

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf

**Charakterisierung von
humanen Stromazellen des subkutanen Fettgewebes
unter besonderer Berücksichtigung
neurogener Differenzierungsansätze *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kai Michael Kompisch

aus Hamburg

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

16.07.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

PD Dr. S. Klutmann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. H.-E. Laack

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“

Richard P. Feynman (1918 – 1988)

Physiker und Nobelpreisträger

I. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	1
II. Einleitung.....	2
1. Adulte Stammzellen.....	2
1.1 Plastizität und Transdifferenzierung.....	2
1.2 Adipose-derived Stem Cells (ASC).....	6
1.2.1 Ansätze neurogener Differenzierung von ASC.....	7
1.3 Adulte multipotente adulte Stammzellen der Haut.....	9
2. Neurogenes Induktionsmedium (NID).....	10
2.1 Die Rolle des zyklischen Adenosin-Monophosphates (cAMP) im Rahmen von Neuroregulation und neurogener Differenzierung.....	10
2.2 Die Rolle der Cyclooxygenase (COX) und ihrer Inhibitoren im Rahmen von Neuroprotektion, Neuroregeneration und neurogener Differenzierung.....	14
2.3 Die Rolle des Insulins im Rahmen neuronaler Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse.....	16
III. Material.....	18
1. Die ASC-Zelllinien.....	18
2. Humane Stromazellen der Haut (Skin-derived Stromal Cells, SSC).....	18
3. Neurogenes Induktionsmedium (NID).....	19
3.1 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) als Phosphodiesterase-Inhibitor.....	19
3.2 Indomethacin als Cyclooxygenase-Inhibitor.....	19
3.3 Insulin-Lösung.....	19
IV. Methoden.....	20
1. Zellkultur.....	20
1.1 Isolierung von humanen ASC-Zellen.....	20
1.2 Kultivierung von humanen ASC-Zellen.....	21
1.3 Kryokonservierung von humanen ASC-Zellen.....	22
1.4 Revitalisierung kryokonservierter ASC-Zellen.....	23
1.5 Gewinnung und Kultivierung humaner Stromazellen der Haut. (SSC).....	23
1.6 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination der Zellkultur.....	24
2. Zellmorphologie.....	24
2.1 Beurteilung der Zellmorphologie unter Standard-Kulturbedingungen.....	24
2.2 Beurteilung der Zellmorphologie unter neurogener Induktion (NID).....	25

3.	Expression von Oberflächenantigenen.....	25
3.1	Durchflusszytometrie.....	25
4.	Immunhistochemie.....	26
4.1	Expression proneuraler Marker: Musashi-1, Nestin und β -III-Tubulin.....	26
4.2	Immunhistochemischer Nachweis des cAMP response element binding-protein (CREB) in ASC und SSC.....	28
5.	Untersuchungen zur Zellproliferation.....	29
5.1	Zellzählung.....	29
5.2	Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationsdauer im Rahmen der Proliferationsexperimente.....	29
5.3	Untersuchungen zur Zellproliferation unter Zugabe der Testsubstanzen.....	31
5.3.1	Festlegung von Inkubationszeitraum und Zellkonzentration.....	31
5.3.2	Zellproliferation unter neurogener Induktion.....	32
5.3.3	Zellproliferation unter Berücksichtigung der Einzelsubstanzen.....	33
6.	Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes sowie der Zellzyklusphasen.....	34
7.	RNS-Extraktion und Analyse der Genexpression unter neurogener Induktion.....	36
8.	Statistische Auswertung.....	37
V.	Ergebnisse.....	38
1.	ASC und SSC unter Standard-Kulturbedingungen.....	38
2.	Expression von Oberflächenantigenen.....	39
2.1	Durchflusszytometrie.....	39
3.	Morphologische Veränderungen unter neurogener Induktion (NID).....	43
4.	Immunhistochemie.....	45
4.1	Expression proneuraler Marker: Musashi-1, Nestin und β -III-Tubulin.....	45
4.2	Nachweis des cAMP response element binding-protein (CREB) in ASC und SSC.....	49
5.	Untersuchungen zur Zellproliferation.....	50
5.1	Proliferation unter neurogener Induktion.....	50
5.2	Proliferation unter Berücksichtigung der Einzelsubstanzen.....	52

5.3 Vergleichende Betrachtung des antiproliferativen Effektes unter neurogener Induktion.....	55
6. Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes und der Zellzyklusphasen.....	58
7. Analyse der Genexpression unter neurogener Induktion (NID).....	64
VI. Diskussion.....	68
VII. Zusammenfassung.....	88
VIII. Literaturverzeichnis.....	89
IX. Appendix.....	119
X. Danksagung.....	126
XI. Lebenslauf.....	127
XII. Erklärung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
AP	alkalische Phosphatase
ASC	adipose-derived stem cell
ATF	activating transcription factor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bHLH	basic helix-loop-helix-Motiv
BMSC	bone marrow-derived stromal / stem cell
BSA	bovines Serum-Albumin
bZip	basic domain leucin zipper-Motiv
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclic adenosine-monophosphate
CBP	CREB-binding protein
CCN	Cyclin
CD	cluster of differentiation
CDC	cell division cycle (protein)
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzenimeter
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cAMP response element modulator
d	Tag (die)
db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
DMC	dermal multipotent cell
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
ECC	embryonal carcinoma cell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	embryonal stem cell
g	Gramm
GDNF	glial-derived neurotrophic factor

GFAP	glial fibrillary acid protein
h	Stunde (hora)
hEG	human embryonic germ cell
Hes	hairy and enhancer of split
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICM	inner cell mass
IF	Intermediärfilament
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MAPC	multipotent adult progenitor cell
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
µM	mikromolar
mM	millimolar
NF	Neurofilament
NID	neurogenes Induktionsmedium / neurogene Induktion
NSAR	nicht-steroidales Antirheumatikum
NSC	neural stem cell
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
nm	Nanometer
NT	Neurotrophin
P	Passage
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PDE	Phosphodiesterase
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLA	processed lipoaspirate cell
PNS	peripheres Nervensystem
RGC	retinal ganglion cell

RNS	Ribonukleinsäure
SAM	significance analysis of microarrays
SCP	scalp tissue mesenchymal stem cell-like cell
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SMN	spinal motor neuron
SOX	sex determining region y box
SSC	skin-derived stromal cell
SVF	stromal-vascular fraction
TBS	tris buffered saline
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TOR	target of rapamycin
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
USSC	unrestricted somatic stem cell
\bar{x}	arithmetisches Mittel
XTT	(2,3-bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid
ZF	Zhangfei transcription factor

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Stammzellen und insbesondere deren klinische bzw. therapeutische Applikationsmöglichkeiten stellen derzeit einen Schwerpunkt der medizinischen Forschung dar. Hierbei erfolgt zunehmend eine Fokussierung auf adulte Stammzellen, zumal diese offenbar ein multi- bzw. pluripotentes Differenzierungspotential aufweisen und zudem die Option autologer Stammzelltransplantationen eröffnen. Aus dem Fettgewebe isolierte adulte Stammzellen, sog. *Adipose-derived Stem Cells* (ASC), stellen derzeit in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Zellentität dar. Speziell die Generierung neuraler bzw. neuronaler Progenitorzellen ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, zumal die autoregenerativen Kapazitäten des zentralen Nervensystems limitiert sind. Jedoch werden die Möglichkeiten einer derartigen neurogenen Induktion adulter Stammzellen zunehmend auch kritisch diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ASC-Zellen aus humanen Liposuktionsproben zu isolieren und diese morphologisch sowie immunphänotypisch zu charakterisieren. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen definierter neurogener Induktionsbedingungen auf die Morphologie, die Gen- bzw. Proteinexpression sowie insbesondere auf die Zellproliferation und den Zellzyklus dieser Zellen untersucht werden. Abschließend sollten die so gewonnen Ergebnisse unter Einbeziehung der Literatur einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Vergleichend hierzu sollten humane Stromazellen der Haut (*Skin-derived Stromal Cells*, SSC) in die Experimente mit einbezogen werden, zumal für derartige Zellen gleichfalls ein neurogenes Differenzierungspotential dokumentiert ist und entsprechende Vergleichsdaten gegenüber ASC-Zellen bis dato fehlen, wobei die vorliegende Arbeit jedoch auf ASC-Zellen fokussierte.

II. Einleitung

1. Adulte Stammzellen

1.1 Plastizität und Transdifferenzierung

Stammzellen und insbesondere deren mögliche klinische Anwendungen sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt.

Hierbei wird unter Stammzellen primär eine Zellpopulation verstanden, die zum einen durch Zellteilung zum Erhalt der Population befähigt ist (sog. *self-renewal*), zum anderen aber auch dadurch gekennzeichnet ist, dass diese zunächst unspezialisierten Zellen sich infolge distinkter biochemischer und / oder physiologischer Stimuli in sekundär spezialisierte Zellen differenzieren können (Herzog et al., 2003; Kokai et al., 2005). In diesem Zusammenhang spielt das Prinzip der sog. asymmetrischen Teilung eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu dem klassischen Konzept der mitotischen Teilung gehen hierbei aus einer Stammzelle zwei unterschiedliche Tochterzellen hervor: eine sich differenzierende (spezialisierende) Zelle sowie eine weiterhin undifferenzierte, nachwievor zur Proliferation d. h. zur wiederholten Teilung befähigte neue Stammzelle.

Im wesentlichen werden zwei Entitäten von Stammzellen unterschieden: einerseits die embryonalen Stammzellen (*Embryonic Stem Cells* = ESC), andererseits die adulten oder somatischen Stammzellen. Während es sich bei embryonalen Stammzellen um eine sich von den Zellen der Inneren Zellmasse (*Inner Cell Mass* = ICM) der Blastozyste ableitende, pluripotente Zellpopulation handelt, die prinzipiell zur Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) befähigt ist, lassen sich adulte Stammzellen aus diversen Organen bzw. Geweben des Säugetierorganismus isolieren (u. a. der Haut [Chunmeng et al., 2004; Toma et al., 2001 + 2005; Young et al., 2001], dem Perichondrium [Yotsuyanagi et al., 1999], dem Periost [Yoshimura et al., 2007], der Synovia [Yoshimura et al., 2007], der Kornea [Du et al., 2005], dem Intestinum [Dekaney et al., 2006; Nishimura et al., 2003], der Leber [Gordon et al., 2000], dem Pankreas [Bonner-Weir et al., 2000; Lin et al., 2006], der Prostata [Wang et al., 2006], Blutgefäßen, der Niere, der Lunge [da Silva Meirelles et al., 2006], der Milz, dem Thymus [da Silva Meirelles et al., 2006; Krampera et al., 2007], der Skelettmuskulatur [Grounds et al., 1999; Young

et al., 2001], der Brustdrüse [Clarke et al., 2005] sowie dem Knochenmark [Terskikh et al., 2006] und dem Fettgewebe [Zuk et al., 2001] sowie dem zentralen Nervensystem [Uchida et al., 2000]), wo ihnen offenbar originär eine entscheidende Rolle im Rahmen der physiologischen Gewebeerneuerung zukommt.

Interessanterweise finden sich im Falle der adulten Stammzellen zunehmend Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht ausschließlich um – in Abhängigkeit des sie beherbergenden Gewebes – determinierte Vorläuferzellen handelt, sondern ggfs. auch um multi- oder sogar pluripotente Zellen. Für das Knochenmark des Säugetierorganismus konnte gezeigt werden, dass für aus diesem isolierte Zellen offenbar sowohl eine Differenzierung entlang mesenchymaler bzw. entlang weiterer mesodermaler sowie endo- und ektodermaler Linien möglich ist (Deng et al., 2001; Hermann et al., 2004; Jiang et al., 2002; Petersen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Schwartz et al., 2002; Scintu et al., 2006; Theise et al., 2000a + b; Woodbury et al., 2000).

Es ist jedoch nach wie vor nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen diesen als Plastizität bezeichneten Differenzierungsphänomenen zugrunde liegen, wobei hier unter Plastizität die Fähigkeit einer aus einem spezifischen adulten Gewebe isolierten Zellpopulation verstanden wird, sich sekundär in Zellen zu entwickeln, welche anhand des Musters ihrer Genexpression sowie ihres funktionalen Phänotypes einem anderen adulten Gewebe zuzuordnen sind (Herzog et al., 2003). Im Wesentlichen lassen sich in diesem Zusammenhang vier Modelle unterscheiden, welche in Abbildung 1 (s. u.) schematisch dargestellt sind.

Das erste Modell geht von der Existenz einer multi- bzw. pluripotenten adulten Stamm- oder Progenitorzelle aus, welche sich in determinierte, d. h. einer bestimmten Differenzierungslinie entsprechende Vorläuferzellen weiterentwickelt, wobei diese wie auch die aus ihnen hervorgehenden Zellen mit Bezug auf das jeweilige Ursprungsgewebe sowohl typisch als auch atypisch sein können (Kontinuitätsmodell). Hinweise auf die Existenz derartiger Zellen sind derzeit sowohl für das Knochenmark als auch für Nabelschnurblutisolat beschrieben. Für diese im Falle des Knochenmarks als *Multipotent Adult Progenitor Cell* (= MAPC) bezeichneten Zellen ist eine mesenchymale, neuroektodermale sowie endotheliale Differenzierbarkeit beobachtet worden (Schwartz et al., 2002). In Analogie hierzu konnte aus dem Blut der Nabelschnur Neugeborener eine adhärent wachsende, fibroblastoide Zellpopulation isoliert werden, welche als USSC (= *Unrestricted*

Somatic Stem Cell) bezeichnet wird und sowohl in vitro als auch in vivo ein multi- bzw. pluripotentes Differenzierungsmuster zeigt (Kögler et al., 2004).

Die Modelle 2 und 3 beschreiben das Phänomen der Plastizität als Resultat eines als Transdifferenzierung bezeichneten Prozesses. Hierbei kann unter Transdifferenzierung prinzipiell die Fähigkeit einer determinierten (Progenitor-) Zelle verstanden werden, ihr Genexpressionsprofil entsprechend dem eines anderen Zelltyps zu verändern (Herzog et al., 2003), wobei die Begriffe Transdifferenzierung und Plastizität in der Literatur bisweilen synonym gebraucht werden. In diesem Zusammenhang lassen sich generell zwei Formen unterscheiden, welche als indirekte bzw. direkte Transdifferenzierung bezeichnet werden.

Hierbei beschreibt die indirekte Transdifferenzierung ein zweiphasiges De- und Redifferenzierungsmodell, in dessen Mittelpunkt eine sog. intermediäre Progenitorzelle steht.

Die direkte Transdifferenzierung geht von einer unmittelbaren Änderung des Genexpressionsprofils aus. Die Abgrenzung zwischen der sog. indirekten bzw. direkten Transdifferenzierung ist indes derzeit lediglich theoretischer Natur, zumal bis dato der Nachweis einer derartigen intermediären Progenitorzelle nicht erfolgt ist.

Das letzte hier vorgestellte Modell stellt Differenzierungs- bzw. Plastizitätsphänomene in den Kontext zellulärer Fusionsprozesse. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Korrektur eines Enzymdefektes der murinen Leber unter Verwendung von aus dem Knochenmark isolierter Zellen höchstwahrscheinlich auf die Fusion von Donor- und Empfängerzellen unter Ausbildung von tetra- bzw. hexaploiden Zellen zurückzuführen ist (Wang et al., 2003). Derartige Zell-Zell-Fusionen zwischen Knochenmarkszellen und Kardiomyozyten, Purkinje-Zellen sowie intestinalen Progenitorzellen sind gleichfalls beschrieben (Alvarez-Dolado et al., 2003; Rizvi et al., 2006).

Es muss jedoch betont werden, dass es sich bei den hier beschriebenen Modellen lediglich um theoretische Erklärungsansätze für beobachtete Differenzierungsphänomene handelt, welche ihrem Wesen nach keinesfalls als statisch zu begreifen sind und sich zudem nicht gegenseitig ausschließen. Vielmehr muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt davon ausgegangen werden, dass derartige Plastizitätsmechanismen parallel existieren, wie insbesondere die Entwicklung von Hepatozyten aus sog. multipotenten adulten Progenitorzellen (MAPC) einerseits bzw.

via Zell-Zell-Fusionen andererseits vermuten läßt (Schwartz et al., 2002 und Wang et al., 2003).

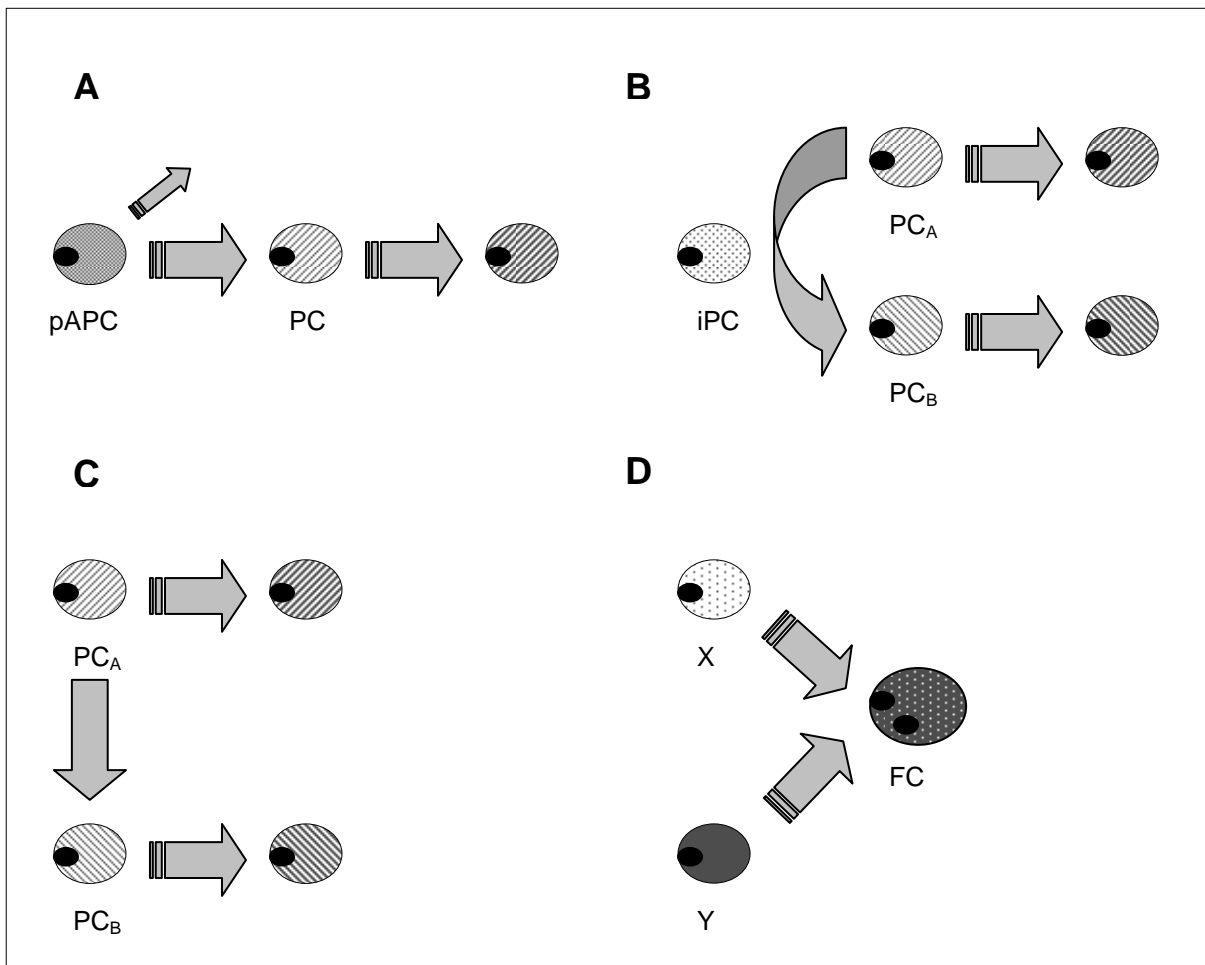


Abb. 1: Darstellung unterschiedlicher Plastizitätsmodelle (modifiziert nach: Herzog et al., 2003)

- A: Modell einer pluripotenten adulten Stammzelle:** ausgehend von einer möglicherweise pluripotenten adulten Stammzelle (*pluripotent Adult Progenitor Cell* = pAPC) entwickeln sich über die Zwischenstufe der Vorläuferzellen (*Progenitor Cell* = PC) unterschiedliche Zelltypen unterschiedlicher Linien- bzw. Keimblattzugehörigkeit.
- B: Modell der indirekten Transdifferenzierung:** indirekte d. h. mittelbare Änderung des Genexpressionsmusters einer Vorläuferzelle (PC_A) in das einer anderen (PC_B) über die Zwischenstufe einer intermediären Progenitor-Zelle (*intermediate Progenitor Cell* = iPC) im Zuge eines De- und Redifferenzierungsprozesses.
- C: Modell der direkten Transdifferenzierung:** direkte d. h. unmittelbare Änderung des Genexpressionsmusters einer Vorläuferzelle (PC_A) in das einer anderen (PC_B).
- D: Fusionsmodell:** das durch die Fusion zweier adulter Zellen entstandene Heterokaryon bedingt eine Änderung der Genexpression in Form einer Fusionszelle (FC), welche die Charakteristika des einen und / oder des anderen Fusionspartners aufweist; hierbei muß es sich bei den fusionierenden Zellen nicht zwangsläufig um Stamm- / Progenitorzellen handeln.

1.2 Adipose-derived Stem Cells (ASC)

Wie das Knochenmark auch ist das Fettgewebe des Säugetiers mesodermalen Ursprungs und weist wie dieses eine heterogene bindegewebige Zellfraktion auf, welche als *Stromal Vascular Fraction* (SVF) bezeichnet wird und vermittels enzymatischen Verdaus aus dem Gewebeverband heraus isoliert werden kann (di Rocco et al., 2006; Rodbell, 1964; Zuk et al. 2001).

Diese Parallelität zum Knochenmark und insbesondere die Tatsache, dass – vergleichbar der Situation im Knochenmark – auch im adulten Organismus sowohl hypertrophische als auch hyperplastische Prozesse innerhalb des Fettgewebes nachzuweisen sind, lassen auch hier die Existenz einer Stammzellpopulation vermuten (Hauner et al., 1989; Hirsch et al., 1976).

In der Tat läßt sich aus der SVF in Kultur eine als *Adipose-derived Stem Cells* (ASCs)* bezeichnete Zellpopulation gewinnen, welche sich *in vitro* – entsprechend den mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes – durch eine fibroblastoide Gestalt, ein adhärentes Wachstum, eine konstante Zellteilung über einen längeren Passagezeitraum sowie – in Analogie zu dem zuvor erläuterten Konzept der Plastizität adulter Stammzellen – einen multipotenten Differenzierungscharakter auszeichnet (s. Tabelle 1 des Anhangs).

* ASC = *Adipose-derived Stem Cell* (Zuk, 2004); synonym werden hierfür auch die Begriffe (h)ADAS = (*human*) *Adipose-derived Adult Stem / Stromal Cell* (Estes et al., 2006; Guilak et al., 2006; Strem et al., 2005), ADASC = *Adipose Tissue-Derived Adult Stem Cell* (Boquest et al., 2005), ADPC = *Adipose-derived Precursor Cell* (Leong et al., 2006), AMC = *Adipose-derived Mesenchymal Cell* (Chiou et al., 2006), AT-MSc = *Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell* (Knippenberg et al., 2005), ATSC = *Adipose Tissue Stromal Cell* (Gronthos et al., 2001; Hattori et al., 2006), AT-SVF = *Adipose Tissue - Stromal Vascular Fraction* (di Rocco et al., 2006), (h)MADS = (*human*) *Multipotent Adipose-derived Stem Cell* (Rodriguez et al., 2005) und PLA = *Processed Lipoaspirate Cell* (Ashjian et al., 2003; de la Fuente et al., 2004; Rodríguez et al., 2006; Zuk et al., 2001+2002) verwendet

Auch im Falle der ASC ist die Frage nach den dieser Plastizität zugrunde liegenden zellulären Mechanismen umstritten. Während von einigen Autoren eine multipotente adulte Stammzellpopulation beschrieben wird (u. a. Boquest et al., 2005; Guilak et al., 2006), gehen andere von der parallelen Existenz determinierter Progenitorzellen (sog. *Lineage-specific Progenitor Cells*) aus, welche sich mittels entsprechender Kulturbedingungen gezielt selektionieren lassen (Chiou et al., 2006). Es sei jedoch bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich derartige Modelle einander keinesfalls ausschließen, sondern vielmehr unterschiedliche Phasen ein und desselben Prozesses widerspiegeln könnten (s. Abb. 1). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass ASC an Fusionsprozessen beteiligt sind, wie dies bereits zuvor für aus dem Knochenmark isolierte Stammzellen beschrieben worden ist (di Rocco et al., 2006).

Die Zu- bzw. Einordnung bestimmter Mechanismen der ASC-Differenzierung wird zudem auch dadurch erschwert, dass bis dato keine einheitliche phänotypische Definition dieser Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker existiert. Wie der Tabelle 2 des Anhangs (siehe dort) zu entnehmen ist, wird eine Vielzahl von Oberflächenantigenen zur Charakterisierung von ASC-Zellen herangezogen, wobei sich die jeweils bestimmten Expressionsprofile in Teilen widersprechen. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erheblich bzw. läßt diese bisweilen sogar unmöglich erscheinen.

1.2.1 Ansätze neurogener Differenzierung von ASC

Die Stammzell-basierte Therapie degenerativ oder traumatisch bedingter neurologischer Erkrankungen bzw. Folgezustände stellt eine große Herausforderungen der Medizin dar.

Obwohl sowohl für embryonale Stammzellen (ESC) als auch für (adulte) neurale Stammzellen (NSC) erfolgversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer neurogenen Differenzierung sowie einer funktionalen Integration derartiger Zellen in ein Empfängergewebe vorliegen (Song et al., 2002; Wernig et al., 2004), erscheint deren klinische Anwendung insbesondere aufgrund ihrer limitierten Verfügbarkeit und – insbesondere im Falle embryonaler Stammzellen – der bestehenden Rechtslage

sowie der nachwievor ungeklärten Frage einer ethisch-moralischen Legitimation zum heutigen Zeitpunkt eher fraglich.

Um dieses Dilemma zu umgehen, kommt der Isolierung möglicherweise pluripotenter Zellen aus peripheren adulten Geweben eine besondere Bedeutung zu. Wie bereits zuvor insbesondere für mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes beschrieben, so stellt sich daher auch im Falle der *Adipose-derived Stem Cells* (ASCs) die Frage nach einer möglichen neurogenen (Trans-) Differenzierung dieser Zellen.

Hauptaugenmerk liegt hierbei derzeit auf der Induktion eines neuronalen bzw. neuronalen (Trans-) Differenzierungsprozesses mittels löslicher Mediatoren, wobei diese in Abhängigkeit der jeweiligen Autoren bisweilen erheblich in Art, Zusammensetzung und Inkubationsdauer variieren (siehe Tabelle 3 des Anhangs). Jedoch scheint hierbei sowohl der Aktivierung des cAMP-Systems bzw. cAMP-getriggelter Signalkaskaden (Stimulierung der Adenylatzyklase mittels Forskolin einerseits bzw. verzögerter cAMP-Abbau durch Inhibition der Phosphodiesterase mittels IBMX andererseits) als auch dem Proteohormon Insulin eine nicht unerhebliche Bedeutung zuzukommen.

Es zeigt sich, dass ASCs unter definierten Induktionsbedingungen morphologische und phänotypische Charakteristika aufweisen, welche mit einem frühen Entwicklungsstadium neuronaler bzw. glialer Zellen vereinbar sind. Die ebenfalls beschriebene Koexpression derartiger neuronaler / glialer Marker lässt zudem vermuten, dass es sich hierbei um einen gerichteten, jedoch ggfs. nachwievor flexiblen Prozess handelt.

Indes erscheint das u.a. von Safford et al. (2002 + 2004) sowie von Zuk et al. (2002) beschriebene Zeitfenster von 1 bis 24 Stunden, innerhalb dessen es laut der Autoren zu ersten entscheidenden morphologischen und phänotypischen Veränderungen im Sinne einer neurogenen (Trans-) Differenzierung kommt, eher fraglich. Im Gegensatz dazu konnten Ashjian et al. (2003) derartige Effekte erst nach 72 Stunden bei deutlich weniger als 5% der Gesamtpopulation beobachten; unter 14-tägiger Inkubation kommt es hier zu einer stetigen Zunahme dieses Wertes auf maximal ca. 20 bis 25% der Gesamtpopulation. Unter dem von Safford et al. (2004) beschriebenen Induktionsprotokoll kommt es indessen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellvitalität, welche in dem kompletten Absterben der Kultur binnen 14 Tagen mündet, so dass hier ggfs. zytotoxische Effekte (z. B. Destruktion bzw.

Desintegration des Zytoskeletts?, Apoptose?) im Zusammenhang mit der Adaptation einer mit neuronalen bzw. glialen Zellen vergleichbaren Morphologie eine Rolle spielen könnten (siehe hierzu z. B. Bertani et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Zudem konnte in keinem Fall der Nachweis eines neuronalen Aktivitätsmusters bei der Ableitung von Membranpotentialen erfolgen. Jedoch finden sich Hinweise auf die Ausbildung spezifischer Ionenkanäle (Ashjian et al., 2003; Safford et al., 2004), wie sie unter anderem im Rahmen der neurogenen Differenzierung bzw. der Maturation neuraler Progenitorzellen des adulten Hippocampus beschrieben sind (Hogg et al., 2004).

Einen interessanten Ansatz stellt die von Kang et al. (2003b) im Tiermodell durchgeführte intracerebro-ventrikuläre Injektion ex vivo BDNF-transduzierter ASC-Zellen nach Okklusion der A. cerebri media dar, wobei hier ggfs. weniger eine neurogene (Trans-) Differenzierung als vielmehr die lokale Freisetzung trophischer Faktoren im Vordergrund steht. Für eine detailliertere Übersicht des derzeit in der Literatur beschriebenen neurogenen (Trans-) Differenzierungspotentials von ASCs sei hier auf die Tabelle 3 des Anhangs verwiesen.

1.3 Adulte multipotente Stromazellen der Haut

Die Haut des Säugetierorganismus weist ein erhebliches regeneratisches Potential auf. Dieser Befund sowie die Tatsache, dass auch die Haut über ein dermales bindegewebiges Stroma verfügt, legt die Existenz entsprechender Stamm- bzw. Stromazellen nahe.

In der Tat konnten u. a. Chunmeng et al. (2004), Shih et al. (2005) sowie Toma et al. (2001 + 2005) aus Hautpräparaten adulte Stamm- bzw. Stromazellen isolieren, welche in vitro sowohl ein mesodermales als auch ein neuroektodermales und damit letztlich multipotentes Differenzierungspotential aufwiesen. Sowohl Chunmeng et al. (2004) als auch Shih et al. (2005) beschrieben derartige Zellen als adhärente, teilungsaktive, fibroblastoide Zellen, welche zudem ein mit mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes einerseits bzw. des (subkutanen) Fettgewebes andererseits vergleichbares Oberflächenantigen-Expressionsmuster aufwiesen. Aufgrund dieser Parallelität erschien es lohnend, derartige Hautstromazellen vergleichend in die vorliegende Arbeit einzubeziehen.

2. Neurogenes Induktionsmedium (NID)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das erstmals von Ashjian et al. (2003) im Zusammenhang mit der (Trans-) Differenzierung von ASCs in frühe neurale Progenitoren beschriebene und unter anderem von Boquest et al. (2005), Fujimura et al. (2005) sowie Ning et al. (2006) aufgegriffene Induktionsmedium einer detaillierteren Betrachtung unterzogen. Dieses basiert auf der Kombination des Phosphodiesterase-Inhibitors 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin sowie des Proteohormons Insulin.

2.1 Die Rolle des zyklischen Adenosin-Monophosphates (cAMP) im Rahmen von Neuroregulation und neurogener Differenzierung

Das zyklische Adenosin-3',5'-Monophosphat (*cyclic adenosine-monophosphate* = cAMP), welches vermittelt der membranständigen Adenylat-Zyklase aus Adenosin-Triphosphat (ATP) generiert wird, spielt als sog. sekundärer Botenstoff eine entscheidende Rolle im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion (Dumaz et al., 2002) und hierbei insbesondere auch im Zusammenhang mit Prozessen der Neuroregulation sowie der neurogenen Differenzierung. So konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intrazytoplasmatischen cAMP-Spiegels mit einer signifikanten Verlängerung der Überlebensspanne neuronaler Zellen *in vitro* assoziiert ist (Hanson et al., 1998), wobei es unter dem zusätzlichen Einfluß unterschiedlicher Neurotrophine (BDNF, GDNF, NT-3, NT-4/5) zu einer Verstärkung dieses Effektes kommen kann (Lara et al., 2003; Peng et al., 2003). Interessanterweise bedingt eine cAMP-Erhöhung bei retinalen Ganglienzellen (*retinal ganglion cells* = RGC) sowie bei spinalen Motoneuronen (*spinal motor neurons* = SMN) der Ratte eine Verlagerung des Neurotrophinrezeptors TrkB aus dem Intrazellulärraum in die Zellmembran hinein, so dass cAMP möglicherweise u. a. über diesen Mechanismus eine entscheidende Rolle innerhalb neuroregulatorischer Abläufe wahrnimmt (Meyer-Franke et al., 1998).

Darüber hinaus scheinen cAMP-abhängige Signalkaskaden in die Regulation des Wachstums sowie der Regeneration von Neuriten bzw. Axonen involviert zu sein

(Harper et al., 2004; Neumann et al., 2002; Peng et al., 2003; Qiu et al., 2002; Teng et al., 2006).

Ein neurogener Differenzierungseffekt des cAMP-Systems bzw. Hinweise auf dessen Beteiligung an derartigen Prozessen sind für unterschiedliche Zellentitäten beschrieben. So führt eine Hemmung des intrazellulären Abbaus von cAMP bei C6-Gliom-Zellen zur Ausbildung einer neuronähnlichen Zelle (Sharma et al., 1987); ein vergleichbares Phänomen lässt sich zudem auch im Falle der Medulloblastom-Zelllinie MCD-1 beobachten (Moore et al., 1996). Darüber hinaus führt die Erhöhung des intrazytoplasmatischen cAMP-Spiegels bei humanen Prostatakarzinom-Zellen zu der Adaptation neuroendokriner Charakteristika (Bang et al., 1994). Pan et al. (2005) konnten zeigen, dass es bei den von ihnen untersuchten humanen embryonalen Keimzellen (*human embryonic germ cells* = hEG) unter in vitro Kulturbedingungen und unter Zugabe des membrangängigen cAMP-Derivates Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) sowie des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin zu einer neuronalen Differenzierung kommt; hierbei konnten sowohl das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2ab (MAP2ab), Synaptophysin, β -Tubulin III, die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) als auch Tyrosin-Hydroxylase (TH) nachgewiesen werden. Gleichfalls scheint das cAMP-System eine entscheidende Rolle im Rahmen der neurogenen Differenzierung sowohl von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes (BMSC) als auch von *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) zu spielen (Ashjian et al., 2003; Deng et al., 2001; Guo et al., 2005; Long et al., 2005; Safford et al., 2002 + 2004; Scintu et al., 2006; Zuk et al., 2002), wobei hier u. U. insbesondere ein (Transdifferenzierungs-) Prozess hin zu einer neur(on)alen Vorläuferzelle und damit gewissermaßen ein initiiender Prozess im Vordergrund steht (Ashjian et al., 2003; Deng et al., 2001; Guo et al., 2005).

