 2. Tag) im Wachstum der Populationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an WF keine signifikanten Unterschiede mehr gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zellkulturen wahrscheinlich mit Wachstumsfaktor gesättigt waren und so bei den gegebenen Bedingungen wie Größe des *wells* sowie Nahrungs- bzw. Sauerstoffangebot keine weitere Steigerung des Zellwachstums mehr angeregt werden konnte.

So zeigen auch andere Arbeiten über NS, dass die Anzahl vitaler Zellen auf ca. 20% abnimmt, wenn sie über einen Zeitraum von 10 Tagen in dem selben Medium gehalten wurden (Bez et al., 2003). Das würde die Abnahme des Unterschiedes im Wachstum der Kultur trotz verschiedener Wachstumsfaktorkonzentrationen erklären.

4.2.2 Die Neurotrophine NT4 und NGF in drei verschiedenen Konzentrationen

Es ist bekannt, dass das Wachstum humaner embryonaler Stammzellen als eine pluripotente Population die Balance zwischen Überlebens-, Proliferations- und Selbsterneuerungs-Signalen erfordert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass humane Stammzellen Rezeptoren der Tropomyosin-verwandten Kinase (Trk)-Familie aufweisen, die antiapoptotische Signale vermitteln. Das heißt, dass Wachstumsfaktoren der Superfamilie der Neurotrophine, zu denen BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), Neurotrophin 3, 4, und 5 und NGF gehören, Überlebensfaktoren für humane Stammzellen sind.

Die Zugabe dieser WF zum Kulturmedium verbessert also ihr clonales Überleben, so dass mehr Zellen länger ihr Potential zur Proliferation und Differenzierung beibehalten. Der zugrunde liegende Mechanismus ist, dass in Anwesenheit von Neurotrophinen in einer Stammzellkultur die Trk-Rezeptoren phosphoryliert sind und über den Phosphatidylinositol-Signalweg Überleben vermittelt wird. Eine Inhibierung des

Rezeptors dagegen würde zur Apoptose führen. Die Mitose-Aktivität dagegen wird über den Proteinkinase-Signalweg der Neurotrophine verbessert (Pyle et al., 2006). Dass Neurotrophine auch für Differenzierungsabläufe verantwortlich sind, wird in zahlreiche Publikationen angedeutet (Tzeng, 2002) und bestätigt sich in unseren eigenen Differenzierungsexperimenten.

Pyle et al. (2006) kultivierten humane ES mit verschiedenen Konzentrationen an NGF, NT4 u.a. und führten am 5. Tag immunhistochemische Färbungen durch, um die phosphorylierten Trk-Rezeptoren sichtbar zu machen. Dabei zeigte sich, dass 10ng/ml gefolgt von 50ng/ml (NGF und NT4) die höchste Dichte an phosphorylierten Rezeptoren provozierte, und sich damit diese Konzentrationen am besten auf das Überleben der Zellkulturen auswirkten. Insgesamt zeigte sich unter NT4 mehr Phosphorylierung der Trk-Rezeptoren als unter NGF.

Bei dem Vergleich der Phosphorylierungs-Menge unter NT4 (100ng/ml) zu NT4 (1ng/ml) ergab sich, dass die niedrigere Konzentration ein besseres Überleben gewährleistete.

Dieses Resultat stimmt (übertragen auf unsere hier durchgeführten Proliferationsversuche in verschiedenen Konzentrationen an NGF und NT4) in einigen Punkten mit unseren Ergebnissen überein, welche im Folgenden erläutert werden.

Zunächst konnte in den drei Konzentrationen von NT4 (10, 50 und 100ng/ml) kein relevanter Unterschied in der Verdopplungszeit der Kulturen beobachtet werden. Sie betrug in allen drei Fällen 1,6 Tage \pm 0,1 bis 0,3.

Es wurde deutlich, dass NT4 jedoch einen entscheidenden Einfluss auf Proliferation und Überleben hat; er ist im Vergleich zu Kulturen in reinem S4-Medium mit einer Verdopplungszeit von 2,7 \pm 0,2 Tagen signifikant ($\delta = 0,002$). Das weist darauf hin, dass die neuralen Vorläuferzellen sowie die humanen Stammzellen Trk-Rezeptoren (oder zumindest ähnliche Rezeptoren besitzen) an die NT4 und NGF anbinden können.

Da sich auch hier durch die Proliferationsversuche keine optimale Konzentration an NT4 herauskristallisiert hat, musste diese wieder am Parameter „Differenzierung“ - die sich unter NT4 bzw. NGF (10ng/ml) als optimal erwies - bestimmt werden.

Ähnlich verhielt es sich mit der Konzentration für NGF. Hier unterschieden sich 10ng/ml und 50ng/ml bezüglich der Proliferation und dem Überleben der Zellen kaum, was sich in einer Verdopplungszeit von 1,8 \pm 0,1 bzw. 0,2 Tagen widerspiegelte. NGF

100ng/ml dagegen unterschied sich von den beiden erstgenannten Konzentrationen mit einer Verdopplungszeit von 2,1 +/- 0,2 Tagen, was jedoch mit $\delta = 0,1$ nicht als signifikant bewertet werden kann.

So ist auch bei dem letzten WF nicht die Proliferationsrate, sondern der Differenzierungserfolg entscheidend dafür, dass NGF (10ng/ml) als die beste WF-Konzentration für das Hühnchenzell-Modell zu werten ist.

Außerdem bestätigen unsere Befunde die von Pyle, dass die hohe Konzentration von 100ng/ml schlechtere Effekte hat als geringere Konzentrationen wie 10ng/ml. Wie sich noch geringere Konzentrationen an WF auf die neuralen Vorläuferzellen des Hühnchen auswirken, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2.3 Vergleich der drei WF (10ng/ml) mit S4-Medium

Vergleicht man nun S4-Medium mit den drei WF in der „Differenzierungskonzentration“ von 10ng/ml, ergibt sich ein klares Bild: Die WF führen nicht nur zur Differenzierung, sondern steigern auch die Proliferation von Zellen.

Wie in den Untersuchungsergebnissen von Pyle ist die Wirkung von NT4 auf Proliferation und Überleben insgesamt etwas besser als die von NGF, wie die Verdopplungszeiten von 1,6 im Vergleich zu 1,8 +/- 0,2 Tagen zeigen; im Mittelfeld liegt FGF. Da die Unterschiede jedoch nicht signifikant sind, kann davon ausgegangen werden, dass alle drei WF in ähnlichem Maße Einfluss auf die Proliferation nehmen.

