Aus der Klinik für Augenheilkunde des Kopf- und Hautzentrums des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf Direktor Professor Dr. med. Gisbert Richard

Das Integrations- und Differenzierungspotential von neuralen Stammzellen im embryonalen Nervensystem: Xenotransplantation von murinen neuralen Stammzellen in das Nervensystem von Hühnchenembryonen

> Promotion Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Marion Christiane Mayr Aus Bochum

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin Der Universität Hamburg am: 05.05.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Udo Bartsch Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Markus Glatzel Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Boris Fehse

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Stammzellen	6
1.1.1 Embryonale Stammzellen	9
1.1.2 Gewebespezifische Stammzellen	13
1.1.2.1 Knochenmarks-Stammzellen	14
1.1.2.2 Retinale Vorläufer- und Stammzellen	16
1.1.3 Neurale Stammzellen	20
1.1.3.1 Neurale Stammzellen in vitro	22
1.1.3.2 Neurale Stammzellen in vivo	24
1.1.3.4 Adulte neurale Stammzellen	27
1.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen	30
1.2 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	32
1.3 Theoretische Grundlagen	34
1.3.1 EGFP-exprimierende Zellen	34
1.3.2 Zelltypen des zentralen Nervensystems und zelltypspezifische Proteine	34
1.3.2.1 Neurone	34
1.3.2.2 Astrozyten	35
1.3.2.3 Oligodendrozyten	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	37
2.2 Verwendete Lösungen	43
2.3 Versuchstiere	46
2.3.1 EGFP-transgene Mäuse	46
2.3.2 Hühnchenembryonen	46
2.3.3 Transplantationen von neuralen Stammzellen in das Gehirn von	
Hühnchenembryonen	47
2.3.4 Präparation der Gewebe	49
2.3.5 Herstellung der Gewebeschnitte	49
2.4 EGFP-exprimierende neurale Stammzellen	50
2.4.1 Isolation der Zellen	50
2.4.2 Kultivierung der Zellen	51
2.4.2.1 Neurosphärenkulturen	51

	2.4.2.2 In vitro Differenzierung von adhärent wachsenden Kulturen	51
	2.4.3 Vorbereitung der Zellen zur Transplantation	52
	2.4.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen	52
	2.5 Färbungsmethoden	53
	2.5.1 Immunhistochemie	53
	2.5.1.1 Immunzytochemie an in vitro differenzierten Zellen	53
	2.5.1.2 Immunhistochemie an Gewebeschnitten	54
	2.5.1.3 HRP-Färbungen auf Gewebeschnitten	56
	2.5.2 nicht-radioaktive in situ Hybridisierung	57
	2.6 Mikroskopie und Bilddokumentation	60
3.	Ergebnisse	61
	3.1 Murine neurale Stammzellen	61
	3.1.1 Neurosphärenkulturen	61
	3.1.2 Immunzytochemische Analyse zur Differenzierung der Zellen in vitro	63
	3.2 Intrazerebroventrikuläre Transplantation von murinen neuralen Stammzellen in	1
	das Gehirn von Hühnchenembryonen	66
	3.2.1 Immunhistochemische Analyse des Integrationspotentials muriner neuraler	•
		_
	Stammzellen	68
	Stammzellen	68
	Stammzellen 3.2.2 Analyse der Morphologie transplantierter Spenderzellen mittels HRP- Färbungen	68 73
	Stammzellen 3.2.2 Analyse der Morphologie transplantierter Spenderzellen mittels HRP- Färbungen 3.2.3 Differenzierung der transplantierten murinen neuralen Stammzellen <i>in vivo</i>	68 73 974
	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 74 74
	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 74 82
	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 74 74 82
	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 74 82 85
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 74 74 82 85 86
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 74 82 85 86 86
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 74 74 82 85 86 86 86 87
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 74 82 85 86 86 86 87
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	<ul> <li>68</li> <li>73</li> <li>74</li> <li>74</li> <li>82</li> <li>85</li> <li>86</li> <li>86</li> <li>87</li> <li>90</li> </ul>
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 82 85 86 86 86 87 90 en
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 82 85 86 86 86 87 90 en 93
4.	<ul> <li>Stammzellen</li></ul>	68 73 974 82 85 86 86 86 87 90 en 93 98

5. Zusammenfassung	107
6. Literaturverzeichnis	110
7. Anhang	124
7.1 Abkürzungsverzeichnis	124
7.2 Danksagung	127
7.3 Lebenslauf	
7.4 Eidesstattliche Versicherung	