Auf der Ebene der Signaltransduktion könnte hierbei den sog. cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren der CREB-ATF-Familie (CREB = *cAMP-response element binding-protein*, ATF = *activating transcription factor*) eine Schlüsselfunktion zukommen (für eine Übersicht siehe Tabelle 1). Diese zu der Gruppe der sog. bZip- (*basic domain leucine zipper*) Transkriptionsfaktoren zählenden Proteine regulieren – ggfs. in Assoziation mit bestimmten Kofaktoren (u.a. CBP = *CREB-binding protein*) – die Expression sog. cAMP-sensitiver Gene, welche in ihrer Promotorregion eine 8 Basenpaare umfassende, als *cAMP response element* (CRE) bezeichnete Nukleotidsequenz (5'-TGACGTCA-3') aufweisen. Die Aktivierung der der CREB-ATF-

Familie zuzurechnenden Transkriptionsfaktoren erfolgt durch deren Kinase-vermittelte Phosphorylierung mit anschließender selektiver (Hetero-) Dimerisierung, wobei diese sowohl zwischen bestimmten Transkriptionsfaktoren der CREB-ATF-Familie als auch offenbar mit anderen bZip-Faktoren erfolgen kann (Hai & Hartman, 2001). Im Rahmen der Aktivierung dieser CREB-ATF-Transkriptionsfaktoren spielen interessanterweise anscheinend nicht nur die cAMP / PKA (= Proteinkinase A) – Kaskade eine entscheidende Rolle, sondern offenbar auch weitere, sich u. U. wechselseitig beeinflussende intrazelluläre Transduktionsmechanismen (siehe Abbildung 2). So ist beispielsweise eine cAMP-vermittelte Aktivierung des MAPK-Systems im Rahmen der neurogenen (Trans-) Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beschrieben (Kim et al., 2005). Sanchez et al. (2004) konnten zudem anhand von Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y zeigen, dass diese auf einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels mit der Ausbildung axonähnlicher Fortsätze reagierten, wobei offenbar sowohl die Proteinkinase A als auch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3K) an der Vermittlung dieses cAMP-getriggerten Effektes beteiligt waren. Darüber hinaus existieren auch cAMP-unabhängige Mechanismen der CREB-ATF-Aktivierung (Servillo et al., 2002).

Subfamilie	zugehörige Transkriptionsfaktoren
CREB	CREB CREM ATF1
CRE-BP1	CRE-BP1* ATFa CRE-BPa
ATF3	ATF3 JDP2
ATF4	ATF4** ATFx
ATF6	ATF6 CREB-RP
B-ATF	B-ATF JDP-1

Tab. 1: Die Familie der CREB-ATF-Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach *Hai & Hartman, 2001*)
 (ATF, activating transcription factor; B-ATF, B cell-derived ATF; CREB, cAMP response element binding-protein; CRE-BP1, cyclic AMP response element DNA-binding protein isoform 1; CREB-RP, CREB-related protein; CREM, cAMP response element modulator; JDP, Jun dimerization partner)
 * = ATF2 ** = CREB2

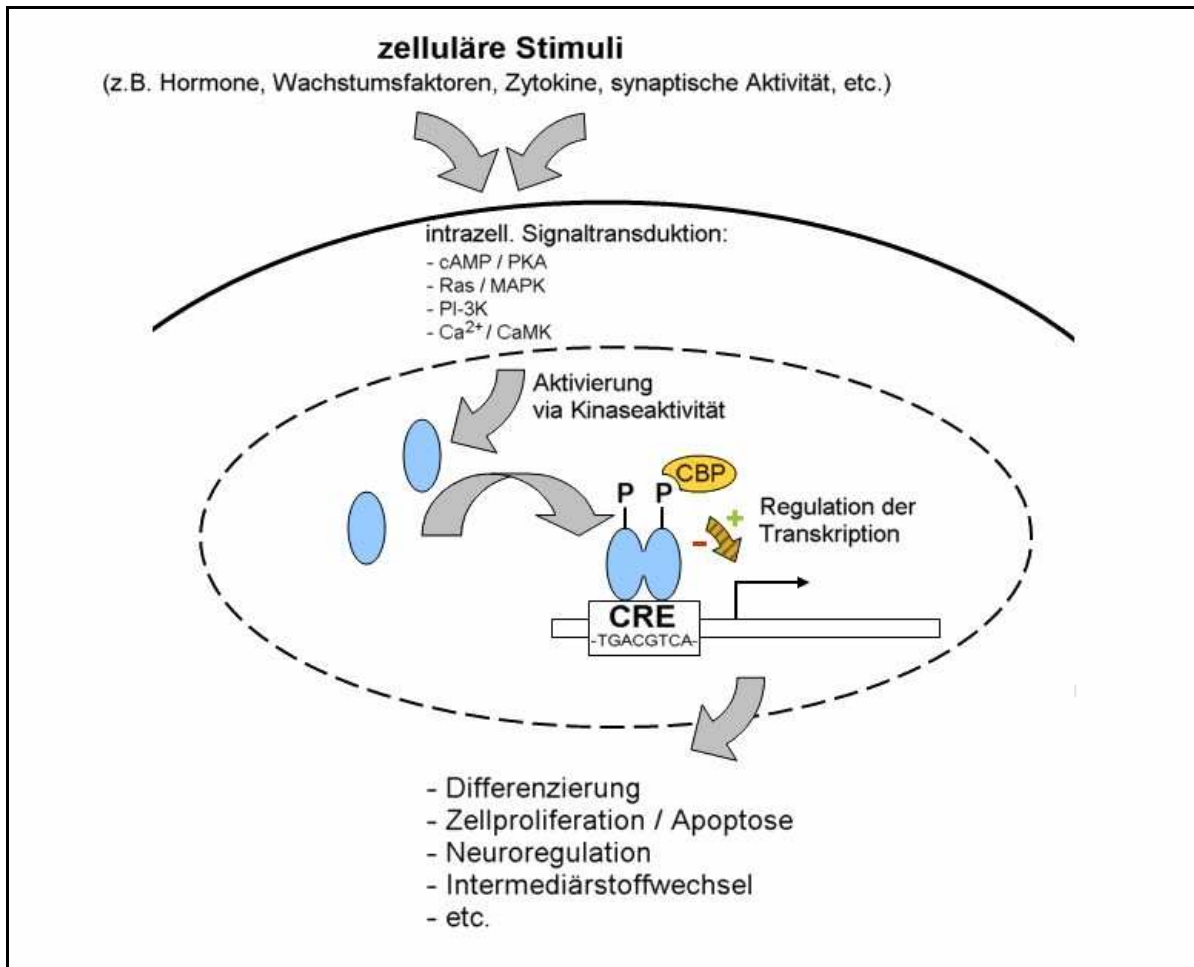


Abb. 2: Regulation der Genexpression durch sog. cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach: Dawson & Ginty, 2002; Servillo et al., 2002):

Die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktions-Kaskaden durch bestimmte zelluläre Stimuli führt zu einer Kinase-vermittelten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der CREB-ATF-Familie (in der Abbildung blau dargestellt). Diese binden nach Dimerisierung an eine als cAMP response element (CRE) bezeichnete Nukleotidsequenz innerhalb der Promotorregion sog. cAMP-sensitiver Gene und regulieren so – z. T. in Assoziation mit spezifischen Co-Faktoren (z. B. CBP) – deren Expression.

MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase A; PI-3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; CaMK, Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Kinase; CBP, CREB-binding protein; CRE, cAMP response element

2.2 Die Rolle der Cyclooxygenase (COX) und ihrer Inhibitoren im Rahmen von Neuroprotektion, Neuroregeneration und neurogener Differenzierung

Die Cyclooxygenase (COX^{*}) katalysiert die Bildung von Prostaglandin G₂/H₂ (PGG₂/H₂) aus Arachidonsäure und stellt somit das regulierende Schlüsselenzym innerhalb der Prostanoid-Biosynthese dar (Kaufmann et al., 1996; Vio et al., 1997). Hierbei lassen sich im wesentlichen zwei Isoformen unterscheiden, welche als COX-1 bzw. als COX-2 bezeichnet werden (Kaufmann et al., 1996).

Während die COX-1 in einer Vielzahl von Zellen bzw. peripheren Geweben konstitutiv exprimiert wird, kommt es im Falle der COX-2 insbesondere durch den Einfluß distinkter Stimuli, wie z. B. von Zytokinen und bakteriellen Endotoxinen, zu einer Induktion der Enzymsynthese, so dass dieser Isoform eine entscheidende Rolle im Rahmen entzündlicher Prozesse zukommt (Kaufmann et al., 1996; Smith et al., 1996).

Es finden sich jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass es sich bei der COX-2 nicht ausschließlich um ein induzierbares, pro-inflammatorisches Enzym handelt. So findet man in bestimmten Organen, wie z. B. in der Niere (Therland et al., 2004) sowie dem Rückenmark und dem Gehirn (Hoffmann C, 2000), eine dauerhaft hohe Aktivität der Cyclooxygenase 2, so dass auch hier von einer konstitutiven Enzymexpression ausgegangen werden muss.

Mit Blick auf das zentrale Nervensystem (ZNS) kann daher eine parallele neuronale Expression von COX-1 und COX-2 angenommen werden (siehe auch Hewett et al., 2000).

Indes erscheint die Frage, ob sich die Aktivität der COX-2 auf bestimmte Subpopulationen des zentralen Nervensystems (ZNS) beschränkt, nach wie vor umstritten; ggfs. muß hier auch eine unterschiedliche regionale Verteilung in Betracht gezogen werden (Kaufmann et al., 1996; Yamagata et al., 1993).

Interessanterweise scheint das Cyclooxygenasesystem insbesondere auch mit neuroregenerativen bzw. neuroprotektiven Prozessen im Zusammenhang zu stehen.

* synonym wird auch der Begriff Prostaglandin-G₂/H₂-Synthase (Vio et al., 1997) bzw. Prostaglandin (Endoperoxid) H Synthase (Smith et al., 1996) gebraucht

So üben sog. nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) in vitro einen hemmenden Einfluß auf die Neubildung sowie die Extension von β -Amyloid-Fibrillen aus, welche im Zusammenhang mit der Pathogenese der Alzheimer-Demenz (AD) gesehen werden, und führen zudem dosisabhängig zu deren Destabilisierung (Hirohata et al., 2005). Bemerkenswerterweise unterstützen die Ergebnisse diverser epidemiologischer Studien die These eines derartigen neuroprotektiven Effektes von NSAR (u.a. auch von Indomethacin) bzw. von selektiven Inhibitoren der COX-2 mit Blick auf das Krankheitsbild der Alzheimer-Demenz (Andersen et al., 1995; Beard et al., 1998; Ferencik et al., 2001; McGeer 1995 + 1996; Stewart et al., 1997).

Ebenfalls muß die Beteiligung insbesondere der COX-2 an der Vermittlung distinkter neurotoxischer Stimuli vermutet werden (Araki et al., 2001; Hewett et al., 2000).

Zudem konnte in einem Tiermodell gezeigt werden, dass die systemische Applikation des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin nach fokaler zerebraler Ischämie zu einer gesteigerten Freisetzung, Überlebensrate und Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen führt (Hoehn et al., 2005).

Eine Studie aus dem Jahre 2005 konnte im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung der humanen Myeloid-Zellen (HL-60) zeigen, dass eine Inhibition der Cyclooxygenase – sowohl durch Ascorbat als auch durch nicht-steroidale Antirheumatika wie Acetylsalicylsäure (ASS) und Indomethacin – zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären cAMP führte, welches mit einer gesteigerten Differenzierung einherging; zudem lassen die Ergebnisse dieser Studie vermuten, dass diese Elevation des cAMP-Spiegels durch ein vermehrtes Vorhandensein freier Arachidonsäure bedingt war (López-Lluch et al., 2005). Interessanterweise führte Ascorbat in vitro ebenfalls zu einer verstärkten Differenzierung zentralnervöser Progenitorzellen in Zellen mit einem neuronalen bzw. astrozytären Phänotyp, wobei hier die gewonnenen Daten auf einen intrazellulären Transduktionsmechanismus hindeuten (Lee et al., 2003). In Verbindung mit dem zuvor Gesagten wäre auch hier eine mittelbare Aktivierung des cAMP-Systems in Folge einer Akkumulation von Arachidonsäure denkbar. In der Tat finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Beteiligung der Arachidonsäure an Differenzierungsprozessen neuronaler Vorläuferzellen (Bartlett et al., 1995) sowie an neuronalen Wachstumsprozessen (Geddis et al., 2004).

Diese letztgenannten Ergebnisse sind insofern von besonderer Bedeutung, als dass sie auf eine mögliche Verbindung zwischen dem Cyclooxygenase-System und dem cAMP-System im Rahmen neuronaler Differenzierungs- und Wachstumsprozesse hinweisen.

2.3 Die Rolle des Insulins im Rahmen neuronaler Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse

Das Proteohormon Insulin besteht aus insgesamt zwei Peptidketten, welche als A-Kette mit 21 Aminosäuren bzw. als B-Kette mit insgesamt 30 Aminosäuren bezeichnet werden, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Insulin spielt als sog. anaboles Hormon eine entscheidende Rolle im Rahmen diverser Stoffwechselprozesse, insbesondere jedoch des Kohlenhydratstoffwechsels. Mit Blick auf das zentrale Nervensystem bedingt Insulin in Neuronen eine aktivitätsabhängige Verlagerung der zellulären Glukosetransporter-Isoform GLUT3 in die Plasmamembran hinein und führt somit zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme (Uemura et al., 2006).

Darüber hinaus ist Insulin an neuronalen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. So konnte unter dem Einfluß von Insulin in vitro eine Verlagerung des GABA_A-Rezeptors aus dem intrazellulären Kompartiment in postsynaptische bzw. dendritische Regionen der Plasmamembran hinein beobachtet werden (Wan et al., 1997). Desweiteren konnte anhand einer thalamokortikalen Ko-Kultur gezeigt werden, dass hier die chronische Applikation von Insulin zu einer rapiden Aktivierung stiller Synapsen führt (Plitzko et al., 2001). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Insulin offenbar eine nicht unerhebliche Rolle im Rahmen neuronaler Plastizitätsmechanismen zukommt.

Am Beispiel von *Drosophila* konnte eine Studie aus dem Jahre 2004 zeigen, dass die Aktivität der Insulin-Rezeptor/TOR-Signalkaskade eine entscheidende Rolle im Rahmen der zeitlichen Regulation insbesondere auch neuronaler Differenzierungsprozesse spielt, wobei dieser Übertragungsweg entweder dem Ras/MAPK-System nachgeschaltet ist oder hierzu parallel verläuft (Bateman und McNeill, 2004), welches interessanterweise offenbar auch eine zentrale Funktion im Rahmen cAMP-vermittelter neuronaler Induktions- bzw. Differenzierungsprozesse

spielt (s.o.). Darüber hinaus ist auch für Vertebraten sowohl eine Insulin-vermittelte Aktivierung der Ras/MAPK-Signalkaskade als auch eine Beteiligung des Insulins im Rahmen der Neurogenese beschrieben (Bateman und McNeill, 2006). Auch hierbei könnte eine Modulation der Genexpression via cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, zumal deren MAPK-vermittelte Aktivierung bekannt ist. Zudem involvieren Insulin-getriggerte Signalkaskaden auch das PI-3-Kinase-System (Lee et al., 2005), welches gleichfalls zu einer mittelbaren Aktivierung von CRE-bindenden Proteinen führt (s. o.).

Insgesamt betrachtet erscheint somit der Aktivierung des cAMP-Systems bzw. cAMP-getriggerten Signaltransduktionsmechanismen (wie z. B. von CREB-ATF-Transkriptionsfaktoren) eine Schlüsselfunktion im Rahmen neurogener Regenerations- und Differenzierungsprozesse zuzukommen. Hierbei kann die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels entweder direkt, d. h. über die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) bzw. die exogene Zufuhr des membranpermeablen Derivates Dibutyryl (db)-cAMP, oder indirekt, d. h. über eine Hemmung der cAMP-Degradation mittels pharmakologischer Inhibition der Phosphodiesterase(n) (PDE) sowie möglicherweise aber auch Arachidonat-vermittelt infolge einer Hemmung der Cyclooxygenase (COX) erfolgen. Darüber hinaus kann jedoch die Aktivierung prinzipiell cAMP-regulierter Signalkaskaden (s. o.) offenbar auch cAMP-unabhängig erfolgen. Hier sei speziell auf die Insulin-vermittelte Aktivierung der Ras/MAPK- sowie der PI-3-Kinase-Kaskade verwiesen.

Ob die sowohl für Insulin als auch für das Cyclooxygenase-System zudem beschriebenen Effekte im Rahmen von Neuroprotektion und –regeneration gleichfalls über die o. g. Signalkaskaden vermittelt werden, oder ob hierbei auch andere Transduktionswege eine Rolle spielen, kann an dieser Stelle indes nicht gesagt werden.

III. Material

1. Die ASC-Zelllinien

Die Isolierung der verwendeten ASC-Zelllinien* erfolgte aus Proben humaner Liposuktionspräparate des subkutanen Fettgewebes, welche im Rahmen elektiv durchgeführter kosmetisch-operativer Eingriffe gewonnen wurden. Im Zuge des ärztlichen Aufklärungsgesprächs wurden die jeweiligen Patientinnen und Patienten auf die beabsichtigte wissenschaftliche Weiterverwendung des entfernten Gewebes hingewiesen. Eine Weiterverwendung im Sinne einer Isolierung, Kultivierung sowie experimentellen Analyse von ASC-Zellen erfolgte nur nach entsprechender Aufklärung der Patientin / des Patienten und bei Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (Antrag-Nr. OB-065/05).

Insgesamt wurden Gewebeproben von 5 gesunden weiblichen Patienten im Alter von 22 bis 50 Jahren aufgearbeitet und entsprechende ASC-Zellen gewonnen. Genauere Angaben hierzu sind der Tabelle 2 (s. u.) zu entnehmen.

2. Humane Stromazellen der Haut (Skin-derived Stromal Cells, SSC)

Die im Rahmen der durchgeführten Experimente vergleichend betrachteten humanen adulten Stromazellen der Haut (im Rahmen der vorliegenden Arbeit als *Skin-derived Stromal Cells* = SSC bezeichnet) wurden aus einem kutanen Operationspräparat des Abdomens gewonnen, wobei es sich auch hier um einen elektiv durchgeführten kosmetischen Eingriff handelte. Die Aufarbeitung im Labor erfolgte nach Aufklärung über die beabsichtigte wissenschaftliche Weiterverwendung des entfernten Gewebes und schriftlicher Dokumentation der entsprechenden Einverständniserklärung sowie in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (Antrag-Nr. OB-065/05).

* Im Rahmen dieser Arbeit wird im weiteren vereinfachend der Begriff Zelllinie gleichbedeutend mit Zellisolaten unterschiedlicher Donatoren verwendet

3. Neurogenes Induktionsmedium (NID):

Als neurogenes Induktionsmedium im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente die erstmals von Ashjian et al. (2003) im Zusammenhang mit einer neuralen Induktion bzw. Differenzierung von humanen ASC-Zellen beschriebene Substanzkombination aus Isobutylmethylxanthin (IBMX), Indomethacin und Insulin.

3.1 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) als Phosphodiesterase-Inhibitor

Als Hemmstoff der zellulären Phosphodiesterase (PDE) wurde 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX; Sigma-Aldrich) eingesetzt. Dieses wurde in 100% unvergälltem Ethanol gelöst und anschließend in entsprechendem Kulturmedium weiter verdünnt.

3.2 Indomethacin als Cyclooxygenase-Inhibitor

Als nicht selektiver Hemmstoff der Cyclooxygenase (COX) wurde Indomethacin (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieses wurde gemäß den Angaben des Herstellers in 100% unvergälltem Ethanol gelöst und in entsprechendem Kulturmedium weiter verdünnt.

3.3 Insulin-Lösung

Bei dem im Rahmen der Induktionsexperimente verwendeten Insulin handelte es sich um bovines Insulin, welches in Form einer 10 mg/ml-Lösung (Sigma-Aldrich) bezogen wurde.

IV. Methoden

1. Zellkultur

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit den unten näher bezeichneten ASC- bzw. SSC-Zelllinien erfolgten ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank (SterilGARD®, Class II Type A/B₃ Biological Safety Cabinet; The Baker Company, Sanford, Maine, USA) unter sterilen Bedingungen.

1.1 Isolierung von humanen ASC-Zellen

Die verwendeten ASC-Zellen wurden aus Proben humaner Liposuktionspräparate des subkutanen Fettgewebes isoliert, welche im Rahmen elektiv durchgeführter kosmetisch-operativer Eingriffe gewonnen wurden.

Lagerung und Transport der Proben erfolgte in sterilen 50 ml-Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt Inc., Newton, NC, USA) bei 4° C. Eine Aufarbeitung der Proben – wie nachfolgend beschrieben – fand binnen maximal 2 Stunden post operationem statt.

Die jeweiligen Proben der Liposuktionspräparate wurden zunächst sukzessive mit insgesamt ca. 100 bis 150 ml PBS (37°C) (Gibco® Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen. Anschließend wurde das Probenvolumen sowie das jeweilige Probengewicht bestimmt (die jeweiligen Werte sind der Tabelle 2 zu entnehmen).

Die Isolierung der stromalen Zellfraktion erfolgte in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle zur Isolierung von ASC (Zuk et al., 2001). Hierzu wurden 0,075 g Kollagenase (Collagenase Type CLS, 158 U/mg; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in 50 ml PBS (37° C) gelöst und die Lösung anschließend mittels eines 0,45 µm-Filters (Qualilab®) steril filtriert. Diese Kollagenase-Lösung wurde entsprechend dem zuvor bestimmten Probenvolumen im Verhältnis 1:1 mit der Liposuktions-Probe versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde die Kollagenase-Aktivität durch Zugabe eines antimykotischen Kulturmediums gestoppt. Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; 1000 mg/L Glukose, 4 mM L-Glutamin, 110 mg/L Natriumpyruvat; Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, USA). Dieses wurde zudem mit 10%

hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS; Gibco®), 100 U/ml Penicillin + 100 µg / ml Streptomycin (Gibco®) sowie 100 U/ml Nystatin (Sigma®) versetzt. Dieser Ansatz wird im Folgenden als antimykotisches Kulturmedium bezeichnet.

Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, der gesamte Überstand verworfen und das resultierende Zellpellet in 5 ml antimykotischem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) überführt, in welche zuvor bereits jeweils 15 ml antimykotisches Kulturmedium gegeben worden waren.

Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt, jede Zellkulturflasche einmal mit ca. 15 ml PBS gespült und frisches antimykotisches Kulturmedium zugegeben.

Zelllinie	Alter [Jahre]	Entnahmeregion	Probenvolumen [ml]	Probengewicht [g]
ASC 1	36 / ♀	Hüfte	7,0	5,8
ASC 2	50 / ♀	Abdomen	7,5	9,2
ASC 3	22 / ♀	Oberschenkel medial	10,0	9,4
ASC 4	35 / ♀	Hüfte → Oberschenkel	12,5	10,9
ASC 5	39 / ♀	Oberschenkel medial	20,0	17,8

Tabelle 2: Übersicht der isolierten ASC-Zelllinien sowie der entsprechenden Proben- und Patientendaten

1.2 Kultivierung von humanen ASC-Zellen

Die Kultivierung der isolierten ASC-Zellen erfolgte als Passage P₀ in antimykotischem Kulturmedium unter Standardbedingungen (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂/95% Luft) in einem *Hera Cell* Brutschrank (Heraeus Instruments, Deutschland) für insgesamt 7 Tage, wobei alle 2 bis 3 Tage das Nährmedium ersetzt wurde. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt, jede Kulturflasche mit ca. 15 ml PBS gespült und frisches Kulturmedium zugefügt, wobei

dieses Nährmedium dem zuvor beschriebenen entsprach, jedoch *kein* Nystatin enthielt. Dieses Medium wird im Folgenden als Kulturmedium bezeichnet.

Die Kultivierung der isolierten Zellen erfolgte bis zu einer ca. 80 - 90%igen Konfluenz. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen passagiert.

Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und jede Kulturflasche mit ca. 15 ml PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit je 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco® Trypsin-EDTA, Invitrogen, Carlsbad, USA) für 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Das Trypsin-EDTA wurde nach Ablauf dieser Zeit durch Zugabe des Kulturmediums im Verhältnis 1:1 inaktiviert, um so die Ablösereaktion zu unterbinden und eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension auf neue 75 cm²-Zellkulturflaschen verteilt, die bereits mit ca. 15 ml Kulturmedium befüllt worden waren.

Eine Inkubation der Zellen erfolgte unter den oben näher bezeichneten Standardbedingungen bis zum erneuten Erreichen einer ca. 80 - 90%igen Konfluenz als Passage 1 (P₁).

1.3 Kryokonservierung von humanen ASC-Zellen

Um die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden Aliquots der oben genannten ASC-Zellen vor Beginn der Versuchsreihen kryokonserviert.

Hierzu wurden Zellen der Passage 1 (P₁) wie zuvor beschrieben in Suspension gebracht (s. 1.2), diese für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Die resultierenden Zellpellets wurden anschließend in ca. 10 ml Gefriermedium (Cryo-safe I, c. c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland) resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials, Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark) auf identische Aliquots von 1 ml verteilt. Diese wurden gemäß den Angaben des Herstellers für 40 Minuten bei -25°C im Gefrierschrank tiefgefroren und anschließend für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Im Anschluß daran erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

1.4 Revitalisierung kryokonservierter humaner ASC-Zellen

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Experimente wurden ausschließlich mit zuvor revitalisierten ASC-Zellen der Passagen 3 bis 10 ($P_3 - P_{10}$) durchgeführt.

Hierzu wurde eine entsprechende Anzahl von kryokonservierten Aliquots aufgetaut und auf Zellkulturflaschen verteilt. Eine Kultivierung erfolgte unter den oben ausgeführten Standardbedingungen, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht war (ca. 80 – 90%ige Konfluenz). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wie unter 1.2 beschrieben in Suspension gebracht und diese den entsprechenden Versuchsreihen zugeführt bzw. erneut auf Zellkulturflaschen verteilt.

1.5 Gewinnung und Kultivierung humaner Stromazellen der Haut (SSC)

Die im Rahmen dieser Arbeit vergleichend betrachteten humanen Stromazellen der Haut (SSC = *Skin-derived Stromal Cells*) wurden aus einem kutanen Operationspräparat des Abdomens einer gesunden 42 jährigen Patientin gewonnen. Hierzu wurde das Präparat unter sterilen Bedingungen zunächst in PBS-Puffer gewaschen und sorgsam von anhaftenden Geweberesten befreit; anschließend wurde das Präparat in kleinste Segmente (Kantenlänge ca. 1 – 2 mm) zerteilt und diese unter Verwendung des oben beschriebenen antimykotischen Kultumediums in einer Zellkulturflasche (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) ausgebracht; die weitere Kultivierung erfolgte unter den bereits o.g. Standardbedingungen im Brutschrank.

Die adhärent wachsenden, initial ellipsoiden bis spindelförmigen Zellen wurden zunächst mit auf 37°C erwärmtem PBS sorgfältig gewaschen und anschließend mittels Zugabe von Trypsin-EDTA in Suspension gebracht. Diese Zellsuspension wurde auf frische Kulturflaschen aufgeteilt, wobei nunmehr das zuvor genannte Kulturmedium ohne antimykotischen Zusatz verwendet wurde.

Kryokonservierung und Revitalisierung der SSC-Zellen erfolgte entsprechend dem für ASC-Zellen beschriebenen Verfahren (s. o.).

1.6 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination der Zellkultur

Um eine eventuelle Mykoplasmenkontamination der Zellkultur im Vorfeld der unten beschriebenen Kryokonservierung der Zellisolate bzw. der durchzuführenden Versuchsreihen auszuschließen, wurde der *Mykoplasma Hoechst Stain Kit* (MP Biomedicals, LLC; Eschwege, Deutschland) auf Basis einer Darstellung der DNS mittels Immunfluoreszenz eingesetzt. Dieser ist zur Detektion der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen vorkommenden Mykoplasmen geeignet und wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

In keinem Falle konnte eine Kontamination durch Mykoplasmen festgestellt werden.

2. Zellmorphologie

2.1 Beurteilung der Zellmorphologie unter Standard-Kulturbedingungen

Die morphologische Beurteilung der jeweiligen ASC- bzw. SSC-Zellpräparationen unter den oben näher bezeichneten Standard-Kulturbedingungen erfolgte mittels eines entsprechenden Photomikroskopes (Axiovert 35, Zeiss, Deutschland) als Durchlichtmikroskopie.

2.2 Beurteilung der Zellmorphologie unter neurogener Induktion (NID)

Um die Auswirkungen des neurogenen Induktionsmediums (NID) auf die Morphologie der untersuchten Zellen beurteilen zu können, wurden humane ASC- und SSC-Zellen in einer Dichte von ca. 2.000 Zellen / cm² für 24 Stunden unter Standardbedingungen in Zellkulturflaschen (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und das Induktionsmedium zugefügt (D-MEM + 1000 mg/L Glukose, 4 mM L-Glutamin, 110 mg/L Natriumpyruvat + 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum FCS + 0,5 mM IBMX + 200µM Indomethacin + 5 µg / ml Insulin + 1% Ethanol + 100 U/ml Penicillin + 100 µg / ml Streptomycin). Ein entsprechender Ansatz ohne Testsubstanzen diente in diesem Zusammenhang als Kontrolle.

Nach weiteren 96 Stunden erfolgte die mikroskopische Betrachtung der Zellen wie oben beschrieben.

3. Expression von Oberflächenantigenen

3.1 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung des Phänotypes revitalisierter ASC- bzw. SSC-Zellen unter Standard Kulturbedingungen erfolgte mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung entsprechender fluoreszenz-markierter Antikörper (FACS = *fluorescence activated cell sorting*). Auswahl und Bestimmung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Oberflächenantigene erfolgte in enger Abstimmung mit der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) und stellt das dort etablierte Muster zur Charakterisierung mesenchymaler Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (BMSC) dar (siehe Tabelle 3).

Hierzu wurden unter Standard-Kulturbedingungen expandierte ASC- bzw. SSC-Zellen zunächst wie zuvor beschrieben in Suspension gebracht, die jeweilige Zellkonzentration (Zellzahl / ml) unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (s. u.) bestimmt und anschließend zentrifugiert (5 min, 1500 U/min) sowie der Überstand verworfen.

Die so gewonnenen Zellpellets, welche minimal ca. $3,8 \times 10^5$ Zellen und maximal ca. $7,2 \times 10^5$ Zellen enthielten, wurden in jeweils 700 µl FACS-Puffer (D-PBS [Gibco®] + 2% FCS + 0,1% Natriumazid) resuspendiert und zu je 100 µl aliquotiert. Diese Suspensionsaliquots wurden im Anschluß hieran mit den entsprechenden fluoreszenz-markierten mouse-anti-human Antikörpern für insgesamt 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (3 min, 3500 U/min) und der Überstand sorgsam abgesaugt. Anschließend wurden die so generierten Zellpellets in entsprechenden Volumina FACS-Puffer resuspendiert.

Analyse und Auswertung erfolgten unter Verwendung eines Durchflusszytometers (FACSCalibur®, BD Biosciences, USA) sowie der korrespondierenden Software

(CellQuest[®], BD Biosciences, USA), wobei jeweils ca. 10.000 Ereignisse einbezogen wurden.

Oberflächenantigen	Isotyp	Markierung	Hersteller
CD 34	mIgG ₁	PE	BD Biosciences
CD 45 ¹	mIgG ₁	PE	BD Biosciences
CD 59 ²	mIgG ₁	FITC	BD Biosciences
CD 90 ³	mIgG ₁	FITC	Serotec
CD 105 ⁴	mIgG ₁	FITC	Serotec
Isotypenkontrollen			
mIgG ₁	-	PE + FITC	BD Biosciences

Tabelle 3: Übersicht der im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse von ASC- und SSC-Zellen verwendeten Antikörper
PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein Isothiocyanat

¹: lymphocyte common antigen

²: CD59 stellt ein Homolog des sog. stem-cell antigen 1 (SCA-1) dar

³: Thy-1

⁴: Endoglin

4. Immunhistochemie

4.1 Expression proneuraler Marker: Musashi-1, Nestin und β -III-Tubulin

Um die Neurogenität der im Rahmen dieser Arbeit näher betrachteten Induktionsbedingungen zu beurteilen, wurde die Expression des mRNA-bindenden Proteins Musashi-1 (Rabbit Polyclonal anti-human Musashi 1 Antibody, Abcam) sowie von Nestin (Mouse monoclonal anti-human Nestin Antibody, Chemicon/Millipore) und β -III-Tubulin (Mouse monoclonal anti-human β -III-Tubulin Antibody, TU-20-Clone, Chemicon/Millipore) immunhistologisch untersucht, welche zur Charakterisierung neuraler bzw. neuronaler Progenitoren herangezogen werden können (Hermann et al., 2004; Kaneko et al., 2000; Mo et al., 2007; Moreels et al., 2005; Nagase et al., 2007; Tonchev et al., 2005).

Hierzu wurden ASC- sowie SSC-Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern (*Falcon® Culture Slide*; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) initial für 24 Stunden unter den oben benannten Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend

wurde das Medium abgesaugt, jede Kammer sorgsam mit PBS-Puffer gespült und das neurogene Induktionsmedium (NID) zugefügt; ein entsprechender Ansatz, welcher lediglich 1% Ethanol enthielt, diente hierbei als Kontrolle.

Nach weiteren 96 Stunden wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Um eine Permeabilisierung der Zellen zu erreichen, wurden diese für 10 Minuten mit Methanol (4° C) inkubiert und im Anschluß daran für jeweils 5 Minuten einmal mit PBS sowie zweimal mit 0,1% Triton X-100 in TBS-Puffer (Trizma Base, NaCl, HCl, pH 7,6) gespült.

Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen mittels normalem Schweine- (Musashi 1) bzw. Kaninchen-Serum (β -III-Tubulin, Nestin) (beide Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper in einer jeweils zuvor ermittelten Verdünnung (Musashi 1 1:1000; β -III-Tubulin 1:500; Nestin 1:100) bei 4°C über Nacht.

Nach dreimaliger Spülung mit TBS-Puffer (pH 7,6) erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinierten sekundären Antikörper (Swine-anti-Rabbit bzw. Rabbit-anti-Mouse; DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:200.

Im Anschluß hieran wurden die Zellen erneut mit TBS-Puffer gespült und für weitere 30 Minuten mit dem Vectastain®-ABC-AP Kit (Vector Laboratories, Burlingame) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholter Spülung mit TBS erfolgte die Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität mittels Neufuchsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): Hierzu wurden 7,5 ml einer 4% Natriumnitritlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 300 μ l Neufuchsin Stammlösung (5g Neufuchsin in 100 ml 2 N HCL) vermischt. Anschließend wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 750 μ l Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst und umgehend der Lösung als Substrat für die alkalische Phosphatase zugefügt. Zudem wurde der Entwicklungslösung Levamisol (80 mg / 200 ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase beigefügt. Die Objektträger wurden in dieser Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert; nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch mehrmaliges Spülen mit Leitungswasser gestoppt.

Abschließend wurden die Präparate mit Crystal/Mount (Biomedica Corporation, Foster City, USA) beschichtet und danach unter Verwendung von Permanent Mounting Media (Biomedica Corporation, Foster City, USA) mit einem entsprechenden Deckglas versehen.

Die jeweiligen Verdünnungen wurden für den Nachweis von Musashi 1 und β -III-Tubulin mit DAKO Antibody Diluent (DAKO, Glostrup, Dänemark) vorgenommen; für die Darstellung von Nestin erfolgten diese in TBS / 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Parallel hierzu wurden für jede Zelllinie bzw. für jedes der untersuchten Antigene entsprechende Isotypenkontrollen als Negativkontrolle mitgeführt; in keinem Falle konnte hierbei eine unspezifische Bindung nachgewiesen werden.

4.2 Immunhistochemischer Nachweis des cAMP response element binding-protein (CREB) in ASC und SSC

Für den immunhistochemischen Nachweis des CREB wurden *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) sowie humane Haut-Stromazellen (SSC) für 48 Stunden auf 8-Kammer-Objektträgern (*Falcon® Culture Slide*; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) unter den zuvor näher bezeichneten Standardkulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt, jede Kammer mit PBS-Puffer gespült und die Zellen für 30 Minuten mit 4% PFA bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte auch hier die Permeabilisierung der Zellmembran bzw. des Nukleus mittels Methanol bzw. 0,1% Triton X-100 in TBS-Puffer (s. o.).

Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen mittels normalem Kaninchenserum (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (goat anti-human CREB Antibody, R&D-Systems) in einer Verdünnung von 1:100 bei 4°C über Nacht.

Nach dreimaliger Spülung mit TBS-Puffer (pH 7,6) erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinierten sekundären Antikörper (Rabbit-anti-Goat; DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:200.

Die Entwicklung der Farbreaktion sowie die Weiterbehandlung der Präparate erfolgte wie unter 4.1 beschrieben.

Parallel wurden entsprechende Ansätze ohne primären Antikörper als Negativkontrollen mitgeführt, wobei in keinem Falle eine unspezifische Bindung nachgewiesen werden konnte.

Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit DAKO Antibody Diluent (DAKO, Glostrup, Dänemark) vorgenommen.

5. Untersuchungen zur Zellproliferation

5.1 Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet (Schichtdicke $d = 0,1 \text{ mm}$).

Hierzu wurden je $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension (s. 1.2) in eine Zählkammer pipettiert und insgesamt 8 Grossquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Da jedes Grossquadrat (= 16 mittlere Quadrate) das Volumen von $0,1 \text{ mm}^3 (=10^{-4} \text{ cm}^3)$ repräsentiert und 1 cm^3 äquivalent zu 1 ml ist, ergibt sich die Zellzahl / ml gemäß der Formel:

$\frac{\text{Gezählte Zellzahl (8 Grossquadrate)} \times 10.000}{\text{Anzahl der ausgezählten Grossquadrate (8)}} = \text{Zellzahl / ml}$
--

Abb. 3: Formel zur Berechnung der Zellzahl / ml in der Zählkammer nach Neubauer

5.2 Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationsdauer im Rahmen der Proliferationsexperimente

Da in den im Folgenden beschriebenen Zellproliferationsexperimenten der Einfluss der oben genannten Testsubstanzen, einzeln oder in Kombination, auf das Wachstumsverhalten der 5 ASC-Zelllinien sowie von SSC untersucht werden sollte, war es zunächst wichtig, sowohl den Inkubationszeitraum als auch die optimale

Zellkonzentration festzulegen. Hierbei war entscheidend, dass sich die Zellen innerhalb des Versuchszeitraumes in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Zu diesem Zweck wurde für jede der Zelllinien eine Eichreihe erstellt. Hierzu wurde für jede Zelllinie zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von 4×10^4 Zellen / ml über verschiedene Verdünnungsschritte mit Kulturmedium bis zu einer Zellzahl von 1×10^3 Zellen / ml hergestellt.

Für jede der zuvor genannten Zelllinien (ASC bzw. SSC) wurde pro Zellkonzentration ein Vierfachansatz pipettiert, wobei jeweils 90 µl Zellsuspension pro Napf einer Mikrotiter-Platte (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) gegeben wurden. Zusätzlich wurde je Mikrotiterplatte eine entsprechende Anzahl an Vierfachansätzen mit jeweils 90 µl Kulturmedium als Leerwert für das ELISA-Lesegerät pipettiert.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden, welche ein optimales Anwachsen der Zellen am Boden der Mikrotiterplatten gewährleisten sollte, wurden in jeden Napf 10 µl des entsprechenden Kulturmediums gegeben, welches 10% Ethanol enthielt, so dass die endgültige Ethanol-Konzentration pro Napf 1 % betrug. Dies entsprach derjenigen Ethanol-Konzentration, in der im Rahmen der späteren Versuchsreihen die Testsubstanzen zugefügt wurden. Hierdurch sollte ein eventueller Einfluss des Ethanols auf die Zellproliferation berücksichtigt werden.

Zur Ermittlung der Zelldichte wurde der *Cellproliferation Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt.

Dafür wurden *XTT labeling reagent* und *electron coupling reagent* in einem Verhältnis von 50 : 1 gemischt, was einer XTT-Endkonzentration von 0,3 mg / ml entspricht. Hiervon wurden jeweils 50 µl pro Napf auf die Mikrotiterplatte pipettiert und die Platten zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gegeben.

Eine Auswertung erfolgte am 4., 5., 6. sowie am 7. Tag nach 4, 5 und 6 Stunden mittels eines ELISA-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Napf [Ifd. Nr.]	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32
Zellkonzentration [Zellen / ml]	0	40x10 ³	20x10 ³	10x10 ³	8x10 ³	4x10 ³	2x10 ³	1x10 ³
Zellsuspension [µl]	0	90	90	90	90	90	90	90
Gesamtvolumen [µl]	100	100	100	100	100	100	100	100
Ethanolkonzentration [%]	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 4: Pipettierschema der Eichreihen

5.3 Untersuchungen zur Zellproliferation unter Zugabe der Testsubstanzen

5.3.1 Festlegung von Inkubationszeitraum und Zellkonzentration

Wie bereits zuvor dargelegt, galt es im Vorfeld der eigentlichen Zellproliferationsversuche anhand der erstellten Eichreihen zunächst den entsprechenden Inkubationszeitraum sowie die zu verwendenden Zellkonzentrationen festzulegen.

Nach Auswertung der jeweiligen Eichreihen wurde der Inkubationszeitraum auf insgesamt 5 Tage (entsprechend 120 Stunden) festgelegt, da sich hier für alle untersuchten Zelllinien ein den oben dargelegten Kriterien entsprechendes Proliferationsverhalten innerhalb eines umschriebenen Konzentrationsbereiches finden ließ.

Es erfolgte zunächst eine 24-stündige Inkubation ohne Testsubstanzen, woran sich eine weitere 96-stündige Inkubation in Anwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen anschloss.

Die in diesem Zusammenhang festgesetzten Zellkonzentrationen / ml der jeweiligen ASC-Zelllinien sowie der Zelllinie SSC sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Zelllinie	ASC 1	ASC 2	ASC 3	ASC 4	ASC 5	SSC
Zellzahl / ml	6.000	12.000	8.000	15.000	10.000	10.000

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der im Rahmen der Proliferationsexperimente verwendeten Zellkonzentrationen

5.3.2 Zellproliferation unter neurogener Induktion

Als Induktionsprotokoll diente im Rahmen dieser Arbeit eine Substanzkombination, wie sie bereits von Ashjian et al. (2003) beschrieben wurde (0,5 mM IBMX, 200 µM Indomethacin, 5 µg / ml Insulin). Im weiteren wird diese als neurogenes Induktionsmedium (= NID) bezeichnet.

Auf den einzelnen Mikrotiterplatten wurde auch hierbei jeder Versuch in einem Vierfachansatz durchgeführt, wobei jeder Versuch in mindestens 3 unabhängigen Versuchen wiederholt wurde, so dass letztlich für jede Zelllinie 12 entsprechende Werte vorlagen.

Hierzu wurden ASC-Zellen bei 80 – 90%iger Konfluenz in Suspension gebracht. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl / ml gemäß der zuvor genannten Methode.

Zunächst wurden hierfür pro Napf jeweils 90 µl einer Zellsuspension pipettiert, wobei die Zellzahl / ml der in Tabelle 5 für die jeweilige ASC-Zelllinie bzw. für SSC genannten Zellkonzentration entsprach. Zusätzlich wurde je Mikrotiterplatte ein Vierfachansatz mit jeweils 90 µl Kulturmedium als Leerwert für das ELISA-Lesegerät pipettiert.

Nach einer Anwachsphase von 24 Stunden wurden die Testsubstanzen entsprechend dem Induktionsprotokoll in gelöster Form zugesetzt. Hierzu wurden zunächst Indomethacin und Isobutylmethylxanthin (IBMX) in Ethanol gelöst, mittels Kulturmedium weiter verdünnt sowie entsprechende Volumina der oben benannten Insulin-Lösung zugefügt. Hiervon wurden jeweils 10 µl pro Napf der Mikrotiterplatte gegeben, so dass sich die im Pipettierschema aufgeführten Endkonzentrationen ergaben (s. Tabelle 6). Parallel hierzu wurde jeweils ein Vierfachansatz pipettiert,

welcher als Kontrollwerte im Rahmen der Proliferationsexperimente diente und 1% Ethanol enthielt.

Napf [Ifd. Nr.]	1 - 4	5 - 8	9 - 12
Indomethacin-Konzentration / Napf [μM]	Leerwert	Kontrolle	200
IBMX-Konzentration / Napf [mM]			0,5
Insulin-Konzentration / Napf [$\mu\text{g/ml}$]			5
Zellsuspension [μl]		90	90
Gesamtvolumen [μl]	100	100	100
Ethanolkonzentration [%]	1	1	1

Tabelle 6: Pipettierschema für das im Rahmen der Proliferationsexperimente verwendete Protokoll nach *Ashjian et al. (2003)* = neurogenes Induktionsmedium (NID)

Die Ermittlung der Zelldichte erfolgte nach weiteren 96 Stunden mittels des *Cellproliferation Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach 5 Stunden durch Bestimmung der Extinktion, da sich dieses Zeitfenster als optimal herausstellte.

5.3.3 Zellproliferation unter Berücksichtigung der Einzelsubstanzen

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, welchen Effekt einzelne Komponenten des oben beschriebenen Induktionsmediums auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zelllinien (ASC bzw. SSC) ausüben, wurden die genannten Testsubstanzen einzeln sowie in beliebiger Kombination getestet.

Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien entsprechend der zuvor bezifferten Zelldichte in Mikrotiterplatten kultiviert. Auch hier handelte es sich bei jedem Versuch um einen Vierfachansatz, wobei jeder Versuch in mindestens 3 unabhängigen Versuchen wiederholt wurde, so dass letztlich für jede Zelllinie bzw. jede getestete Substanzkombination 12 Werte vorlagen.

Die Durchführung der Experimente entsprach der unter 5.3.2 beschriebenen; der entsprechende Versuchsansatz ist in Tabelle 7 schematisch wiedergegeben.

Napf [Ifd. Nr.]	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36
Indomethacin [μM] [*]	Leerwert	Kontrolle	0	200	0	200	0	200	200
IBMX [mM] [*]			0	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5
Insulin [$\mu\text{g/ml}$] [*]			5	0	0	5	5	0	5
Zellsuspension [μl]		90	90	90	90	90	90	90	90
Gesamtvolumen [μl]	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ethanol [%] [*]	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 7: Pipettierschema zur Testung von Einzelsubstanzen bzw. Substanzkombinationen;
* : Konzentrationsangaben pro Napf

Die Versuchsauswertung erfolgte – wie oben beschrieben – nach 24 + 96 Stunden mittels des *Cellproliferation Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach weiteren 5 Stunden durch Bestimmung der Extinktion.

6. Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes sowie der Zellzyklusphasen

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte durch Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes nach DNS-Fluoreszenz-Markierung mittels des membrangängigen, hochspezifischen

DNS-Farbstoffes DRAQ-5 (Biostatus DRAQ-5, Alexis Corporation, Lausen, Schweiz) unter Verwendung eines *Laser Scanning Cytometers* (LSC) sowie der entsprechenden Software zur Auswertung der gewonnenen Daten (Win Cyte™; CompuCyte Corporation) (siehe auch Martin et al., 2005); die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 633 nm, die korrespondierende Messung der Emission bei einer Wellenlänge von 650 nm. Hierbei wurden Zellen mit einfachem relativen DNS-Gehalt der G₁-Phase, Zellen mit doppeltem relativen DNS-Gehalt der G₂/M-Phase des Zellzyklus zugerechnet (siehe Smith et al., 2000).

Die Kultivierung der untersuchten ASC-Linien bzw. von SSC erfolgte auf 2-Napf-Chamber-Slides (LAB-TEK®, Nalge Nunc Int., Naperville, USA) in einer Konzentration von jeweils 10.000 Zellen / Napf.

In Analogie zu den zuvor beschriebenen Proliferationsexperimenten wurde auch hier nach einer initialen Anwachsphase von 24 Stunden das neurogene Induktionsmedium (NID) zugefügt. Parallel hierzu wurde ein entsprechender Ansatz, welcher lediglich 1% Ethanol enthielt, als Kontrolle mitgeführt.

Nach weiteren 96 Stunden wurden die jeweiligen Kulturmedien abgesaugt, jedes Well mit PBS gespült und die Zellen anschließend mittels 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert.

Danach wurde jedes Chamber-Slide erneut mit PBS-Puffer gespült; im Anschluß wurde pro Napf 1 ml einer 1:100 verdünnten RNase-Lösung (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pipettiert und die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit TBS-Puffer erfolgte die Zugabe des DNS-Fluoreszenzfarbstoffes DRAQ-5 in einer Verdünnung von 1:500 in TBS. Hieran schloß sich eine erneute Inkubation von 15 Minuten im Brutschrank an.

Abschließend wurde jeder Napf 2 mal für jeweils 5 Minuten mit TBS-Puffer gespült und die Objektträger unter Verwendung eines Fluoreszenz-Mounting-Mediums (Fluorescent Mounting Medium, DakoCytomation, Dänemark) mit einem Deckglas versehen.

Insgesamt wurden für jede Zelllinie mindestens 8 Wertepaare unter Induktions- bzw. Kontrollbedingungen im Zuge von mindestens 3 unabhängigen Experimenten erhoben.

7. RNS-Extraktion und Analyse der Genexpression unter neurogener Induktion (NID)

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, ob und in wieweit es in Anwesenheit des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten neurogenen Induktionsmediums (NID) bei den untersuchten Zelllinien zu Veränderungen auf der Ebene der Genexpression kommt, wurden zunächst entsprechende RNS-Proben extrahiert und anschließend die Genexpression in Relation zur korrespondierenden Kontrolle beurteilt.

Hierzu wurden jeweils mindestens 500.000 ASC- sowie SSC-Zellen als Vierfachansatz in 175 cm²-Kulturflaschen (Sarstedt Inc.; Newton, NC, USA) ausgebracht und für 24 Stunden unter den zuvor benannten Standard-Kulturbedingungen inkubiert.

Im Anschluß daran wurde das Kulturmedium entfernt, jede Kulturflasche sorgfältig mit PBS-Puffer gespült und das neurogene Induktionsmedium zugefügt (25 ml pro Ansatz). Entsprechende Ansätze ohne Testsubstanzen dienten im Rahmen dieses Experimentes als Kontrollen.

Nach Inkubationszeiten von 6 und 12 Stunden wurden die jeweiligen Medien abgesaugt, die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen und wie oben beschrieben in Suspension gebracht. Anschließend wurden die so gewonnenen Zellsuspensionen für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS-Puffer sorgsam resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl / ml mittels Neubauer-Zählkammer (s.o.) wurden für jede Zelllinie entsprechende Ansätze eingestellt, welche 500.000 Zellen enthielten, und diese erneut zentrifugiert (10 min; 1500 U/min).

Die Extraktion der RNS aus den so generierten Zellpellets erfolgte im Anschluß hieran unter Verwendung eines entsprechenden Extraktions-Kits (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), welcher zur Isolierung zellulärer humaner RNS geeignet ist, gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Analyse sowie die Aufbereitung der Datensätze erfolgte als sog. *Human Exonic Evidence-based Oligonucleotide (HEEO) Array* durch das Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

8. Statistische Auswertung

Für die entsprechenden statistischen Berechnungen sowie für die Erstellung der gezeigten Diagramme wurde die Software *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, California USA) verwendet, wobei hier p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet wurden.

Um einen Vergleich der im Rahmen der Proliferationsexperimente gewonnenen Daten zu ermöglichen und um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Zellproliferation der jeweiligen ASC- bzw. SSC-Zellen durch die Zugabe der untersuchten Testsubstanzen bzw. Substanzkombinationen statistisch signifikant beeinflusst wird, wurden zunächst die ELISA-Reader Werte in Relation zu den entsprechenden Kontrollwerten gesetzt (Angabe in % der Kontrolle). Anschließend erfolgte die Auswertung mittels eines ungepaarten zweiseitigen *t*-Testes. Im Rahmen der vergleichenden Betrachtung der Zelllinien untereinander kam ein *Friedman-Test* mit anschließendem *Dunn's post-Test* zur Anwendung.

Im Rahmen der Bestimmung der Zellzyklusphasen wurde für jede der untersuchten Zelllinien bzw. -isolate die unter Induktionsbedingungen beobachtete prozentuale Verteilung der Zellpopulation auf die untersuchten Phasen des Zellzyklus in Relation zu der jeweils korrespondierenden Kontrolle gesetzt. Ziel war es, eine Aussage darüber treffen zu können, ob es hierbei innerhalb der betreffenden Linie zu einer statistisch signifikanten Verschiebung im Vergleich zu dem unter Kontrollbedingungen erhobenen Verteilungsmuster kommt. Die statistische Auswertung erfolgte hier mittels eines ungepaarten zweiseitigen *t*-Testes. Vergleichende Betrachtungen zwischen den untersuchten Zelllinien wurden hierbei wiederum unter Verwendung des *Friedman-Testes* und anschließendem *Dunn's post-Test* vorgenommen.

In allen Fällen wurde zusätzlich die Standardabweichung (SD) bestimmt und graphisch dargestellt.

V. Ergebnisse

1. ASC und SSC unter Standard-Kulturbedingungen

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten ASC-Zellen stellten sich unter Standard-Kulturbedingungen innerhalb des hier betrachteten Passagezeitraumes als adhärent, sich teils überlagernd wachsende Zellen dar, wobei unter morphologischen Gesichtspunkten prinzipiell zwei unterschiedliche Zelltypen bzw. -konfigurationen voneinander abgegrenzt werden konnten: Einerseits kompakte spindelförmige Zellen, andererseits flache, breitbasig adhärent wachsende, unregelmäßig begrenzte, polygonale Zellen, die in Einzelfällen binukleär imponierten.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich zudem auch im Falle der humanen Haut-Stromazellen (SSC). Auch hier ließen sich spindelförmige, kompakte fibroblastoide Zellen sowie große, flache, unregelmäßig konturierte, z.T. binukleäre Zellen voneinander unterscheiden.

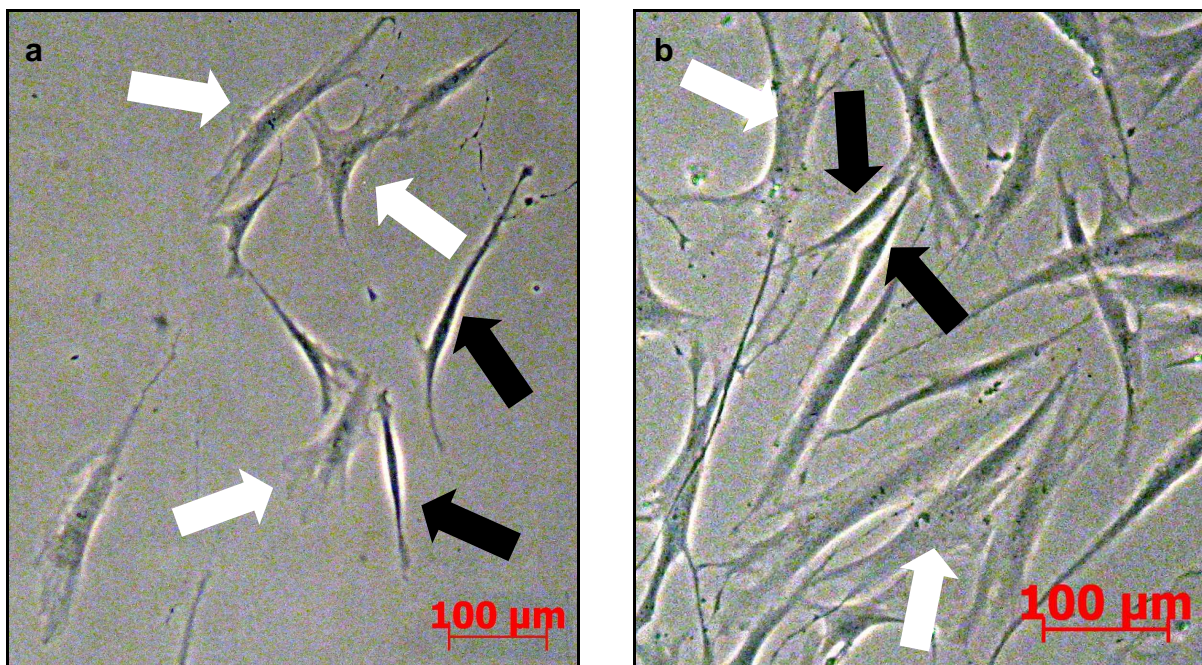


Abb. 4: Adipose-derived Stem Cells (ASC) (a) und Humane Stromazellen der Haut (SSC) (b) unter Standard-Kulturbedingungen. Prinzipiell lassen sich morphologisch zwei unterschiedliche Zelltypen- bzw. -konfigurationen unterscheiden: (1) spindelförmige, fibroblastoide Zellen (schwarze Pfeile) und (2) große, flache, breitbasig adhärent wachsende, unregelmäßig begrenzte Zellen (weiße Pfeile).

2. Expression von Oberflächenantigenen

2.1 Durchflusszytometrie

Die nachstehenden Abbildungen zeigen die phänotypische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ASC- bzw. SSC-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Diese wurden entsprechend ihrer Größe (*Forward Scatter*) und Granularität (*Side Scatter*) in einer Region zusammengefaßt (R1), wobei Zellverklumpungen und Doubletten nicht einbezogen wurden. Für die Zellen innerhalb dieser Region, welche ca. 95 – 99% der Gesamtpopulation umfasste, ist die Expression des untersuchten Antigens (rote Linie) im Vergleich zu der korrespondierenden Isotypenkontrolle (grüne Linie) dargestellt. Hierbei bezeichnet M1 den als positiv gewerteten Anteil der Gesamt Ereignisse.

ASC-Zellen zeigten sich hierbei unter Standard-Kulturbedingungen (bis auf eine Ausnahme) durchweg negativ für die lympho-hämatopoetischen Marker CD34 und CD45. Im Falle der Linie ASC 1 fand sich in Relation zur korrespondierenden Isotypenkontrolle für CD34 eine erkennbare Verlagerung des Signals in höhere Intensitätsbereiche hinein; zudem fiel hier ein schwach ausgeprägter zweiter Peak auf, welcher als positives Signal im Sinne einer CD34-positiven Subpopulation gewertet wurde (s. Abb. 5a).

Im Gegensatz hierzu konnte bei allen untersuchten Linien ein Nachweis der Marker CD59, CD90 sowie CD105 eindeutig erfolgen.

Interessanterweise ließ sich für die vergleichend betrachteten SSC-Zellen ein gleichartiges Antigenexpressionsmuster nachweisen.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 8 (s.u.).

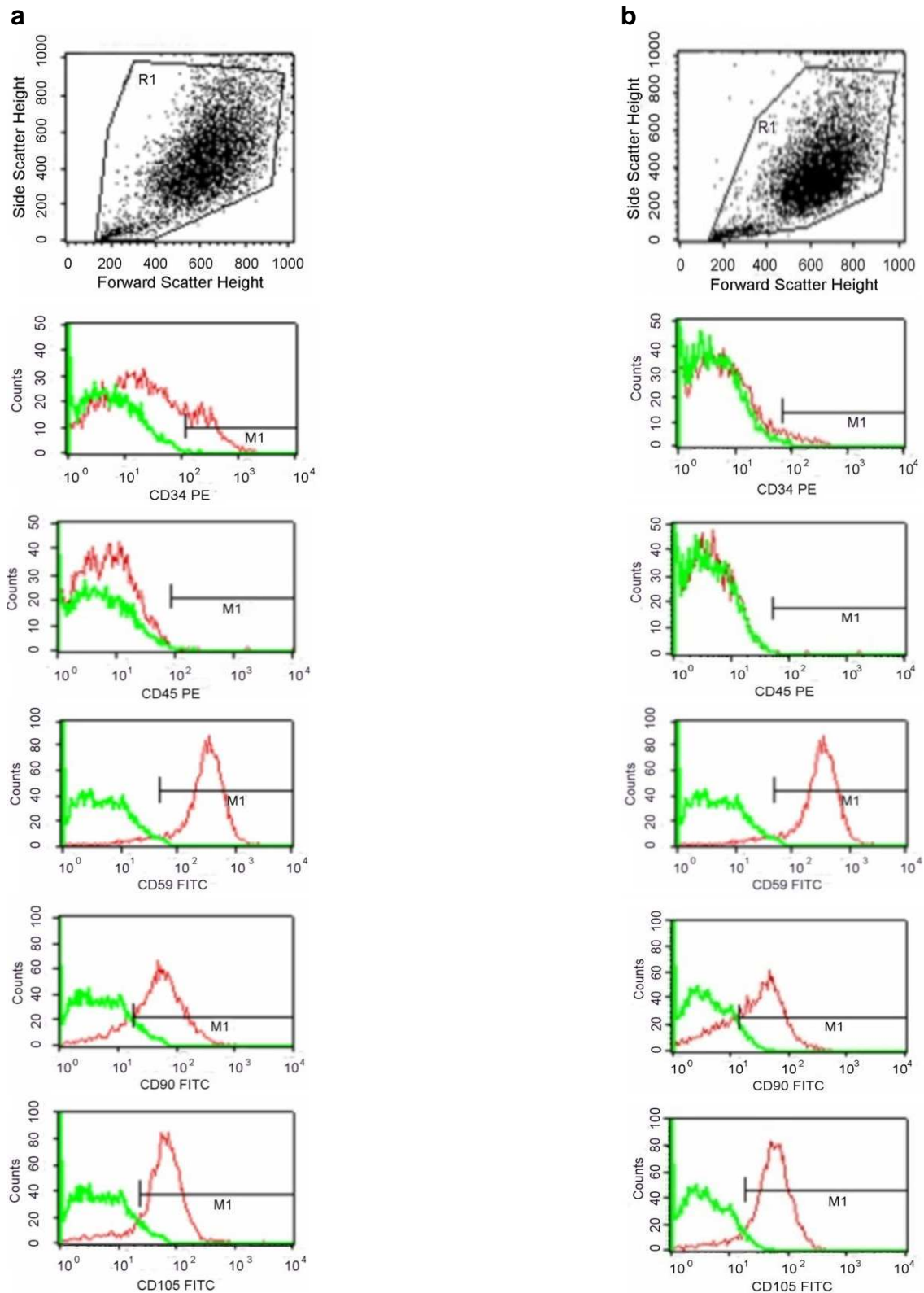


Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Linien ASC 1 (a) und ASC 2 (b): Die Darstellung zeigt die Expression des untersuchten Antigens (rote Linie) in Relation zu der korrespondierenden Isotypenkontrolle (grüne Linie) bezogen auf die Gesamtpopulation (R1); M1 markiert den als positiv gewerteten Anteil der Gesamtereignisse. Im Falle der Linie ASC 1 zeigt sich mit Blick auf das CD34-Oberflächenantigen im Gegensatz zu den nachfolgend untersuchten Zell-Isolaten ein als positiv gewerteter, schwach ausgebildeter zweiter Peak (a).

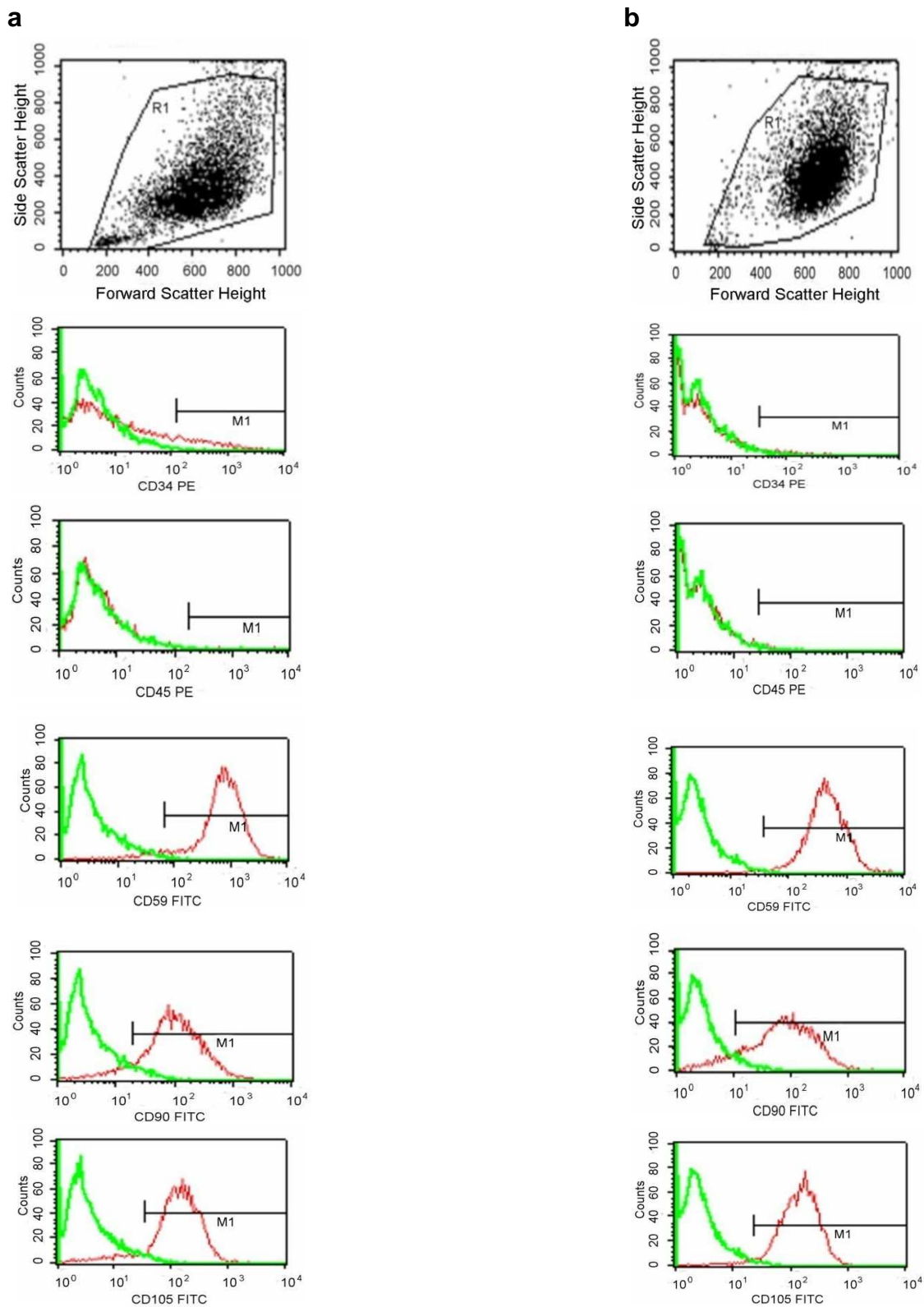


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse der Linien ASC 3 (a) und ASC 4 (b): Die Darstellung zeigt die Expression des untersuchten Antigens (rote Linie) in Relation zu der korrespondierenden Isotypenkontrolle (grüne Linie) bezogen auf die Gesamtpopulation (R1); M1 markiert den als positiv gewerteten Anteil der Gesamtergebnisse.

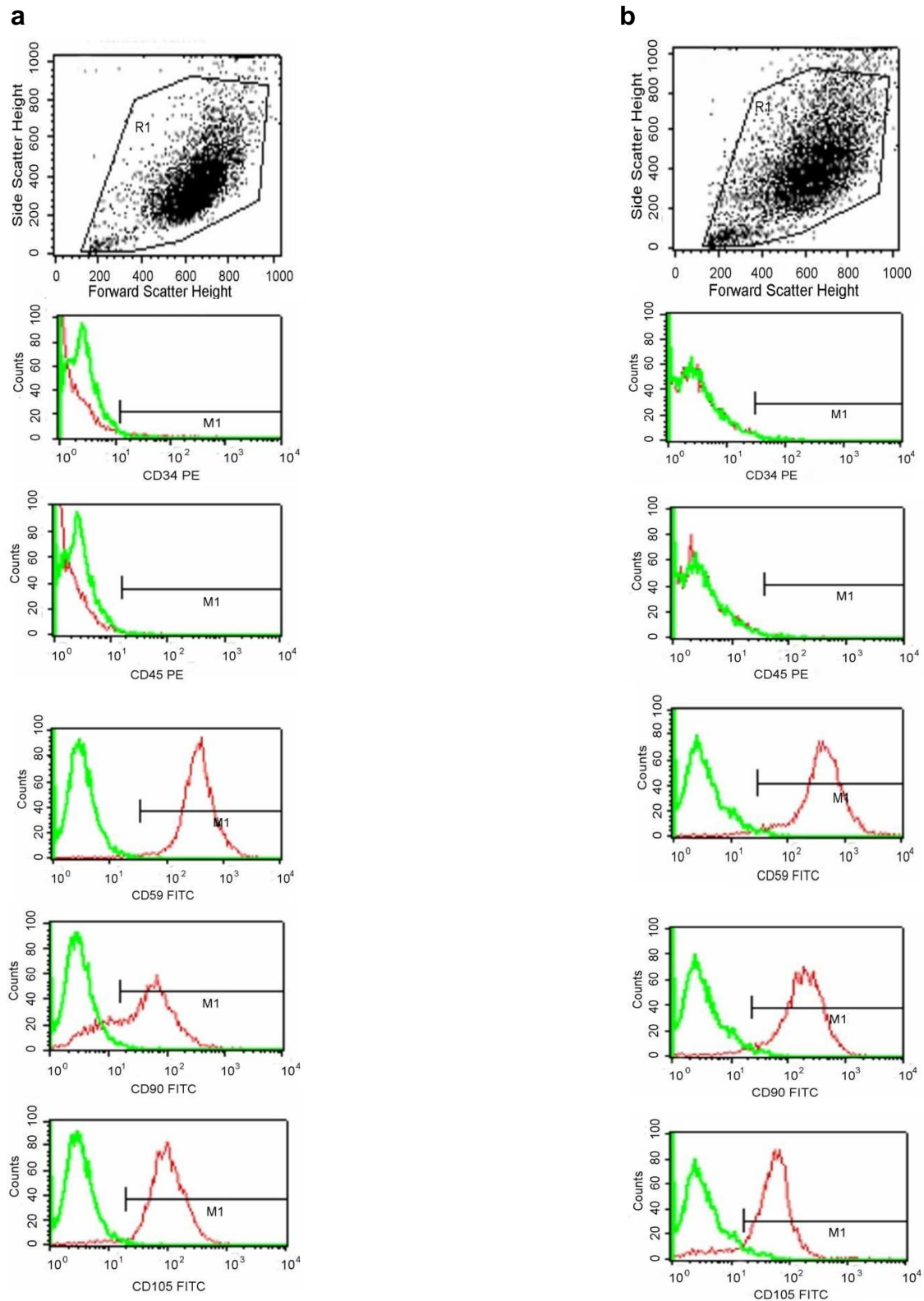


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Linien ASC 5 (a) und der vergleichend betrachteten humanen Stromazellen der Haut (SSC) (b): Die Darstellung zeigt die Expression des untersuchten Antigens (rote Linie) in Relation zu der korrespondierenden Isotypenkontrolle (grüne Linie) bezogen auf die Gesamtpopulation (R1); M1 markiert den als positiv gewerteten Anteil der Gesamtereignisse.

	CD34	CD45	CD59	CD90	CD105
ASC	3,2 ± 2 (15,1)	0,2 ± 0,1	97,0 ± 1,3	83,2 ± 4,3	94,8 ± 1,7
SSC	0,4	0,3	98,8	97,4	91,6

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der als positiv gewerteten Ereignisse bezogen auf die Gesamtheit der gewerteten Ereignisse (R1); $\bar{x} \pm \text{SEM}$

: im Falle der Linie ASC 1 konnte bei einem entsprechenden Anteil das betreffenden Antigen nachgewiesen werden

3. Morphologische Veränderungen unter neurogener Induktion (NID)

Unter neurogener Induktion (NID) ließen sich interessanterweise sowohl bei den untersuchten ASC als auch im Falle der SSC multiple Zellen beobachten, welche sich durch ein kompaktes sphärisches, sich im Phasenkontrast leuchtend abhebendes Soma auszeichneten. Zudem fielen hiervon ausgehende, in der Regel bipolar, bisweilen auch tri- oder multipolar angeordnete filamentöse zytoplasmatische Fortsätze unterschiedlicher Länge auf. Diese wiesen z. T. terminale Bifurkationen bzw. Auftreibungen auf und vermittelten in beiden Fällen den Eindruck gut abgrenzbarer Interzellularkontakte. Hierbei konnten derartige Zell-Zell-Kontakte sowohl zwischen den Fortsätzen als auch im Sinne eines extenso-somatischen Kontaktes zwischen Fortsätzen und eigentlichem Zelleib benachbarter Zellen beobachtet werden. Parallel hierzu fanden sich derartige Zellen auch singulär, d. h. ohne mikroskopisch erkennbare Kontakte zu benachbarten Zellen.

Daneben ließen sich auch Zellen erkennen, welche sich als flache, breitbasig adhärent wachsende, unregelmäßig begrenzte, polygonale Zellen darstellten und somit ihrer Morphologie nach mit den jeweiligen Kontrollkulturen vergleichbar waren. Hier zeigten sich die Zellen nahezu homogen in dieser Konfiguration.

Darüberhinaus zeigte der Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle sowohl für die untersuchten ASC-Zelllinien als auch für die vergleichend betrachteten humanen Haut-Stromazellen (SSC) eine unter neurogener Induktion deutlich geringere Zelldichte.