4.3 Charakterisierung der Neurosphären

Die Neurosphäre ist ein immer noch nicht vollständig geklärtes Phänomen. Nur wenige Wissenschaftler haben sich darauf konzentriert, sie zu beschreiben und zu charakterisieren.

NS wurden hier als frei im Medium flottierende Strukturen beschrieben, die durchaus adhärent werden können, sich aber in reinem Expansionsmedium schnell wieder vom Untergrund lösten.

Es konnten NS sowohl in ihrer als typisch definierten kugeligen Form beobachtet werden, während andere eher wie irreguläre Zellkluster mit unscharfen Rändern aussahen. Diese Beobachtung wurde so auch von Bez et al. (2003) gemacht.

Weiterhin hatten größere NS einen dunkleren Kern, während kleinere eher als durchscheinend imponierten.

Es ist bekannt, dass die NS-bildenden Zellen nur durch sehr schwache Kontaktstellen-Komplexe (*gap junctions*) miteinander verbunden sind. Desmosomen konnten bisher nicht gefunden werden, und es gibt auch keinerlei Hinweise auf eine Fusion des Plasmalemmas. Dadurch kann erklärt werden, dass Zentrifugieren (das notwendig war, um Wachstumsfaktoren zu entziehen) die NS und ihre Differenzierung negativ beeinflusst hat. Es war außerdem wichtig, bei der regelmäßigen Zugabe von Wachstumsfaktoren und Nährmedium die Kultur nicht mit der Eppendorfpipette zu vermischen, sondern kontaktlos zu arbeiten.

In Zellvereinzlungsexperimenten, in denen NS mechanisch zerstört wurden, konnte gezeigt werden, dass eine vitale NS normalerweise über 80% vitale Zellen beinhaltet. Unsere im Neuronal-Base-Medium ganz braun gefärbten NS waren also tatsächlich stark apoptotisch. Weithin ist bekannt, dass die Zellen nicht synchronisiert sind, sondern sich in allen 3 Phasen des Zellzyklus (die meisten natürlich in G0/1) befinden.

In unseren Versuchen wuchsen die NS zu durchschnittlich 125µm großen Zellkonglomeraten. Dieser Mittelwert setzt sich zusammen aus kleinen und größeren Sphären, die von 25µm und 50µm bis 150µm und 250µm maßen. Mit diesen Größenverhältnissen bewegen wir uns quantitativ – wie auch morphologisch - im Rahmen dessen, was andere Gruppen bei der Forschung mit humanen neuronalen Vorläufern gefunden haben (Benzing, 2006). Auch die Beobachtung, dass unsere Zellkulturen schon innerhalb eines Tages NS bildeten, stimmt mit den Angaben anderer Arbeiten über humane neurale Progenitorzellen überein.

4.4 Die Korrelation zwischen Wachstumsfaktoren und Neurosphären

In unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass durch Wachstumsfaktoren die Menge und Größe der NS gesteigert werden konnte. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Wachstumsfaktoren (oder durch Variationen ihrer Konzentration) bezüglich NS-Menge und -Größe konnten allerdings nicht gefunden werden.

Bei Untersuchungen mit klonierten Mauszellen wurde gezeigt, dass mit EGF Neurosphären größeren Durchmessers erzeugt werden konnten als mit bFGF, und dass durch eine Zugabe beider WF sowohl große wie kleine NS gebildet wurden (Pagano et al., 2000).

Nach einem Zeitraum von ca. 5-9 Tagen hörte bei unseren Versuchen das Wachstum der NS auf. Die Menge und der Durchmesser der NS schwankten um recht konstante Endwerte. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass keine Passagen durchgeführt wurden und die Zellpopulationen abnehmenden Ressourcen an Platz, Nährmedium und Sauerstoff ausgesetzt waren.

Es ist allerdings auch von humanen Neurosphären bekannt, dass ihre Expansion sehr langsam vorangeht und trotz fortgeführter Kultivierung ihre Vergrößerung nach 35 Tagen aufhört (Svendsen et al. 1997).

Ausläufer im Rahmen der Differenzierung konnten vorwiegend in NS mit größeren Durchmessern beobachtet werden. Dies unterstreicht unsere Beobachtung, dass in Kulturen mit 10ng/ml am 7. Tag die Neurosphären größere Durchmesser aufwiesen als in Kulturen mit höheren WF-Konzentrationen (in denen kaum Differenzierung gefunden werden konnte). Es wurde dabei allerdings keine Signifikanz nachgewiesen.

Da unter allen Wachstumsfaktoren und Konzentrationen Sphären mit ausreichend großem Durchmesser (mindestens 75 μ m) gefunden werden konnten, war die Voraussetzung für die Differenzierung in allen Kulturen gewährleistet. Da sich aber dennoch nur die Kulturen differenzierten, die 10ng/ml WF enthielten, müssen noch andere Faktoren als lediglich ausreichend große NS für das Differenzierungsgeschehen essentiell sein.

Konkret konnte am Beispiel von FGF gezeigt werden, dass 10ng/ml WF die beste Konzentration für unser Modell darstellt.

In niedrigen Konzentrationen von FGF entwickeln sich zwar weniger NS als in FGF 100ng/ml, allerdings übertrafen sie diese an Größe. Da die Größe der NS von der Proliferation der Zellen abhängt, kann man konstatieren, dass bei FGF 10ng/ml stärkeres Zellpopulationswachstum in den Sphären stattfindet.

Da für Differenzierungsversuche die NS die zentralen Strukturen darstellen, aus denen später Ausläufer wachsen, kamen wir zu dem Ergebnis, dass hinsichtlich Proliferation, Neurosphärenbildung und Differenzierung FGF (10ng/ml) die beste Konzentration für neurale Hühnchenvorläuferzellen ist. Diesbezüglich stimmen unsere Ergebnisse - z.T. artenübergreifend - mit denen anderer Forschergruppen überein (Riaz et al., 2004, Glaser et al., 2005).

Vergleicht man alle Kulturen bezüglich der Größe der NS am 7. Tag, so wird deutlich, dass Zellkulturen mit Wachstumsfaktoren deutlich größere Sphären bilden. So waren am 7. Tag in S4-Medium die Sphären nur 70 +/- 40µm groß, während unter FGF (10ng/ml) 115 +/- 15µm große Sphären imponierten. Unter Einfluss von NGF fanden sich am 7. Tag deutlich größere NS als in NT4 (10ng/ml).

4.5 Wachstumsfaktoren und Differenzierung

4.5.1 Auswahl und Einsatz von Wachstumsfaktoren

Der Einsatz der Wachstumsfaktoren wurde nach schon bestehenden Differenzierungsprotokollen ausgewählt. Die beiden Neurotrophine boten sich an, da schon viel über ihre Wirkmechanismen bekannt ist und sie in Differenzierungsversuchen besonders mit neuronalen Vorläufern erfolgreich eingesetzt worden sind.