#### 1. Einleitung

#### 1.1 Stammzellen

Dem zentralen Nervensystem adulter Säuger fehlt weitgehend die Fähigkeit zur Neubildung von Nervenzellen. Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Huntington und Morbus Alzheimer, oder Verletzungen des zentralen Nervensystems können daher die degenerierten oder lädierten Neurone nicht ersetzt werden. Diese stark limitierte Regenerationsfähigkeit des zentralen Nervensystems erklärt die äußerst begrenzten Therapiemöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen. Bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankungen wäre der funktionelle Ersatz der degenerierten Zellen die einzig mögliche kausale therapeutische Option. Seit es möglich ist, Stammzellen zu isolieren und in vitro zu kultivieren und zu expandieren, wird der Einsatz dieser Zellen für solche Zellersatztherapien intensiv untersucht und diskutiert (Le Belle and Svendsen 2002; Burns et al. 2006; Chen et al. 2007; Wataya et al. 2008; Zhang and Pasumarthi 2008). Ein viel versprechender Behandlungsansatz für das erkrankte oder verletzte zentrale Nervensystem stellen Zellersatzstrategien dar, die auf Transplantationen von neuralen Strammzellen basieren. Da neurale Stammzellen in vitro effizient expandiert werden können und da diese Zellen in sämtliche neurale Zelltypen differenzieren können, stellen sie potentielle Kandidatenzellen dar, um abgestorbene oder funktionell defekte Zellen des Nervensystems zu ersetzen (Klassen et al. 2004; Taylor and Minger 2005; Lim et al. 2007; Sher et al. 2008; Wataya et al. 2008). Um einen solchen funktionellen Ersatz degenerierter neuraler Zelltypen zu erreichen, werden zwei prinzipiell unterschiedliche experimentelle Therapieansätze verfolgt. Zum einen wird versucht, durch eine Transplantation von in vitro expandierten Stammzellen degenerierte oder pathologisch veränderte Zellen zu ersetzten (Ben-Hur and Goldman 2008; Conti et al. 2008; Suter and Krause 2008; Baker and Brown 2009). Zum anderen wird versucht, einen Zellersatz durch die Aktivierung endogener Stammzellen des erkrankten Gewebes zu erreichen (Emsley et al. 2005; Ohori et al. 2006; Hagg 2007). Eine weitere Stammzell-basierte therapeutische Option zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen bietet die ex vivo Gentherapie. Im Rahmen einer ex vivo Gentherapie können in vitro expandierte Stammzellen gentechnisch manipuliert, und über eine Transplantation dieser Zellen therapeutisch wirksame Genprodukte wie beispielsweise anti-angiogene, neuroprotektive oder antitumorigene Faktoren in das erkrankte Gewebe geschleust werden, um so den Krankheitsverlauf zu verlangsamen oder aufzuhalten. Tumorerkrankungen des zentralen Nervensystems sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Genetisch modifizierte neurale Stammzellen, die anti-tumorigene Faktoren produzieren, sind in der Lage, das Tumorwachstum zu reduzieren (Dwain et al. 2006). Dabei wird die Fähigkeit transplantierter Stammzellen, gezielt zu den pathologisch veränderten Gewebeanteilen im Nervensystems des Empfängers zu migrieren, ausgenutzt, um solche therapeutisch wirksamen Genprodukte in die erkrankten Gewebe einzuschleusen (Chen et al. 2007; Mapara et al. 2007). Stammzellen wurden auch erfolgreich eingesetzt, um neuroprotektive Faktoren, die eine Verlangsamung neurodegenerativer Erkrankungen bewirken, in das Nervensystem entsprechender Tiermodelle einzuschleusen. So führte beispielsweise die Transplantation genetisch manipulierter neurale Stammzellen mit einer Überexpression des neurotrophen Faktors "glial cell linederived neurotrophic factor" (GDNF) zu einer verzögerten Degeneration von Photorezeptoren in einem Tiermodell für eine retinale Dystrophie (Gregory-Evans et al. 2009). Auch bei Verletzungen des zentralen Nervensystems konnte das therapeutische Potential genetisch modifizierter neuraler Stammzellen in Tiermodellen gezeigt werden. Durch eine Transplantation neuraler Stammzellen mit einer Überexpression des "brainderived neurotrophic factors" (BDNF) in das lädierte Rückenmark von Ratten konnte beispielsweise in Verhaltensexperimenten eine Verbesserung der Symptome erzielt werden (Li et al. 2006).

Stammzellen sind allgemein über zwei wesentliche Kriterien definiert (McKay 1997; Doe et al. 1998; Gage 1998):

- Zum einen weisen Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auf, wobei entweder durch symmetrische Zellteilungen zwei neue Stammzellen entstehen oder durch asymmetrische Zellteilungen eine neue Stammzelle und eine differenzierte Zelle hervorgehen.
- Zum anderen handelt es sich bei Stammzellen um multipotente Zellen mit der Fähigkeit, in verschiedene spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Das Differenzierungspotential einer Stammzelle ist dabei als die Gesamtheit aller Zelltypen definiert, in die sich die Zelle unter entsprechenden Umgebungsbedingungen differenzieren kann (Temple 2001b).

Hierbei muss innerhalb der heterogenen Gruppe der Stammzellen, isoliert aus unterschiedlichsten Geweben und Spendern verschiedener Entwicklungsstadien, unterschieden werden (Temple 2001b): So handelt es sich bei der Zygote um eine totipotente Stammzelle, aus der alle Zelltypen des entsprechenden Organismus einschließlich des Trophoblasten entstehen können. Embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert werden, sind pluripotente Stammzellen. Aus ihnen können sämtliche reife Zelltypen des Organismus, nicht aber die extraembryonalen Gewebe hervorgehen. Gewebespezifische Stammzellen schließlich sind multipotente Zellen, die sich in verschiedene Zelltypen differenzieren können, die für die jeweiligen Gewebe charakteristisch sind, aus denen sie entstammen (Stemple and Anderson 1992; Morrison et al. 1997). Stammzellen sind in vielen sich entwickelnden Geweben des embryonalen Vertebraten zu finden und persistieren auch in adulten, sich lebenslang regenerierenden Geweben, wie dem Knochenmark, den Epithelien der Haut, den Schleimhäuten oder den Drüsen.



Abbildung 1: Pluripotente embryonale Stammzellen und multipotente gewebespezifische Stammzellen:

Embryonale Stammzellen verfügen über das Potential, in sämtliche Zelltypen des Organismus zu differenzieren; gewebespezifische Stammzellen dagegen können nur in die jeweiligen Zelltypen des Gewebes differenzieren, aus dem sie isoliert wurden.

Nach: http://www.stemcellresearchfoundation.org

## 1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen stammen aus der inneren Zellmasse von Blastozyten und haben als pluripotente Zellen das Potential, alle drei Keimblätter - und damit alle Gewebetypen eines Organismus einschließlich der Keimbahn - zu generieren (Nagy et al. 1990; Nagy et al. 1993). Sie lassen sich *in vitro* massiv expandieren, ohne dass sie dabei ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Pluripotenz verlieren. Embryonale Stammzellen sind außerdem vergleichsweise einfach gentechnisch manipulierbar, und damit nicht nur für Zellersatzstrategien, sondern auch für *ex vivo* Gentherapieansätze interessante Kandidatenzellen.