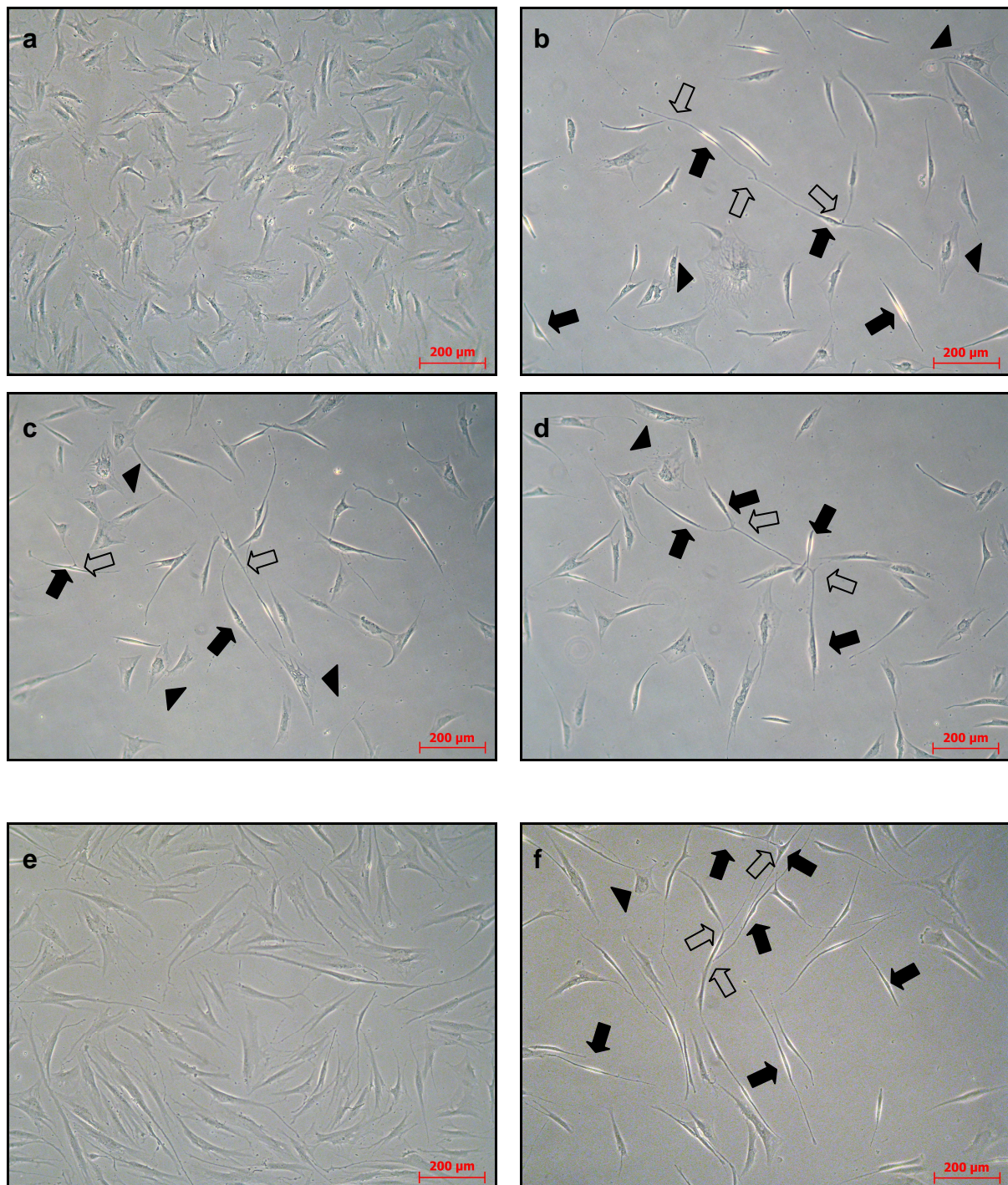


Abb. 8: *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) unter Kontrollbedingungen (a) und unter neurogener Induktion (b - d); humane Haut-Stromazellen (SSC) unter Kontrollbedingungen (e) und unter neurogener Induktion (f) nach einer Gesamtkubationszeit von 5 Tagen

Unter Induktionsbedingungen finden sich im Vergleich zur Kontrolle spindelförmige Zellen, welche sich durch ein kondensiertes Soma sowie hiervon ausgehende, in der Regel bipolare Fortsätze auszeichnen (in den Abbildungen exemplarisch durch schwarze Pfeile markiert). Diese vermitteln in einigen Fällen den Eindruck gut abgrenzbarer Interzellularkontakte (exemplarisch durch transparente Pfeile markiert). Parallel hierzu fanden sich unter Induktionsbedingungen Zellen, welche als flache, breitbasig adhären wachsende, unregelmäßig begrenzte, polygonale Zellen imponierten und somit mit unter Kontrollbedingungen kultivierten Zellen vergleichbar waren (exemplarisch durch schwarze Pfeilspitzen gekennzeichnet). Zudem fällt eine in Relation zu den jeweiligen Kontrollgruppen deutlich geringere Zelldichte auf.

4. Immunhistochemie

4.1 Untersuchung der Expression proneuraler Marker: Musashi-1, Nestin und β -III-Tubulin

Das mRNA-bindende Protein Musashi-1 konnte in allen untersuchten ASC-Zelllinien sowie in humanen Stromazellen der Haut (SSC) nachgewiesen werden. Hierbei erfolgte eine Darstellung interessanterweise sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter neurogener Induktion (NID) als granulierte intrazytoplasmatische Markierung. Bei genauerer Betrachtung fiel hierbei insbesondere unter Kontrollbedingungen eine saumartige perinukleäre bzw. den Kern bipolar einfassende Konzentrierung auf. Im Gegensatz hierzu fand sich unter neurogenen Induktionsbedingungen eine deutlich intensivere, z. T. das gesamte Zytoplasma ausfüllende Markierung. Zudem fanden sich auch unter Kontrollbedingungen vereinzelte Zellen, welche hinsichtlich der Intensität der Markierung mit dem unter neurogener Induktion beobachteten Bild vergleichbar waren. Die Abbildungen 9.1b und 9.2b veranschaulichen zudem gut die sich unter neurogener Induktion ausbildende Zellmorphologie in Form einer Kondensation des Zellsomas und der Ausbildung feiner zytoplasmatischer Fortsätze mit zum Teil konusartigen terminalen Auftreibungen, insbesondere im Bereich der hier deutlich abgrenzbaren Interzellularkontakte.

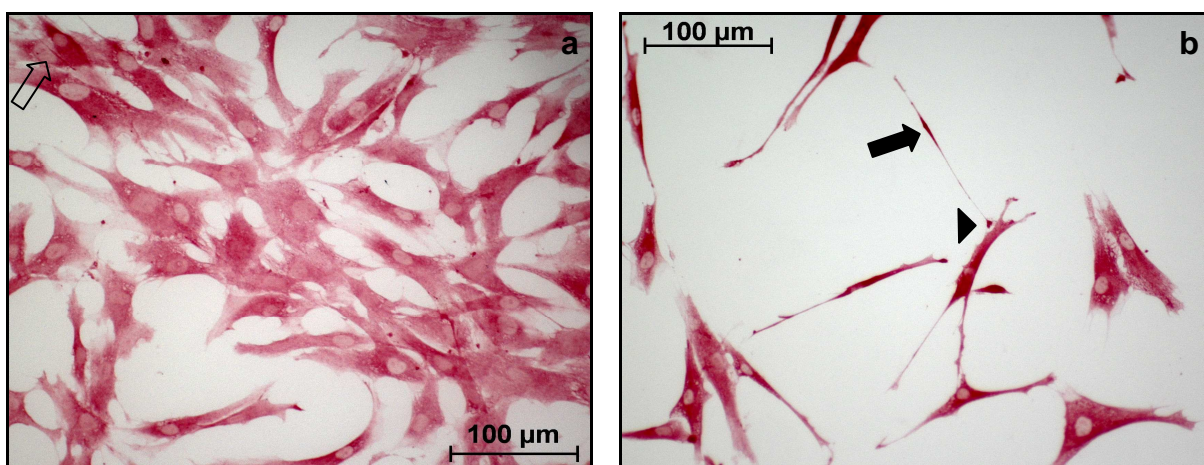


Abb. 9.1: Immunhistologischer Nachweis von Musashi-1 in Adipose-derived Stem Cells (ASC) unter Kontrollbedingungen (a) sowie unter neurogener Induktion (b).

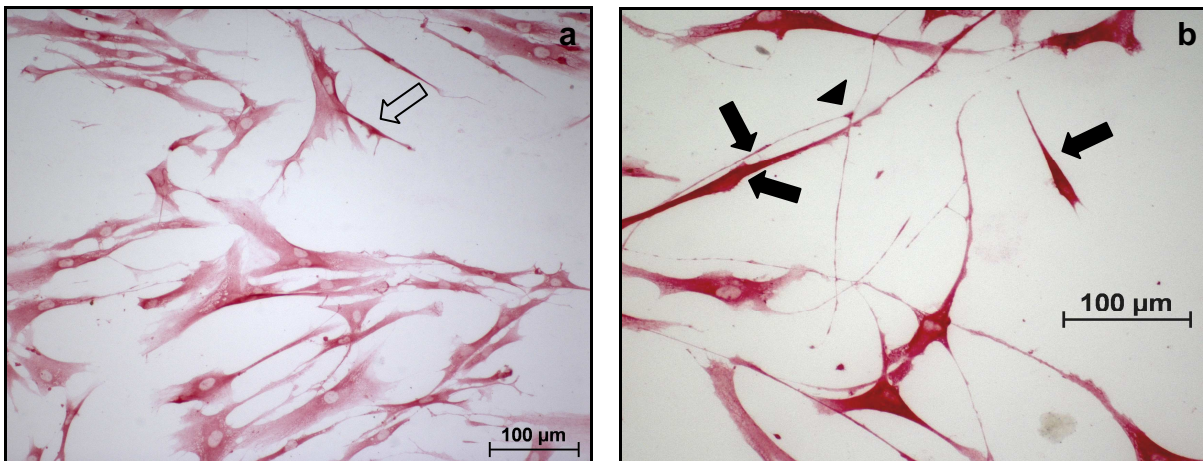


Abb. 9.2: Immunhistologischer Nachweis von Musashi-1 in humanen Haut-Stromazellen (SSC) unter Kontroll- (a) bzw. neurogenen Induktionsbedingungen (b).

Sowohl in ASCs als auch in SSCs konnte Musashi-1 als intrazytoplasmatische granulierte Markierung nachgewiesen werden, wobei sich die Markierung unter neurogener Induktion kontrastreicher bzw. intensiver darzustellen schien als unter entsprechenden Kontrollbedingungen. Unter neurogener Induktion kam es bei einem Teil der Zellpopulation zur Ausbildung eines kondensierten Zellsomas mit hiervon ausgehenden filamentösen Fortsätzen (schwarzer Pfeil), welche z.T. terminal lokalisierte konusartige Auftreibungen zeigten (schwarze Pfeilspitze).

Zudem fielen bereits unter Kontrollbedingungen deutlich intensiver gefärbte Zellen auf (exemplarisch markiert durch weiße Pfeile).

Das Intermediärfilament Nestin konnte ebenfalls in ASCs sowie in SSCs nachgewiesen werden. Mit Blick auf das intrazelluläre Verteilungsmuster erfolgte eine Darstellung sowohl unter Kontroll- als auch unter neurogenen Induktionsbedingungen insbesondere als mittelgradig ausgeprägte granulierte intrazytoplasmatische Markierung (s. Abb. 10). Im Gegensatz zu Musashi 1 fand sich hier indes kein klar abgrenzbarer perinukleärer Randsaum bzw. eine perinukleäre Konzentrierung.

Eindeutige Unterschiede zwischen der vergleichend betrachteten Kontrollgruppe einerseits und der Induktionsgruppe andererseits konnten immunhistologisch jedoch nicht festgestellt werden.

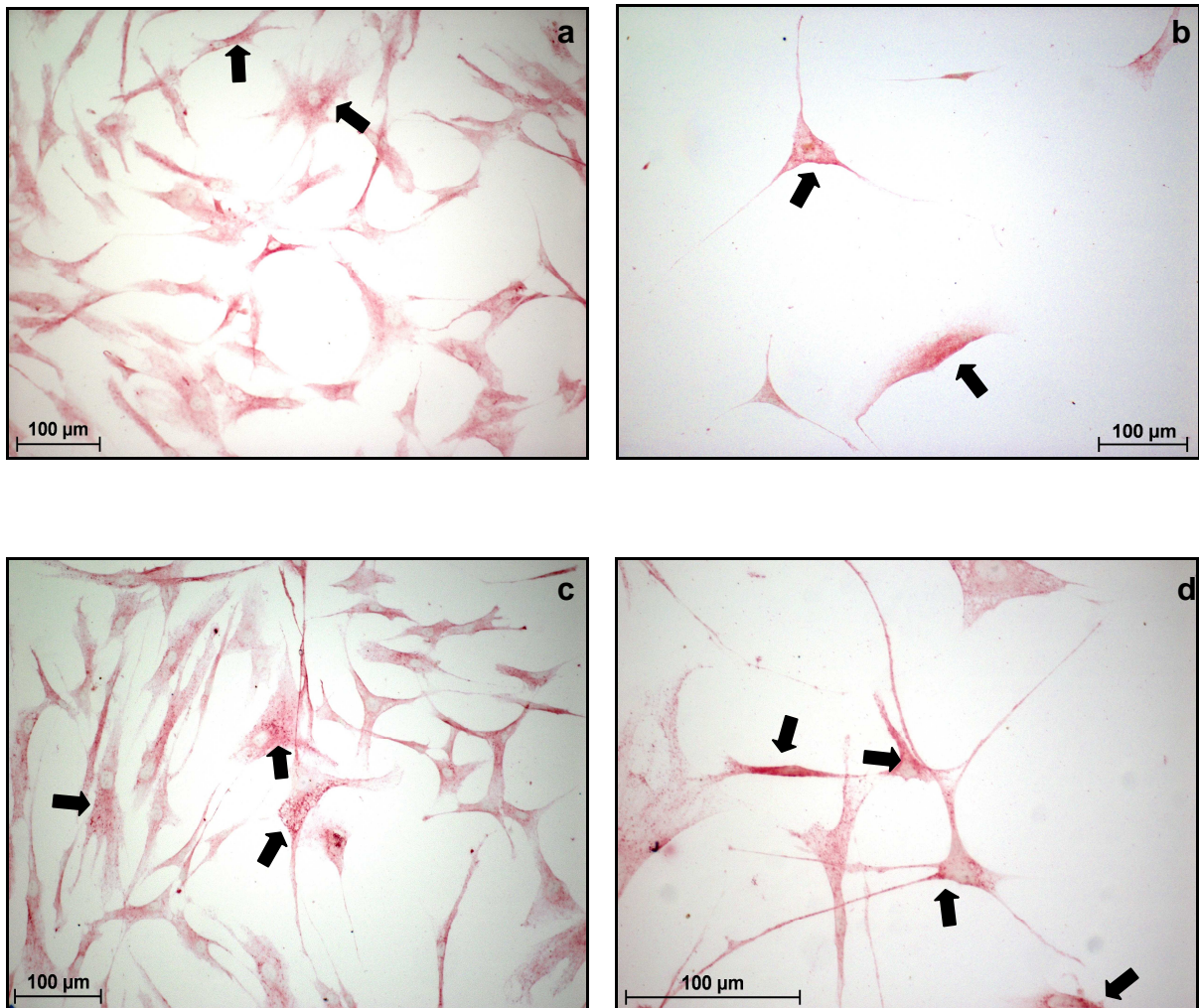


Abb. 10: Immunhistologischer Nachweis von Nestin in Adipose-derived Stem Cells (ASCs) unter Kontroll- (a) bzw. neurogenen Induktionsbedingungen (b); immunhistologischer Nachweis von Nestin in humanen Haut-Stromazellen (SSC) unter Kontroll- (c) bzw. neurogenen Induktionsbedingungen (d).

Sowohl in ASCs als auch in SSCs konnte Nestin als intrazytoplasmatische granulierte Markierung nachgewiesen werden, wobei sich interessanterweise die Markierung unter neurogener Induktion im wesentlichen nicht von der unter Kontrollbedingungen beobachteten abhob.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich interessanterweise sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen eine schwach ausgeprägte granulierte intrazytoplasmatische β -III-Tubulin-Markierung (s. Abb. 11).

Im Gegensatz hierzu waren unter neurogener Induktion zusätzlich sehr vereinzelt Zellen mit in Relation zu der jeweiligen Kontrolle stärker ausgeprägter intrazytoplasmatischer Markierung erkennbar, wobei dies insbesondere in (partiell) spindelförmig elongierten Zellen beobachtet werden konnte.

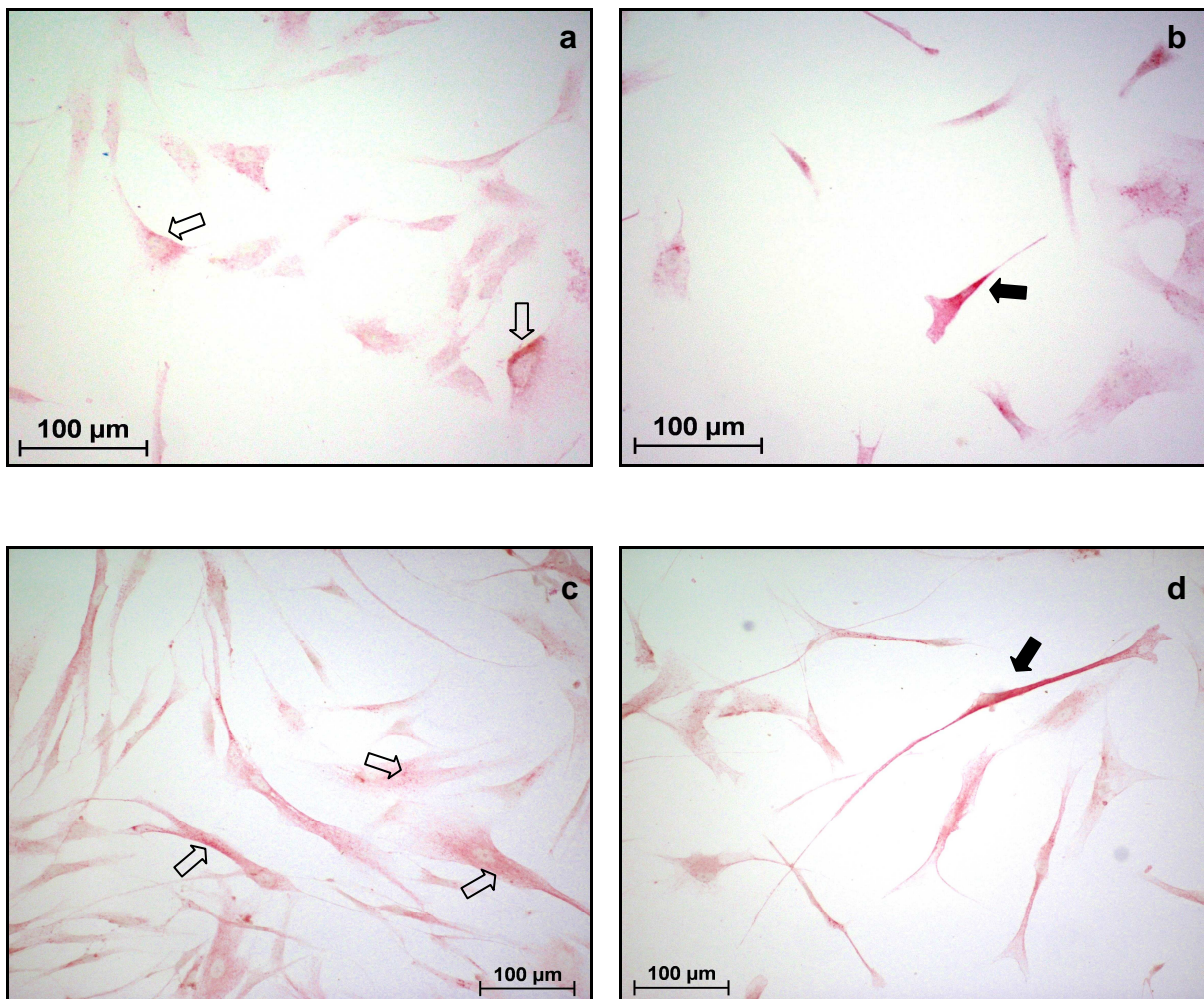


Abb. 11: Immunhistologische Analyse der Expression von β -III-Tubulin in Adipose-derived Stem Cells (ASCs) unter Kontrollbedingungen (a) sowie unter neurogener Induktion (b); immunhistologische Analyse der Expression von β -III-Tubulin in humanen Haut-Stromazellen (SSC) unter Kontrollbedingungen (c) sowie unter neurogener Induktion (d).

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich interessanterweise eine schwach ausgeprägte intrazytoplasmatisch lokalisierte, granulierte Markierung (exemplarisch durch transparente Pfeile markiert). Darüber hinaus fanden sich sowohl in ASC als auch in SSC unter neurogenen Induktionsbedingungen vereinzelte Zellen mit in Relation zu der korrespondierenden Kontrolle intensiver ausgeprägter intrazytoplasmatischer Markierung (schwarzer Pfeil).

4.2 Nachweis des cAMP Response Element Binding-Protein (CREB) in ASC und SSC

Der als *cAMP response element binding-protein* (CREB) bezeichnete Transkriptionsfaktor konnte sowohl in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ASC-Zellen als auch in den vergleichend betrachteten humanen Haut-Stromazellen (SSC) immunhistologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 12). Hierbei stellte sich CREB insbesondere als zytoplasmatisch bzw. deutlich ausgeprägte perinukleär lokalisierte granuliert Markierung dar. Insgesamt zeigte sich in diesem Zusammenhang für alle hier betrachteten ASC-Zelllinien ein vergleichbares Färbemuster; im Falle der SSC-Zellen erschien die Immunreaktivität in Relation zu ASC-Zellen insgesamt betrachtet schwächer ausgeprägt zu sein, wobei das intrazelluläre Verteilungsmuster dem für ASC-Zellen beschriebenen entsprach.

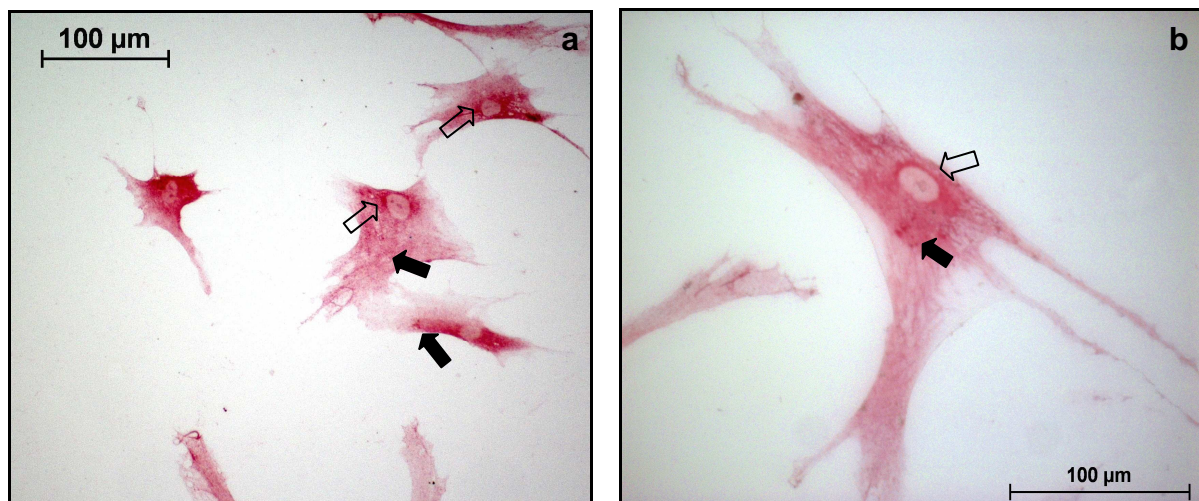


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis des *cAMP-response element binding-protein* (CREB) in Adipose-derived Stem Cells (ASCs) (a) und humanen Haut-Stromazellen (SSCs) (b) unter Standardkulturbedingungen; schwarze Pfeile: CREB intrazytoplasmatisch, transparente Pfeile: CREB perinukleär

5. Untersuchungen zur Zellproliferation

5.1 Proliferation unter neurogener Induktion

Zunächst wurden die Auswirkungen des neurogenen Induktionsmediums (NID) auf das Proliferationsverhalten für die entsprechenden ASC-Zelllinien sowie für humane Haut-Stromazellen (SSC) einzeln untersucht. Eine zusammenfassende graphische Darstellung zeigt Abbildung 13.

Unter neurogenen Induktionsbedingungen (NID) zeigte sich für alle untersuchten ASC-Zelllinien eine signifikante Hemmung des Zellwachstums. Hierbei wurden die Linien ASC 1 und 5 relativ am stärksten gehemmt; es kam hier zu einer Reduktion der Zellzahl auf Werte entsprechend $39,3\% \pm 4,6\%$ der Kontrolle ($p < 0,001$) bzw. $38,7\% \pm 9,4$ der Kontrolle ($p < 0,001$). Im Falle der Linie ASC 3 kam es zu einer Abnahme des Anteils vitaler Zellen auf $53,1\% \pm 8,4\%$ der Kontrolle ($p < 0,001$), während es unter entsprechenden Kulturbedingungen bei den Linien ASC 2 bzw. 4 zu einer Reduktion der Zellzahl entsprechend $65,7\% \pm 13,9\%$ der Kontrolle ($p < 0,001$) bzw. $61,9\% \pm 3,4$ der Kontrolle ($p < 0,001$) kam.

Interessanterweise zeigte auch die untersuchte SSC-Linie unter neurogenen Induktionsbedingungen eine signifikante Hemmung des Zellwachstums; diese war jedoch mit einer Reduktion der Zellzahl auf $72,6\% \pm 9,2\%$ der Kontrolle ($p < 0,001$) in Relation zu den getesteten ASC-Zelllinien merklich schwächer ausgeprägt.

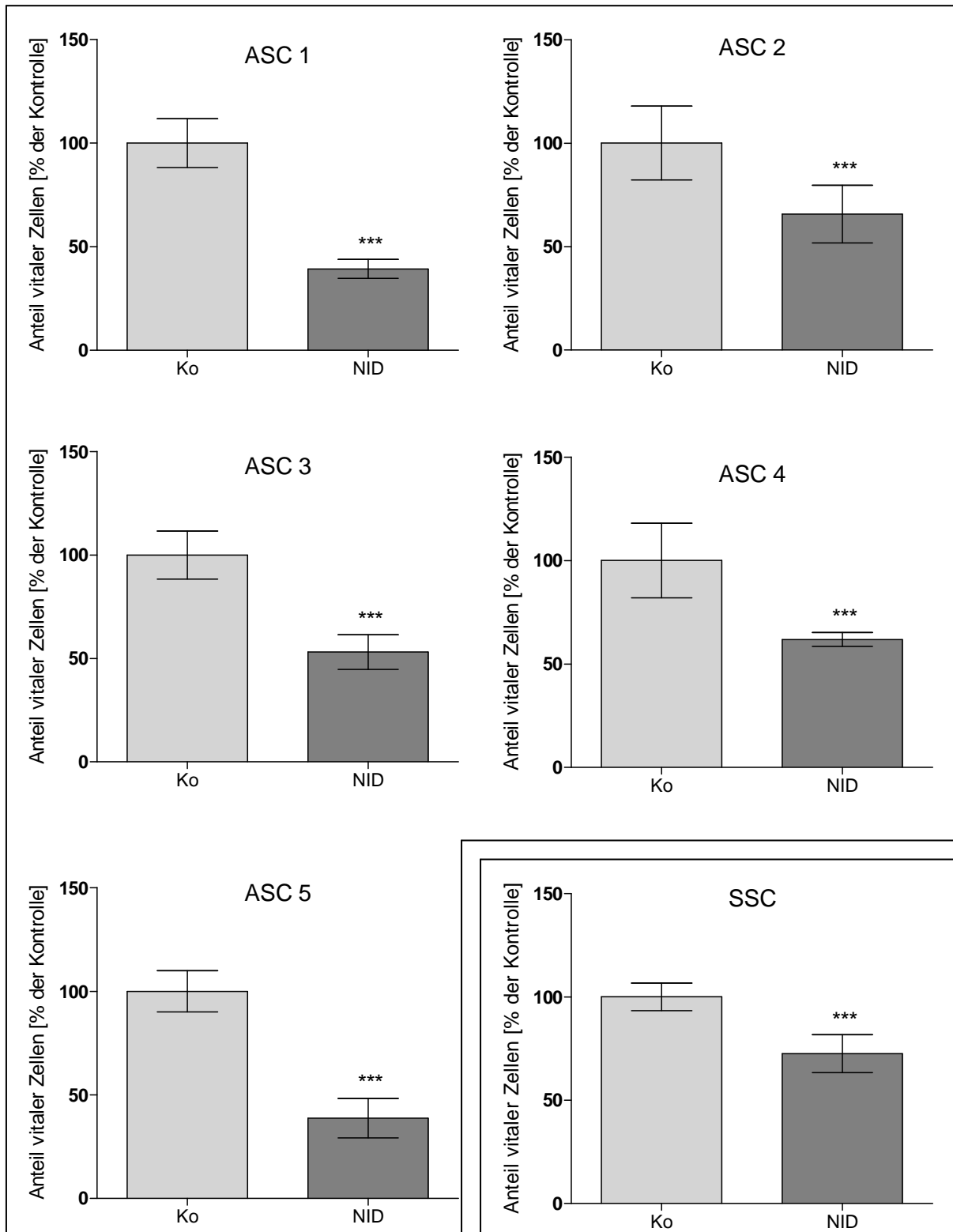


Abb. 13: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung des neurogenen Induktionsmediums (NID) auf das Proliferationsverhalten der untersuchten ASC-Zelllinien sowie der humanen Haut-Stromazellen (SSC); in allen Fällen zeigt sich ein hoch signifikanter antiproliferativer Effekt von NID in Relation zu der korrespondierenden Kontrolle (Ko).

*** = $p < 0,001$

5.2 Proliferation unter Berücksichtigung der Einzelsubstanzen

In einem zweiten Schritt sollten die Einzelkomponenten des neurogenen Induktionsmediums (NID) hinsichtlich ihres antiproliferativen Potentials untersucht werden, um ggfs. so den beobachteten Effekt detaillierter analysieren zu können. Eine graphische Übersicht der Ergebnisse zeigt Abbildung 14.

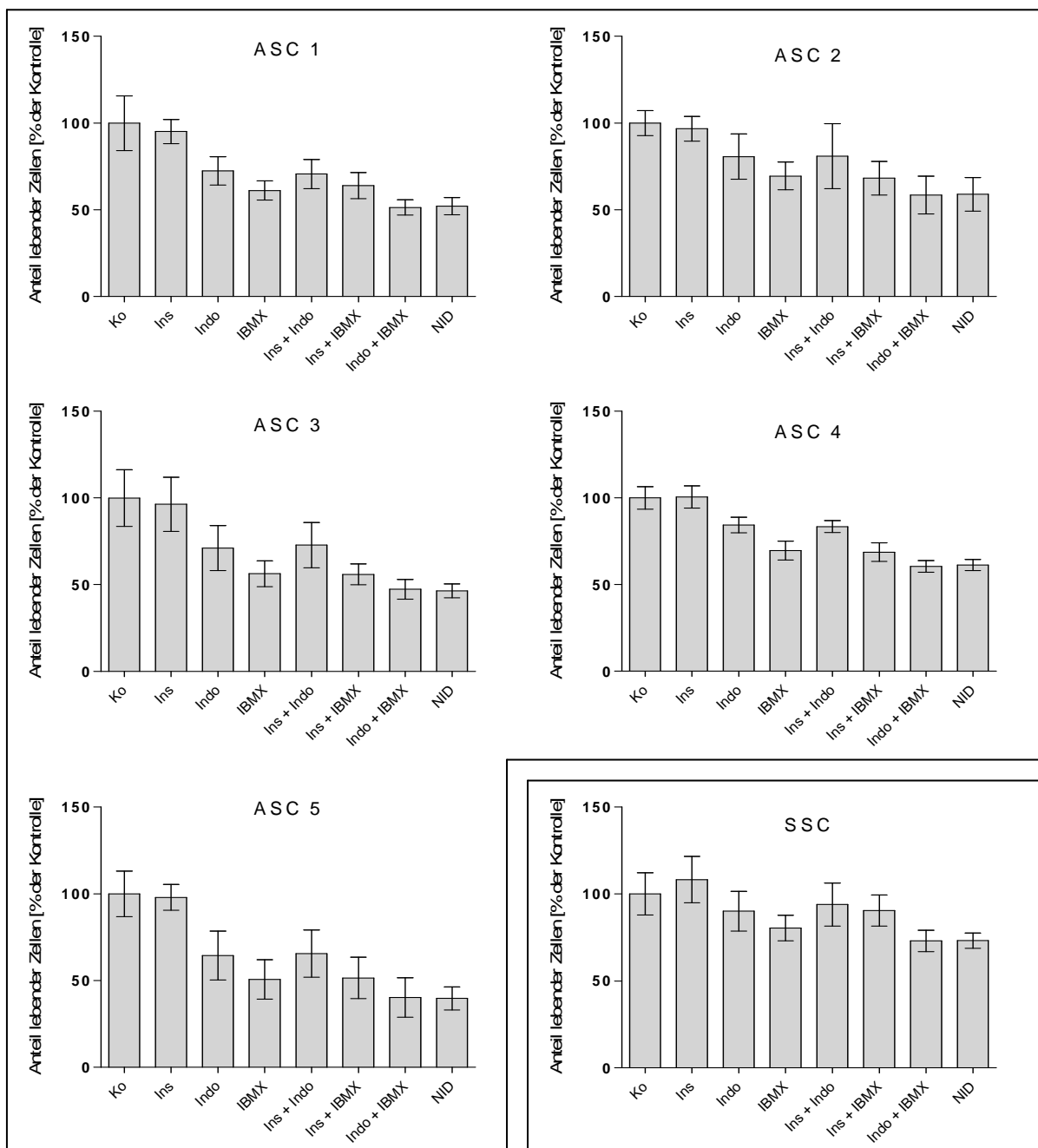


Abb. 14: Effekt der getesteten Einzelsubstanzen bzw. Substanzkombinationen auf das Proliferationsverhalten von ASC bzw. SSC Nach einer Gesamtkubationszeit von 5 Tagen

Ko = Kontrolle (1% EtOH); Ins = Insulin; Indo = Indomethacin; IBMX = Isobutylmethylxanthin

Für die getesteten Einzelsubstanzen zeigte sich für alle ASC-Zelllinien sowie für die SSC-Linie folgendes Bild:

Unter der Zugabe von Insulin kam es bei keiner der untersuchten ASC-Linien zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Zellzahl in Relation zur Kontrolle; im Mittel lag hierbei der relative prozentuale Anteil vitaler Zellen in einem Bereich zwischen 95,1% (ASC 1) und 100,6% (ASC 4) der Kontrolle ($p \approx 0,34 - 0,84$); die SSC-Linie zeigte im Vergleich zur Kontrolle einen geringen pro-proliferativen Effekt entsprechend einer mittleren Zunahme des Anteils vitaler Zellen um ca. 8,2% auf $108,2\% \pm 13,3\%$, welcher jedoch im Vergleich zu der korrespondierenden Kontrolle ebenfalls statistisch nicht signifikant ausfiel ($p \approx 0,13$).

Im Gegensatz hierzu konnte für Indomethacin bei allen untersuchten ASC-Linien eine signifikante Abnahme des Anteils vitaler Zellen in Relation zur Kontrolle beobachtet werden ($p < 0,001$); im Mittel lag hierbei der prozentuale Anteil vitaler Zellen in Relation zur Kontrolle bei $64,4\% \pm 14,1\%$ (ASC 5), $71,1\% \pm 13,0\%$ (ASC 3), $72,5\% \pm 8,2\%$ (ASC 1), $80,7\% \pm 13,0\%$ (ASC 2) und $84,3\% \pm 4,5\%$ (ASC 4). Bei den vergleichend betrachteten humanen Haut-Stromazellen (SSC) konnte indes kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollwerten festgestellt werden ($p > 0,05$). Hier betrug der mittlere Anteil vitaler Zellen in Relation zur Kontrolle $90,1\% \pm 11,4\%$.

Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX rief – verglichen mit den entsprechenden Kontrollwerten – bei allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Hemmung der Proliferation hervor ($p < 0,001$), welcher jedoch im Falle der humanen SSC-Zelllinie relativ betrachtet am schwächsten ausgeprägt war und sich von den Linien ASC 1 ($p < 0,01$), ASC 3 ($p < 0,001$) und ASC 5 ($p < 0,001$) signifikant abhob. Im Mittel kam es hier bei den untersuchten ASC-Linien zu einer Reduktion des relativen Anteils vitaler Zellen auf $50,8\% \pm 11,4\%$ (ASC 5), $56,3\% \pm 7,5\%$ (ASC 3), $61,2\% \pm 5,4\%$ (ASC 1), $69,5\% \pm 8,0\%$ (ASC 2) und $69,6\% \pm 5,4\%$ (ASC 4); für SSC-Zellen konnte im Gegensatz hierzu lediglich eine Abnahme auf im Mittel $80,4\% \pm 7,4\%$ beobachtet werden. Zudem kam es sowohl bei ASC- als auch bei SSC-Zellen unter IBMX zu einer statistisch signifikanten Änderung der Proliferation gegenüber der Behandlung mit Insulin ($p < 0,001$) bzw. Indomethacin ($p < 0,05 - p < 0,001$). Die einzige Ausnahme stellte hierbei die Linie ASC 2 dar; hier kam es im Falle von IBMX zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber Indomethacin ($p = 0,058$).

Mit Blick auf die getesteten Substanzkombinationen zeigte sich für die untersuchten ASC-Zelllinien, dass es unter gleichzeitiger Zugabe von Insulin nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung des antiproliferativen Effektes von Indomethacin bzw. IBMX gegenüber deren Einzeltestungen kam ($p > 0,05$). Im Falle der SSC zeigte sich in diesem Zusammenhang ein abweichendes Bild: in beiden Fällen konnte hier erneut ein pro-proliferativer Effekt des Insulins beobachtet werden. Dieser fiel in der Kombination mit Indomethacin mit ca. 3,9% ($p > 0,05$) deutlich geringer aus als in Verbindung mit IBMX; hier kam es in Verbindung mit Insulin zu einer statistisch signifikanten Veränderung im Sinne einer Abmilderung des antiproliferativen Effektes entsprechend ca. 10% gegenüber der alleinigen Behandlung mit IBMX ($p < 0,01$).

Interessanterweise zeigte die Kombination von Indomethacin und IBMX bei allen Zelllinien eine erkennbare Zunahme des wachstumshemmenden Effektes gegenüber den jeweiligen Einzeltestungen bzw. der Kombination der entsprechenden Einzelsubstanz mit Insulin. Im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Indomethacin kam es hier zu einer statistisch signifikanten Zunahme des antiproliferativen Effektes ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Entsprechende Ergebnisse zeigten sich hierbei auch gegenüber einer Monotherapie mit IBMX ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). Im Mittel kam es hier bei den untersuchten ASC-Zelllinien zu einer Abnahme des Anteils vitaler Zellen bezogen auf die korrespondierende Kontrolle auf 40,3% \pm 11,4% (ASC 5), 47,3% \pm 5,7% (ASC 3), 51,4% \pm 4,4% (ASC 1), 58,6% \pm 10,9% (ASC 2) und 60,5% \pm 60,5% \pm 3,4% (ASC 4); die humanen Haut-Stromazellen zeigten im Vergleich hierzu lediglich eine Abnahme auf 72,9% \pm 6,1%. In allen Fällen kam es darüber hinaus zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl in Relation zur Kontrolle ($p < 0,001$).

In Anwesenheit des neurogenen Induktionsmediums (NID) kam es erwartungsgemäß bei allen hier untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl in Relation zur Kontrolle ($p < 0,001$). Für die untersuchten ASC-Linien zeigte sich hierbei im Mittel eine Reduktion auf 39,8% \pm 6,6% (ASC 5), 46,4% \pm 4,0% (ASC 3), 52,2% \pm 5,0% (ASC 1), 59,0% \pm 9,7% (ASC 2) und 61,2% \pm 3,2% (ASC 4); im Falle der SSC-Linie zeigte sich eine Abnahme auf 73,1% \pm 4,4%. Der unter neurogener Induktion beobachtete antiproliferative Effekt fiel zudem gegenüber der alleinigen Behandlung mit Indomethacin ($p < 0,05$ – $0,001$) bzw. IBMX ($p < 0,01$ – $0,001$) statistisch signifikant aus.

Interessanterweise konnte sowohl für ASCs als auch für humane SSCs hinsichtlich des gemessenen antiproliferativen Effektes kein zahlenmäßiger bzw. statistisch signifikanter Unterschied zwischen der als neurogenes Induktionsmedium bezeichneten Substanzkombination und der Verbindung von Indomethacin und IBMX festgestellt werden ($p=0,59 - 0,94$), so dass es sich hierbei offensichtlich um einen kombinierten (additiven?) antiproliferativen Effekt des Cyclooxygenase-Hemmers Indomethacin einerseits und des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX andererseits handelt, wobei letzterer offenkundig das stärkste antiproliferative Potential der hier getesteten Einzelsubstanzen aufwies.

Im Gegensatz zu den hier untersuchten Adipose-derived Stem Cells (ASCs) konnte für die vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen ein deutlich verminderter antiproliferativer Effekt der getesteten Einzelsubstanzen als auch insbesondere des neurogenen Induktionsmediums beobachtet werden. Hierbei könnten sowohl ein pro-proliferativer Effekt des Insulins als auch insbesondere ein vermindertes Ansprechen dieser Zellen auf den Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX eine Rolle spielen.

5.3 Vergleichende Betrachtung des antiproliferativen Effektes unter neurogener Induktion

Um eine abschließende Aussage über den antiproliferativen Effekt des neurogenen Induktionsmediums (NID) auf die untersuchten Zelllinien (ASC bzw. SSC) treffen zu können, wurden die im Rahmen der Proliferationsexperimente gewonnenen Daten zusammengefasst; anschließend wurde der Einfluss auf das Wachstumsverhalten der jeweiligen Zelllinie vergleichend betrachtet (s. Abbildung 15).

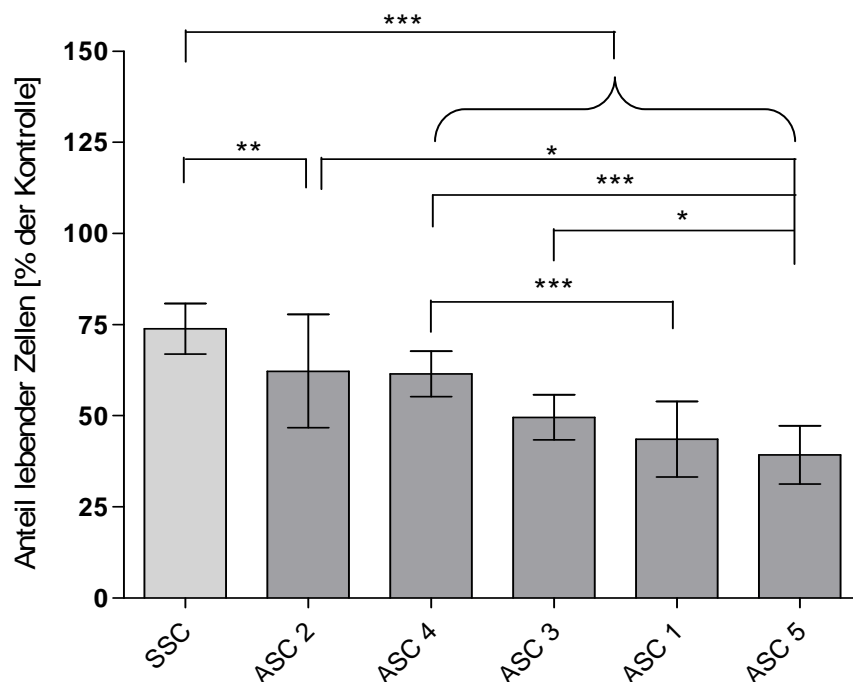


Abb. 15: Antiproliferativer Effekt des neurogenen Induktionsmediums (NID) auf Adipose-derived Stem Cells (ASC) und humane Haut-Stromazellen (SSC): Im Falle der untersuchten ASC-Zelllinien zeigt sich in Relation zu den humanen SSCs ein signifikant höherer antiproliferativer Effekt des neurogenen Induktionsmediums. Zudem finden sich signifikante Unterschiede innerhalb der ASC-Gruppe.
Anteil vitaler Zellen in Relation zu der korrespondierenden Kontrolle (= 100%);

* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$

Hierbei fand sich hinsichtlich des unter neurogener Induktion (NID) beobachteten antiproliferativen Effektes ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten ASC-Zelllinien und den vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Während Letztere in Relation zur Kontrolle im Mittel eine Reduktion des Anteils vitaler Zellen auf $73,9\% \pm 6,9\%$ erkennen ließen, war diese im Falle der ASC-Zelllinien mit einer Reduktion auf Werte von $39,3\% \pm 8\%$ (ASC 5), $43,6\% \pm 10,3\%$ (ASC 1), $49,6\% \pm 6,2\%$ (ASC 3), $61,5\% \pm 6,2\%$ (ASC 4) und $62,3\% \pm 15,5\%$ (ASC 2) deutlich ausgeprägter, so dass die hier betrachteten humanen ASC-Linien unter neurogener Induktion in ihrem Wachstum insgesamt signifikant besser gehemmt wurden als als SSC-Zellen.

Zudem zeigte sich, dass der wachstumshemmende Effekt unter neurogener Induktion bei den einzelnen ASC-Zelllinien signifikant unterschiedlich ausgeprägt war. Dieser war im Falle der Linie ASC 5 mit einer Abnahme des Anteils vitaler Zellen

in Relation zur Kontrolle auf $39,3\% \pm 8,0\%$ am stärksten ausgeprägt, wobei diese signifikant besser gehemmt wurde als die Linien ASC 2 ($60,8\% \pm 15,5\%$; $p < 0,05$), ASC 3 ($49,6\% \pm 6,2\%$; $p < 0,05$) und ASC 4 ($61,5\% \pm 6,2\%$; $p < 0,001$); kein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch im Vergleich zu der Linie ASC 1 ($43,6\% \pm 10,3\%$; $p > 0,05$). Die Linie ASC 1 zeigte ebenfalls eine signifikant bessere Hemmung im Vergleich zu der Linie ASC 4 ($p < 0,001$), wohingegen sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Linien ASC 2 bzw. 3 fand ($p > 0,05$). Zwischen den Linien ASC 2, 3 und 4 fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Aufgrund der Tatsache, dass für humane *Adipose-derived Stem Cells* ein Einfluss des Donor-Alters auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen in vitro (Lei et al., 2007) sowie eine mit dem Alter abnehmende Differenzierungskapazität stromaler Zellen des subkutanen Fettgewebes (SVF) beschrieben ist (Hauner et al., 1989), wurde der unter neurogener Induktion (NID) beobachtete antiproliferative Effekt in Beziehung zu dem Alter des jeweiligen Donors gesetzt (Abb. 16):

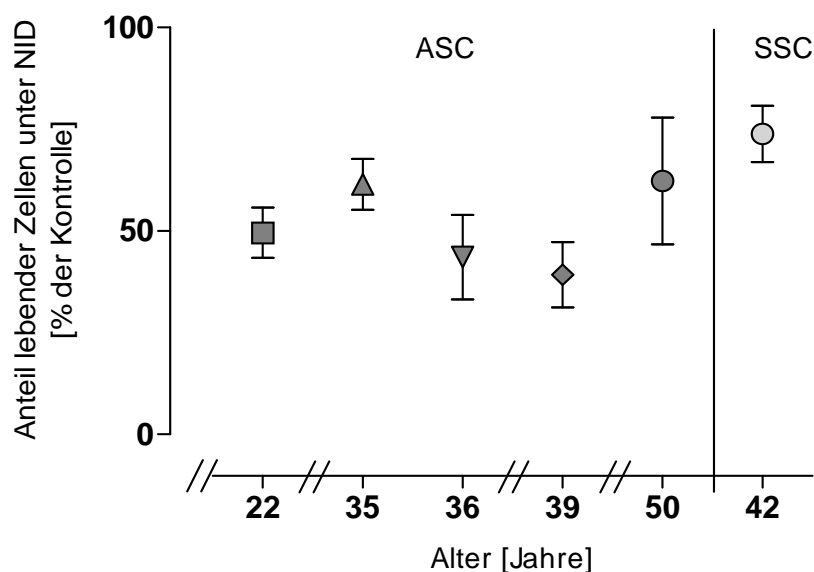


Abb. 16: Antiproliferativer Effekt auf die untersuchten ASC-Zelllinien unter neurogener Induktion (NID) in Relation zum Alter des Donors; vergleichend ist die Linie SSC dargestellt: Eine direkte Abhängigkeit des unter NID beobachteten antiproliferativen Effektes und dem Alter des jeweiligen Donors wird nicht erkennbar.

Basierend auf den hier zur Verfügung stehenden Daten wurde eine direkte Abhängigkeit des für die untersuchten ASC-Zelllinien beobachteten und z. T. signifikant unterschiedlichen antiproliferativen Effektes von dem Alter des jeweiligen Donors nicht erkennbar.

6. Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes und der Zellzyklusphasen

Im Rahmen der Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes nach DNS-Fluoreszenzmarkierung mittels DRAQ5 sowie der hierauf aufbauenden Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte zunächst die vergleichende Betrachtung der prozentualen Verteilung der Zellpopulation auf die Phasen G1 und G2/M unter Kontroll- bzw. Induktionsbedingungen (NID) wie in Abbildung 17 dargestellt.

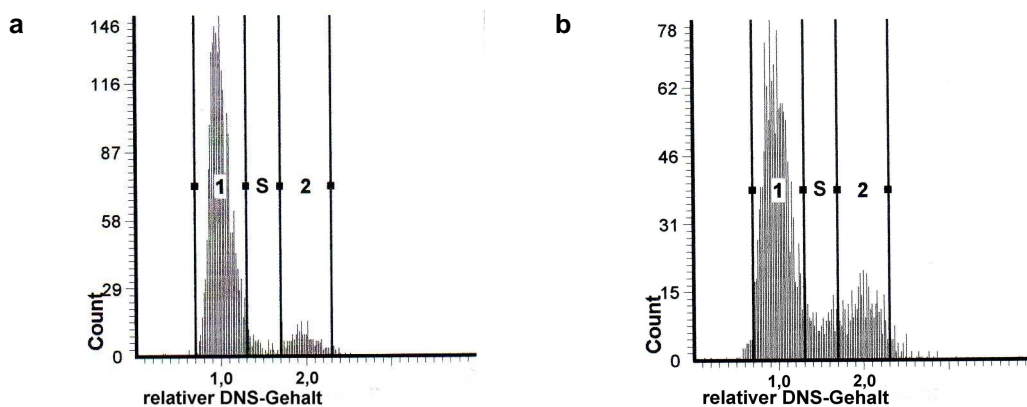


Abb. 17: Bestimmung der Phasen G1 (1) und G2/M (2) mittels DRAQ5 unter Kontrollbedingungen (a) sowie unter neurogener Induktion (b) nach einer Gesamtinkubationszeit von 5 Tagen ($n \approx 2.000$): Die Auswertung zeigt unter neurogener Induktion eine deutliche Abnahme des G1-Anteiles mit Verlagerung in die Phasen S und G2/M. Die Abbildung ist für ASC- sowie SSC-Zellen repräsentativ.

Hierbei zeigten interessanterweise sowohl ASC- als auch SSC-Zellen unter neurogener Induktion (NID) eine signifikante Reduktion des G1-Anteiles im Vergleich zu der korrespondierenden Kontrolle (s. Abb. 18). Diese war im Falle der Linie ASC 2 mit einer mittleren Reduktion um ca. 13,3% relativ am stärksten ausgeprägt (74,3% vs. 61,0%; $p < 0,001$); im Gegensatz hierzu zeigte die Linie ASC 5 lediglich eine mittlere Abnahme des G1-Anteils um 7,5 % (71,0% vs. 63,5%; $p < 0,001$), wobei hierbei der bereits unter Kontrollbedingungen deutlich geringere und sich von den Linien ASC 3 ($p < 0,01$) bzw. ASC 4 ($p < 0,05$) sowie der Linie SSC ($p < 0,05$) statistisch signifikant abhebende G1-Anteil dieser Linie zu berücksichtigen ist. Die Linien ASC 1 (78,1% vs. 67,5%, -10,6%; $p < 0,001$), ASC 3 (78,7% vs. 69,0%, -9,7%; $p < 0,01$) und ASC 4 (79,1% vs. 66,7%, -12,4%; $p < 0,001$) zeigten eine vergleichbare Reaktion. Die

Linie SSC liess sich zudem mit einer mittleren Reduktion des G1-Anteiles um 11,8% (78,7% vs. 63,5%, $p < 0,001$) nicht von den hier untersuchten ASC-Linien abgrenzen. Parallel hierzu kam es unter Induktionsbedingungen zu einer statistisch signifikanten Zunahme des G2/M-Anteils, wie der Vergleich mit den unter Kontrollbedingungen erhobenen Werten zeigte; lediglich im Falle der Linie ASC 5 ließ sich im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihe keine statistisch signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle erkennen (-0,4%; $p \approx 0,675$). Auch hier sei jedoch auf den sich bereits unter Kontrollbedingungen relativ hoch darstellenden G2/M-Anteil dieser Linie verwiesen. Entsprechend dem sich mit Blick auf die G1-Phase darstellenden Bild zeigte auch hier die Linie ASC 2 mit einer mittleren Zunahme um 6,2% (10,2% vs. 16,4%, $p < 0,001$) die deutlichsten Veränderungen. Diese waren im Falle von ASC 1 (9,3% vs. 12,6%, +3,3%; $p < 0,01$), ASC 3 (11,3% vs. 13,3%, +2%; $p < 0,05$) und ASC 4 (12,3% vs. 15,9%, +3,6%; $p < 0,05$) merklich geringer ausgeprägt, jedoch nachwievor gut von den jeweiligen unter Kontrollbedingungen erhobenen Werten abgrenzbar.

Auch die vergleichend betrachteten humanen Haut-Stromazellen (SSC) zeigten mit einer mittleren Zunahme des G2/M-Anteils von 4,6% (8,3% vs. 12,9%, +4,6%; $p < 0,05$) unter Induktionsbedingungen eine mit ASC vergleichbare Reaktion.

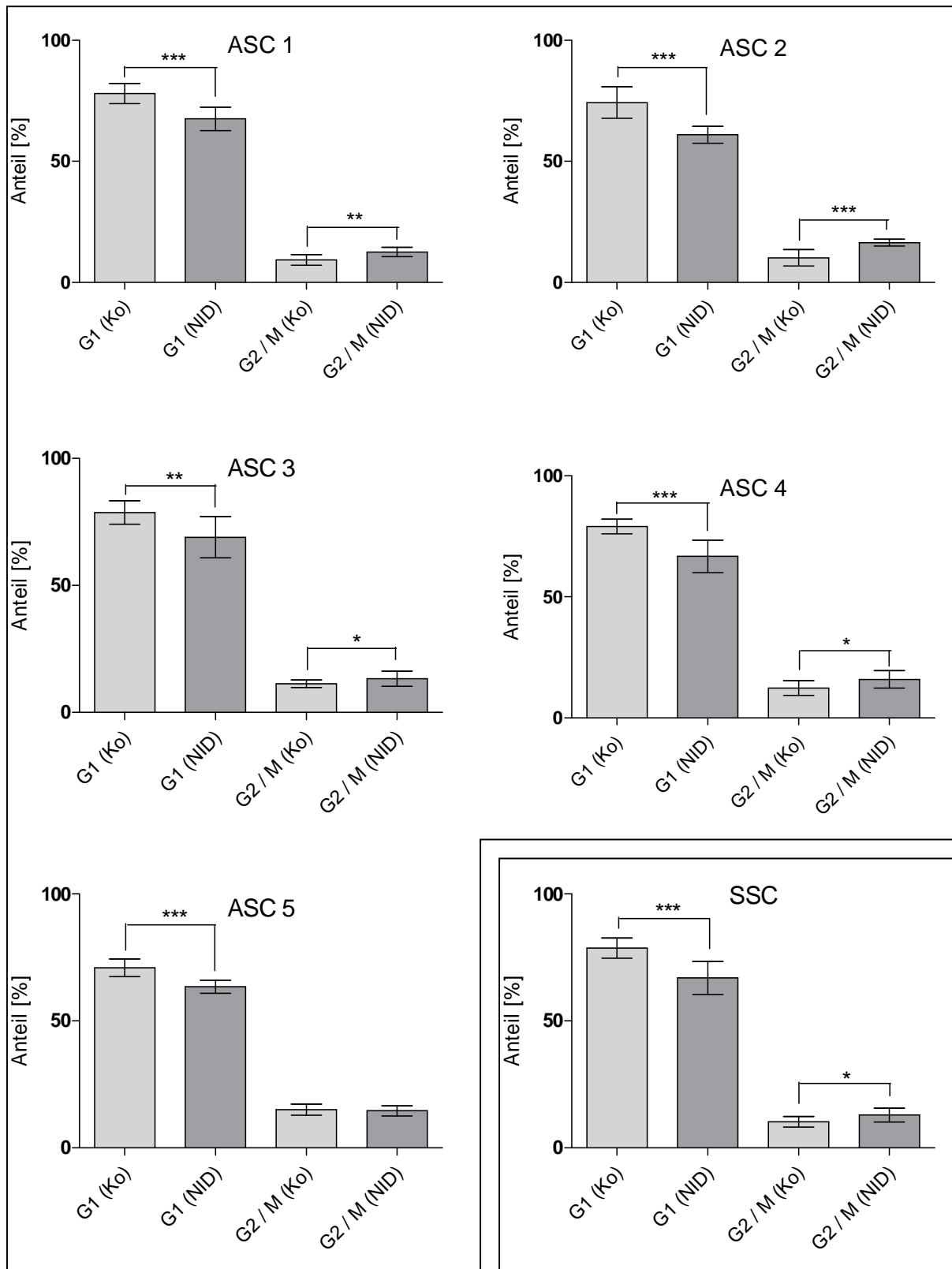


Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Zellpopulation auf die Phasen G1 und G2/M des Zellzyklus unter Kontrollbedingungen (Ko) bzw. neurogener Induktion (NID) nach insgesamt 5 Tagen: Es zeigt sich unter NID in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Abnahme des G1-Anteiles sowie eine signifikante Zunahme des G2/M-Anteiles; lediglich die Linie ASC 5 weist keine nachweisbare Veränderung innerhalb der G2/M-Phase auf.

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

In einem zweiten Schritt sollte eine detailliertere Betrachtung dieser unter Induktionsbedingungen erkennbaren Zellzyklus-Veränderungen vorgenommen werden. Hierzu wurden insgesamt 5 Phasen gemäß des in Abbildung 19 dargestellten Schemas abgegrenzt, welche als G1b-, S-, G2-, M- und G1a-Phase definiert wurden, und die jeweilige prozentuale Verteilung der Zellpopulation auf diese Phasen unter Kontroll- bzw. Induktionsbedingungen vergleichend betrachtet.

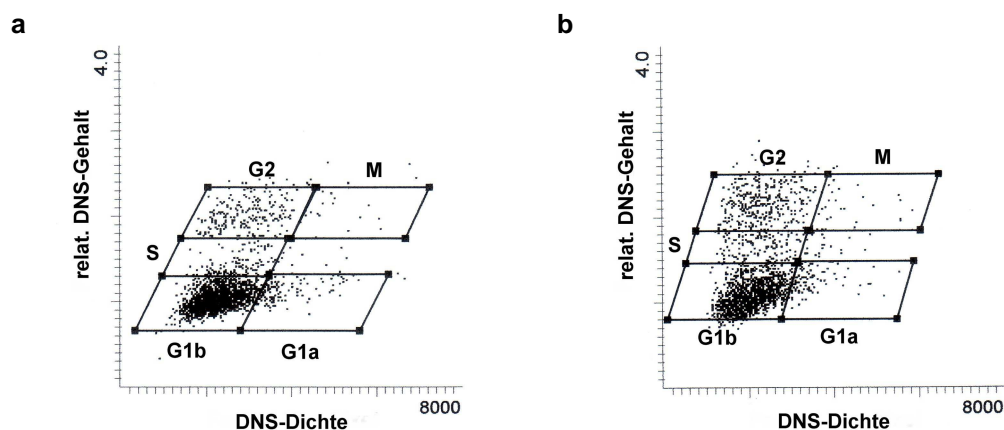


Abb. 19: Darstellung der DNS-Dichte in Relation zum relativen DNS-Gehalt: Unterteilung des Zellzyklus in die Phasen G1b, S, G2, M und G1a unter Kontrollbedingungen (a) bzw. unter neurogener Induktion (b) ($n \approx 2000$): Unter Induktion wird eine Abnahme des G1b-Anteiles deutlich. Parallel hierzu zeigt sich eine Verlagerung der Zellpopulation in die Phasen S und G2. Die Abbildung ist für ASC- und SSC-Zellen repräsentativ.

Auch hier zeigte sich zunächst eine signifikante Reduktion der als G1b bezeichneten späten G1-Phase, wobei diese im Falle der individuellen Zelllinien hinsichtlich ihrer Ausprägung im Wesentlichen dem zuvor erlernten Muster entsprach (s. Abb. 20). Ergänzend wurde nunmehr zudem sowohl bei den hier untersuchten ASC-Isolaten als auch bei der vergleichend betrachteten Linie SSC eine statistisch signifikante Erhöhung des S-Phasen-Anteiles (S) erkennbar. Diese war interessanterweise mit einer mittleren Zunahme von 7,7% bei den humanen Haut-Stromazellen (SSC) ausgeprägter als bei ASC, welche zusammenfassend eine mittlere Zunahme von 5,3% aufwiesen, jedoch war dieser Unterschied nicht als signifikant zu bewerten ($p > 0,05$).

Parallel hierzu fand sich unter neurogener Induktion (NID) eine signifikante Zunahme innerhalb der G2-Phase; einzig die Linie ASC 5 wies – entsprechend den zuvor für die G2/M-Phase dargelegten Ergebnissen – keine nachweisliche Veränderung gegenüber den unter Kontrollbedingungen erhobenen Werten auf ($p > 0,05$).

Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, kam es mit Blick auf die M-Phase unter den hier näher betrachteten neurogenen Induktionsbedingungen zu keiner zahlenmäßigen Veränderung des mitotischen Anteils der Zellpopulation gegenüber den korrespondierenden Kontrollen ($p > 0,05$). Berücksichtigt man jedoch den entsprechenden G2-Anteil, so wird deutlich, dass das Verhältnis von M- zu G2-Phase und damit der von der G2- in die Mitose-Phase übertretende Anteil der Population unter neurogener Induktion bei allen hier untersuchten Zelllinien abnahm. Darüber hinaus zeigte sich interessanterweise sowohl bei ASCs als auch SSCs eine signifikante Abnahme des als G1a definierten frühen bzw. postmitotischen G1-Anteiles.

Insgesamt zeigte sich somit unter neurogener Induktion (NID) das Bild eines vermehrten Eintretens in den Zellzyklus (Abnahme in G1b bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme des S-Phasen-Anteiles) und Arretierung im Bereich der G2-Phase bzw. einer verzögert ablaufenden G2-M-Transition (Zunahme des G2-Anteiles, Abnahme des relativen M-Phasen-Anteiles im Vergleich zur G2-Phase und Reduktion des G1a-Anteiles).

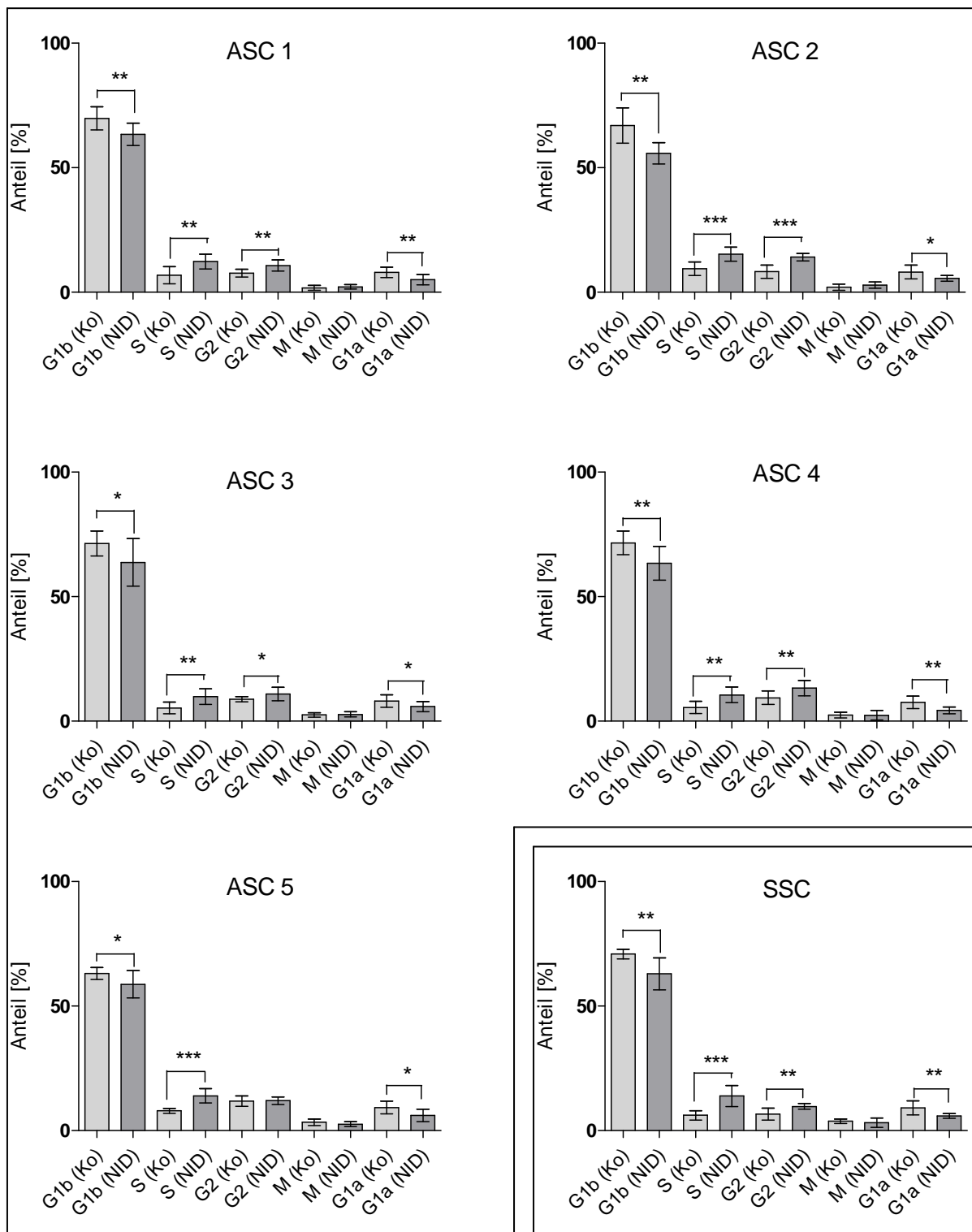


Abb. 20: Prozentuale Verteilung der Zellpopulation auf die Phasen G1b, S, G2, M und G1a unter Kontrollbedingungen (Ko) bzw. unter neurogener Induktion (NID) nach einer Gesamtinkubationszeit von 5 Tagen: Parallel zu einer signifikanten Reduktion des G1b-Anteiles zeigt sich eine signifikante Zunahme des S- bzw. des G2-Anteiles sowie eine signifikante Reduktion des postmitotischen G1a-Anteiles; zudem fällt eine Abnahme des Verhältnisses von M- zu G2-Phase auf. Insgesamt spiegelt dies ein vermehrtes Eintreten in den Zellzyklus bei gleichzeitiger Arretierung im Bereich der G2/(M)-Phase wider.

* = p<0,05

** = p< 0,01

*** = p<0,001

7. Analyse der Genexpression unter neurogener Induktion (NID)

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Analyse der Genexpression bzw. deren Veränderungen unter neurogener Induktion (NID) fokussierte gezielt auf relativ frühe Zeitpunkte, um so insbesondere die initialen Prozesse einer möglichen neurogenen (Trans-) Differenzierung erfassen zu können.

Eine zusammenfassende Übersicht der hierbei im Vordergrund stehenden Ergebnisse findet sich in Tabelle 9:

Gensymbol	Gen- / Proteinname	relative Änderung der Expression			
		6h		12h	
		ASC	SSC	ASC	SSC
ATF2	activating transcription factor 2 (=CRE-BP1)	0,6	-	-	-
ATF4	activating transcription factor 4 (= CREB 2)	1,8	-	1,5	1,3
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	1,6	-	1,7	-
CCNB1	Cyclin B1	0,6	-	-	-
CCND1	Cyclin D1	-	0,5	0,5	0,4
CCND3	Cyclin D3	-	-	-	0,4
CCNE2	Cyclin E2	-	-	0,4	-
CDC6	cell division cycle 6	-	1,4	0,4	-
CDC20	cell division cycle 20	0,5	-	0,5	-
CDC25A	cell division cycle 25A	1,4	-	0,4	-
CDC25C	cell division cycle 25C	-	-	1,6	-
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (= p16)	-	0,5	0,05	-
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (= p15)	0,4	0,3	-	-
CREB1	cAMP response element binding protein 1	-	-	1,6	-
CREBBP	CREB binding protein (=CBP)	0,6	-	-	-
CREM	cAMP response element modulator	5,4	1,4	1,5	1,9
GFAP	glial fibrillary acid protein	1,3	-	-	-
HES1	hairy and enhancer of split homolog 1	1,4	-	1,4	2,4
NUMB	Numb homologue	0,4	0,5	0,4	0,4
PDE1C	unspezifische cAMP / cGMP Phosphodiesterase 1C	-	-	0,4	0,4
PDE4A	cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4A	0,5	0,5	0,5	0,5
PDE4B	cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4B	-	2,4	-	2,3
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase2 = COX2	2,9	3,6	3,0	5,5
SOX4	sex determining region Y box 4	1,3	1,4	1,8	1,7
TUBB3	β-III-Tubulin	-	-	1,6	-
VIM	Vimentin	1,5	-	-	-
ZF	Zhangfei transcription factor	1,6	1,7	-	1,6

Tab. 9: Veränderung der Genexpression in *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) und humanen Haut-Stromazellen (SSC) unter neurogener Induktion (NID); dargestellt ist die relative Veränderung des zellulären mRNA-Gehaltes in Relation zur korrespondierenden Kontrolle zu dem genannten Zeitpunkt nach Zugabe des Induktionsmediums.

Unter neurogener Induktion fand sich innerhalb des betrachteten Zeitfensters interessanterweise eine vermehrte Expression bzw. Induktion von Genen, die für Transkriptionsfaktoren der sog. CREB-ATF-Familie kodieren (s. Tab. 9). So zeigte sich im Falle der hier untersuchten ASC-Zellen nach 6 Stunden Induktion ein in Relation zur Kontrollgruppe 5,4-fach erhöhter relativer mRNA-Gehalt des *cAMP-response-element modulators* (CREM), nach 12 Stunden war eine Erhöhung um den Faktor 1,5 nachweisbar. Im Gegensatz hierzu fand sich für die parallel betrachteten SSC-Zellen innerhalb desselben Zeitfensters lediglich eine Erhöhung des relativen CREM-mRNA-Gehaltes um den Faktor 1,4 (6h) bzw. 1,9 (12h). Dieses könnte als Ausdruck einer differierenden zeitlichen Expressionskinetik von CREM in ASCs einerseits bzw. SSCs andererseits unter neurogener Induktion aufgefasst werden.

In ASC-Zellen konnte zudem unter neurogener Induktion nach 12 Stunden eine Erhöhung der Expression des *cAMP response element binding-proteins 1* (CREB1) um den Faktor 1,6 nachgewiesen werden, wohingegen sich nach 6 Stunden noch keine Veränderung der Expression gegenüber der korrespondierenden Kontrolle zeigte. Im Gegensatz hierzu kam es in SSC-Zellen unter entsprechenden Bedingungen an keinem der betrachteten Zeitpunkte zu einer sich von der Kontrolle abgrenzenden CREB1-Expression. Auch hier könnte eine unterschiedliche Expressionskinetik vermutet werden.