Auch FGF ist ein Standard-Wachstumsfaktor in vielen Stammzellprotokollen, nicht nur bezüglich der Proliferations-steigernden, sondern auch wegen seiner starken Differenzierungs-fördernden Wirkung.

In vielen Arbeiten werden mehrere Wachstumsfaktoren gleichzeitig eingesetzt (Glaser et al., 2005). Hier kam es jedoch darauf an, zunächst so wenig unbekannte Variablen wie möglich zu haben um a) klare Ergebnisse bezüglich der Wirkung der verschiedenen Faktoren zu erhalten und b) um zu zeigen, dass auch mit einem sehr einfachen Schema Resultate erzielbar sind und c) um damit ein sehr preiswertes und praktikables, aber dennoch potentes Stammzell-Differenzierungs-Modell vorzustellen.

Sicher lassen sich die Kulturbedingungen durch diverse (in zahlreichen Publikationen beschriebene) Methoden verbessern (Glaser et al., 2005), um die Überlebensdauer der Kulturen, ihr Proliferationsvermögen und die Differenzierungspotenz zu optimieren. Dies war jedoch nicht das Ziel dieser ersten Versuchsreihe.

Die Auswahl der WF-Konzentrationen richtete sich zunächst danach, ob damit in anderen Forschungsgruppen Erfolge erzielt worden waren. Zusätzlich wurden weitere Konzentrationen zum Vergleich ausgewählt und getestet. Somit konnten unsere Ergebnisse schließlich mit denen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

4.5.2 Fibroblast growth factor

Fibroblast growth factor ist allgemein bekannt als ein Mitglied in der großen Proteinfamilie, die Heparin und Heparin-Sulfat bindet und die Funktionen eines weiten Spektrums an Zelltypen moduliert. FGF tritt in vielerlei Isoformen auf und wird hauptsächlich in Geweben mesenchymalen und neuroektodermalen Ursprungs exprimiert. Er spielt daher bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der Induktion des Mesoderms und Neuroektoderms und stimuliert das Wachstum und die Entwicklung von beispielsweise neuen Blutgefäßen (Faitova, 2004).

FGF findet in zahlreichen Differenzierungsprotokollen von Stammzellen Anwendung. Obwohl er überwiegend als Expansionsfaktor genutzt wird (Kruithof et al., 2006) und damit Proliferation (aber nicht Differenzierung) unterstützt, gibt es Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass er allein als Differenzierungsfaktor für pre-neurale Phänotypen Potential hat (Benzing et al., 2006). Von diesen Autoren wurde er in einer Konzentration von 10ng/ml eingesetzt, was unseren Ergebnissen (10ng/ml als beste Arbeitskonzentration für NS-Wachstum und Differenzierung) entspricht.

Die Wirkungsweise von FGF ist komplex. Bezüglich Zellwachstum und Differenzierung beschreiben z.B. Ding et al. den sog. *Sprouty2* (Spry2) bei Säugern als ein Schlüsselregulator für den Tyrosinkinase-Rezeptor/ ERK-Signalweg, der in vielen biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung und Migration involviert ist und durch Mitogene wie z.B. EGF und FGF hochreguliert wird (Ding et al., 2007).

Ein anderer Signalmechanismus wurde nun von Stachowiak et al. beschrieben, bei dem extra- und intrazelluläre Signale die Proliferation, das Wachstum, die Differenzierung sowie andere Funktionen von Zellen des Nervensystems regulieren.

Durch Zellstimulation wird FGF-Rezeptor1 (ein typisches Plasma-Membran-assoziiertes Protein) vom Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol freigesetzt und wandert auf einen Importin- β -vermittelten Transportweg zusammen mit seinem Ligand FGF2 zum Nukleus. Die Ansammlung von FGFR1 (FGF-Rezeptor1) im Nukleus wurde aktiviert durch Veränderungen im Zell-Kontakt und durch Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern und Hormonen sowie durch eine Vielzahl von verschiedenen *second messengern*. Dieses wurde daher integratives nukleäres FGFR1-Signaling (INFS) genannt. Im Zellkern dient FGFR1 als ein genereller

Transkriptions-Regulator und stimuliert u.a. Multi-Gen-Programme für Zellwachstum und Differenzierung (Stachowiak et al., 2003).

Dass FGF eine wichtige Rolle speziell in der Entwicklung des Hühnchenembryos spielt, zeigt Pourquie in seiner Arbeit über die Entwicklung der Somiten im Hühnchenembryo (Pourquie, 2004).

In dem hier vorgestellten Protokoll trägt FGF wesentlich zur Differenzierung bei. Seine Eigenschaften als stärkster Expansionsfaktor im Vergleich zu anderen WF konnte allerdings nicht bestätigt werden, denn Zellen unter FGF-Einfluss zeigten kein signifikant schnelleres Wachstum. Er konnte aber als ein sehr potenter Faktor zur Induktion von Differenzierung genutzt werden. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass unter FGF von 32,3% aller NF-positiven Zellen kein Nestin mehr produziert wurde (im Vlg. zu 25,8% im Falle von NT4 (10ng/ml) und immerhin 30,7% durch NGF (10ng/ml)).

Nelson et al. verglichen ebenfalls die Wirkung der Konzentration von FGF auf neuronale Vorläuferzellen während der kortikalen Neurogenese und fanden, dass geringe Mengen von 2pg/ml die Neurogenese förderten, während FGF in einer Konzentration von 20ng/ml die Neurogenese bzw. Differenzierung behindert (Nelson und Svendsen, 2006). Auch in unserem Fall provozierte die kleinste Menge an FGF die beste Differenzierung, während FGF (50 und 100ng/ml) zu schlechteren Resultaten führte.

4.5.4 Neurotrophin-4

Die Neurotrophine sind eine Familie von Polypeptid-Nervenwachstumsfaktoren, die mit dem Prototyp NGF verwandt sind. Beim Säuger umfasst diese Genfamilie jedoch nicht nur NGF, sondern auch BDNF, Neurotrophin 3 und 4/5. Während NGF spezifisch an TrkA bindet, bevorzugen BDNF und NT4/5 eher TrkB, und schließlich bindet NT-3 hauptsächlich an Trk C (Lindsay 1996).

Memberg und Hall untersuchten den Einfluss verschiedener Neurotrophine auf sensorische Nervenvorläufer bei der Ratte. Sie fanden, dass eine Konzentration von NT4 (15ng/ml) die Anzahl an gebildeten Neuronen am stärksten erhöhen konnte. Bei NGF war die optimale Arbeitskonzentration 2ng/ml (Memberg und Hall, 1995).