Embryonale Stammzellen konnten bisher vitro über gerichtete in Differenzierungsprotokolle und/oder genetische Manipulation in zahlreiche therapeutisch relevante Zelltypen differenzieren (Smith 1992; Desbaillets et al. 2000). In vitro kultivierte embryonale Stammzellen können zu Zellkolonien, sogenannten embryoid bodies, proliferieren. Diese enthalten u.a. verschiedene differenzierte hämatopoetische Zelltypen, deren Anzahl durch die Exposition der Kulturen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflussbar ist (Wiles and Keller 1991). Andere Experimente zeigten, dass über gentechnische Manipulationen murine embryonale Stammzellen in hoch differenzierte, nahezu reine Kardiomyozyten-Kulturen differenziert werden können (Klug et al. 1996). Weiterhin wurden aus murinen embryonalen Stammzellen beispielsweise Zellen generiert, die Insulin und andere Hormone des endokrinen Pankreas exprimierten. Sie bildeten in vitro - und nach Transplantation in diabetische Mäuse in vivo - den pankreatischen Inseln ähnliche Zellkluster (Lumelsky et al. 2001).

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass aus murinen oder humanen embryonalen Stammzellen effizient neurale Zelltypen abgeleitet werden können. So wurde für murine embryonale Stammzellen beispielsweise gezeigt, dass sie *in vitro* effizient in Oligodendrozytenvorläuferzellen differenziert werden können. Diese Oligodendrozytenvorläuferzellen differenzierten *in vivo* nach Transplantation in ein Tiermodell für eine dysmyelinisierende Erkrankung in Oligodendrozyten, die wiederum die Axone der Empfängergewebe effizient myelinisieren konnten (Brustle et al. 1999). Nach Transplantationen in das zentrale Nervensystem können murine embryonale Stammzellen nicht nur in gliale sondern auch in neuronale Zelltypen differenzieren (Arnhold et al. 2000). Auch aus murinen embryonalen Stammzellen abgeleitete neurale Vorläuferzellen, die in Ratten mit subakuten Rückenmarksverletzungen transplantiert wurden, differenzierten im Empfängergewebe sowohl in Gliazellen als auch in Neurone (McDonald et al. 1999).

Speziell Transplantationen in embryonales Empfängergewebe zeigen die Möglichkeit zur Differenzierung embryonaler Stammzellen in neurale Zelltypen (Brustle et al. 1997): So resultierten beispielsweise intraventrikuläre Transplantationen von aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten neuralen Vorläuferzellen in die Gehirne embryonaler Ratten in einer Integration der Zellen in verschiedenste Regionen des sich entwickelnden Gehirns. Die Zellen differenzierten dabei sowohl in Gliazellen als auch in Neurone (Brustle et al. 1997). Primäre embryonale Stammzellen scheinen aber auch über die Fähigkeit zu verfügen, in intakte adulte Gewebe zu integrieren (Hara et al. 2004). So integrierten beispielsweise murine embryonale Stammzellen nach einer intravitrealen Transplantation in die Augen gesunder adulter Mäuse, und bildeten in der inneren plexiformen Schicht der Empfänger-Netzhäute neuronale Netzwerke aus (Hara et al. 2004).

Auch für humane embryonale Stammzellen wurde gezeigt, dass sie *in vitro* effizient in Neurone differenziert werden können (Schuldiner et al. 2001; Lamba et al. 2006). Auch Zhang et al und Reubinoff et al konnten *in vitro* aus humanen embryonalen Stammzellen die drei prinzipiellen neuralen Zelltypen - Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone - ableiten. In beiden Untersuchungen konnten die humanen Vorläuferzellen erfolgreich in neonatale Mäuse transplantiert werden. Nach massiver Integration in verschiedene Bereiche der Empfängergewebe differenzierten sie sowohl in Oligodendrozyten als auch in retinale Pigmentepithelzellen und retinale Vorläuferzellen (Reubinoff et al. 2001; Zhang et al. 2001).

Zudem können aus embryonalen Stammzellen auch spezialisierte retinale Nervenzelltypen abgeleitet werden. In Kokulturen von aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten neuralen Vorläuferzellen mit retinalen Zelltypen differenzierte ein Teil der neuralen Vorläuferzellen in Zellen, die für retinale Nervenzellen typische Antigene exprimierten (Zhao et al. 2002). Auch am Tiermodell konnte nach subretinalen Transplantationen von aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleiteten neuralen Vorläuferzellen gezeigt werden, dass die Spenderzellen in die Empfänger-Netzhäute integrierten und dort in Zelltypen differenzierten, die für retinale Nervenzellen typische Antigene exprimierten (Banin et al. 2006). Embryonale Stammzellen konnten auch in vitro und nach Transplantation in vivo über geeignete Kulturund Differenzierungsbedingungen in retinale Ganglionzellen differenziert werden, die verschiedene Zelltyp-spezifische Markerproteine exprimierten (Jagatha et al. 2009). Auch die Generierung von Photorezeptoren aus embryonalen Stammzellen verschiedener Spezies wie der Maus, aber auch dem Affen und des Menschen, ist unter definierten Kulturbedingungen und der gezielten Exposition mit bestimmten Wachstumsfaktoren *in vitro* bereits gelungen (Osakada et al. 2008). Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass Photorezeptoren *in vitro* effizient aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitet werden können, sondern auch, dass sie nach Transplantation in funktionell intakte Photorezeptoren differenzieren können. Sie verbesserten nach Transplantation in ein Tiermodell für die congenitale Amaurose die nachweisbare Lichtreaktion der behandelten Tiere (Lamba et al. 2009).

Retinale Pigmentepithelzellen stellen einen weiteren Zelltyp dar, der effizient aus embryonalen Stammzellen abgeleitet werden konnte. Hier konnte in Langzeitstudien an Tiermodellen für degenerative Makulaerkrankungen gezeigt werden, dass aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitete und subretinal transplantierte retinale Pigmentepithelzellen zu einer signifikanten Verbesserung der visuellen Funktion führten (Lu et al. 2009). Humane embryonale Stammzellen stellen so eine praktisch unendlich expandierbare zelluläre Quelle für retinale Vorläuferzellen und retinale Zelltypen dar (Lamba et al. 2006) und sind damit für den Aufbau zellbasierter Therapieansätze für degenerative Erkrankungen der Netzhaut besonders interessante Kandidatenzellen (Banin et al. 2006).