Ergänzend fand sich in ASC-Zellen nach 6 Stunden eine um den Faktor 0,6 verminderte Expression des Kofaktors *CREB binding-protein* (CREBBP = CBP); keine Veränderung gegenüber der Kontrolle fand sich hingegen nach einem Induktionszeitraum von 12 Stunden. In humanen SSC-Zellen ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine von der Kontrolle abweichende Expression des CBP nachweisen.

Unter neurogenen Induktionsbedingungen zeigte sich zudem in ASC-Zellen nach 6 Stunden eine um den Faktor 0,6 verminderte Expression des *activating transcription factor 2* (ATF2). Im Gegensatz hierzu fand sich sowohl in humanen ASC- als auch SSC-Zellen eine in Relation zur Kontrolle erhöhte Expression von *activating transcription factor 4* (ATF4 = CREB2). Hierbei fand sich in ASC-Zellen nach 6 Stunden eine Erhöhung um den Faktor 1,8, nach 12 Stunden um den Faktor 1,5. Für die vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen konnte nach 6 Stunden keine Veränderung der ATF4-Expression gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden, jedoch fand sich nach 12 Stunden eine um den Faktor 1,3 erhöhte Genexpression dieses Transkriptionsfaktors unter neurogenen Induktionsbedingungen.

Zudem zeigte sich sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen unter neurogener Induktion eine vermehrte Expression des sog. *Zhangfei transcription factors* (ZF). Der Zhangfei(ZF)-Transkriptionsfaktor zählt ebenfalls zu der Familie der sog. bZip-Transkriptionsfaktoren und bildet offenbar Heterodimere mit ATF4 aus, wodurch es zu einer Verstärkung der Bindungsaffinität von ATF4 an das *cAMP response element* (CRE) bzw. der Transaktivierung des CRE durch ATF4 kommt (Hogan et al., 2006). Hierbei kam es in ASC zu einer Veränderung gegenüber der Kontrolle um den Faktor 1,6 (6h), in SSCs fand sich eine relative Erhöhung um den Faktor 1,7 (6h) bzw. 1,6 (12h).

Darüber hinaus zeigte sich sowohl für ASC- als auch für SSC-Zellen unter neurogener Induktion nach 6 bzw. 12 Stunden eine deutliche Erhöhung der Expression der Cyclooxygenase 2 (COX2 = Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 = PTGS2).

Für ASC-Zellen fand sich unter neurogener Induktion sowohl nach 6 als auch nach 12 Stunden eine relative Erhöhung der HES1-Expression (= *Hairy and Enhancer of Split*) um den Faktor 1,4; in SSC-Zellen zeigte sich unter entsprechenden Bedingungen nach 12 Stunden eine Veränderung der HES1-Genexpression um den Faktor 2,4.

Unter neurogenen Induktionsbedingungen konnte darüber hinaus sowohl in ASC- als auch in humanen SSC-Zellen eine erhöhte SOX4-Expression nachgewiesen werden, wobei sich ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte (s. Tab. 9).

Parallel zeigte sich in ASC-Zellen unter neurogener Induktion eine vermehrte Expression von GFAP (x1,3; 6h), β -III-Tubulin (x1,6; 12h) und Vimentin (x1,5; 6h). Entsprechende Veränderungen konnten zu den betrachteten Zeitpunkten in den vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen indes nicht beobachtet werden.

Zudem fand sich für ASC-Zellen eine vermehrte Expression des als *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) bezeichneten Neurotrophins (x1,6; 6h bzw. x1,7; 12h), wohingegen sich in SSC-Zellen derartige Veränderungen nicht nachweisen ließen.

Im Rahmen der hier dargestellten Genexpressionsanalyse ließ sich in ASC-Zellen unter neurogener Induktion eine verminderte Numb-Expression bzw. eine Abnahme des relativen Numb-mRNA-Gehaltes um den Faktor 0,4 (6h) bzw. 0,5 (12h) nachweisen. Eine vergleichbare Reaktion zeigten zudem auch die vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen; auch hier kam es unter neurogenen

Induktionsbedingungen zu einer verminderten Expression von Numb (x 0,4 nach 6 bzw. 12h).

Zudem fand sich unter neurogener Induktion sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen eine gegenüber der korrespondierenden Kontrolle veränderte Expression unterschiedlicher Zellzyklus-assoziiierter Gene.

So konnte in beiden Fällen eine Herabregulierung sog. CDK-Inhibitoren (CDK = cyclin-dependent kinase) nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die der Gruppe der Ink4-Inhibitoren (Ink4 = *inhibitors of cdk4/6*) zuzurechnenden Faktoren p15 und p16 (siehe Tab. 9). Zudem zeigte sich eine verminderte Expression der zu den sog. primären Cyclinen zählenden Cycline B1, D1, D3 und E2. Darüber hinaus fand sich sowohl in ASC- wie auch in SSC-Zellen eine gegenüber der jeweiligen Kontrolle veränderte Expression sog. Cdc (*cell division cycle*) Proteine. Im Einzelnen handelte es sich hierbei um die Faktoren Cdc 6, 20 sowie 25A und B. Interessanterweise kam es sowohl in humanen ASC- als auch SSC-Zellen unter neurogener Induktion zu einer veränderten Expression von zyklischen Nukleotiden abbauenden Phosphodiesterasen. Im einzelnen fand sich eine verminderte Expression der unspezifischen Phosphodiesterase 1C (PDE1C) um den Faktor 0,4 nach 12 Stunden Induktion sowie der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase 4A (PDE4A) um den Faktor 0,5 nach 6 bzw. 12 Stunden. In humanen SSC-Zellen zeigte sich zudem unter neurogener Induktion eine in Relation zur Kontrolle um den Faktor 2,3 bzw. 2,4 erhöhte Expression der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase 4B (PDE4B).

Die im Rahmen des hier durchgeführten Microarray-Experimentes gewonnenen Daten wurden zudem einer Signifikanzanalyse (SAM = *significance analysis of microarrays*) unterzogen, um eine Aussage über die in ASC- bzw. humanen SSC-Zellen unter neurogener Induktion differentiell exprimierten Gene treffen zu können. Hierbei zeigte sich, dass ASC- bzw. humane SSC-Zellen unter Induktionsbedingungen in insgesamt 1071 Genen eine signifikant unterschiedliche Expression aufwiesen, wobei hiervon in Relation zu SSC 924 Gene in ASC überexprimiert und 147 Gene unterexprimiert wurden.

VI. Diskussion

Die Entwicklung stammzell-basierter Therapien stellt derzeit einen zentralen Schwerpunkt der medizinischen Forschung dar.

Hierbei sind in den letzten Jahren zunehmend adulte Stammzellen in den Fokus der Forschung gerückt, zumal diese einerseits eine vielversprechende Alternative zu den rechtlich sowie ethisch-moralisch umstrittenen und in ihrer Verfügbarkeit stark limitierten embryonalen Stammzellen darstellen, andererseits jedoch auch die Option autologer Stammzelltransplantationen bieten. Derartige adulte bzw. somatische Stammzellen lassen sich offenbar aus einer Vielzahl von peripheren Geweben und Organen isolieren.

Zudem haben die im Rahmen entsprechender Studien gewonnenen Erkenntnisse – insbesondere im Hinblick auf mesenchymale adulte Stammzellen – zu der Entwicklung neuer Konzepte von Plastizität und (Trans-) Differenzierung über die vormals bestehenden Keimblattgrenzen hinaus geführt.

Für aus dem (subkutanen) Fettgewebe isolierte Stamm- bzw. Stromazellen, den sog. *Adipose-derived Stem Cells* (ASC), ist ein multipotentes Differenzierungspotential beschrieben (für eine Literaturübersicht sei hier auf die Tabelle 1 des Appendix verwiesen). Diese erscheinen zum heutigen Zeitpunkt als eine der vielversprechendsten somatischen Stammzellentitäten, insbesondere, da ihre Isolierung in Form der sog. Liposuktion in einer für den Patienten mit einem geringen Morbiditätsrisiko verbundenen sowie umfassenden Art und Weise erfolgen kann. Es konnte gezeigt werden, dass der ASC-Anteil mit ca. 2% - 10% der Gesamtmenge nukleärer Zellen der isolierten stromalen Zellfraktion (SVF) deutlich oberhalb der für die Gewinnung mesenchymaler Stamm- bzw. Stromazellen aus dem Knochenmark beschriebenen Werte von ca. 0,01% – 0,001% liegt (Strem et al., 2005; Varma et al., 2007).

Vor dem Hintergrund, dass eine neurogene (Trans-) Differenzierung von mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes zunehmend kritisch diskutiert wird (Bertani et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004), fokussierte die vorliegende Arbeit gezielt auf die Frage einer möglichen neurogenen Differenzierung von ASC-Zellen, wie sie von unterschiedlichen Autoren in der Literatur beschrieben wird (Ashjian et al., 2003; Boquest et al., 2005; Fujimura et al., 2005; Guilak et al., 2006; Kang et al., 2003b + 2004 + 2006; Nagase et al., 2007;

Ning et al., 2006; Safford et al., 2002 + 2004; Tholpady et al., 2003; Zuk et al., 2002; s. a. Tabelle 3 des Appendix).

Ziel dieser Arbeit war es daher, entsprechende humane Stromazellen des subkutanen Fettgewebes aus Liposuktionsproben zu isolieren und im Anschluss hieran die erstmals von Ashjian et al. (2003) beschriebenen sowie von Boquest et al. (2005), Fujimura et al. (2005) und Ning et al. (2006) aufgegriffenen neurogenen Induktionsbedingungen einer eingehenderen bzw. kritischen Betrachtung zu unterziehen, wobei hierbei ein Hauptaugenmerk auf den Auswirkungen dieser Kulturbedingungen auf das Proliferationsverhalten bzw. den Zellzyklus der hier untersuchten ASC-Zellen lag. Vergleichend hierzu wurden humane Stromazellen der Haut (SSC) in die Experimente mit einbezogen, zumal für derartige Zellen ein multipotentes bzw. neurogenes Differenzierungspotential in der Literatur aufgezeigt wird (Chunmeng et al., 2004; Gingras et al., 2007; Shih et al., 2005; Toma et al., 2001 + 2005) und vergleichende Daten zwischen Stromazellen des (subkutanen) Fettgewebes einerseits und der Haut andererseits bis dato fehlen. Es sei jedoch betont, dass die vorliegende Arbeit auf die Charakterisierung von ASC-Zellen fokussierte.

Es wurden zuvor kryokonservierte ASC-Zellen von insgesamt 5 gesunden weiblichen Donatoren isoliert und Zellen der Passagen 2 bis 10 ($P_2 - P_{10}$) in die Experimente einbezogen.

Die Grundlage für die Festlegung auf diesen Passagezeitraum bildeten hierbei insbesondere die Untersuchungen von Zuk et al. (2001) zur β -Galaktosidase-Aktivität in ASC-Kulturen in Abhängigkeit von der Passagezahl. Hierbei wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in ASC-Zellen der Passagen 1 bis 15 ($P_1 - P_{15}$) bestimmt, wobei eine Aktivität ausschließlich in alternden, nicht länger proliferativ aktiven Zellen feststellbar ist. In Zellen der Passage P_1 konnte hierbei keinerlei β -Galaktosidase-Aktivität festgestellt werden, bis einschließlich der Passage 10 (P_{10}) war lediglich ein Anstieg auf Werte von unter 5% zu erkennen. Zudem zeigte sich innerhalb desselben Zeitraumes ein linearer Zusammenhang zwischen der kumulativen Verdoppelung der Population und der Passagezahl, welches eine relativ konstante Proliferation vermuten lässt (bezogen auf den untersuchten Zeitraum), so dass es sich offenbar bei ASC-Isolaten auch innerhalb eines längeren Kulturzeitraumes um eine stabile Population handelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließen sich unter Standard-Kulturbedingungen interessanterweise zwei unterschiedliche Zellmorphologien ausmachen: einerseits fanden sich spindelförmige, kompakte Zellen, andererseits große, flache, breitbasig adhärent wachsende, unregelmäßig konturierte, polygonale Zellen, die in Einzelfällen zudem als binukleär imponierten. Ein entsprechendes Bild konnte auch im Falle der vergleichend betrachteten humanen SSC-Zellen beobachtet werden, so dass sich diese mikroskopisch nicht gegenüber den hier untersuchten ASC-Zellen abgrenzen ließen. Diese hier beschriebenen morphologischen Charakteristika stimmen zudem mit entsprechenden Darstellungen der Literatur von *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) sowie mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (BMSC) und anderer Organe überein (siehe u.a. da Silva Meirelles et al., 2006; Leong et al., 2006). Ob es sich hierbei wie von Leong et al. (2006) vermutet um zwei unterschiedliche Zellentitäten und damit um eine heterogene Population handelt, oder ob die hier dargestellten Zellmorphologien lediglich unterschiedliche Konfigurationen eines einheitlichen Zelltyps widerspiegeln, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und muss an dieser Stelle weiterhin Gegenstand der Diskussion bleiben. Jedoch lässt die Tatsache, dass sich hier unter Standard-Kulturbedingungen morphologische Zwischen- bzw. Übergangsformen abgrenzen ließen, derartige Konfigurationswechsel generell als durchaus möglich erscheinen.

Um eine genauere Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen ASC- bzw. SSC-Zellen vornehmen zu können, wurde eine Charakterisierung anhand der Expression bestimmter Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie angestrebt. Hierbei ließ sich interessanterweise sowohl für humane ASC- als auch SSC-Zellen hinsichtlich der untersuchten Oberflächenantigene ein sich entsprechendes Expressionsprofil nachweisen. ASC- sowie SSC-Zellen waren durchgehend positiv für das sog. *stem cell antigen 1* (SCA-1) Homolog CD59, welches sich u. a. sowohl auf mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (u.a. Izadpanah et al., 2005; Javazon et al., 2001; Keating, 2006; Oswald et al., 2004) als auch auf multipotenten Zellen der Dermis (Chunmeng et al., 2004) nachweisen lässt sowie offenbar auch auf Stamm- bzw. Stromazellen des (subkutanen) Fettgewebes (für eine Literaturübersicht sei hier auf die Tabelle 2 des Appendix verwiesen). Zudem ist die Expression von SCA-1 u. a. auf Stamm- / Progenitor-Zellen der Prostata beschrieben (Wang et al., 2006). Die Marker CD90

(Thy-1) und CD105 (Endoglin), welche sich charakteristischerweise auf mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (u. a. Izadpanah et al., 2005; Keating, 2006; Oswald et al., 2004) sowie des (subkutanen) Fettgewebes (s. Tab. 2 des Appendix) nachweisen lassen, konnten ebenfalls auf den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ASC- bzw. SSC-Zellen als eindeutig positiv bestimmt werden.

Humane ASC- und SSC-Zellen zeigten sich – vergleichbar mit mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (u.a. Izadpanah et al., 2005; Keating, 2006; Oswald et al., 2004) – bis auf ASC 1 durchgehend negativ für die lympho-hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 (*lymphocyte common antigen*). Zu unserer Überraschung fand sich im Falle der Linie ASC 1 eine erkennbare Verlagerung des Signals in höhere Intensitätsbereiche hinein, wobei hier zudem ein schwach ausgeprägter zweiter Peak auffiel, welcher als positives Signal im Sinne einer CD34-positiven Subpopulation gewertet wurde. Die Tabelle 10 (s. u.) stellt das im Rahmen dieser Arbeit für ASC- und SSC-Zellen bestimmte Oberflächenantigen-Expressionsmuster entsprechenden aus der Literatur entnommenen Daten gegenüber:

	ASC	SSC	PLA ¹	BMSC ²	DMC ³	SCP ⁴
CD34	- *	-	- **	-	-	-
CD45	-	-	-	-	***	-
CD59	+	+	+	+	+	***
CD90	+	+	+	+	+	+
CD105	+	+	+	+	***	+

Tabelle 10: vergleichende Übersicht des Antigen-Expressionsmusters von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ASC- und SSC-Zellen sowie von Processed Lipoaspirate Cells (PLA), Bone Marrow-derived mesenchymal Stem / Stromal Cells (BMSC), Dermal Multipotent Cells (DMC) und Scalp Tissue Mesenchymal Stem Cell-like Cells (SCP)

+ = positiv, Antigen wird expremiert; - = negativ, keine Expression des betreffenden Antigens

¹: de la Fuente et al., 2004

²: Izadpanah et al., 2005; Javazon et al., 2001; Keating, 2006; Oswald et al., 2004

³: Chunmeng et al., 2004

⁴: Shih et al., 2005

*: im Falle eines Donors konnte der Nachweis von CD34 erfolgen

**: generell ist die Expression des CD34-Antigens für ASC in der Literatur nachwievor umstritten (s. Tab. 2 des Appendix)

***: das betreffende Antigen wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht

Die Expression des CD34-Oberflächenantigens ist im Falle der *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) in der Literatur nachwievor umstritten (s. Tab. 2 des Appendix). Während die Mehrheit der Autoren ASC-Zellen als eine primär CD34-negative Zellentität beschreibt, gehen andere von einer CD34-positiven Stammzellpopulation aus (Miranville et al., 2004; Planat-Benard et al., 2004; Sengenès et al., 2005). In diesem Zusammenhang erscheinen die Beobachtungen von Boquest et al. (2005), Moon et al. (2006), Ning et al. (2006), Puissant et al. (2005) und Varma et al. (2007) von besonderer Bedeutung zu sein, zumal diese Autoren eine sich verändernde Expression des CD34-Oberflächenantigens unter in vitro-Kulturbedingungen nachweisen konnten. Hierbei kommt es offenbar in Abhängigkeit des Kulturzeitraumes bzw. der Passagezahl zu einem zunehmenden Verlust des CD34-Oberflächenantigens. So konnten Ning et al. (2006) mittels Immunfluoreszenz in aus Sprague-Dawley Ratten gewonnenen ASC-Zellkulturen der Passage 0 (P_0) zu 100% das CD34-Antigen nachweisen, wohingegen in Zellen der Passage 3 (P_3) das betreffende Antigen nicht mehr zu detektieren war. Vergleichbare Beobachtungen konnten Boquest et al. (2005) und Puissant et al. (2005) an humanen ASC-Zellen machen. Moon et al. (2006) konnten zudem mittels eines sog. *Colony Forming Unit (CFU)-Assays* an zuvor MACS (*Magnetic Cell Sorting*)-selektierten CD34-positiven humanen ASC-Zellen zeigen, dass es sich bei dem dort beobachteten Verlust des CD34-Oberflächenantigens offenbar um eine Herabregulierung der CD34-Genexpression handelt und nicht um eine Selektionierung CD34-negativer Zellen. Vor diesem Hintergrund könnte der im Falle der Linie ASC 1 erfolgte Nachweis einer CD34-positiven Subpopulation als Ausdruck einer gegenüber den Linien ASC 2 – 5 zeitlich verzögert ablaufenden Herabregulierung der CD34-Genexpression aufgefasst werden; ggfs. spielen hierbei derzeit noch unbekannte Donor-spezifische Faktoren eine Rolle.

Varma et al. (2007) konnten anhand eines Vergleiches zwischen frisch-isolierten und kultivierten ASC-Zellen (P_4) zeigen, dass es hierbei unter in vitro Kulturbedingungen offenbar nicht nur zu einer deutlichen Herabregulierung des CD34-Antigens kommt, sondern dass gleichzeitig auch anderer Oberflächenmarker vermindert bzw. vermehrt exprimiert werden. So beschreiben die Autoren einen Verlust des HLA-DR (II)-und des CD117-Antigens sowie parallel hierzu eine vermehrte Expression von CD105 .

Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit für die hier untersuchten ASC-Zellen prinzipiell ein sich entsprechendes Antigen-Expressionsprofil aufgezeigt werden konnte, so

erscheint auf molekularer Ebene die phänotypische Charakterisierung bzw. die Definition von *Adipose-derived Stem Cells* insgesamt betrachtet nachwievor eher uneinheitlich (s. Tab. 2 des Appendix), wobei die genauen Ursachen für diese sich zum Teil erheblich widersprechenden Daten bis heute nicht bekannt sind. Daher ist es dringend notwendig, eben diese Einflussgrößen einer genaueren Betrachtung zu unterziehen, wobei in diesem Zusammenhang sowohl Donor-spezifische Faktoren, wie z. B. Geschlecht, Alter und Entnahmeregion sowie eventuell bestehende Grunderkrankungen, als auch Zellkultur-bedingte Faktoren, wie z. B. die jeweiligen in vitro Kulturbedingungen sowie insbesondere Kulturzeitraum und Passagedauer bzw. –anzahl aber u. U. auch sekundäre Homogenisierungsprozesse gleichermaßen von Bedeutung sein könnten. Nur so ist es letztlich möglich, vergleichbare Rahmenbedingungen zu schaffen, die dann Grundlage einer einheitlichen Charakterisierung bzw. Definition von ASC sein können. Möglicherweise wird hierbei in Zukunft weniger die Bestimmung eines Oberflächenantigen-Profiles als vielmehr – wie z. B. von Wagner et al. (2005) angeregt – ein Zelltyp-spezifisches Genexpressionsmuster im Vordergrund stehen.

Unter in vitro Kulturbedingungen konnten unter Zugabe des neurogenen Induktionsmediums (NID) sowohl bei den humanen ASC- als auch bei SSC-Zellen charakteristische Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet werden. Diese waren gekennzeichnet durch die Ausbildung eines kompakten, sphärischen Zellsomas sowie hiervon ausgehender, in der Regel bipolar, bisweilen aber auch tri- oder multipolar angeordneter, filamentöser zytoplasmatischer Fortsätze unterschiedlicher Länge. Diese wiesen z. T. terminale Bifurkationen bzw. konusartige Auftreibungen auf und vermittelten z. T. den Eindruck gut abgrenzbarer Interzellularkontakte.

Diese hier skizzierten morphologischen Kernveränderungen decken sich prinzipiell mit den typischerweise im Zusammenhang mit einer neurogenen Induktion bzw. Differenzierung von *Adipose-derived Stem Cells* (u. a. Ashjian et al., 2003; Fujimura et al., 2005; Kang et al., 2003b + 2004; Ning et al., 2006; Safford et al., 2002 + 2004), aber auch von mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes (u.a. Chu et a., 2006; Scintu et al., 2006) sowie von aus Hautgewebe isolierten Stammzellen (Shih et al., 2005) beschriebenen Beobachtungen. Im Gegensatz zu Ashjian et al. (2003), Fujimura et al. (2005) und Ning et al. (2006), welche unter neurogener Induktion von *Adipose-derived Stem*

Cells die Ausbildung überwiegend multipolarer Zellen beobachteten, stellten sich die hier untersuchten ASC- sowie die vergleichend betrachteten SSC-Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter vergleichbaren Induktionsbedingungen bzw. unter Verwendung gleicher Testsubstanzen in gleicher Konzentration jedoch primär als schlanke bipolare Zellen dar und glichen somit interessanterweise morphologisch sog. radialen Gliazellen (*radial glia cells*), welche als neurale Progenitoren identifiziert wurden (Malatesta et al., 2000; Mo et al., 2007; Moreels et al., 2005). Schwartz et al. (2003) konnten zudem vergleichbare Morphologien im Rahmen einer *in vitro* Kultur von humanen neuronalen Progenitorzellen beobachten. Dies könnte durchaus als Hinweis auf eine mögliche neurogene Differenzierung von humanen *Adipose-derived Stem Cells* (ASC), aber auch von humanen Haut-Stromazellen (SSC), in neurale Vorläuferzellen aufgefasst werden.

Vor diesem Hintergrund wurde die Expression von Musashi-1 und Nestin, welche als neurale Stamm- bzw. Progenitorzellmarker gelten (Hermann et al., 2004; Kaneko et al., 2000; Moreels et al., 2005; Nagase et al., 2007; Tonchev et al., 2005), sowie von β -III-Tubulin als Marker neuronaler Progenitoren bzw. früher neuronaler Zellen (Mo et al., 2007; Tonchev et al., 2005) immunhistochemisch untersucht, wobei hier ASC- und SSC-Zellen sowohl unter Kontroll- als auch unter neurogenen Induktionsbedingungen vergleichend betrachtet wurden.

Hierbei konnte Musashi-1 sowohl in *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) als auch in SSC-Zellen nachgewiesen werden, wobei eine Darstellung bemerkenswerterweise gleichermaßen unter Kontroll- wie auch unter neurogenen Induktionsbedingungen erfolgte. Zudem fanden sich interessanterweise hinsichtlich des Färbemusters erkennbare Unterschiede zwischen Kontrollzellen und unter neurogenen Induktionsbedingungen kultivierten Zellen. So fiel unter Kontrollbedingungen eine perinukleäre bzw. den Kern bipolar einfassende Konzentrierung der Musashi-1-Markierung auf, während sich unter neurogener Induktion z. T. nahezu das gesamte Zytoplasma intensiv gefärbt darstellte. Somit erschien in der Gesamtbetrachtung die Markierung unter neurogener Induktion stärker ausgeprägt als unter entsprechenden Kontrollbedingungen.

Musashi-1 stellt ein mRNA-bindendes Protein dar, welches offenbar eine zentrale Rolle im Rahmen der sog. asymmetrischen Progenitorzellteilung spielt (Okano et al., 2002 + 2005), und konnte verschiedentlich in neuronalen Stamm- bzw. Progenitorzellen nachgewiesen werden (s.o.). Auf molekularer Ebene scheint Musashi-1 die

Translation bestimmter Proteine zu unterbinden, indem es spezifisch vermittelt sog. RRM = *RNA recognition motifs* an eine charakteristische RNA-Bindungs-Sequenz innerhalb der mRNA bindet (Okano et al., 2002). In Säugetieren konnte als ein Protein, dessen Transkription durch Musashi-1 negativ reguliert wird, das sog. Numb-Protein identifiziert werden (Okano et al., 2002 + 2005), welches eine regulierende Funktion im Zusammenhang mit neuralen bzw. neuronalen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen einnimmt (Toriya et al., 2006). Hierbei zeichnen sich neurale Stamm- bzw. Progenitorzellen durch eine offenbar Musashi-1-vermittelte verminderte Numb-Aktivität mit nachfolgender Aktivierung der sog. Notch-1-Hes-1-Signalkaskade aus (Okano et al., 2002 + 2005). Hes1 (*hairy and enhancer of split 1*) zählt zu den sog. *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren (bHLH). Diese spielen offenbar eine entscheidende Rolle im Rahmen der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes von neuralen Stamm- bzw. Vorläuferzellen und damit insbesondere der zeitlichen Koordinierung der Neurogenese (Kageyama et al., 2005; Ross et al., 2003), wobei sich speziell neuronale Vorläuferzellen durch eine hohe Hes1-Expression auszeichnen (Scintu et al., 2006).

Bemerkenswerterweise konnte sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen unter neurogener Induktion einerseits eine verminderte Numb-Expression, andererseits in Übereinstimmung mit Scintu et al. (2006) eine erhöhte Expression des Hes1-Transkriptionsfaktors gezeigt werden (s.o.). Dieses könnte in der Tat als ein indirekter Hinweis auf eine unter neurogener Induktion verstärkte Musashi-1-Aktivität bzw. -Expression aufgefasst werden. Bereits Hermann et al. (2004) konnten zeigen, dass die Generierung von mit neuralen Stamm- bzw. Progenitorzellen vergleichbaren Zellen aus humanen mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarkes mit einer vermehrten Expression von Musashi-1 assoziiert ist.

Zudem fielen bereits unter Kontrollbedingungen Zellen auf, welche hinsichtlich ihres Färbemusters bzw. der Intensität der Markierung durchaus mit unter neurogenen Induktionsbedingungen kultivierten Zellen vergleichbar waren. Hier könnte u. U. eine Selektionierung einer bestimmten ASC- bzw. SSC-Subpopulation vermutet werden. Dies entspräche dem von Chiou et al. (2006) formulierten Prinzip der Selektionierung sog. determinierter Progenitorzellen (*lineage-specific progenitor cells*).

Der Nachweis von Musashi-1 in undifferenzierten ASC- bzw. SSC-Zellen deckt sich zudem mit der in der Literatur zunehmend geäußerten Vermutung, dass Musashi-1 nicht ausschließlich in neuralen Stamm- bzw. Progenitorzellen exprimiert wird,

sondern als genereller Stammzellmarker aufzufassen ist. So scheint Musashi-1 auch in Stamm- bzw. Progenitorzellen des Intestinums (Dekaney et al., 2006; Fukui et al., 2006; Kayahara et al., 2003; Nagata et al., 2006; Nishimura et al., 2003), der Brustdrüse (Clarke et al., 2005) sowie der Haarfollikel (Sugiyama-Nakagiri et al., 2006) exprimiert zu werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen daher den Schluss nahe, dass es sich auch bei humanen *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) um Musashi-1-positive Stamm- bzw. Progenitorzellen handelt. Gleichfalls konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich aus entsprechenden Hautpräparaten unter in vitro Kulturbedingungen gleichfalls Musashi-1-positive Zellen isolieren lassen (*Skin-derived Stromal Cells* = SSC), welche zudem unter morphologischen Gesichtspunkten sowie hinsichtlich ihres Oberflächenantigen-Expressionsmusters sowohl mit *Adipose-derived Stem Cells* als auch mit Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarkes vergleichbar sind, so dass auch hier das Vorliegen einer Stamm- bzw. Progenitorzellpopulation zu vermuten ist.

Nestin zählt zu den sog. Intermediärfilamenten (IF) und gilt als Markerprotein neuroepithelialer / neuraler Stamm- bzw. Progenitorzellen einschließlich radialer Gliazellen (u.a. Dahlstrand et al., 1995; Felling et al., 2006; Hermann et al., 2004; Ishiwata et al., 2006; Moreels et al., 2005; Nagase et al., 2007; Schwartz et al., 2003; Shimizu et al., 2006; Tonchev et al., 2005; Wiese et al., 2004), wobei sich eine entsprechende Expression in teilungsaktiven Zellen des zentralen bzw. peripheren Nervensystems bereits in relativ frühen embryonalen Entwicklungsstadien nachweisen lässt (Dahlstrand et al., 1995; Michalczyk und Ziman, 2005; Shimizu et al., 2006).

In der Tat konnte verschiedentlich im Rahmen neurogener Induktions- bzw. Differenzierungsprozesse von mesenchymalen Stamm- bzw. Progenitorzellen des Knochenmarkes sowie des subkutanen Fettgewebes Nestin in entsprechend induzierten Zellen nachgewiesen werden (u.a. Fujimura et al., 2005; Hermann et al., 2004; Nagase et al., 2007; Ning et al., 2006; Kang et al., 2003 + 2004; Safford et al., 2002 + 2004; Scintu et al., 2006). Interessanterweise konnten Hermann et al. (2004), Kang et al. (2003b + 2004), Ning et al. (2006), Scintu et al. (2006) und Zuk et al. (2002) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hierbei eine Nestinexpression darüber hinaus auch in nicht induzierten Zellen der entsprechenden Kontrollgruppe aufzeigen. Wiese et al. (2004) konnten gleichfalls Nestin in aus embryonalen Stammzellen generierten multipotenten Progenitorzellen

in hoher Konzentration nachweisen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Tondreau et al. (2004), welche in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes bereits unter Standardkulturbedingungen die konstitutive Expression (pro-)neuraler Proteine nachweisen konnten. Wislet-Gendebien et al. (2005) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Expression von Nestin in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes mit einer relativen Überexpression bestimmter neuroregulatorischer (Transkriptions-) Faktoren einhergeht, so dass die Expression von Nestin vor diesem Hintergrund u. U. vielmehr einen Zustand gesteigerter Suszeptibilität gegenüber extrinsischen Differenzierungssignalen widerspiegelt. In diese Richtung weisen zudem auch die Beobachtungen von Niki et al. (1999). Diese konnten überraschenderweise im Rahmen eines Tiermodells sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression von Nestin in den sog. *Ito*-Zellen (= Stellatumzellen) der Leber nachweisen, wobei diese Nestin-Expression offenbar mit dem Übergang von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand assoziiert war.

Es erscheint somit letztlich insgesamt fraglich, ob die Expression von Nestin überhaupt ein spezifisches Charakteristikum neuraler Progenitorzellen darstellt, oder ob diese nicht vielmehr generell als Ausdruck eines zellulären Aktivierungszustandes zu werten ist.

β -III-Tubulin wird in der Literatur im Zusammenhang mit einem frühen Stadium neuronal gerichteter Differenzierungsprozesse diskutiert (u. a. Jirásek et al., 2007) und lässt sich entsprechend in sog. neuronal-determinierten Progenitorzellen nachweisen (Mo et al., 2007; Tonchev et al., 2005). Interessanterweise ließ sich im Rahmen dieser Arbeit unter neurogenen Induktionsbedingungen für ASC-Zellen eine Erhöhung der Genexpression von β -III-Tubulin bereits nach 12 Stunden nachweisen. Immunhistologisch fanden sich zudem nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden sowohl im Falle der untersuchten ASC- wie auch der SSC-Präparate Zellen, welche in Relation zu der korrespondierenden Kontrolle eine intensivere β -III-Tubulin-Immunreaktivität aufwiesen, wobei sich der Anteil derartiger Zellen merklich unterhalb von 1% der Gesamtpopulation bewegte. Hierbei könnte es sich in der Tat um eine Subpopulation von mit neuronal determinierten Progenitorzellen vergleichbaren Zellen handeln. Ob diese Zellen als Korrelat eines im Sinne des Kontinuitätsmodelles vorgeschrittenen neural-neuronalen Differenzierungsprozesses aufgefasst werden können, oder ob sie sich direkt aus ASC- bzw. SSC-Zellen entwickeln, muss jedoch weiterhin Gegenstand der Diskussion bleiben.

Interessanterweise zeigte sich auch unter entsprechenden Kontrollbedingungen sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen eine schwach ausgeprägte intrazytoplasmatische Granulierung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Tondreau et al. (2004) sowie Wenisch et al. (2006), welche in mesenchymalen Stammzellen unter Standard-Kulturbedingungen gleichfalls β -III-Tubulin immunhistologisch nachweisen konnten. Zudem unterstützen diese Ergebnisse die bereits von Tondreau et al. (2004) in diesem Zusammenhang formulierte Hypothese einer „multidifferenzierten“ Stammzelle als Korrelat eines multipotenten Differenzierungspotentials.

Darüber hinaus konnte in ASC-Zellen eine moderate Erhöhung der Genexpression von GFAP (*glial fibrillary acid protein*) und Vimentin nach einem Induktionszeitraum von 6 Stunden nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich interessanterweise um Marker, die typischerweise in den bereits zuvor genannten radialen Gliazellen und damit in neuronalen Progenitoren exprimiert werden. So konnten auch Schwartz et al. (2003) sowohl GFAP als auch Vimentin in neuronalen Progenitorzellkulturen nachweisen. Darüber hinaus kam es im Falle der hier untersuchten ASC-Zellen unter neurogener Induktion zu einer vermehrten Expression des zu den Neurotrophen zählenden *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), welcher sich gleichfalls in neuronalen Stammzellen detektieren lässt (Niles et al., 2004).

Darüber hinaus fiel unter neurogenen Induktionsbedingungen (NID) eine in Relation zu der korrespondierenden Kontrolle deutlich geringere Zelldichte auf. In der Tat konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der durchgeführten Proliferationsexperimente erstmalig ein eindeutig signifikanter antiproliferativer Effekt des hier untersuchten Induktionsmediums sowohl auf ASC- als auch auf SSC-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise fanden sich hierbei statistisch signifikante Unterschiede zwischen ASC-Zellen einerseits und SSC-Zellen andererseits, wobei die hier betrachteten humanen ASC-Linien unter neurogener Induktion in ihrem Wachstum insgesamt signifikant besser gehemmt wurden als SSC-Zellen. Zudem zeigte sich, dass der wachstumshemmende Effekt unter neurogener Induktion bei den einzelnen ASC-Zelllinien signifikant unterschiedlich ausgeprägt war.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Substanzbestandteile des neurogenen Induktionsmediums (NID) Insulin, Indomethacin und Isobutylmethylxanthin (IBMX) sich hinsichtlich ihres individuellen antiproliferativen Potentials zum Teil deutlich bzw. statistisch signifikant voneinander unterscheiden,

wobei der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX eindeutig die stärkste wachstumshemmende Wirkung bei allen getesteten Zelllinien hervorrief.