Damit kommen wir mit unseren Ergebnissen zumindest im Falle von NT4 (10ng/ml) denen von Memberg sehr nahe.

Die Ergebnisse von Caldwell et al. unterstützen unsere Beobachtung, dass die Neuron-ähnlichen Zellausläufer am zahlreichsten unter NT4 gefunden wurden. Auch diese Arbeitsgruppe testete zahlreiche WF und beurteilte den prozentualen Anteil von Astrozyten im Vergleich zu Neuronen. Unter NT4 konnte die größte Anzahl an Neuronen festgestellt werden (Caldwell und Xiaolin, 2001).

4.5.3 Nerve growth factor

Der erste Vertreter der Superfamilie der neurotrophen Substanzen, NGF, wurde vor fast sechzig Jahren aus dem Gift der Mokassinschlange isoliert (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951). Diese Leistung von Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen wurde mit dem Nobelpreis gewürdigt.

NGF bindet mindestens an zwei Rezeptoren. TrkA ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase und aktiviert den Signalweg in der Zelle, indem es ein Phosphatmolekül an Tyrosin ankoppelt. Die Rolle des andere Rezeptors, LNGFR (*Low affinity nerve growth factor receptor*) oder besser bekannt als p75, ist weniger klar (Edwards et al, 1986).

„Die Neurotrophine, von denen NGF der bekannteste ist, unterstützen das Überleben und die Differenzierung von sensorischen Neuronen im Hühnchenembryo in extrem niedrigen Konzentrationen von 10-12 M oder weniger“. Mit diesen Worten beschreiben Meakin und Shooter 1992 die Tatsache, dass NGF eine Wirkung auf die Differenzierung von Neuronen im Hühnchenembryo hat (Meakin und Shooter, 1992).

Auch unsere Zellen differenzierten sich unter NGF-Einfluss:

In einer Konzentration von 10ng/ml führte es zu den besten Ergebnissen, während NGF (50 und 100ng/ml) kaum Differenzierung hervorrufen konnten.

Unsere Beobachtung wird bestätigt durch die Ergebnisse von Lin et al., die an einer Phäochromozytom-Zelllinie untersuchten, ob der TrkA-Rezeptor-Aktivator 5H5 zusammen mit NGF die Zellen zur Differenzierung anregen kann. 10ng/ml NGF führte zum gewünschten Resultat (Lin et al., 2007).

Dass allerdings nicht für alle Modelle eine niedrige Konzentration an NGF geeignet ist, zeigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Elena Cattaneo, die neuronale Progenitorzellen durch die Expression des Neurofilaments Nestin identifizierte. Die Zellen proliferierten als Antwort auf die Zugabe von NGF und differenzierten sich zu

Neuron-ähnlichen Zellen. Die Zellen waren nun (wie in unseren Versuchen auch) noch immer positiv auf Nestin, exprimierten aber nun zusätzlich den für Neurone typischen Faktor Neurofilament (Cattaneo und McKay, 1990).

In einigen wichtigen Punkten unterschied sich jedoch Cattaneo's Vorgehensweise von der unseren. Abgesehen von der Tatsache, dass es sich bei den Versuchstieren um Ratten handelte, wurde eine größere Konzentration an NGF - nämlich 150ng/ml - als optimal befunden. Außerdem konnten die Zellen auf Deckgläschen kultiviert werden, was sich in unseren Experimenten als nicht praktikabel herausstellte.

4.5.5 Wachstumsfaktor-Entzug

In vielen Publikationen über Differenzierungsversuche wird die Notwendigkeit eines späteren Wachstumsfaktor-Entzuges beschrieben. So behandelte die Arbeitsgruppe von Elena Cattaneo ihre Zellen zunächst neun Tage mit bFGF und NGF und entzog dann die Wachstumsfaktoren, woraufhin sich die Zellen differenzierten (Cattaneo und McKay, 1990).

Neurogenese wird durch Transkriptionsfaktoren wie Mash1, Math1 und Neuro D vorangetrieben, während es von anderen (u.a. Hes1, Hes 5) unterdrückt wird. Wie und welche extrazellulären Faktoren an ihrer Regulation beteiligt sind, ist noch in hohem Maße unklar. Ito und Furunkawa untersuchten dazu an neuralen Stammzellen der Maus die Wirkung von Neurotrophinen auf die Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung von Nervenzellen essentiell sind.

Sie beschrieben, dass alle Neurotrophine bei Anwesenheit von FGF-2 den Level von Mash1 und Math 1 mRNA erhöhten, jedoch nicht den von Hes1, Hes 5 und Neuro D mRNA.

Daraus resultiert, dass die Zellen Nestin, aber nicht MAP2 (*microtubuli associates protein 2*) exprimierten, also undifferenziert blieben.

Der Entzug von FGF-2 erniedrigte den Level von Hes 1 und Hes 5 mRNA und erhöhte den von Mash1, Math 1 und Neuro D mRNAs, besonders nach Vorbehandlung der Zellen mit Neurotrophin und *brain-derived-neurotrophic-facotor*. Neuronale Differenzierung trat ein (Ito und Furunka, 2004).

In unserem Stammzellmodell erwies sich ein Wachstumsfaktorentzug für das Eintreten von Differenzierung als nicht notwendig und wirkte sich sogar negativ aus. Die Zellen, welche jeweils am 4. Tag (Glaser und Brüstle, 2005) nach Präparation und Kultivierung mit WF zentrifugiert und mit frischem S4-Medium weiter kultiviert wurden, zeigten

keinerlei Differenzierungsbestreben mehr, obwohl sie dies vorher getan hatten. Andere Studien kamen ebenfalls zu dem Resultat, dass ein mechanisches Trauma Neurone zerstören und erneutes Wachstum verhindern kann (Svendsen et al., 1998). Auch die NS reduzierten sich bis zum völligen Verschwinden.

Dies könnte entweder damit erklärt werden, dass das Zentrifugieren die Zellen geschädigt hat oder aber dass das Ursprungsmedium von den Zellen selbst gebildete Stoffe enthielt, die für die Differenzierung notwendig sind.

Zur Klärung wurde eine Art WF-Entzug durch Verdünnung vorgenommen, indem den Zellen nach einmaliger WF-Zugabe nur noch S4-Medium zugeführt wurde. Allerdings zeigten sich dabei keine Unterschiede zur Differenzierung, die mit einer konsequenten Zugabe von WF erreicht werden konnte.

Die Abweichung zu den publizierten Ergebnissen mit WF-Entzug könnte evtl. dadurch erklärt werden, dass in unseren Experimenten nur ein WF zugegeben und keine gleichzeitige Vorbehandlung mit FGF durchgeführt wurde.