Grundsätzlich bieten humane embryonale Stammzellen die Möglichkeit, gezielt bestimmte therapeutisch relevante neurale Zelltypen zu generieren (Tondeur et al. 2008; Zweigerdt 2009). Ein möglicher therapeutischer Einsatz von embryonalen Stammzellen wird dabei nicht nur im Zusammenhang mit degenerativen retinalen Erkrankungen diskutiert, sondern auch im Zusammenhang von degenerativen neurologischen Erkrankungen, bei denen in eng umgrenzten Bereichen ein bestimmter oder nur wenige verschiedene Zelltypen betroffen sind (Yasuhara et al. 2006). Diese und zahlreiche ähnliche Studien mit humanen embryonalen Stammzellen deuten an, dass es sich bei diesen Zellen um besonders viel versprechende Kandidatenzellen handelt, um zellbasierte Therapieansätze für unterschiedlichste Erkrankungen zu etablieren: Embryonale Stammzellen sind unter geeigneten Kultivierungsbedingungen *in vitro* effizient expandierbar, können vergleichsweise einfach genetisch manipuliert werden und können unter kontrollierten Differenzierungsbedingungen *in vitro* in bestimmte Zelltypen differenziert werden (Tondeur et al. 2008; Jagatha et al. 2009). Auch *in vivo* 

haben embryonale Stammzellen ein beachtliches Integrations- und - in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen - Differenzierungspotential. So könnten embryonale Stammzellen eine nahezu unerschöpfliche Quelle für Transplantationstherapien vor allem bei solchen neurodegenerativen Erkrankungen darstellen, bei denen nur eine bestimmte Zellart in begrenzten Arealen des zentralen Nervensystems betroffen ist (Osakada et al. 2008; Lamba et al. 2009; Lu et al. 2009).

Obwohl embryonale Stammzellen ein großes Potential für den Aufbau zellbasierter Therapien zur Behandlung verschiedenster degenerativer Erkrankungen aufweisen, bergen sie gerade aufgrund ihrer Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung und ihres großen Differenzierungspotentials auch mögliche Risiken in der therapeutischen Anwendung, die in der Zukunft weitere intensive Studien notwendig machen werden. So wurden beispielsweise nach subretinalen Transplantation von aus murinen embryonalen Stammzellen gewonnenen neuralen Vorläuferzellen in die Augen von Rhodopsin-Knockout-Mäusen acht Wochen nach Transplantation Neoplasien gefunden (Arnhold et al. 2004). Diese konnten als Teratome identifiziert werden, die nahezu alle Gewebe des transplantierten Auges befielen. Transplantationen von embryonalen Stammzellen bergen also das Risiko, daß die transplantierten Zellen in den Empfängergeweben Tumore ausbilden (Arnhold et al. 2004). Neben dem Risiko der Tumorbildung existieren gegen den Einsatz humaner embryonaler Stammzellen aber auch juristische und ethische Bedenken, da für die Gewinnung dieser Zellen humane Embryonen zerstört werden müssen. In Zukunft wird es nötig sein, zuverlässige Methoden zu etablieren, die es möglich machen, bestimmte gewünschte Zelltypen in ausreichender Anzahl aus embryonalen Stammzellen abzuleiten, ihre Funktionsfähigkeit nachzuweisen und ihr tumorigenes Potential auszuschließen, bevor ein therapeutischer Einsatz embryonaler Stammzellen bei verschiedensten Erkrankungen in Betracht gezogen werden kann.

## 1.1.2 Gewebespezifische Stammzellen

Gewebespezifische Stammzellen konnten sowohl aus sich lebenslang regenerierenden Geweben wie dem Knochenmark und den Epithelien der Haut, als auch aus verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems, der Herzmuskulatur und der Neuroretina isoliert werden (Temple 2001b). Gewebespezifische Stammzellen sind als multipotente Zellen definiert, die in die verschiedenen für das jeweilige Ursprungsgewebe charakteristischen Zelltypen differenzieren können (Temple 2001b). Die multipotenten gewebespezifischen Stammzellen weisen damit im Vergleich zu den pluripotenten embryonalen Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotential auf. In den letzten Jahren haben jedoch mehrere Studien gezeigt, dass verschiedenste gewebespezifische Stammzellen unter bestimmten experimentellen Bedingungen scheinbar nicht nur Zelltypen ihres Ursprungsgewebes, sondern auch Zelltypen anderer Gewebe und sogar anderer Keimblätter generieren können (Bjornson et al. 1999; Gussoni et al. 1999). Allerdings ist diese "Transdifferenzierung" gewebespezifischer Stammzellen Gegenstand intensiver kontroverser Diskussionen (Castro et al. 2002; Wagers et al. 2002; Cogle et al. 2004). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass transplantierte gewebespezifische Stammzellen mit endogenen differenzierten Zelltypen der Empfängergewebe fusionieren können. Zumindest bei einem Teil der berichteten "Transdifferenzierungen" gewebespezifischer Stammzellen könnte es sich Fusionsereignisse, die damit lediglich um solche fälschlicherweise als "Transdifferenzierungen" interpretiert wurden, handeln ((Nygren et al. 2004); siehe auch 1.1.2.1 Knochenmarks-Stammzellen). Im Falle von Knochenmarks-Stammzellen wurden Fusionsereignisse sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen: In vitro fusionierten beispielsweise Knochenmarks-Stammzellen spontan mit embryonalen Stammzellen (Terada et al. 2002). Die aus solchen spontanen Fusionsereignissen entstandenen Zellen können phänotypisch und ohne detaillierte Analyse des Genotyps oft nicht von echten transdifferenzierten Zellen unterschieden werden und führen somit unter Umständen zu Fehlinterpretationen. So wurde berichtet, dass transplantierte Knochenmark-Stammzellen in Hepatozyten, Purkinjezellen des Kleinhirns oder kardiale Muskelzellen "transdifferenzieren" können. Später wurde dann gezeigt, dass die transplantierten Knochenmark-Stammzellen nicht in die verschiedenen Zelltypen "transdifferenziert" waren, sondern vielmehr mit endogenen Hepatozyten, Purkinjezellen oder kardialen Muskelzellen fusioniert waren. Diese Fusionsprodukte wurden irrtümlich als "transdifferenzierte" Zelltypen interpretiert, da sie die

Morphologie und das Antigenprofil von Hepatozyten, Purkinjezellen oder Muskelzellen aufwiesen und gleichzeitig das Reportergen der transplantierten Stammzellen exprimierten (Alvarez-Dolado et al. 2003).