Bemerkenswerterweise konnte für die Kombination von Indomethacin und Isobutylmethylxanthin ein gegenüber den jeweiligen Einzeltestungen verstärkter, sich von diesen signifikant abhebender antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden. Dieser unterschied sich zudem überraschenderweise weder zahlenmäßig noch statistisch von dem unter neurogener Induktion beobachteten wachstumshemmenden Effekt, so dass dieser offenbar auf die kombinierte Wirkung des Cyclooxygenase-Hemmers Indomethacin und des Phosphodiesterase-Inhibitors Isobutylmethylxanthin zurückzuführen war.

In der Literatur ist ein durch cAMP vermittelter antiproliferativer Effekt für unterschiedliche Zellentitäten verschiedentlich beschrieben (Baptist et al., 1993; Eyers et al., 2005; Kamiya et al., 2007; Kronemann et al., 1999; Lee et al., 1999; Liu et al., 2004; Liu et al., 2005; Naderi et al., 2005). Liu et al. (2004) konnten in diesem Zusammenhang darüber hinaus einen direkten Einfluss des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) auf den Zellzyklus nachweisen: so zeigte sich unter der Zugabe des membranpermeablen Derivates Dibutyryl-cAMP eine signifikante Abnahme des G0/G1-Phasenanteiles sowie parallel hierzu eine nachweisbare bzw. statistisch signifikante Verlagerung in die Phasen S und G2/M im Sinne eines vermehrten Eintretens in den Zellzyklus bei gleichzeitiger Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase. Zuvor hatten bereits Baptist et al. (1993) einen negativen Effekt des cAMP auf die sog. G2-M-Transition beschrieben.

Im Gegensatz hierzu konnten Naderi et al. (2005), Kronemann et al. (1999) und Lee et al. (1999) einen Einfluss des cAMP insbesondere auf den Übergang von der G0/G1- in die S-Phase des Zellzyklus beobachten, so dass cAMP-vermittelte Mechanismen offenbar multilokulär in den Zellzyklus eingreifen und zu dessen Dysregulation führen können. Gegebenenfalls spielen hierbei u. a. auch zellspezifische Faktoren sowie das jeweilige perizelluläre Milieu eine entscheidende Rolle.

Sowohl für Indomethacin als auch für andere nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) ist in der Literatur gleichfalls ein antiproliferativer Effekt dokumentiert. So konnte für Indomethacin ein derartiger Effekt auf Colonkarzinomzellen (Kralj et al., 2001; Smith et al., 2000), Leberkarzinom- bzw. Hepatomzellen (Baek et al., 2007; Hial et al., 1977) sowie auf Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms (Quidville et al.,

2004), aber auch auf Osteoblasten (Chang et al., 2005) nachgewiesen werden. Für den spezifischen COX2-Inhibitor Celecoxib ist gleichfalls ein antiproliferativer Effekt in vitro beschrieben (Dvory-Sobol et al., 2006). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nachwievor nicht eindeutig geklärt. Baek et al. (2007), Chang et al. (2005) und Smith et al. (2000) konnten anhand der von ihnen untersuchten Zellentitäten zeigen, dass hier offenbar eine G1-Arretierung bzw. ein hemmender Effekt auf die G1-S-Transition sowie (sekundäre) apoptotische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen könnten. Dvory-Sobol et al. (2006) konnten im Gegensatz hierzu anhand eines in vitro Zellkulturmodelles eine durch Celecoxib vermittelte G2/M-Arretierung nachweisen. Hierbei spielte offenbar die p53-vermittelte Herabregulierung von Cyclin B1 eine zentrale Rolle. López-Lluch et al. (2005) konnten zudem im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung der Myeloid-Zelllinie HL-60 zeigen, dass es hier infolge der Inhibition der Cyclooxygenase (COX) mittels nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR) zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kam. Somit könnte Indomethacin in der Tat eine mittelbare Aktivierung des cAMP-Systems hervorrufen und damit im Zusammenhang mit den hier näher betrachteten neurogenen Induktionsbedingungen synergistisch mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX wirken.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auf Grundlage der durchgeführten Analyse der Zellzyklusphasen unter neurogener Induktion sowohl für ASC- als auch für SSC-Zellen in der Tat nach einem Inkubationszeitraum von 96 Stunden eine Veränderung gegenüber den korrespondierenden Kontrollen gezeigt werden. So kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion des G1-Anteiles bei gleichzeitig erkennbarer Verlagerung in die Phasen S und G2. Zudem wurde eine zumindest partielle Arretierung der Zellen in G2 bzw. eine verzögerte G2-M-Transition erkennbar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es unter entsprechenden Induktionsbedingungen zu einer gegenüber der Kontrolle veränderten Expression von sog. Zellzyklus-assoziierten Genen kam.

So konnte in beiden Fällen eine Herabregulierung sog. CDK-Inhibitoren (CDK = *cyclin-dependent kinase*) nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die der Gruppe der Ink4-Inhibitoren (Ink4 = *inhibitors of cdk4/6*) zuzurechnenden Faktoren p15 und p16. Diese binden spezifisch die CDK4/6 unter Ausbildung trimerischer Komplexe und unterbinden so die Bindung des CDK-Aktivators Cyclin D (Sridhar et al., 2006). Zudem zeigte sich eine verminderte Expression der zu den sog. primären

Cyclinen zählenden Cycline B1, D1, D3 und E2, welche eine zentrale Rolle im Rahmen der Zellzyklus-Progression spielen (Bondi et al., 2005). Hierbei kommt dem B1-Cyclin eine regulierende Funktion der G2-M-Transition zu (Dvory-Sobol et al., 2006; Sivaprasad et al., 2007; Taylor und Stark, 2001), wohingegen die Cycline D1, D3 und E2 regulierende Faktoren der G1-Progression bzw. der G1-S-Transition darstellen (Büschges et al., 1999; Hedberg et al., 2003; Sivaprasad et al., 2007).

Darüber hinaus fand sich sowohl in ASC- wie auch in SSC-Zellen eine gegenüber der jeweiligen Kontrolle veränderte Expression sog. Cdc (*cell division cycle*) Proteine. Im Einzelnen handelte es sich hierbei um die Faktoren Cdc 6, 20 sowie 25A und B. Das Cdc6-Protein ist Bestandteil des sog. präreplikativen Komplexes (pre-RC = *pre-replicative complex*) und stellt in diesem Zusammenhang einen regulierenden Faktor der DNS-Replikation dar (Sivaprasad et al., 2007). Cdc20 ist ein Aktivator des sog. *anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C) und nimmt eine regulative Funktion innerhalb der G2/M-Phase bzw. der mitotischen Teilung ein (Irniger, 2002). So führt eine Inaktivierung von Cdc20 in malignen Tumorzellen interessanterweise zu einer G2/M-Arretierung und damit zu einer Supprimierung des Zellwachstums (Kidokoro et al., 2007). Die sog. Cdc25-Zellzyklusproteine umfassen eine Gruppe von Proteinphosphatasen, welche gezielt Cyclin-abhängige Kinasen dephosphorylieren und so letztlich deren Assoziation mit den korrespondierenden Cyclinen ermöglichen. Somit stellen die Cdc25-Zellzyklusproteine ein entscheidendes Regulativ innerhalb des Zellzyklus dar, wobei Cdc25A der G1-S-Transition und Cdc25B bzw. C der G2-M-Transition zugeordnet werden können (Savitzky und Finkel, 2002).

Somit erscheint es möglich, dass es unter den hier getesteten neurogenen Induktionsbedingungen (NID) zu einer multifokalen Alteration des Zellzyklus bzw. der Zellzyklusprogression und damit letztlich zu dem hier beobachteten antiproliferativen Effekt kam. Bei der Diskussion dieser Ergebnisse ist jedoch kritisch zu bedenken, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit bewusst auf eine Synchronisation der Zellen verzichtet wurde. Zudem muss betont werden, dass es sich bei dem Zellzyklus um einen dynamischen Prozess handelt, so dass die hier dokumentierten Zellzyklusalterationen lediglich eine Momentaufnahme repräsentieren und keine eindeutigen Aussagen über eventuell hiervon abweichende Zellzyklusveränderungen innerhalb des Inkubationszeitraumes erlauben.

Die Initiierung eines gerichteten neuralen bzw. neuronalen Differenzierungsprozesses setzt den Übergang von einem proliferativen in einen nicht länger teilungsaktiven Zustand und damit letztlich das Verlassen des Zellzyklus voraus (Nguyen et al., 2006; Ohnuma et al., 2003). Nègre et al. (2003) konnten am Beispiel von *Drosophila* interessanterweise zeigen, dass die Arretierung innerhalb der G2-Phase des Zellzyklus eine zentrale Rolle im Rahmen der Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS) spielt. Ob die hier sowohl für humane ASC- als auch für SSC-Zellen nachgewiesene G2-Arretierung in der Tat Ausdruck eines neuralen und / oder neuronalen (Trans-) Differenzierungsprozesses ist, oder ob es sich hierbei um ein hiervon gänzlich unabhängiges Sekundärphänomen handelt, konnte indes nicht eindeutig geklärt werden und sollte Gegenstand weiterführender Studien sein. So beschrieben u. a. Cramer et al. (1997) das Phänomen des sog. *mitotic cell roundings*, d. h. einer mitoseassoziierten zellulären Retraktion bzw. Kondensation. So könnte die u. a. auch hier im Zusammenhang mit einer möglicherweise neurogenen Induktion bzw. Differenzierung von ASC- und SSC-Zellen beobachtete Ausbildung einer neuronoiden Morphologie u. U. Ausdruck einer Arretierung der Zellen im Bereich der G2-M-Transition sein. In der Tat ließen sich retrospektiv auch unter Standardkulturbedingungen sowohl in ASC- als auch in SSC-Kulturen offenbar mitoseassoziierte Kondensationskonfigurationen beobachten. Dies zeigt, dass die Beurteilung eines neurogenen Differenzierungsprozesses allein unter morphologischen Gesichtspunkten in jeglicher Hinsicht inadäquat ist und sollte darüber hinaus auch Anlass zu einer kritischen Reevaluation entsprechend publizierter Ergebnisse geben.

Die vorliegende Arbeit konnte zudem zeigen, dass an der Vermittlung der unter neurogenen Induktionsbedingungen beobachteten morphologischen wie auch proliferativen Veränderungen auf der Ebene der Signaltransduktion u. a. anscheinend auch cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren der sog. CREB-ATF-Familie beteiligt waren. Hierbei schien jedoch weniger ein singulärer Faktor, als vielmehr das Zusammenspiel unterschiedlicher Transkriptions- und Kofaktoren von Bedeutung zu sein, wenngleich die im Rahmen der Genexpressionsanalyse erhobenen Daten eine entscheidende Rolle des *cAMP response element modulators* (CREM) insbesondere in ASC-Zellen vermuten lassen.

Zudem zeigte sich sowohl in ASC- wie auch in SSC-Zellen unter neurogener Induktion nach 6 bzw. 12 Stunden eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2).

Bemerkenswerterweise spielt offenbar auch im Rahmen der Regulation der COX-2-Expression das CREB-ATF-System eine entscheidende Rolle (s. Abb. 24). So konnte das *cAMP response element* (CRE) als eines der zentralen regulativen Elemente innerhalb der COX-2-Promotorregion identifiziert werden (Klein et al., 2007; Schroer et al., 2002).

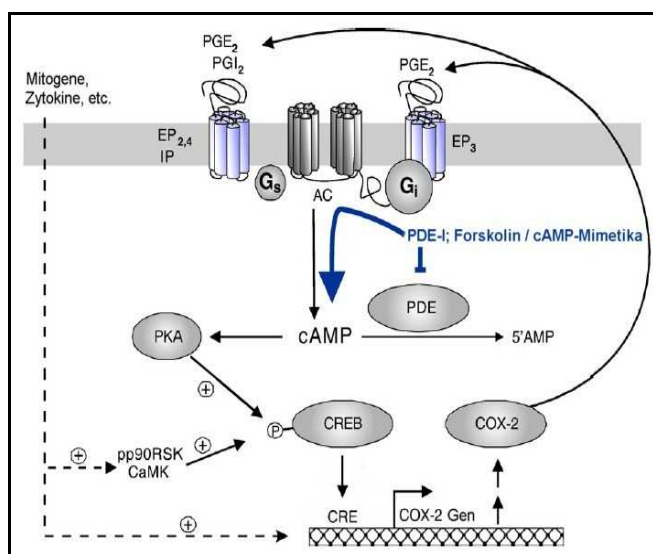


Abb. 21:

Regulation der COX-2-Genexpression durch cAMP und CREB/ATF

(modifizierte Abbildung aus *Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP* (Klein et al., 2007; *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, S. 1606)

EP, Prostaglandin-E-Rezeptor; G_i, inhibitorisches G-Protein; G_s, stimulierendes G-Protein; IP, Prostaglandin-I-Rezeptor; PGE, Prostaglandin E; PGI, Prostaglandin I; pp90RSK, ribosomale S6 Kinase

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die im Rahmen dieser Arbeit unter neurogenen Induktionsbedingungen beobachtete vermehrte COX-2-Expression auf eine cAMP-getriggerte Aktivierung von CREB/ATF-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist. Bei der Diskussion dieser Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass das neurogene Induktionsmedium den Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin enthielt, so dass eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase 2 nicht mit einer vermehrten Aktivität dieses Enzyms gleichgesetzt werden darf.

Wie bereits zuvor eingehender dargestellt, ergaben sich hinsichtlich des unter neurogener Induktion beobachteten antiproliferativen Effektes statistisch signifikante Unterschiede sowohl zwischen ASC- und SSC-Zellen einerseits als auch zwischen den hier betrachteten ASC-Zelllinien andererseits. Aufgrund der Tatsache, dass die Inhibition des Abbaus von cAMP mittels des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX den stärksten antiproliferativen Effekt in allen hier untersuchten Zelllinien hervorrief,

ist es naheliegend, die möglichen Ursachen hierfür insbesondere in der jeweiligen zellspezifischen Konfiguration des intrazellulären cAMP-Systems zu vermuten.

Eine zentrale Größe innerhalb dieses Systems stellt das basale intrazelluläre cAMP-Niveau dar. Dieses ist das Ergebnis eines innerhalb enger Grenzen koordinierten Zusammenspiels von cAMP-Synthese vermittelt Adenylatzyklase (AC) auf der einen und cAMP-Degradation durch entsprechende Phosphodiesterasen (PDE) auf der anderen Seite. Die Möglichkeit, in dieses System gezielt regulierend einzugreifen, wird u. a. entscheidend durch die Grundaktivität der Adenylatzyklase und damit letztlich von den jeweils exprimierten Isoformen dieses Enzyms bestimmt. So führt eine PDE-Hemmung bei hoher Grundaktivität der Adenylatzyklase (wie sie u. a. in Adipozyten beobachtet wird) zu einer deutlichen Veränderung des cAMP-Niveaus, wohingegen dies bei niedriger Enzymaktivität (wie z. B. in Hepatozyten) lediglich eine marginale Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorruft (Houslay et al., 1997). Zudem handelt es sich bei den zyklische Nukleotide degradierenden Phosphodiesterasen um eine große hetero- bzw. multigene Enzymfamilie. Die Subfamilien PDE1, 2, 3, 4 und 7, welche entweder spezifisch oder unspezifisch cAMP hydrolysieren, zeichnen sich interessanterweise durch heterogene Regionen innerhalb des aktiven Zentrums aus, welche nicht nur die Substratspezifität, sondern offenbar auch die Suszeptibilität gegenüber entsprechenden Enzyminhibitoren determinieren (Houslay et al., 1997).

Somit kommt insgesamt bei Eingriffen in das cAMP-System dem Zelltyp-spezifischen AC- sowie PDE-Expressionsmuster eine zentrale Bedeutung zu. Interzelluläre Unterschiede hinsichtlich dieses Expressionsmusters könnten durchaus die hier beobachteten, z. T. signifikant unterschiedlichen antiproliferativen Effekte erklären. In der Tat kommt es unter neurogener Induktion sowohl bei ASC- als auch bei SSC-Zellen zu einer Veränderung des PDE-Expressionsmusters (s. o.). Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist die in humanen SSC-Zellen unter neurogener Induktion nachgewiesene vermehrte Expression der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase-Isoform PDE-4B. Dies könnte zu einem gegenüber ASC-Zellen verminderten bzw. zeitlich verzögerten Ansteigen der intrazellulären cAMP-Konzentration geführt und so die hier dokumentierten Unterschiede zwischen diesen beiden Zellentitäten – zumindest in Teilen – bedingt haben. Die diesem Phänomen zugrunde liegenden genauen molekularen Mechanismen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, jedoch könnte es sich hierbei um einen

cAMP-getriggerten Regelkreis handeln. Gestützt wird diese Hypothese von den Ergebnissen von Jiang et al. (1998), welche gleichfalls eine Induktion der PDE-4B infolge einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nachweisen konnten. Zudem fand sich im Rahmen der durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen in SSC-Zellen eine in Relation zu ASC-Zellen geringer ausgeprägte CREB-Immunreaktivität. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang daher eine unterschiedliche Expression von CREB bzw. von Transkriptionsfaktoren der CREB-ATF-Familie eine Rolle.

Insgesamt betrachtet lassen sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse durchaus im Sinne einer neurogenen Induktion sowohl von humanen ASC- als auch interessanterweise von SSC-Zellen bzw. einer Differenzierung dieser Zellen in neurale / neuronale Progenitorzellen interpretieren; einen klaren Beleg für eine derartige (Trans-) Differenzierung stellen sie indes ausdrücklich nicht dar. So konnten insbesondere Musashi-1 sowie Nestin sowohl auf Grundlage der hier experimentell gewonnenen Daten als auch auf Grundlage der Literatur nicht eindeutig neuronalen / neuronalen Progenitorzellen und damit einem neurogenen Induktionsprozess zugeordnet werden (s. o.). Auf die Tatsache, dass die Ausbildung einer neuronoiden Morphologie nicht zwangsläufig auch auf einen entsprechend ablaufenden neurogenen Differenzierungsprozess hinweisen muss, wurde bereits zuvor hingewiesen (siehe hierzu auch Bertani et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Darüber hinaus ist jedoch auch zu bedenken, dass die hier dargestellten Ergebnisse immer vor dem Hintergrund der im Rahmen dieser Arbeit gewählten neurogenen Inkubationsdauer von 96 Stunden zu diskutieren sind. Dieser ergab sich letztlich aus der Zielsetzung, die immunhistochemischen Experimente einerseits sowie die Experimente zur Zellproliferation und zur Analyse der Zellzyklusphasen andererseits unter vergleichbaren Rahmenbedingungen durchzuführen. Ashjian et al. (2003) konnten unter Verwendung der hier näher betrachteten Induktionsbedingungen jedoch erst nach einem minimalen Behandlungszeitraum von 9 Tagen den maximalen Anteil von Zellen mit neuronähnlicher Konfiguration beobachten, so dass somit die vorliegende Arbeit demnach gewissermaßen auf eine frühe Induktionsphase fokussierte.

Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang auch der Anteil des Serums an dem jeweils verwendeten neurogenen Induktionsmedium eine zentrale Rolle im Rahmen

der (zeitlichen) Koordinierung des Induktionsprozesses. So konnten Ashjian et al. (2003) unter Zugabe von insgesamt 10% Serum nach morphologischen Kriterien einen maximalen Anteil differenzierter Zellen von ca. 22% beobachten, wohingegen Ning et al. (2006) unter Zugabe der gleichen Testsubstanzen in identischer Konzentration, jedoch ohne den Zusatz von Serum, einen morphologischen Differenzierungsgrad von nahezu 100% erzielten. Auch Fujimura et al. (2005) konnten unter Zugabe von Serum einen verzögernden Effekt hinsichtlich der neurogenen Differenzierung von ASC-Zellen nachweisen. Bereits Pacherník et al. (2005) konnten einen hemmenden Einfluss des Serums im Zusammenhang mit neuronalen Differenzierungsprozessen nachweisen.

Zudem sollte im Zusammenhang mit der Beurteilung eines möglicherweise neurogenen Induktions- bzw. Differenzierungsprozesses anhand der Expression bestimmter neuraler Markerproteine berücksichtigt werden, dass diese wie z. B. im Falle der Neurofilamente (NF), Nestin, GFAP und der neuronenspezifischen Enolase (NSE) offenbar überraschenderweise primär auf translationaler denn auf transkriptionaler Ebene reguliert wird (Scintu et al., 2006), so dass die relative Veränderung der Genexpression nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Veränderung auf Proteinebene korreliert.

Letztlich stellen jedoch *Adipose-derived Stem Cells* (ASC) eine im Hinblick auf eine möglicherweise therapeutische Applikation im Rahmen der regenerativen Medizin durchaus vielversprechende Zellentität dar. Dies wird insbesondere durch das derzeit dokumentierte multipotente Differenzierungspotential dieser Zellen in vitro deutlich (siehe Tabelle 1 des Appendix). Zudem sind bis dato bereits unterschiedliche Therapieversuche im Tiermodell (Cao et al., 2005; Conejero et al., 2006; di Rocco et al., 2006; Kang et al., 2003 + 2006; Nakagami et al., 2005; Peterson et al., 2005; Planat-Benard et al., 2004; Rehman et al., 2004; Valina et al., 2007; Yoon et al., 2007) sowie am Menschen (García-Olmo et al., 2003; Jack et al., 2005; Lendeckel et al., 2004) erfolgreich durchgeführt worden.

Hinsichtlich eines möglichen neurogenen Differenzierungspotentials von ASC-Zellen sollte im weiteren eine Konzentrierung auf funktionelle Aspekte, d. h. letztlich die Möglichkeit einer funktionellen Integration derart induzierter Zellen in ein neuronales Gewebe in vivo, erfolgen.

Möglicherweise stellt jedoch die neurogene in vitro Induktion von *Adipose-derived Stem Cells* mit sekundärer Transplantation in ein entsprechend geschädigtes

Nervengewebe nur eine mögliche therapeutische Applikation dieser Zellentität dar. So konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass ASC-Zellen trophische sowie antiapoptotische Faktoren sezernieren (Nakagami et al., 2005; Rehman et al., 2004). Kang et al. (2003a) konnten darüber hinaus anhand eines in vitro Modells zeigen, dass humane ASC-Zellen in Kokultur mit murinen neuronalen Stammzellen (mNSC) eine neurogene Differenzierung dieser Zellen induzierten, wobei hierbei interessanterweise direkte Zell-Zell-Kontakte und damit möglicherweise membrangebundene Proteine von ASC eine entscheidende Rolle spielten. Somit könnte die gezielte Aktivierung lokaler autoregeneratorischer Mechanismen eine weitere therapeutische Applikationsform von *Adipose-derived Stem Cells* darstellen. Die hier untersuchten *Skin-derived Stromal Cells* (SSC) waren morphologisch sowie immunphänotypisch mit ASC-Zellen vergleichbar. Zudem konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Stammzellmarker CD59 sowie Musashi-1 in entsprechenden Kulturen nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch auch Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsverhaltens sowie der Genexpression nachgewiesen werden. Weitere Studien müssen zeigen, inwieweit sich diese Zellen von *Adipose-derived Stem Cells* sowie anderen Stammzellentitäten abgrenzen lassen und welches Differenzierungs- bzw. therapeutische Potential diese u. U. aufweisen. Gerade vor diesem Hintergrund sind die von Hee & Nicoll (2006) sowie von Lysy et al. (2007) publizierte Ergebnisse von besonderem Interesse. Diese Arbeiten konnten überraschenderweise zeigen, dass humane Fibroblasten der Haut Charakteristika von mesenchymalen Stammzellen aufwiesen und sowohl eine mesodermale als auch ektodermale Differenzierungskapazität besaßen. Rieske et al. (2005) konnten darüber hinaus anhand der aus humanen Fibroblasten generierten Zelllinie MRC-5 nachweisen, dass diese Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, der Wachstumsrate und ihres Genexpressionsmusters mit embryonalen Stammzellen sowie neuroektodermalen Zellen vergleichbar waren. Diese exprimierten u. a. die Transkriptionsfaktoren Oct-3/4 und REX-1, welche typischerweise in pluripotenten Zellen nachgewiesen werden können, als auch die von embryonalen Stammzellen exprimierten Oberflächenmarker SSEA-1, SSEA-3 und SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen*), TRA-1-60 und TRA-1-81 sowie insbesondere auch Musashi-1, Nestin und β -III-Tubulin. Diese Ergebnisse werden möglicherweise zu einer gänzlich veränderten Betrachtung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen führen bzw. führen müssen.

VII. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten ASC- bzw. SSC-Zellen wiesen in vitro eine für mesenchymale Stammzellen charakteristische Morphologie auf und exprimierten die Oberflächenantigene CD90 und CD105 sowie das *stem cell antigen-1* (SCA-1)-Homolog CD59 und waren negativ für die lympho-hämatopoetischen Marker CD34 und CD45. Sowohl in ASC- als auch in SSC-Zellen konnte zudem der Stammzellmarker Musashi-1 nachgewiesen werden. Unter neurogenen Induktionsbedingungen (NID) kam es zur Ausbildung einer mit neuronalen Progenitorzellen vergleichbaren Morphologie. Hierbei zeigten sowohl ASC- als auch SSC-Zellen immunhistologisch eine deutlich intensivere Musashi-1-Markierung sowie in Einzelfällen von β -III-Tubulin bei nahezu unveränderter Expression von Nestin. In ASC-Zellen zeigte sich zudem nach 6 bzw. 12 Stunden eine geringgradig erhöhte Genexpression von GFAP, β -III-Tubulin, Vimentin und BDNF. In beiden Fällen war zudem eine vermehrte Expression der neuroregulatorischen Transkriptionsfaktoren Hes1 und SOX4 nachweisbar. Zudem konnte für beide Zellentitäten ein signifikanter antiproliferativer Effekt des neurogenen Induktionsmediums bzw. der Einzelsubstanzen nachgewiesen werden. Auf der Ebene des Zellzyklus zeigte sich eine Arretierung der Zellen im Bereich der G2-M-Transition. Immunhistologisch konnte in ASC- und SSC-Zellen der CREB-Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden; unter NID zeigte sich zudem ein verändertes Expressionsprofil von CREB-ATF-Transkriptionsfaktoren, insbesondere von CREM. Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl ASC- als auch SSC-Zellen unter definierten Induktionsbedingungen spezifische Charakteristika neuronaler Progenitorzellen adaptierten und dass auf Ebene der Signaltransduktion hierbei wahrscheinlich Faktoren der CREB-ATF-Familie beteiligt waren. Jedoch machen die Ergebnisse auch deutlich, dass die Gestalt der Zellen kein eindeutiges Kriterium eines neurogenen Differenzierungsprozesses ist; vielmehr könnte es sich hierbei um ein im Zuge eines Zellzyklusarrestes auftretendes Sekundärphänomen handeln. Daher sollte eine kritische Reevaluation bisher publizierter Studien, welche die Morphologie als zentrales Differenzierungskriterium beschreiben, dringend erfolgen.

VIII. Literaturverzeichnis

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425: 968 - 73

Andersen K, Launer LJ, Ott A, Hoes AW, Breteler MM, Hofman A (1995) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study. *Neurology* 45: 1441 - 45

Araki E, Forster C, Dubinsky JM, Ross ME, Iadecola C (2001) Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. *Stroke* 32: 2370 - 75

Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2003) In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111: 1922 - 31

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM (2004) Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6: 7 - 14

Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F (2003) Effects of transforming growth factor beta 1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 9: 1301 - 12

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25: 3211 - 22

Baek JY, Hur W, Wang JS, Bae SH, Yoon SK (2007) Selektive COX-2 inhibitor, NS-398, supresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest. *World J Gastroenterol* 13: 1175 - 81

Banas A, Teratani E, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T (2007) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46: 219 - 28

Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P, Niklinski WT, Myers CE, Trepel JB (1994) Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5330 - 34

Baptist M, Dumont JE, Roger PP (1993) Demonstration of cell cycle kinetics in thyroid primary culture by immunostaining of proliferating cell nuclear antigen: differences in cyclic AMP-dependent and -independent mitogenic stimulations. *J Cell Sci* 105: 69 - 80

Bartlett PF, Richards LR, Kilpatrick TJ, Talman PS, Bailey KA, Brooker GJ, Dutton R, Koblar S, Nurcombe V, Ford M (1995) Regulation of neural precursor differentiation in the embryonic and adult forebrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 559 - 62

Bateman JM, McNeill H (2006) Insulin/IGF signalling in neurogenesis. *Cell Mol Life Sci* 63: 1701 - 5

Bateman JM, McNeill H (2004) Temporal control of differentiation by insulin receptor/Tor pathway in *Drosophila*. *Cell* 119: 87 - 96

Beard CM, Waring SC, O'Brien PC, Kurland LT, Kokmen E (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc* 73: 951 - 55

Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, Muhr J (2006) The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev* 20: 3475 - 86

Bertani N, Malatesta P, Volpi G, Sonogo P, Perris R (2005) Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci* 118: 3925 - 36

Betre H, Ong SR, Guilak F, Chilkoti A, Fermor B, Setton LA (2006) Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials* 27: 91 - 99

Björntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U (1978) Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19: 316 - 24

Björntorp P, Karlsson M, Pettersson P, Sypniewska G (1980) Differentiation and function of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J Lipid Res* 21: 714-23

Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR (2005) Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* 58: 509 - 14

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song K-H, Sharma A, O'Neil JJ (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7999 - 8004

Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE (2005) Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 16: 1131 - 41

Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P (2005) Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 142 - 50

Büsches R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G (1999) Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9: 435 - 42

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC (2005) Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 370 - 79

Chang JK, Wang GJ, Tsai ST, Ho ML (2005) Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res* 46: 200 - 10

Chiou M, Xu Y, Longaker MT (2006) Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 644 - 52

Choi YS, Cha SM, Lee YY, Kwon SW, Park CJ, Kim M (2006) Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 631 - 37

Chu MS, Chang CF, Yang CC, Bau YC, Ho LL, Hung SC (2006) Signalling pathway in the induction of neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells. *Cell Signal* 18: 519 - 30

Chunmeng S, Tianmin C (2004) Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc.* 36: 1578 - 81

Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H, Potten CS (2005) A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol* 277: 443 - 56

Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, Breitbart AS (2006) Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 117: 857 - 63

Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT (2004) Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 22: 560 - 67

Cramer LP, Mitchison TJ (1997) Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Mol Biol Cell* 8: 109 - 19

Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84: 109 - 29

Dardick I, Posnanski WJ, Waheed I, Setterfield G (1976) Ultrastructural observations on differentiating human preadipocytes cultured in vitro. *Tissue Cell* 8: 561 - 71

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204 - 13

Dawson TM, Ginty DD (2002) CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide. *Nat Med* 8: 450 - 51

Dekaney CM, Rodriguez JM, Graul MC, Henning SJ (2006) Isolation and characterization of a putative intestinal stem cell fraction from mouse jejunum. *Gastroenterology* 129: 1567 - 80

Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 148 - 152

de la Fuente R, Abad JL, Garcia-Castro J, Fernandez-Miguel G, Petriz J, Rubio D, Vicario-Abejon C, Guillen P, Gonzales MA, Bernad A (2004) Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp Cell Res* 297: 313 - 28

de Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 89: 267 - 70

de Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101 - 9

di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC (2006) Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 119: 2945 - 52

Dicker A, Le Blanc K, Åström G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308: 283 - 90

Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P (2003a) Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21: 622 - 29

Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P (2003b) Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pad. *J Bone Joint Surg Br* 85: 747 - 47

Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL (2005) Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 23: 1266 - 75

Dumaz N, Light Y, Marais R (2002) Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22: 3717 - 28

Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D, Figer A, Birkenfeld S, Madar-Shapiro L, Benamouzig R, Arber N (2006) Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and downregulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer* 42: 422 - 26

Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 763 - 69

Estes BT, Wu AW, Guilak F (2006) Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 54: 1222 - 32

Eyers PA, Liu J, Hayashi NR, Lewellyn AL, Gautier J, Maller JL (2005) Regulation of the G2/M transition in xenopus oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280: 24339 - 46

Felling RJ, Snyder MJ, Romanko MJ, Rothstein RP, Ziegler AN, Yang Z, Givogri MI, Bongarzone ER, Levison SW (2006) Neural stem / progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia / ischemia. *J Neurosci* 26: 4359 - 69

Ferencik M, Novak M, Rovensky J, Rybar I (2001) Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl Lek Listy* 102: 123 - 32

Fujimura J, Ogawa R, Mizuno H, Fukunaga Y, Suzuki H (2005) Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys res Commun* 333: 116 - 21

Fukui T, Takeda H, Shu HJ, Ishihama K, Otake S, Suzuki Y, Nishise S, Ito N, Sato T, Togashi H, Kawata S (2006) Investigation of musashi-1 expressing cells in the murine model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Dig Dis Sci* 51: 1260 - 68

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433 - 38

Gao Y, Nikulina E, Mellado W, Filbin MT (2003) Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci* 23: 11770 - 77

García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, Garcí-Sancho L (2003) Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 18: 451 - 54

Geddis MS, Tornieri K, Giesecke A, Rehder V (2004) PLA2 and secondary metabolites of arachidonic acid control filopodial behavior in neuronal growth cones. *Cell Motil Cytoskeleton* 57: 53 - 67

Gingras M, Champigny MF, Berthod F (2007) Differentiation of human skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J Cell Physiol* 210: 498 - 506

Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW (2000) Liver Regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 156: 607 - 19

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189: 54 - 63

Grounds MD (1999) Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol* 12: 535 - 43

Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM (2006) Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206: 229 - 37

Guo L, Yin F, Meng HQ, Ling L, Hu-Te TN, Li P, Zhang CX, Yu S, Duan DS, Fan HX (2005) Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. *Biomed Environ Sci*. 18: 36 - 42

Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of activating transcription factor / cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273: 1 - 11

Hanson MG, Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1998) Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 18: 7361 - 71

Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, Backovic S, Rothstein JD, Kerr DA (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7123 - 28

Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto M, Ishihara M (2006) Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76: 230 - 39

Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84: 1663 - 70

Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G, Landberg G (2003) Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer* 88: 1417 - 23

Hee CK, Nicoll SB (2006) Induction of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts: potential application to bone tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1: 521 - 24

Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A (2004) Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 117: 4411 - 22

Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102: 3483 - 93

Hewett SJ, Uliasz TF, Vidwans AS, Hewett JA (2000) Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 417 - 25

Hial V, De Mello MC, Horakova Z, Beaven MA (1977) Antiproliferative activity of anti-inflammatory drugs in two mammalian cell culture lines. *J Pharmacol Exp Ther* 202: 446 - 54

Hirohata M, Ono K, Naiki H, Yamada M (2005) Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* 49: 1088 - 99

Hirsch J, Batchelor B (1976) Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5: 299 - 311

Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK (2005) Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 36: 2718 – 24

Hoffmann C (2000) COX-2 in brain and spinal cord – implications for therapeutic use. *Curr Med Chem* 7: 1113 - 20

Hogan MR, Cockram GP, Lu R (2006) Cooperative interaction of Zhangfei and ATF4 in transactivation of the cyclic AMP response element. *FEBS Lett* 580: 58 - 62

Hogg RC, Chipperfield H, Whyte KA, Stafford MR, Hansen MA, Cool SM, Nurcombe V, Adams DJ (2004) Functional maturation of isolated neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19: 2410 - 20

Houslay MD, Milligan G (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22: 217 - 24

Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P (2004) Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 113: 585 - 94

Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B (2005) Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone-marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. *J Orthop Res* 23: 1383 - 89

Im GI, Shin YW, Lee KB (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13: 845 - 53

Imniger S (2002) Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett* 532: 7 - 11

Ishiwata T, Kudo M, Onda M, Fujii T, Teduka K, Suzuki T, Korc M, Naito Z (2006) Defined localization of nestin-expressing cells in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 32: 360 - 68

Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA (2005) Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 14: 440 - 51

Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodríguez LV (2005) Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* 174: 2041 - 2045

Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ (2001) Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 19: 219 - 25

Jiang X, Paskind M, Weltzien R, Epstein PM (1998) Expression and regulation of mRNA for distinct isoforms of cAMP-specific PDE-4 in mitogen-stimulated and leukemic human lymphocytes. *Cell Biochem Biophys* 28: 135 - 60

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzales XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Plackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC,

Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41 - 9

Jin XB, Sun YS, Zhang K, Wang J, Ju XD, Lou SQ (2007) Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. *Acta Pharmacol Sin* 28: 663 - 71

Jirásek T, Písaríková E, Viklický V, Mandys V (2007) Expression of class III beta-tubulin in malignant epithelial tumours: an immunohistochemical study using TU-20 and TuJ-1 antibodies. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 41 - 45

Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 306: 343 - 48

Kamiya K, Sakakibara K, Ryer EJ, Hom RP, Leof EB, Kent KC, Liu B (2007) Phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein mediates transforming growth factor beta-induced downregulation of cyclin A in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 27: 3489 - 98

Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H (2000) Musashi1: An evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 22: 139 - 53

Kang SK, Jun ES, Bae YC, Jung JS (2003a) Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells in vitro. *Dev Brain Res* 145: 141 - 49

Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS (2003b) Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 183: 355 - 66

Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A, Bunnell BA (2004) Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci* 117: 4289 - 99

Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH (2006) Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells* 15: 583 - 94

Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2317 - 21

Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T (2003) Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letters* 535: 131 - 35

Keating A (2006) Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 13: 419 - 25

Kidokoro T, Tanikawa C, Furukawa Y, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K (2007) CDC20, a potential cancer Therapeutic target, is negatively regulated by p53. *Oncogene*, advance online publication 17 September 2007

Kim M, Choi YS, Yang SH, Hong HN, Cho SW, Cha SM, Pak JH, Kim CW, Kwon SW, Park CJ (2006) Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 386 - 92

Kim SS, Choi JM, Kim JW, Ham DS, Ghil SH, Kim MK, Kim-Kwon Y, Hong SY, Ahn SC, Kim SU, Lee YD, Suh-Kim H (2005) cAMP induces neuronal differentiation of mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK. *Neuroreport* 16: 1357 – 61

Klein T, Shephard P, Kleinert H, Kömhoff M (2007) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1605 - 1618

Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, Semeins CM, Muisman PI, Klein-Nulend J (2005) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng* 11: 1780 - 88

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici Ö, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123 - 35

Kokai LE, Rubin JP, Marra KG (2005) The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 116: 1453 - 60

Kralj M, Kapitanovic S, Kovacevic D, Lukac J, Spaventi S, Pavelic K (2001) Effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on the proliferation and apoptosis of colon carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 173 - 79

Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galiè M, Rigotti G, Mosna F, Tinelli M, Lovato L, Anghileri E, Andreini A, Pizzolo G, Sbarbati A, Bonetti B (2007) Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone, fat, spleen and thymus. *Bone* 40: 382 - 90

Kronemann N, Hockher WA, Busse R, Schini-Kerth V (1999) Growth-inhibitory effect of cyclic GMP- and cyclic AMP-dependent vasodilators on rat vascular smooth muscle cells: effect on cell cycle and cyclin expression. *Br J Pharmacol* 126: 349 - 57

Lara J, Kusano K, House S, Gainer H (2003) Interactions of cyclic adenosine monophosphate, brain derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor treatment on the survival and growth of postnatal mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Exp Neurol* 180: 32 - 45

Lee CC, Huang CC, Wu MY, Hsu KS (2005) Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem* 280: 18543 - 50

Lee J, Choi YH, Nguyen PM, Kim JS, Lee SJ, Trepel JB (1999) Cyclic AMP induces inhibition of cyclin A expression and growth arrest in human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1449: 261 - 68

Lee JH, Kemp DM (2006) Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 882 - 88

Lee JY, Chang MY, Park CH, Kim HY, Kim JH, Son H, Lee YS, Lee SH (2003) Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 73: 156 - 65

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS (2004) Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14: 311 - 24

Lei L, Liao W, Sheng P, Fu M, He A, Huang G (2007) Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. *Sci China C Life Sci* 50: 320 - 28

Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP (2004) Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370 - 73

Leong DT, Khor WM, Chew FT, Lim TC, Huttmacher DW (2006) Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments. *Cells Tissues Organs* 182: 1 -11

Lin HT, Chiou SH, Kao CL, Shyr YM, Hsu CJ, Tarng YW, Ho LL, Kwok CF, Ku HH (2006) Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol* 12: 4529 - 35

Lin Y, Tian W, Chen X, Yan Z, Li Z, Qiao J, Tang W, Zheng X (2005) Expression of exogenous or endogenous green fluorescent protein in adipose tissue-derived stromal cells during chondrogenic differentiation. *Mol Cell Biochem* 277: 181 - 90

Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu, L, Tang W, Zheng X, Chen X, Yan Z, Tian W (2006) Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem* 291: 1 - 10

Liu J, Li XD, Ora A, Heikkilä P, Vaehri A, Voutilainen R (2004) cAMP-dependent protein kinase activation inhibits proliferation and enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor- α in NCI-H295R adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 33: 511 - 22

Liu L, Xie Y, Lou L (2005) Cyclic AMP inhibition of proliferation of hepatocellular carcinoma cells is mediated by Akt. *Cancer Biol Ther* 4: 1240 - 47

Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M (2005) Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14: 65 - 69

López-Lluch G, Fernández-Ayala DJ, Alcaín FJ, Burón MI, Quesada JM, Navas P (2005) Inhibition of COX activity by NSAIDs or ascorbate increases cAMP levels and enhances differentiation in $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 -induced HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 436: 32 - 39

Lu P, Blesch A, Tuszynski MH (2004) Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artefact? *J Neurosci Res* 77: 174 - 91

Lysy PA, Smets F, Sibille C, Najimi M, Sokal EM (2007) Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 46: 1574 - 85

Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals neuronal lineage. *Development* 127: 5253 - 63

Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC (2005) DNA labeling in living cells. *Cytometry A* 67: 45 - 52

Martínez-Estrada OM, Muñoz-Santos Y, Julve J, Reina M, Vilaró S (2005) Human adipose tissue as a source of Flk-1⁺ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65: 328 - 33

McGeer PL, McGeer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21: 195 - 218

McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47: 425 - 32

Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21: 681 - 93

Michalczyk K, Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20: 665 - 71

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349 - 55

Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kanagawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H (2006) Monolayered mesenchymal stem cells repair myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12: 459 - 65

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 199 - 209

Mo Z, Moore AR, Filipovic R, Ogawa Y, Kazuhiro I, Antic SD, Zecevic N (2007) Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci* 15: 4132 - 45

Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2006) Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells. *Arthritis Rheum* 54: 843 - 53

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 17: 279 - 90

Moore KD, Dillon-Carter O, Conejero C, Poltorak M, Tornatore C, Freed WJ (1996) In vitro properties of a newly established medulloblastoma cell line, MCD-1. *Mol Chem Neuropathol* 29: 107 - 26

Moreels M, Vandenabeele F, Deryck, Lambrichts I (2005) Radial glial cells derived from the neonatal rat spinal cord: morphological and immunocytochemical characterization. *Arch Histol Cytol* 68: 361 - 69

Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P, Benhaim P, Chen IS, Hedrick MH (2003) Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther* 14: 59 - 66

Naderi S, Gützkow KB, Christoffersen J, Smeland EB, Blomhoff HK (2000) cAMP-mediated growth inhibition of lymphoid cells in G1: rapid down-regulation of cyclin D3 at the level of translation. *Eur J Immunol* 30: 1757 - 68

Nagase T, Matsumoto D, Nagase M, Yoshimura K, Shigeura T, Inouge M, Hasegawa M, Yamagishi M, Machida M (2007) Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis: a preliminary report. *J Craniofac Surg* 18: 49 - 53

Nagata H, Akiba Y, Suzuki H, Okano H, Hibi T (2006) Expression of musashi-1 in the rat stomach and changes during mucosal injury and restitution. *FEBS Letters* 580: 27 - 33

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y (2005) Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 25: 2542 - 47

Nègre N, Ghysen A, Martinez AM (2003) Mitotic G2-arrest is required for neural cell fate determination in *Drosophila*. *Mech Dev* 120: 253 - 65

Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I (2004) Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 77: 192 - 204

Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI (2002) Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34: 885 - 93

Nguyen L, Besson A, Heng JI, Schuurmans C, Teboul L, Parras C, Philpott A, Roberts JM, Guillemot F (2006) p27^{kip1} independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev* 20: 1511 - 24

Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A (1999) Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29: 520 - 27

Niles LP, Armstrong KJ, Rincón Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, Doering LC, Kirkham DL (2004) Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT₁ receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neuroscience* 5:41

Ning H, Lin G, Lue TF, Lin C (2006) Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation* 74: 510 - 18

Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, Kashima K, Mitsufuji S (2003) Expression of musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 48: 1523 - 29

Ohnuma S, Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40: 199 - 208

Okano H, Imai T, Okabe M (2002) Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci* 115: 1355 - 59

Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T (2005) Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res* 306: 349 - 56

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377 - 84

Pacherník J, Bryja V, Ešner M, Kubala L, Dvořák P, Hampl A (2005) Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: inhibitory effects of serum. *Physiol Res* 54: 115 - 22

Pan Y, Chen X, Wang S, Yang S, Bai X, Chi X, Li K, Liu B, Li L (2005) In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 548 – 56

Peng HB, Yang JF, Dai Z, Lee CW, Hung HW, Feng ZH, Ko CP (2003) Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival / growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 23: 5050 - 60

Peptan IA, Hong L, Mao JJ (2006) Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbit. *Plast Reconstr Surg* 117: 1462 - 70

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168 – 70

Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Liebermann JR (2005) Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 11: 120 - 29

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143 - 47

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells. *Circulation* 109: 656 – 63

Plitzko D, Rumpel, S, Gottmann K (2001) Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. *Eur J Neurosci* 14: 1412 - 15

Poznanski WJ, Waheed I, Van R (1973) Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest* 29: 570 - 6

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129: 118 - 29

Quidville V, Segond N, Pidoux E, Cohen R, Jullienne A, Lausson S (2004) Tumor growth inhibition by indomethacin in a mouse model of human medullary thyroid cancer: implication of cyclooxygenases and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Endocrinology* 145: 2561 - 71

Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34: 895 - 903

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK (2003) Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 75: 775 - 79

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL (2004) Secretion of angiogenetic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: r52 – r58

Rieske P, Krynska B, Azizi SA (2005) Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation* 73: 474 - 83

Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, Baily AS, Decker AD, Willenbring H, Grompe M, Fleming WH, Wong MH (2006) Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6321 - 25

Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375 - 80

Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201: 1397 - 1405

Rodríguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ (2006) Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12167 - 72

Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39: 13 - 25

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 371 - 79

Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE (2004) Characterization of neural / glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 187: 319 - 28

Sanchez S, Jimenez C, Carrera AC, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (2004) A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* 44: 231 - 42

Savitzky PA, Finkel T (2002) Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem* 277: 20535 - 40

Schroer K, Zhu Y, Saunders MA, Deng WG, Xu XM, Meyer-Kirchrath J, Wu KK (2002) Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators. *Circulation* 105: 2760 - 2765

Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H (2003) Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 74: 838 - 51

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109: 1291 - 1202

Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argiolu, Ristaldi MS, Sogos V (2006) Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci* 7:14

Sengenès C, Lolkède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié (2005) Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205: 114 - 22

Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 258 - 64

Servillo G, Della Fazia MA, Sassone-Corsi P (2002) Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Exp Cell Res* 275: 143 - 54

Sharma SK, Raj AB (1987) Transient increase in intracellular concentration of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate results in morphological and biochemical differentiation of C6 glioma cells in culture. *J Neurosci Res* 17: 135 - 41

Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT (2005) The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 116: 1686 - 96

Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT (2005) Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 23: 1012 - 20

Shimizu T, Sugawara K, Tosaka M, Imai H, Hoya K, Takeuchi T, Sasaki T, Saito N (2006) Nestin expression in vascular malformations: a novel marker for proliferative endothelium. *Neurol Med Chir* 46: 111 - 17

Sivaprasad U, Machida YJ, Dutta A (2007) APC/C – the master controller of origin licensing? *Cell Div* 2:8

Smith ML, Hawcroft G, Hull MA (2000) The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action.

Smith PJ, Blunt N, Wilshire M, Hoy T, Teesdale-Spittle P, Craven MR, Watson JV, Amos WB, Errington RJ, Patterson LH (2000) Characteristics of a novel deep red / infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry* 40: 280 - 91

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157 - 60

Song HJ, Stevens CF, Gage FH (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 5: 438 - 45

Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ (1997) Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48: 626 - 32

Sridhar J, Akula N, Pattabiraman N (2006) Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *AAPS J* 8: E204 - 21

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132 - 41

Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, Okano H, Shimizu H (2006) Expression of RNA-binding protein musashi-1 in hair follicle development and hair cycle progression. *Am J Pathol* 168: 80 - 92

Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 17: 1 - 10

Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2006) Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 12: 5834 - 45

Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20: 1803 - 15

Teng FY, Tang BL (2006) Axonal regeneration in adult CNS neurons – signaling molecules and pathways. *J Neurochem* 96: 1501 - 8

Terskikh AV, Bryant PJ, Schwartz PH (2006) Mammalian stem cells. *Pediatr Res* 59: 13R - 20R

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000a) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31: 235 – 40

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman I, Henegariu O, Krause DS (2000b) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11 - 16

Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, Ottosen PO, Walter S, Sørensen GL, Skøtt O, Jensen BL (2004) Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vasculature prostaglandin E₂ EP4 receptors. *J Am Soc Nephrol* 15: 1189 - 98

Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC (2003) Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotentia differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272: 398 - 402

Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H (2006) Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1135 - 40

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3: 778 - 84

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23: 727 - 737

Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H (2005) Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 81: 776 - 88

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D (2004) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72: 319 - 26

Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, Okano H (2006) Distinct functions of human numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the *Drosophila* larval brain. *Dev Neurosci* 28: 142 - 55

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14720 - 25

Uemura E, Greenlee HW (2006) Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp Neurol* 198: 48 - 53

Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, Le Jemtel TH, Alt E (2007) Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 28: 2667 - 77

Van RL, Bayliss CE, Roncardi DA (1976) Cytological and enzymatological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 58: 699 - 704

Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ (2007) Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 91 - 104

Vermette M, Trottier V, Ménard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J (2007) Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 28: 2850 - 60

Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL (1997) Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension* 30: 687 - 92

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33: 1402 - 16

Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA_A receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388: 686 - 90

Wang S, Garcia AJ, Wu M, Lawson DA, Witte ON, Wu H (2006) *Pten* deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1480 - 85

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897 – 901

Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V, Klisch C, Meissl H, Schnettler R (2006) Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone* 38: 911 - 21

Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Büssow H, Beck H, Brüstle O (2004) Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. *J Neurosci* 24: 5258 - 68

Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F (2003) Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 412: 196 - 212

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004) Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells ? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510 - 22

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418 - 29

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B (2005) Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23: 392 - 402

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364 - 70

Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371 - 86

Yang LY, Liu XM, Sun B, Hui GZ, Fei J, Guo LH (2004) Adipose tissue-derived stromal cells express neuronal phenotypes. *Chin Med J (Engl.)* 117: 425 - 29

Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR (2007) In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells / poly lactide-co-glycolic acid

constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 13: 619 - 27

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327: 449 - 62

Yotsuyanagi T, Urushidate S, Watanabe M, Sawada Y (1999) Reconstruction of a three-dimensional structure using cartilage regenerated from the perichondrium of rabbits. *Plast Reconstr Surg* 103: 1120 - 23

Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissue of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors. *Anat Rec* 264: 51 - 62

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211 - 28

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279 - 95

Zuk PA (2004) International Fat Applied Technology Society, Pittsburgh, PA, USA. Consensus Statement

IX. Appendix

Tab. 1: Differenzierungs-Potential von Adipose-derived Stem Cells = ASC (Literaturübersicht, geordnet nach Erstautor)

EPC = Endothelial Progenitor Cell; SMC = Smooth Muscle Cell

<i>Ursprung</i>	<i>Differenzierungslinie(n)</i>	<i>Studiendesign</i>	<i>Autor / Referenz</i>
human	neurogen	in vitro	Ashjian et al., 2003
human	chondrogen	in vitro	Awad et al., 2003 + 2004
human	hepatogen	in vitro / in vivo	Banas et al., 2007
human	chondrogen	in vitro	Betre et al., 2006
Ratte	adipogen	in vitro	Björntorp et al., 1978 + 1980
human	adipogen, chondrogen, neurogen, osteogen	in vitro	Boquest et al., 2005
human	epithelial; adipogen	in vitro	Brzoska et al., 2005
human	endothelial; adipogen, osteogen	in vitro / in vivo	Cao et al., 2005
murin	chondrogen	in vitro	Chiou et al., 2006
human	adipogen	in vitro / in vivo	Choi et al., 2006
Lewis Ratte	osteogen	in vitro / in vivo	Conejero et al., 2006
murin	osteogen	in vivo	Cowan et al., 2004
human	adipogen, chondrogen, neurogen, osteogen	in vitro	de Ugarte et al., 2003
human	adipogen, osteogen, chondrogen	in vitro	Dicker et al., 2005
murin	myogen	in vitro / in vivo	di Rocco et al., 2006
human	chondrogen, osteogen	in vitro / in vivo	Dragoo et al., 2003a, b
human	chondrogen	in vitro / in vivo	Erickson et al., 2002
human	chondrogen	in vitro	Estes et al., 2006
murin	neurogen	in vitro	Fujimura et al., 2005
human	adipogen, osteogen	in vitro	Gronthos et al., 2001

human	adipogen, chondrogen, neurogen, osteogen	in vitro	Guilak et al., 2006
human	osteogen	in vitro / in vivo	Hattori et al., 2006
human	adipogen	in vitro	Hauner et al., 1989
human	chondrogen	in vitro	Huang et al., 2004 + 2005
human	chondrogen, osteogen	in vitro	Im et al., 2005
human	chondrogen	in vitro / in vivo	Jin et al., 2007
human; Rhesus Monkey; Ratte	neurogen (adipogen, chondrogen, osteogen)	in vitro / in vivo	Kang et al., 2003b + 2004 + 2006
human	myogen	in vitro / in vivo	Kim et al, 2006
human	adipogen, chondrogen, neurogen, osteogen	in vitro	Krampera et al., 2007
human	myogen; adipogen, osteogen	in vitro	Lee JH & Kemp DM, 2006
human	osteogen	in vitro	Leong et al., 2006
murin	chondrogen	in vitro	Lin et al., 2005
human	adipogen, chondrogen, myogen, osteogen	in vitro	Lin et al., 2006
human	endothelial (EPC)	in vitro	Martínez-Estrada et al., 2005
Sprague-Dawley Ratte	cardiomyogen	in vivo	Miyahara et al., 2006
human	myogen	in vitro	Mizuno et al., 2002
human	adipogen, chondrogen, osteogen	in vitro	Mochizuki et al., 2006
human	endothelial	in vitro / in vivo	Moon et al., 2006
human	adipogen, osteogen	in vitro	Morizono et al., 2003
murin	endothelial / Angiogenese	in vitro / in vivo	Nakagami et al., 2005
human	neurogen	in vitro / in vivo	Nagase et al., 2007
Sprague-Dawley Ratte	adipogen, myogen, neurogen	in vitro	Ning et al., 2006
Kaninchen	osteogen	in vitro	Peptan et al., 2006
human + murin	epithelial	in vitro / in vivo	Planat-Benard et al., 2004

Fortsetzung Tabelle 1

human	adipogen	in vitro	Poznanski et al., 1973
Kaninchen (weiße Neuseeländer)	cardiomyogen	in vitro	Rangappa et al., 2003
human	myogen (SMC); adipogen, osteogen	in vitro	Rodríguez et al., 2006
human + murin	neurogen / glial	in vitro	Safford et al., 2002 + 2004
human	adipogen	in vitro	Sengenès et al., 2005
human	hepatogen	in vitro / in vivo	Seo et al., 2005
murin	osteogen; adipogen	in vitro	Shi et al., 2005
human	hepatogen	in vitro	Talens-Visconti et al., 2006
Sprague-Dawley Ratte	adipogen, chondrogen, neurogen	in vitro	Tholpady et al., 2003
human	endokrin (Insulin, Somatostatin, Glukagon)	in vitro	Timper et al., 2006
human	adipogen	in vitro	Van et al., 1976
human	osteogen	in vitro	Varma et al., 2007
human	adipogen	in vitro	Vermette et al., 2007
human	adipogen, chondrogen, osteogen	in vitro	Wickham et al., 2003
human	adipogen, chondrogen, osteogen	in vitro	Winter et al., 2003
Ratte	neurogen; adipogen	in vitro	Yang et al., 2004
human	osteogen	in vitro / in vivo	Yoon et al., 2007
human	adipogen, chondrogen, myogen, neurogen, osteogen	in vitro	Zuk et al., 2001 + 2002

Fortsetzung Tabelle 1

Tab. 2: ASC-Expressionsprofil definierter Oberflächenantigene (Literaturübersicht, geordnet nach Erstautor)

CD, Cluster of Differentiation; HLA, humanes Leukozyten Antigen; vWF, von-Willebrand-Faktor; Flk-1, fetal liver kinase 1; Flt3, Fms-like tyrosin kinase 3; NGFR, nerve growth-factor receptor; SSEA, Stage Specific Embryonic Antigen ; (...), schwache bzw. fragliche Expression

Ursprung	Phänotyp	Autor / Referenz
human	<u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD90 <u>negativ für:</u> CD11c, CD45	Ashjian et al., 2003
human	<u>positiv für:</u> CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD59, CD90; HLA I <u>negativ für:</u> CD11b, CD45; HLA II	Aust et al., 2004
human	<u>positiv für:</u> CD13, CD29, (CD36), (CD43), CD44, CD47, CD49a-f, CD51, (CD61), (CD63), CD90, (CD104), CD105, (CD146); HLA-I; (vWF) <u>negativ für:</u> CD34 [*] , CD38, CD45, CD62E, CD62P, CD133, CD117/c-kit; NGFR; HLA-II [*] : initial zeigten sich die frisch isolierten ASCs positiv für CD34, unter Kulturbedingungen kam es dann zum Verlust dieses Markers, wobei für einen Donor der Nachweis einer CD34-Expression auch unter Kultur erfolgen konnte	Boquest et al., 2005
human	<u>positiv für:</u> CD10, CD13, CD44, CD90; Vimentin <u>negativ für:</u> CD31, CD34, CD45; vWF	Brzoska et al., 2005
human	<u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD105, CD166; Flk-1; HLA I <u>negativ für:</u> CD31, CD34, CD45, CD106, CD184	Cao et al., 2005
human	<u>positiv für:</u> CD73, CD90, CD105 <u>negativ für:</u> CD34, CD45	Choi et al., 2006
human	<u>positiv für:</u> CD9, (CD13), CD29, CD44, CD49a-c, (CD49d), CD49e, CD51, (CD54), CD55, CD58, CD59, CD90, (CD95), CD105, (CD166); HLA I; β_2 -Mikroglobulin <u>negativ für:</u> CD11b, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49f, CD50, CD56, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD71, CD 102, CD104, CD106, CD117, CD133; NGFR; HLA II; Glykophorin-A	de la Fuente et al., 2004
human	<u>positiv für:</u> CD13, CD29, (CD34), CD44, CD49d, CD54, CD58, CD90, CD105, CD166; SH3, STRO-1 <u>negativ für:</u> CD3, CD4, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD45, CD56, CD62P, CD104, CD106, CD144	de Ugarte et al., 2003
human	<u>positiv für:</u> CD9, CD10, CD13, CD29, CD34 ¹ , CD44, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105, CD 106, CD146, CD166; HLA I ¹ : positiv unter FACS, negativ unter Immunhistochemie <u>negativ für:</u> CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD31, CD45, CD50, CD56, CD62e; HLA II; STRO-1; FVIII	Gronthos et al., 2001

Ratte	<u>positiv für:</u> CD90, CD117, CD133 <u>negativ für:</u> CD34, CD45	Kang et al., 2006
human	<u>positiv für:</u> CD44, CD73, CD90, CD105, (CD106) <u>negativ für:</u> CD11C, CD14, CD31, CD34, CD45, (CD106), CD123	Krampera et al., 2007
human	<u>positiv für:</u> CD13, CD44, CD73, CD90, HLA I <u>negativ für:</u> CD34, CD45, CD56, CD184, HLA II	Lee JH & Kemp DM, 2006
human	<u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD90, CD105 <u>negativ für:</u> CD34, CD14b; HLA-DR; CD117/c-Kit	Lee et al, 2004
human	<u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD73, CD90 <u>negativ für:</u> CD14, CD31, CD34, CD45, CD71	Leong et al., 2006
human	<u>positiv für:</u> CD34 <u>negativ für:</u> CD31, CD45, CD133	Miranville et al., 2004
Sprague-Dawley Ratte	<u>positiv für:</u> CD29, CD90; (CD71, CD106, CD117) <u>negativ für:</u> CD31, CD34, CD45; (αSMA)	Miyahara et al., 2006
human	<u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD90, CD105 <u>negativ für:</u> CD14, CD31, CD34 ¹ , CD45, Flk-1 ¹ : Zellen der Passage 0 (P0) exprimierten zu 90% CD34; die Abnahme führen die Autoren auf eine Herabregulierung der CD34-Gen-Expression zurück und nicht auf eine Selektion	Moon et al., 2006
Sprague-Dawley Ratte	<u>positiv für:</u> STRO-1 <u>negativ für:</u> C34 ¹ ¹ : Zellen der Passage 1 exprimierten CD34; keine Expression konnte dagegen bei Zellen der Passage 3 festgestellt werden	Ning et al., 2006
human	<u>positiv für:</u> CD13, CD34; HLA I <u>negativ für:</u> CD14, CD31, CD45, CD144	Planat-Benard et al., 2004
human	<u>positiv für:</u> CD13, CD44, CD73, CD90, CD105; HLA I; CD34 ¹ ¹ : Abnahme positiver Zellen in Abhängigkeit der Passage <u>negativ für:</u> CD31, CD45, CD144; HLA II	Puissant et al., 2005

Fortsetzung Tabelle 2

human	<p><u>positiv für:</u> CD13, CD44, CD49b, CD90, CD105; HLA I</p> <p><u>negativ für:</u> CD15, CD34, CD117, CD133; STRO-1; FLK-1; gly-A; HLA II</p>	Rodriguez et al., 2005
human	<p><u>positiv für:</u> CD34[*]</p> <p><u>negativ für:</u> CD31[*], CD105[*]</p> <p>[*]: nur die den o.g. Phenotyp exprimierende Subpopulation zeigte lt. Autoren ein entsprechendes adipogenes Differenzierungspotential</p>	Sengenès et al., 2005
human	<p><u>positiv für:</u> CD29, CD44, CD105, CD90</p> <p><u>negativ für:</u> CD34, CD45, CD14; HLA II</p>	Seo et al., 2005
human	<p><u>positiv für:</u> CD13, CD90, CD105</p> <p><u>negativ für:</u> CD45</p>	Taléns-Visconti et al., 2006
human	<p><u>positiv für:</u> CD54, CD90, CD105, CD166; HLA I</p> <p><u>negativ für:</u> CD34[*], CD106, CD117[*], CD133, Flt3; HLA II[*]</p> <p>[*]: initial positiv, Herabregulation unter in vitro Kulturbedingungen</p>	Varma et al., 2007
human	<p><u>positiv für:</u> CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166; HLA I</p> <p><u>negativ für:</u> CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133; SSEA4; HLA II</p>	Wagner et al., 2005
human	<p><u>positiv für:</u> CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD59, CD105, CD106, CD166</p> <p><u>negativ für:</u> CD11a, b, c, CD14, CD18, CD31, CD34, CD45, CD50, CD54, CD56, CD62e; HLA II</p>	Wickham et al., 2003
human	<p><u>positiv für:</u> CD13, CD29, CD44, CD49d, CD71, CD90, CD105; SH3; STRO-1</p> <p><u>negativ für:</u> CD31, CD34, CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62e, CD104, CD106</p>	Zuk et al., 2002

Fortsetzung Tabelle 2

Referenz	Ursprung	Induktionsprotokoll	Nachweis neurogener Differenzierung
Aslijian et al., 2003	human	DMEM + 10% FBS + IBMX + Indomethacin + Insulin	NSE (+/+), Vimentin (+/+), NeuN (+/+), GFAP (-/-), MAP2 (-/-), tau (-/-), trk-A (#/+)
Boquest et al., 2005	human	DMEM (4.5g/l Glukose) + 10% FBS + B27, EGF, bFGF (5 d) → DMEM + IBMX + Indomethacin + Insulin (5 h)	NF200 (-/+), GFAP (-/-)
Fujimura et al., 2005	murin	DMEM + IBMX + Indomethacin + Insulin	Nestin (+/+), NF70 (+/+), MAP2 (-/+), GFAP (-/+); Synaptophysin (+/-), GABA _A -R α1 (-/-); elektronenmikroskopischer Nachweis von Mikrotubuli
Guilak et al., 2006	human	α-MEM + (in 0.5% EtOH) + KCl + Valproat + Forskolin + Hydrocortison + Insulin	NeuN (-/+); NeuN-positive Zellen zudem GFAP +, GAP43 +
Kang et al., 2003b	human	α-MEM + 10% FBS + 5-Azacytidin + NGF, BDNF, bFGF (96 h) // NB + B27; ex vivo Transduktion mittels BDNF-Adenovirus → Injektion in in-vivo-Modell	Nestin (+/+), NSE (-/-), MAP2 (-/+), GFAP (#/+)
Kang et al., 2004	Rhesus Affe	NB + B27, bFGF, EGF, (BDNF) (4-7 d) → NB + B27 (10 d) auf PDL-Laminin	Nestin (+/+), MAP2ab (-/+), GFAP (+/+), NeuN (-/+), NF160 (-/+), trk-B (-/+), MBP (-/-), ChAT (-/-), GAD ₆₅ (-/-)
Kang et al., 2006	Ratte	NB + B27, bFGF, EGF (4-7 d) → NB + 2% FBS + RA + B27 auf PDL-Laminin (10 d) (neurogen) NB + Shh + bFGF + PDGF (4-5 d) (oligodendrogen)	GFAP (+), A2B5 (+), MBP (+), TuJ / βIII-Tubulin (+), PDGFRα (+)
Krampert et al., 2007	human	DMEM + FBS + bFGF (24 h) → DMEM + N2 + BHA + KCl + Valproat + Forskolin (2 - 16 h); Schwannzell-Co-Kultur (± Präinduktion)	PMP22 (#/+), GFAP (#/+), MAP2 (#/+), NeuN (-/+), PSA-NCAM (-/+), Nestin (-/+), S100 (-/+), GalC (-/+)
Nagase et al., 2007	human	DMEM/F12 (1:1) + EGF + bFGF + B27	Nestin ↑, Musashi-1 ↑; Leptin ↓ (quantitative RT-PCR)
Ning et al., 2006	Ratte	DMEM + IBMX + Indomethacin + Insulin (bzw. als Kombination oder Einzelsubstanz)	S100 (-/+), NF70 (-/+), Nestin (+/+); βIII-Tubulin (±/-)
Safford et al., 2002	human + murin	DMEM + BHA (in 0.5% EtOH) + KCl + Valproat + Forskolin + Hydrocortison + Insulin	human: Nestin (-/+), NF-M (#/+), NeuN (-/+), GFAP (-/+) murin: Nestin (#/+), GFAP (-/+), NeuN (-/+)
Safford et al., 2004	murin	α-MEM + BHA (in 0.5% EtOH) + KCl + Valproat + Forskolin + Hydrocortison + Insulin	Nestin (#/+), GFAP (-/+), S100 (-/+), NeuN (-/+), MAP2 (-/+), tau (-/+), βIII-Tubulin (-/+), GABA (-/+), NMDAR1 (-/+), NMDAR (-/+), α1-Ca ²⁺ -Kanal (#/+), GAP-43 (-/+), Synapsin I (+/+), DDC (-/-), TH (-/-), 5-HTP (-/-)
Tholpady et al., 2003	Ratte	DMEM + 20% FBS + β-Mercaptoethanol (24 h) → DMEM + β-Mercaptoethanol	NF-M (#/+), tau (-/+)
Yang et al., 2004	Ratte	DMEM + 10% FBS (Expansion) → DMEM + 2 - 3% FBS (Induktion)	unter Expansionsbedingungen: NSE (+), Vimentin (+), NFT (-); Adaptation einer neuronenähnlichen Morphie unter Induktion
Zuk et al., 2002	human	DMEM + 20% FBS + β-Mercaptoethanol (24 h) → DMEM + β-Mercaptoethanol	Nestin (+/+), NSE (+/+), NeuN (-/+), MAP2 (-/-), NF-70 (-/-), GalC (-/-), GFAP (-/-), ChAT (-/-), GAD ₆₅ (-/-), MBP (-/-)

Tab. 3: Ansätze neurogener Differenzierung von ASC (Übersicht)

α-MEM, alpha Minimum Essential Medium; bFGF, basic Fibroblast Growth Factor; BDNF, Brain-derived Neurotrophic Factor; BHA, Butylhydroxyanisol; ChAT, Cholinacetyltransferase; DDC, Dopadecarboxylase; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; EGF, Epidermal Growth Factor; EtOH, Ethanol; FBS, Fetal Bovine Serum; GABA, γ-amino-Buttersäure; GABA_A-R α1, GABA_A-Rezeptor Subunit α1; GAD65, Glutamat-Decarboxylase (65 kDa); GalC, Galactocerebroside; GAP-43, Growth-associated Protein-43; GFAP, Glial Fibrillary Acid Protein; GGF-2, Glial Growth Factor-2; 5-HTP, 5-Hydroxy-Tryptophan; IBMX, Isobutylmethylxanthin; KCl, Kalium-Chlorid; MAP, Microtubulus-associated Protein; MBP, Myelin Basic Protein; NB, Neurobasal-Medium; NCAM, Neural Cell Adhesion Molecule; NeuN, Neuronal Nuclear Antigen; NF, Neurofilament; NMDAR, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (-Subunit); NGF, Nerve Growth Factor; NSE, Neuron-spezifische Enolase; PDGF, Platelet Derived Growth Factor; PDL, Poly-D-Lysin; PMP22, peripheres Myelinprotein 22; PSA, Polysialinsäure; RA, Retinsäure; TH, Tyrosin-Hydroxylase; trk-A/B, Tyrosinkinase-assoziiierter Rezeptor A/B; + = positive Expression, - = negativ / keine Expression; ± = schwache bzw. fragliche Expression; („vor Induktion bzw. Kontrolle“ / „nach Induktion“)

X. Danksagung

Die Fertigstellung einer solchen Dissertation ist ohne die Hilfe einer Vielzahl von Personen gar nicht möglich, will man die Aufgabe erfolgreich meistern. Ich bitte jedoch an dieser Stelle um Verständnis, dass ich hier nicht alle namentlich nennen kann. Nichts desto trotz gilt mein ganz besonderer Dank eben all diesen.

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. U. Schumacher, für die Überlassung des Themas und für seine permanente Bereitschaft, mir zu buchstäblich jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. med. T. Jansen, Direktor der Klinik für plastische, ästhetische und rekonstruktive Chirurgie Hamburg-Pöseldorf, für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. C. Lange, Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, für die Unterstützung im Rahmen der Oberflächencharakterisierung und FACS-Analyse.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. D. Steinemann, Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Zusammenarbeit im Rahmen der Genexpressionsanalyse bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. R. Müller, Institut für Anatomie II – Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, für die Unterstützung im Zuge der Zellzyklus-Analysen.

Mein ganz spezieller Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie II – Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, insbesondere Frau S. Feldhaus, Frau R. Gehrcke, Frau M. Märker und Herrn K. Siebert für deren Hilfe im Rahmen der praktischen Laborarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Familie sowie bei meiner Verlobten, Frau L. Lembke, für deren Unterstützung in Zeiten von Erfolg und Misserfolg sowie insbesondere deren Geduld und Verständnis bedanken.

XI. Lebenslauf

Name: Kai Michael KOMPISCH
Geburtsdatum: 18.06.1980
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

1986 – 1990 Besuch der Grundschule in Wentorf bei Hamburg

1990 – 1999 Besuch des Gymnasiums in Wentorf bei Hamburg

Juli 1999 Abitur

Juli 1999 – Juli 2000 Zivildienst

April 2001 Aufnahme des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg

März 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit April 2004 Doktorand am Institut für Anatomie II – Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. U. Schumacher)

Februar 2007 – Februar 2008 Praktisches Jahr

I. Tertial Innere Medizin:

Bethesda Allgemeines Krankenhaus Bergedorf (BAKB), Klinik für Innere Medizin (Prof. Dr. med. T. v. Schrenck)

II. Tertial Chirurgie:

Bethesda Allgemeines Krankenhaus Bergedorf (BAKB), Klinik für Chirurgie (Prof. Dr. med. M. Sailer)

III. Tertial Radiologie:

Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift, Abteilung für diagnostische und interventionelle Radiologie (Prof. Dr. med. G. Krupski-Berdien)

XII. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Kai M. Kompisch