4.6 Bestätigung der neuronalen *in-vitro* Differenzierung mittels

Immunhistochemie

NS sind multipotent und können sich daher in verschiedene Phänotypen (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) differenzieren (Pagano et al., 2000, Vescovi et al., 1999)

Die aktuelle Datenlage über NS zeigt, dass sie eine heterogene Gruppe von neuronalen Stammzellen enthalten und daher nicht nur Nestin, einen Marker für neurale Vorläuferzellen (Lendahl et al. 1990), sondern auch spezifische Marker für die verschiedenen neuronalen Zelllinien (Glaser und Brüstle, 2005) exprimieren.

Diese Befunde spiegeln sich auch in unserer Arbeit wieder. In jeder der immunhistochemisch untersuchten Zellkulturen, die sich unter Einfluss der verschiedenen WF differenziert hatten, konnten (wenn auch in verschiedenen prozentualen Mengen-Verhältnissen) für alle vier Marker positive Zellen gefunden werden. D.h. es fanden sich nicht nur Nestin-positive neurale Vorläuferzellen, sondern auch für den Oligodendrozytenmarker MOSP, den Astrozytenmarker GFAP und schließlich für NF positive Zellen und Zellausläufer.

Caldwell et al. führten ähnliche Versuche mit neuroepithelialen embryonalen Vorläuferzellen durch, die mit FGF (und anschließend Entzug) zur Differenzierung stimuliert wurden. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass 90% der Zellen für

Nestin, 60% für MAP2 positiv waren. Auf die Gliamarker GFAP und O2 reagierten nur 15% bzw. 2% der Zellen positiv (Caldwell und Xiaolin, 2001).

Diese prozentuale Zusammenstellung der Zellpopulation entspricht in etwa unseren Ergebnissen.

4.6.1 Nestin und Neurofilament – von Progenitorzellen und Neuronen

Nestin wurde *in vitro* von unseren Zellen transient exprimiert. Hierzu passende *in-vivo* Daten liegen in der Literatur vor: Nestin wird *in vivo* hauptsächlich in den Stammzellen des ZNS im Neuralrohr gebildet. Am Ende der neuronalen Differenzierung wird die Expression von Nestin verringert und später durch Neurofilament ersetzt (Dahlstrand et al., 1992).

Der größte Anteil der NS färbte sich - mit Ausnahme des apoptotischen Zentrums - positiv auf Nestin. Die Neurosphären bestanden also hauptsächlich aus neuronalen Vorläuferzellen (Svendsen et al., 1998).

Sobald eine Sphäre adhärent wurde und Oberflächenkontakt gewährleistet war, fand innerhalb weniger Stunden Migration von Zellen mit Glia-ähnlicher Morphologie statt. Zwischen dem 2. und 7. Tag entwickelten sich radiäre Ausläufer vom Rand der Sphären auf das Substrat. Entlang dieser Stränge konnten unreife Neurone beobachtet werden, deren Ausläufer durch sehr gerade parallele Linien imponierten (s. Abb. 11D mit strahlenförmigen schnurgraden Ausläufern). Dieses Phänomen wurde auch in anderen Untersuchungen zu NS beobachtet, und es wird angenommen, dass diese Neurone evtl. aus tieferen Schichten der Sphären stammen und im Rahmen ihrer Migration ihre Fortsätze hinter sich herziehen (Svendsen et al., 1998).

4.6.2 MOSP und GFAP – von Astrozyten und Oligodendrozyten

Ein Teil der zirkulär aus den Sphären migrierenden Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern war also NF- oder GFAP-, andere zusätzlich auch MOSP-positiv.

Aus den NS entwickelte sich also immer beides: Neurone und Gliazellen. Dieses Phänomen wurde vielfach beobachtet und spricht stark dafür, dass in den NS ein gemeinsamer Vorläuferzelltyp vorliegt (Svendsen et al., 1998).

Es ist natürlich auch möglich, dass zwei unipotente Stammzellen mit ähnlicher Teilungsrate und der Kapazität, entweder Neurone oder Astrozyten zu produzieren, nebeneinander existieren.

Außerdem wird vermutet, dass die sich entwickelnden Astrozyten eine attraktive Oberfläche für das Aussprossen und die Migration von Neuronen darstellen.

Svendsen publizierte, dass sich bei seinen Untersuchungen mit humanen neuronalen Vorläuferzellen Oligodendrozyten nur aus jungen (aber nicht aus älteren) Sphären entwickelten. Dies deutet darauf hin, dass entweder a) ein Oligodendrozyten-Vorläufer sich für eine gewisse Zeit in Kultur teilen kann, dann aber aus der Kultur verschwindet oder b) ein allgemeiner Vorläufer existiert, der zu Beginn noch die Fähigkeit hat, Oligodendrozyten zu produzieren, später aber nicht mehr (Svendsen et al., 1998, Murray und Dubois-Dalcq, 1997).

In unserer Arbeit konnten fast nur für den Oligodendrozyten-Marker MOSP positive Zellen gefunden werden, die gleichzeitig GFAP-positiv waren. Dabei war der Anteil GFAP-positiver Zellen viel höher als der MOSP-positiver Zellen. Weiterhin wurden in früheren Untersuchungen unseres Institutes mit undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen aus 48 Stunden alten Hühnerembryonen beobachtet, dass die NS bereits im undifferenzierten Zustand zu 50% GFAP-positiv sind.

Auch von anderen Autoren wird beschrieben, dass sich unter konventionellen Kulturmethode von Zellen aus der Maus spontan Gliazellen, bei der Ratte besonders Astrozyten bilden (Arsenijevic und Weiss, 1998).

Diese Beobachtungen sprechen eher für die These, dass ein gemeinsamer Vorläufer für Astrozyten und Oligodendrozyten vorliegt.

Es ist durchaus bekannt, dass phänotypisch gemischte gliale Zellen vorkommen, die sowohl Merkmale von Astrozyten und Oligodendrozyten aufweisen.

So haben Raff et al. nach Extraktion von Zellen aus dem optischen Nerv der Ratte beobachtet, wie diese sich je nach Kulturbedingungen in Astrozyten, Oligodendrozyten oder einen gemischten glialen Phänotyp entwickelten. Diese Zellen zeigten sowohl Merkmale von Astrozyten als auch von Oligodendrozyten und es wurde gefolgert, dass sich beide aus einer gemeinsamen Vorläuferlinie entwickeln müssen. Diese Ergebnisse demonstrieren die starke Plastizität der Vorläuferzellen und den Einfluss der Umgebung auf ihr Schicksal (Raff et al., 1983).