Gewebespezifische Stammzellen scheinen in ihrem Differenzierungspotential vielmehr spezialisiert als limitiert zu sein (Ostenfeld et al. 2002). Ihre phänotypische Plastizität in Abhängigkeit von verschiedenen Umgebungsfaktoren kann experimentell am besten *in vivo* durch Transplantationen in unterschiedlichste Empfängergewebe analysiert werden.

#### 1.1.2.1 Knochenmarks-Stammzellen

Das Knochenmark gehört zu den wenigen sich lebenslang regenerierenden Geweben des Säugers. Eine wichtige Population gewebespezifischer Stammzellen entstammt dem Knochenmark, die sich in vielen Studien durch eine scheinbare besonders hohe phänotypische Plastizität auszeichnet (Wagers et al. 2002). So migrierten Knochenmarks-Stammzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse in Regionen induzierter Muskeldegeneration, differenzierten dort in Muskelzellen und waren an der Regeneration der geschädigten Muskelfasern beteiligt (Ferrari et al. 1998). Am Tiermodell für die Muskeldystrophie Duchenne konnte gezeigt werden, dass auch hämatopoetische Stammzellen *in vivo* unter geeigneten Umgebungsbedingungen scheinbar über das Potential verfügen, Muskelzellen zu generieren (Gussoni et al. 1999): Hämatopoetische Stammzellen konnten ebenso wie gewebespezifische Stammzellen aus Muskelgewebe nach Transplantation in die geschädigte Muskulatur integrieren. Hieraus resultierte in beiden Fällen eine Zunahme der bei Muskeldystrophie insuffizienten Expression von Dystrophin (Gussoni et al. 1999).

Darüber hinaus legen die Ergebnisse einiger Studien den Schluss nahe, dass Stammzellen des Knochenmarks sogar in Zelltypen anderer Keimblätter differenzieren können (Kopen et al. 1999). Angesichts der Tatsache, dass die Differenzierung der drei Keimblätter (Mesoderm, Entoderm und Ektoderm) und der aus ihnen entstehenden Gewebe eine der frühsten Entwicklungen in der Embryogenese darstellt, ist diese Beobachtung besonders bemerkenswert. So führte die intravenöse Injektion von Knochenmarks-Stammzellen in Tiermodellen verschiedener Lebererkrankungen zur Regeneration des entodermalen Lebergewebes durch proliferierende Hepatozyten (Petersen et al. 1999; Lagasse et al. 2000). Einige dieser Zellen konnten als von den transplantierten Knochenmark-Stammzellen abstammende Zellen identifiziert werden

(Petersen et al. 1999; Lagasse et al. 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Knochenmarks-Stammzellen unter geeigneten Umgebungsbedingungen auch in Zellen mit einem glialen oder neuronalen Phänotyp differenzieren können (Brazelton et al. 2000). So integrierten intraventrikulär in neonatale Mäuse transplantierte Knochenmarkszellen in das Gehirn der Empfängertiere und differenzierten in verschiedenen Regionen der Empfängergehirne, wie beispielsweise dem Striatum oder dem Hippocampus, in reife Astrozyten. Zusätzlich wurden im Hirnstamm der Empfängergehirne Neurofilament-exprimierende Spenderzellen gefunden, die den Schluss nahe legen, dass die Knochenmarks-Stammzellen in vivo auch ein neuronales Differenzierungspotential aufweisen (Brazelton et al. 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass Knochenmarks-Stammzellen auch nach Transplantation in adultes Empfängergewebe Zellen mit einem neuronalen Phänotypen generieren konnten. In diesen Experimenten wurden aus adulten Mäusen isolierte Knochenmarks-Stammzellen in bestrahlte adulte Nervengewebe transplantiert. In den Empfängergehirnen konnten noch sechs Monate nach der Transplantation Spenderzellen nachgewiesen werden, die neuronale Proteine exprimierten (Brazelton et al. 2000). Allerdings werden gerade Studienergebnisse, die eine "Transdifferenzierung" gewebespezifischer Stammzellen beobachtet haben, sehr kontrovers diskutiert (Terada et al. 2002; Nygren et al. 2004). Möglicherweise ist zumindest ein Teil der oben skizzierten Ergebnisse nicht auf eine tatsächliche "Transdifferenzierung" der transplantierten Stammzellen zurückzuführen, sondern lediglich auf eine Fusion der transplantierten Zellen mit endogenen Zellen der Empfängergewebe. Da die bei solchen Fusionen entstehenden Hybridzellen sowohl das Reportergen der transplantierten Stammzellen als auch die zelltypspezifischen Antigene der spezialisierten endogenen Zellen der Empfängergewebe ko-exprimieren, können solche Zellfusionen fälschlicherweise als "Transdifferenzierungen" interpretiert werden (Nygren et al. 2004). Im Falle von Knochenmarks-Stammzellen wurden Fusionsereignisse sowohl in vitro (Terada et al. 2002) als auch in vivo (Alvarez-Dolado et al. 2003) nachgewiesen. Die aus solchen spontanen Fusionsereignissen entstandenen Zellen können phänotypisch und ohne detaillierte Analyse des Genotyps oft nicht von echten transdifferenzierten Zellen unterschieden werden (siehe auch 1.1.2 Gewebespezifische Stammzellen).