4.6.3 Nestin, ein Stammzellmarker für Säugetiere – auch ein Marker für aviane Stammzellen?

Nestin ist ein weit verbreiteter Marker für neurale Vorläuferzellen des Säugers. Auch in dieser Studie wurde es zur Detektion unreifer Vorläuferzellen benutzt.

Kritiker könnten nun anmerken, dass Nestin ein ausschließlich für Säuger geeigneter Marker ist, und bei Forschungen mit Vogel-Stammzellen das von Fischer und Omar (2005) vorgeschlagene Homolog für Nestin im Huhn (nämlich das intermediäre Filament Transitin) angewendet werden muss.

Transitin wurde bereits 1997 identifiziert und als ein Nestin-ähnliches Protein im Vogel beschrieben (Yuan et al., 1997).

In dieser Studie konnte Transitin wegen Nicht-Beziehbarkeit nicht verwendet werden, weder als Marker für neurale Vorläuferzellen noch als Vergleichs-Marker bei der Beweisführung, dass Nestin auch im postnatalen Huhn ein ausgezeichneter Marker für neurale Stammzellen ist.

Ein Argument dafür, dass Nestin auch ein geeigneter Marker im Huhn-Modell ist, liefern die in diesem Projekt gewonnenen immunhistochemischen Bilder. Ein Teil der Zellen, die für Neurofilament positiv sind, zeigen gleichzeitig eine positive Färbung für Nestin. So wurde schon früher beschrieben, dass sich aus Vorläuferzellen differenzierende Neurone zunächst Nestin produzieren, dessen Expression jedoch im weiteren runterreguliert wird, während gleichzeitig die Produktion von Neurofilament aufgenommen wird (Duprey und Paulin, 1995).

Ähnlich reduzieren auch sich differenzierende Astrozyten die Expression von Vimetin und nehmen gleichzeitig die Produktion von GFAP auf (Bignami und Dahl, 1974).

Allerdings reagierten nicht alle Zellen (die durch die nukleäre Färbung mit DAPI-Movioli leicht ausmachbar waren) positiv auf Nestin. Das zeigt, dass Nestin nicht unspezifisch färbt, sondern durchaus präzise die neuronalen Vorläuferzellen markiert.

4.7 Nachweis, dass es sich bei unseren Zellen um neurale Stammzellen handelt und diese ein alternatives Modell zur Stammzellforschung darstellen

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass es sich bei den vom 48 Stunden alten Hühnchenembryo gewonnenen Zellen um ein *in-vitro* Modell neuraler Stammzellen handelt, die sowohl in ihrem undifferenzierten Zustand proliferieren und Neurosphären bilden als auch unter verschiedenen Kulturbedingungen dazu fähig sind, sich spontan in Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten zu differenzieren (Pera et al., 2000).

Dabei weisen unsere Ergebnisse vielfach Parallelen zu ähnlichen Versuchen mit andere Spezies auf.

Schon frühere Studien haben gezeigt, dass ES-Zellen (gewonnen vom frühen Blastoderm der Hühnchenembryos) hoch potent sind und ähnliche Merkmale wie Maus-ES-Zellen aufweisen. Sie konnten langzeitkultiviert werden und glichen bezüglich morphologischer Erscheinung, Reaktivität gegenüber spezifischen AK, Proliferation und Telomerase-Aktivität sehr den Mauszellen. Schließlich zeigten sie nicht nur eine hohe Kapazität zur Differenzierung (und zwar in Zelltypen aller drei Keimblätter) sondern es konnten durch Injektion der kultivierten Zellen in *White Leghorn Embryos* im Stadium X chimäre Tiere erzeugt werden (Pain et al, 1996).

Eine zunehmende Anzahl an Publikationen deutet nun darauf hin, dass die Ergebnisse, die in *in-vitro*-Differenzierungsversuchen von neuronalen Vorläuferzellen anderer Spezies wie der Maus gefunden werden, auch auf humane Stammzellen übertragen werden können (Zhang et al.; 2001, Carpenter et al., 2003). So kann die Forschung auf diesem Gebiet vorangetrieben werden, ohne dass zunächst humane Embryonen herangezogen werden müssen.

Es ist verlockend zu spekulieren, dass die Stadien der NS-Bildung, Adhärenz, Formation radiärer Ausläufer und offensichtlicher Migration die tatsächlichen Prozesse nachbilden, wie sie im Organismus selbst während der Entwicklung (aber auch im erwachsenen Organismus) ablaufen; wie z.B. die Teilung der neuronalen Vorläufer in der subventrikulären Zone des Primaten, bevor sie zur *pial surface* entlang der radialen Glia migrieren (Rakic, 1985). Es besteht jedoch noch großer Bedarf an weiterführender Forschung, um diese Fragen vollständig klären zu können.

5 Zusammenfassung

Besonders im Hinblick auf die faszinierenden und vielfältigen therapeutischen Aussichten stehen Stammzellen im Focus moderner Forschung. Andererseits ist Stammzellforschung mit z.T. heftig diskutierten Problemen assoziiert, allen voran die ethischen Einwände. Dadurch ist das Thema der Herkunft bzw. Beziehbarkeit von Stammzellen in den Vordergrund gerückt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von neuralen Vorläufer-Zellen aus der Neuralleiste des 48h alten Hühnchenembryos als Stammzellmodell untersucht.

Ziel unserer Arbeit war zum einen, geeignete Bedingungen für die Kultivierung, Neurosphärenbildung und Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen des Hühnchens zu etablieren. Zum anderen sollte gezeigt werden, dass es sich bei dem Hühnchenmodell um ein attraktives System zur Stammzellforschung handelt.

Dafür wurden die Stammzellen aus dem embryonalen Hühnchen extrahiert und nach Supplementierung des Mediums mit NGF, NT4 oder FGF auf Proliferationsverhalten, Neurosphärenbildung und Differenzierung untersucht.

Neben der morphologischen Beurteilung der Zellen wurde auch die Expression des neuralen Stammzellmarkers Nestin, der Marker GFAP und MOSP für Astrozyten und Oligodendrozyten und schließlich des neuronalen Markers Neurofilament immunhistochemisch überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorläuferzellen des Hühnchenembryos ohne Passage über mehrere Wochen kultivierbar waren, sich dabei spontan Neurosphären als typische Kolonieform neuraler Stammzellen bildeten und alle drei Wachstumsfaktoren Differenzierung provozierten. Die Zellen exprimierten schließlich Marker für neurale Vorläuferzellen sowie für Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone.

Insgesamt bieten die neuralen Vorläuferzellen des Hühnerembryos (im Stadium 10 nach Hamburger und Hamilton) ein schnelles, preiswertes und leicht beziehbares System, um mit einfachen Methoden grundlegende Fragen in der Stammzellforschung zu untersuchen. Sie können zumindest teilweise teurere und zeitaufwendigere, vor allem aber ethisch umstrittene Forschungsmodelle ersetzen.

6 Literaturverzeichnis

Arsenijevic Y, Weiss S (1998) Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18: 2118-2128

Benzing C, Segschneider M, Leinhaas A, Itskovitz-Eldor J, Brustle O (2006) Neural conversion of human embryonic stem cell colonies in the presence of fibroblast growth factor-2. *Neuroreport* 17: 1675-1681

Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, Pagano SF, Parati EA (2003) Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 993: 18-29

Bignami A, Dahl D (1974) Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol* 153: 27-38

Burke ZD, Thowfeequ S, Peran M, Tosh D (2007) Stem cells in the adult pancreas and liver. *Biochem J* 404: 169-178

Caldwell J, Locey B, Clarke MF, Emerson SG, Palsson BO (1991) Influence of medium exchange schedules on metabolic, growth, and GM-CSF secretion rates of genetically engineered NIH-3T3 cells *Biotechnol Prog* 7: 1-8

Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN (2001) Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19: 475-479

Carpenter MK, Rosler E, Rao MS (2003) Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5: 79-88

Cattaneo E, McKay R (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347: 762-765

Chang YC, Shyu WC, Lin SZ, Li H (2007) Regenerative therapy for stroke. *Cell Transplant* 16: 171-181

Correia AS, Anisimov SV, Li JY, Brundin P (2005) Stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Ann Med* 37: 487-498

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Strazzer S, Comi GP (2004) Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. *J Cell Mol Med* 8: 329-337

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments *J Cell Sci* 103 (Pt 2): 589-597

Damjanov I (2004) From stem cells to germ cell tumors and back. *Verh Dtsch Ges Pathol* 88: 39-44

Deutscher Bundestag (1990) Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz – EschG). *BGBl* IS: 2746

Deutscher Bundestag (2002) Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzgesetzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher Embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG). *Bundesgesetzblatt* 42: 2277

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2001) Empfehlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Forschung mit menschlichen Stammzellen. *Pressemitteilung* 16: 1-60

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2002) Empfehlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft zum Gesetzentwurf zum Stammzellenimport. *Pressemitteilung* 50: 4

Ding W, Shi W, Bellusci S, Groffen J, Heisterkamp N, Minoo P, Warburton D (2007) Sprouty2 downregulation plays a pivotal role in mediating crosstalk between TGF-beta1 signaling and EGF as well as FGF receptor tyrosine kinase-ERK pathways in mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 212: 796-806

Dunnett SB, Rosser AE (2004) Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx* 1: 394-405

Duprey P, Paulin D (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 39: 443-457

Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ (1986) Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* 319: 784-787

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317

Faitova J (2004) Fibroblast growth factor-2. *Cesk Fysiol* 53: 92-101

Fischer AJ, Omar G (2005) Transitin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Muller glia in the chicken retina. *J Comp Neurol* 484: 1-14

Glaser T, Brustle O (2005) Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection. *Trends Neurosci* 28: 397-400

Glaser T, Perez-Bouza A, Klein K, Brustle O (2005) Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *FASEB J* 19: 112-114

Goldman S (2005) Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* 23: 862-871

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552

Ito H, Furukawa S (2004) Priming of neuronal differentiation of cultured neural stem cells by neutrophins. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 24: 181-185

Kerr CL, Shambloott MJ, Gearhart JD (2006) Pluripotent stem cells from germ cells. *Methods Enzymol* 419: 400-426

Kiatpongsan S, Pruksananonda K, Tannirandom Y (2006) Cell therapy: hype or hope. *J Med Assoc Thai* 89: 550-557

Kornack DR, Rakic P (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4752-4757

Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5768-5773

Kruithof BP, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Perez Pomares JM, Weesie F, Wessels A, Moorman AF, van den Hoff MJ (2006) BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* 295: 507-522

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-2033

Latham KE (2006) The Primate Embryo Gene Expression Resource in embryology and stem cell biology. *Reprod Fertil Dev* 18: 807-810

Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E (2002) Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci* 25: 131-134

Lendahl U, Zimmerman LB & McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595

LEVI-MONTALCINI R, HAMBURGER V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116: 321-361

Lin B, Pirrung MC, Deng L, Li Z, Liu Y, Webster NJ (2007) Neuroprotection by small molecule activators of the nerve growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 59-69

Lindsay RM (1996) Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 365-373

Louet S (2001) French ethics law revised. *Nat Biotechnol* 19: 6

Manganas LN, Maletic-Savatic M (2005) Stem cell therapy for central nervous system demyelinating disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 225-231

Meakin SO, Shooter EM (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 15: 323-331

Memberg SP, Hall AK (1995) Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. *Mol Cell Neurosci* 6: 323-335

Murray K, Dubois-Dalcq M (1997) Emergence of oligodendrocytes from human neural spheres. *J Neurosci Res* 50: 146-156

Nagy A, Vintersten K (2006) Murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 418: 3-21

National Institutes of Health USA (2000) H1H Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells. *Cloning* 1: 225-31

Nelson AD, Svendsen CN (2006) Low concentrations of extracellular FGF-2 are sufficient but not essential for neurogenesis from human neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 33: 29-35

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59: 89-102

Ostrer H, Wilson DI, Hanley NA (2006) Human embryo and early fetus research. *Clin Genet* 70: 98-107

Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M *et al.* (2000) Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18: 295-300

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ (1996) Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339-2348

Pajoohesh-Ganji A, Stepp MA (2005) In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium. *Biol Cell* 97: 265-276

Paul G, Li JY, Brundin P (2002) Stem cells: hype or hope? *Drug Discov Today* 7: 295-302

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A (2000) Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 1): 5-10

Petitte JN, Liu G, Yang Z (2004) Avian pluripotent stem cells. *Mech Dev* 121: 1159-1168

Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B & Baron-Van Evercooren A (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76: 223-231

- Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG, Elefanty AG (2007) Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Serum Free Medium Reveals Distinct Roles for BMP4, VEGF, SCF and FGF2 in Hematopoiesis. *Stem Cells*
- Pourquie O (2004) The chick embryo: a leading model in somitogenesis studies. *Mech Dev* 121: 1069-1079
- Pyle AD, Lock LF, Donovan PJ (2006) Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat Biotechnol* 24: 344-350
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494: 415-434
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-396
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054-1056.
- Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF (2004) The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 153: 39-51
- Richards T (2000) The UK government should sanction carefully regulated research. *BMJ* 321: 1427.-1428
- Rietze R, Poulin P, Weiss S (2000) Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 424: 397-408
- Rizvi AZ, Wong MH (2005) Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells* 23: 150-165
- Sanchez-Ramos J (2006) Stem cells from umbilical cord blood. *Semin Reprod Med* 24: 358-369
- Schmandt T, Meents E, Gossrau G, Gornik V, Okabe S, Brustle O (2005) High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells Dev* 14: 55-64
- Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, Yone K, Komiya S & Taga T (2004) Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol* 189: 33-44
- Stachowiak MK, Fang X, Myers JM, Dunham SM, Berezney R, Maher PA, Stachowiak EK (2003) Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal "feed-forward-and-gate" signaling module that controls cell growth and differentiation. *J Cell Biochem* 90: 662-691
- Stern CD (2005) The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell* 8: 9-17

- Stern CD (1996) Chick stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 212: 195-206
- Stoltz JF, Bensoussan D, Decot V, Ciree A, Netter P, Gillet P (2006) Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview. *Biomed Mater Eng* 16: S3-S18
- Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T, Caldwell MA (1998) A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 85: 141-152
- Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmioli S, Dunnett SB (1997) Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148: 135-146
- Tang MJ, Tannen RL (1994) Metabolic substrates alter attachment and differentiated functions of proximal tubule cell culture. *J Am Soc Nephrol* 4: 1908-1911
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414: 112-117
- Tian HB, Bai ZL, Wang H, Chen JQ, Cheng GX (2005) Efficient differentiation of embryonic stem cells into neurons in glial cell-conditioned medium under attaching conditions. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 480-487
- Trubiani O, Orsini G, Caputi S, Piatelli A (2006) Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19: 451-460
- Tzeng SF (2002) Neural progenitors isolated from newborn rat spinal cords differentiate into neurons and astroglia. *J Biomed Sci* 9: 10-16
- Vescovi AL, Parati EA, Gritti A *et al.* (1999) Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 156: 71-83
- Vieyra DS, Jackson KA, Goodell MA (2005) Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells *Stem Cell. Rev* 1: 65-69
- Weiss ML, Troyer DL (2006) Stem cells in the umbilical cord *Stem Cell. Rev* 2: 155-162
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192: 251-264
- Yamane T, Dylla SJ, Muijtjens M, Weissman IL (2005) Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3312-3317
- Yuan Y, Lee JA, Napier A, Cole GJ (1997) Molecular cloning of a new intermediate filament protein expressed by radial glia and demonstration of alternative splicing in a novel heptad repeat region located in the carboxy-terminal tail domain. *Mol Cell Neurosci* 10: 71-86

Zentrale Ethikkommission der Bundesärztekammer (2002) Stellungnahme der Zentralen Ethikkommission zur Stammzellforschung. Deutsches Ärzteblatt 49: A3249-C2553

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19: 1129-1133

7 Lebenslauf

Name: Nina Kathrin Schneider
Geburtsdatum/-ort: 10.12.1980 in Paderborn
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

SCHULISCHER WERDEGANG

1987-1991 Bonifatius Grundschule in Paderborn
1991-2000 Gymnasium Theodorianum in Paderborn

STUDIUM

Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

09/2000-08/2002 Vorklinischer Studienabschnitt
08/2002 Ärztliche Vorprüfung
8/2002-12/2006 Klinischer Studienabschnitt
08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005-09/2006 Praktisches Jahr in Münster an akademischen
Lehrkrankenhäusern der WWU
Raphaelsklinik (Chirurgie und Innere Medizin)
Universitätsklinikum Münster (Gynäkologie)
12/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2007-10/2007 Experimentelle Doktorarbeit, Institut für Experimentelle
Ophthalmologie

BERUF

02/2008-07/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Pathologie und
Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen
ab 08/2008 Speciality Training, Thames Histopathology School,
Großbritannien

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Thanos für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut unter optimalen und sehr großzügigen Bedingungen durchführen zu können.

Petar Charalambous möchte ich ganz besonders danken für die geduldige Einführung in die Arbeitstechniken und die guten Betreuung während der gesamten Dauer der Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes, die mich tatkräftig unterstützt haben und nicht müde wurden, bei der Erlernung der diversen Techniken alle meine Fragen zu beantworten.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
b.B.	bei Bedarf
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
EC-Zellen	Embryonic Carcinoma Cells
EGF	Epithelial growth factor
EG-Zellen	Embryonic Germ Cells
ES-Zellen	Embryonic Stem-Cells
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFAP	Glial fibrally acidic protein
HBSS	Henk's buffered saline solution
min	Minute
mm	Millimeter
MOSP	Myelin oligodendrocyte specific protein
NB	Neuronal Base
neg.	negativ
NGF	Nerve Growth Factor
NS	Neurosphären
NF	Neurofilament
NT-4	Neurotrophin-4
PBS	Phosphat buffered saline
pos.	positiv
WF	Wachstumsfaktor
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
z.T.	zum Teil

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vitale und apoptotische NS	23
Abb. 2: Einfluss des Mediums auf die NS-Bildung	25
Abb. 3: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der Proliferation	25
Abb. 4: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der NS-Menge	26
Abb. 5: Vergleich von S4- und NB-Medium bezüglich der NS-Größe	26
Abb. 6: Adhäsion der Neurosphären auf verschiedenen Substraten	29
Abb. 7: FGF-Konzentrations-abhängige Proliferation	30
Abb. 8: NT4-Konzentrations-abhängige Proliferation	31
Abb. 9: NGF-Konzentrations-abhängige Proliferation	32
Abb. 10: Einfluss der verschiedenen WF auf die Proliferation	33
Abb. 11: Einfluss der verschiedenen WF auf die NS-Dichte	34
Abb. 12: FGF-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte	35
Abb. 13: NT4-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte	35
Abb. 14: NGF-Konzentrations-Wirkungsverhältnis bezüglich der NS-Dichte	36
Abb. 15: Einfluss der verschiedenen WF auf die NS-Größe	38
Abb. 16: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von FGF (10ng/ml)	40
Abb. 17: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von NT4(10ng/ml)	42
Abb. 18: Morphologische Differenzierung unter Einfluss von NGF(10ng/ml)	43
Abb. 19: Prozentualer Anteil Nestin-positiver aus NF-positiven Zellen nach Einfluss verschiedener WF	47
Abb. 20: Prozentualer Anteil MOSP-positiver aus GFAP-positiven Zellen nach Einfluss verschiedener WF	48
Abb. 21: NS immunhistochemisch	49
Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF	50
Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF	51
Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch FGF	52
Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NT4	53
Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NT4	54
Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NGF	55
Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung durch NGF	56