## 1.1.2.2 Retinale Vorläufer- und Stammzellen

Auch aus dem Auge konnten Zellen isoliert werden, die Charakteristika von retinalen Vorläufer- bzw. Stammzellen aufweisen. Ahmand et al. gelang es aus der Retina embryonaler Ratten Zellen zu isolieren, die sich in Anwesenheit von epidermal growth factor (EGF) in vitro kultivieren ließen. Einige dieser Zellen bildeten unter diesen Kultivierungsbedingungen als Neurosphären bezeichnete Zellaggregate und exprimierten Nestin, ein für neurale Vorläuferzellen typisches Protein. Nach Entzug des Wachstumsfaktors und Zugabe von Serum differenzierten die Zellen in Neurone und Gliazellen (Ahmad et al. 1999). Unter den glialen Zellypen fanden sich neben Astrozyten auch Oligodendrozyten, ein Zelltyp, der normalerweise in der Retina nicht zu finden ist. Darüber hinaus konnten auch retinale Nervenzelltypen wie Photorezeptoren und Amakrine in den differenzierten Kulturen identifiziert werden. Die Differenzierung der Zellen in Photorezeptoren konnte interessanterweise durch Ko-Kultivierung mit retinalen Zellen aus postnatalen Netzhäuten noch gesteigert werden. Versuche, diese Neurosphären über mehrere Passagen in vitro zu expandieren scheiterten jedoch (Ahmad et al. 1999). Diese retinalen Zellen wiesen also in vitro eine beachtenswerte Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene retinale Zelltypen auf und können damit als multipotente Zellen bezeichnet werden. Sie verfügten jedoch nicht über die für Stammzellen charakteristische Eigenschaft zur Selbsterneuerung und müssen daher eher als determinerte retinale Vorläuferzellen denn als echte gewebespezifische Stammzellen angesehen werden. Auch nach subretinaler Transplantation ganzer oder dissoziierter Neurosphären aus primären Kulturen in juvenile Ratten konnte die Expression Photorezeptor-spezifischer Proteine durch diese Zellen in vivo nachgewiesen werden (Chacko et al. 2000).

In weiteren Studien gelang die begrenzte Expansion retinaler Zellen *in vitro* über mehrere Passagen (Yang et al. 2002b; Yang et al. 2002a). Diese Zellen wurden aus Rattenembryonen oder humanen Feten isoliert und als adhärente Kulturen in Anwesenheit von basic fibroblast growth factor (FGF-2), Neurotrophin 3 und geringen Mengen von Serum kultiviert. Diese Expansionskulturen bestanden überwiegend aus Nestin-exprimierenden unreifen Zellen, enthielten aber auch einige differenzierte Astrozyten. Nach Differenzierung fanden sich in den Kulturen einige Astrozyten und zahlreiche Neurone, unter denen bei beiden Spezies Photorezeptoren und verschiedene retinale Interneurone nachgewiesen werden konnten (Yang et al. 2002b; Yang et al. 2002a). Die aus Rattenembryonen isolierten retinalen Vorläufer zeigten nach Transplantation in den subretinalen Raum von Royal College of Surgeons (RCS) Ratten allerdings nur eine limitierte Integrationsfähigkeit, und verblieben im subretinalen Raum und integrierten kaum in die Retina. Im Gegensatz zur vorwiegend neuronalen Differenzierung der Zellen in vitro differenzierten die retinalen Vorläufer in vivo vor allem in Astrozyten und in einige wenige retinale Bipolarzellen (Yang et al. 2002a). Angenieux und Mitarbeiter konnten im Jahr 2006 zeigen, dass die Exposition von adhärent kultivierten und expandierten retinalen Stammzellen mit "epidermal growth factor" (EGF) eine Differenzierung der Zellen in gliale und neuronale Zelltypen induziert. Unter den Neuronen konnten auch retinale Nervenzelltypen wie retinale Ganglionzellen, Photorezeptoren und Bipolarzellen identifiziert werden (Angenieux et al. 2006). Transplantationen dieser Zellen in den subretinalen Raum eines Mausmodells mit einer fortgeschrittenen Degeneration der Photorezeptoren resultierten in einer massiven Integration der Spenderzellen in die Ganglionzellschicht der Empfängernetzhaut und eine Differenzierung vor allem in gliale, aber auch neuronale Zelltypen (Canola et al. 2007).

Die mögliche Anwendbarkeit retinaler Vorläuferzellen für zellbasierte Therapie retinaler Erkrankungen hängt von der Fähigkeit dieser Zellen ab, *in vivo* vornehmlich in Neurone und insbesondere in Photorezeptoren zu differenzieren. Die bisher vorliegenden Daten zeigten allerdings eine vornehmlich gliale Differenzierung von transplantierten retinalen Vorläuferzellen (Yang et al. 2002b; Yang et al. 2002a). Eine verstärkte neuronale Differenzierung retinaler Vorläuferzellen könnte durch eine Manipulation der Zellen vor der Transplantation erreicht werden, beispielsweise durch eine Vordifferenzierung in spezifische retinale Zelltypen durch gerichtete genetische oder epigenetische Differenzierungsprotokolle (Angenieux et al. 2006)

Inzwischen konnten auch echte gewebespezifische Stammzellen, die über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen, im Auge adulter Säuger – einschließlich des Menschen identifiziert werden (Ahmad et al. 2000; Tropepe et al. 2000). Die lebenslange Regenerationsfähigkeit retinaler Zellen bei Fischen und Amphibien, die auf der Präsenz von retinalen Stammzellen in der Peripherie der Netzhaut beruht, ist seit langem bekannt. Dagegen konnten erst im Jahr 2000 im Auge adulter Säugetiere – einschließlich des Menschen – Zellen identifiziert werden, die sich *in vitro* expandieren lassen. Diese Zellen, die aus dem pigmentierten Epithel des Ziliarkörpers isoliert werden konnten, bildeten in Anwesenheit von "fibroblast growth factor-2" (FGF–2) Neurosphären und konnten als retinale Vorläufer identifiziert werden (Ahmad et al.

2000; Tropepe et al. 2000). Nach Differenzierung fanden sich in diesen Kulturen Astrozyten und retinale Neurone, darunter auch Photorezeptoren, Amakrine und Bipolarzellen (Ahmad et al. 2000; Tropepe et al. 2000). Diese Untersuchungen zeigen, dass diese Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz über die beiden wesentlichen Eigenschaften von gewebespezifischen Stammzellen verfügen. Interessanterweise konnte nach intravitrealer Transplantation retinaler Stammzellen aus dem humanen Ziliarkörperepithel in junge Mäuse beobachtet werden, dass ein Teil der humanen Spenderzellen in die äußere nukleäre Schicht integrierte und dort in Zellen differenzierte, die Photorezeptor-spezifische Antigene exprimierten (Coles et al. 2004). Die Spenderzellen wiesen allerdings nicht die typische Morphologie differenzierter Photorezeptoren auf (Coles et al., 2004). Um die prinzipielle Frage zu beantworten, ob überhaupt erwartet werden kann, dass transplantierte Zellen in die äußere nukleäre Schicht der nicht-neurogenen Netzhaut adulter Säugetiere integrieren können und dort in morphologisch komplexe und funktionale Photorezeptoren differenzieren, haben zwei Arbeitsgruppen frisch isolierte primäre retinale Zellsuspensionen in den subretinalen Raum von Mäusen mit gesunden oder dystrophen Netzhäuten transplantiert (MacLaren et al. 2006; Bartsch et al. 2008). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass frisch isolierte Zellen aus jungen postnatalen Netzhäuten tatsächlich das Potential aufweisen, in die Photorezeptorenschicht der Empfängertiere zu integrieren. Dort differenzierten die transplantierten Zellen in offenbar vollkommen normale Photorezeptoren. Die Spenderzellen hatten (i) basale axonale Fortsätze, die synaptische Kontakte mit endogenen retinalen Zelltypen in der äußeren plexiformen Schicht ausbildeten; (ii) Zellkörper, die in der äußeren nukleären Schicht lagen und (iii) einen aufsteigenden Fortsatz, der oberhalb der Membrana limitans externa in einem Photorezeptor-typischen Außensegment endetet. Außerdem exprimierten die Spenderzellen verschiedene Photorezeptor-spezifische Antigen. Interessanterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass die Spender-Photorezeptoren Licht-sensitiv waren und sich damit offenbar funktionell in die Empfänger-Netzhäute integriert hatten (MacLaren et al., 2006; Bartsch et al., 2008). Dabei konnte experimentell ausgeschlossen werden, dass die Spender-Photorezeptoren lediglich das Produkt eine Zellfusion zwischen den transplantierten frisch isolierten retinalen Zellen und endogenen Photorezeptoren waren. Schließlich konnte gezeigt werden, dass postmitotische Photorezeptor-Vorläuferzellen, nicht aber undifferenzierte retinale Vorläuferzellen, das Potential aufwiesen, in die äußere nukleäre Schicht zu integrieren und dort in offenbar normale und voll ausgereifte Photorezeptoren zu differenzieren. Insgesamt zeigen diese Daten, dass ein zellbasierter Ersatz von dysfunktionalen oder degenerierten Photorezeptoren ein viel versprechender Ansatz ist, um Therapieoptionen für bisher nicht behandelbare retinale Dystrophien zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass nur postmitotische Photorezeptor-Vorläuferzellen das Potential aufweisen, in die äußere nukleäre Schicht von Empfänger-Netzhäuten zu integrieren und dort in Photorezeptoren zu differenzieren, und erklären somit die bisher nur eingeschränkten Erfolge, retinale Zelltypen durch Transplantation undifferenzierter Stammzellen oder Vorläuferzellen zu ersetzen.

#### 1.1.3 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen sind für die Entwicklung zellbasierter Therapiestrategien zur Behandlung traumatischer oder degenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems von besonderem Interesse. Als gewebespezifische Stammzellen verfügen neurale Stammzellen über das Potential, in die verschiedenen prinzipiellen neuralen Zelltypen zu differenzieren (Reynolds and Weiss 1996). Neurale Stammzellen können aus verschiedenen Regionen des embryonalen und des adulten Nervensystems isoliert werden (Gage 2000). Im embryonalen Nervensystem wurden neurale Stammzellen bereits in verschiedensten Regionen des zentralen (Reynolds et al. 1992; Kilpatrick and Bartlett 1993) und peripheren (Stemple and Anderson 1992) Nervensystems nachgewiesen. Entgegen der früheren Annahme, dass das Nervensystem adulter Säuger über keinerlei Fähigkeit zur Neubildung von Nervenzellen verfügt, konnten auch aus dem adulten Gehirn neurale Stammzellen isoliert werden: Adulte neurale Stammzellen wurden vor allem im Gyrus dentatus des Hippokampus und der Subventrikularzone gefunden, zwei Regionen, in denen beim adulten Säuger einschließlich des Menschen eine kontinuierliche Neurogenese stattfindet (Reynolds and Weiss 1992; Lois and Alvarez-Buylla 1993; McKay 2000). Neurale Stammzellen konnten aber auch aus nicht-neurogenen Regionen des zentralen Nervensystems adulter Säugetiere isoliert werden (Weiss et al. 1996).



Abbildung 2: Stammzellen mit neuralem Potential, hierarchisch dargestellt von der Zygote als primitivster Zelle mit dem größten Differenzierungspotential bis zu reifen postmitotischen Zellen. Die kleinen aufwärts zeigenden Pfeile deuten mögliche Dedifferenzierungen an. Nach (Gage 2000).

## 1.1.3.1 Neurale Stammzellen in vitro

Neurale Stammzellen können aus ihrem Ursprungsgewebe isoliert und in vitro in Gegenwart von Wachstumsfaktoren kultiviert und effizient expandiert werden. Eine bewährte Methode ist dabei die Expansion neuraler Stammzellen mit Hilfe des Wachstumsfaktors "epidermal growth factor" (EGF). In Gegenwart dieses Mitogens können große Mengen von Tochterzellen generiert werden, die als Neurosphären bezeichnete Zellaggregate bilden und sich über mehrere Passagen expandieren lassen (Reynolds et al. 1992; Reynolds and Weiss 1996). Ein anderes Mitogen, das neurale Stammzellen zur effizienten Proliferation stimuliert, ist der Wachstumsfaktor "fibroblast growth factor-2" (FGF-2) (Gensburger et al. 1987; Richards et al. 1992). Dabei haben die für die Expansion der Zellen verwendeten Wachstumsfaktoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferationskapazität und das phänotypische Differenzierungspotential der Zellpopulationen (Vescovi et al. 1993; Caldwell et al. 2001), wie eine Studie an adulten neuralen Stammzellen aus der Subventrikularzone zeigt (Whittemore et al. 1999). Nur in Gegenwart von EGF und FGF-2 oder FGF-2 und Heparin konnten die neuralen Stammzellen expandiert werden. Hierbei differenzierten sowohl die EGF/FGF-2 expandierten Zellen als auch die FGF-2/Heparin expandierten Zellen in die drei prinzipiellen neuralen Zelltypen des zentralen Nervensystems: in Neurone, in Oligodendrozyten und in Astrozyten. Jedoch schienen die EGF/FGF-2expandierten Zellen überwiegend in Astrozyten zu differenzieren, während die FGF-2/Heparin-expandierten Zellen ein größeres Potential zur neuronalen Differenzierung aufwiesen (Whittemore et al. 1999). Durch Exposition der Zellkulturen mit bestimmten zusätzlichen Mitogenen konnte hierbei jeweils die Anzahl der Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten in differenzierten Kulturen weiter moduliert werden (Whittemore et al. 1999). Durch Entzug der Wachstumsfaktoren oder Exposition mit bestimmten Differenzierungsfaktoren, die die Entwicklung der Zellen in bestimmte Zelltypen stimulieren, kann also eine Differenzierung der Zellen in vitro in reife Zelltypen erreicht werden. Auch neurale Stammzellen aus dem embryonalen Nervensystem zeigen unter dem Einfluss bestimmter Mitogene ein entsprechendes Verhalten in vitro (Maric et al. 2003). Neurale Stammzellen aus dem Telencephalon der embryonalen Ratte proliferierten in FGF-2-haltigem Medium ohne dass dabei eine Differenzierung in reife neurale Zelltypen stattfand. Kultivierung der Zellen mit EGF und FGF-2 hatte eine Proliferation der Zellen und eine Differenzierung in Vorläufer neuronalen, astroglialen und oligodendroglialen Phänotyps zur Folge (Maric et al. 2003). Extrinsische Faktoren

haben *in vitro* also einen wesentlichen Einfluss auf die Differenzierung der multipotenten Zellen und können eine präferentielle Differenzierung in ganz bestimmte Zelltypen induzieren. So führt beispielsweise die Exposition embryonaler neuraler Stammzellen aus der Subventrikularzone mit "bone morphogenetic protein" (BMP) zur selektiven und dosisabhängigen Differenzierung der multipotenten Zellen in astrogliale Zelltypen (Gross et al. 1996).

Interessanterweise konnte eine Veränderung der Ansprechbarkeit der Stammzellen für Mitogene in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium ihres Spenders festgestellt werden. Während der Embryonalentwicklung werden die verschiedenen neuralen Zelltypen eines Gewebes in einer charakteristischen präzisen zeitlichen Abfolge generiert. Generell beginnt die Neurogenese des zentralen und peripheren Nervensystems vor der Gliogenese. Entsprechend zeigte sich bei Stammzellen, die aus Spendern unterschiedlicher Entwicklungsstadien isoliert wurden, eine unterschiedliche Reaktion auf die Applikation derselben Wachstumsfaktoren. Dies lässt die Vermutung zu, dass Stammzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien über unterschiedliche intrinsische Eigenschaften verfügen. So werden Veränderungen in der Anzahl und Art der Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium vermutet (Temple 2001a). Beispielsweise entstanden aus Kulturen neuraler Stammzellen, die aus frühen embryonalen Stadien isoliert wurden, unter dem Einfluss von BMP überwiegend Neurone. Zellen aus älteren Embryonen differenzierten dagegen in Gegenwart von BMP eher in gliale Zelltypen (Mehler et al. 2000). Möglicherweise nehmen also entwicklungsbedingte restriktive Eigenschaften neuraler Stammzellen Einfluss auf ihr späteres Differenzierungspotential. Während der Embryogenese entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzell-Populationen die verschiedenen. fiir die unterschiedlichen Hirnregionen charakteristischen, Zelltypen. Diese Neurogenese wird durch intrinsische Eigenschaften der Zellen und lokale Umgebungsbedingungen des Gewebes bestimmt. Ähnliches lässt sich auch bei isolierten Zellen in vitro beobachten (Kalyani et al. 1998): So können aus neuralen Vorläuferzellen des embryonalen Rückenmarks in vitro reife Neurone mit unterschiedlichen Phänotypen generiert werden. Während ihrer Entwicklung in reife Zelltypen zeigen die Vorläuferzellen eine variierende Reaktivität auf Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren. Gleichzeitig exprimieren sie für das jeweilige Entwicklungsstadium spezifische Proteine. Durch kontrollierte Kulturbedingungen kann Einfluss auf diese Differenzierung genommen werden (Kalyani et al. 1998). Unter den aus neuralen Vorläufern generierten Zellen

finden sich auch Zellen, die für die Region, aus der die Vorläufer isoliert wurden, spezifisch sind. So konnten in Kulturen embryonaler Stammzellen aus der CA3-Region Ratte Regionen-spezifische CA3-pyramidale Neurone des Hippokampus der identifiziert werden (Shetty 2004). Neurale Stammzellen und die aus ihnen generierten Vorläufer können also vermutlich in vitro in Regionen-spezifische Phänotypen differenzieren (Hitoshi et al. 2002). Diese Eigenschaft scheint jedoch keine irreversible Determinierung zu sein, sondern kann durch definierte Umgebungsbedingungen modifiziert werden (Svendsen and Caldwell 2000). Inwieweit die Entwicklung neuraler Stammzellen von lokalen Umgebungsbedingungen und intrinsischen Eigenschaften der Zellen bestimmt wird, ist *in vitro* nicht eindeutig festzustellen. Zu vermuten ist jedoch, dass neurale Stammzellen über geeignete Kulturbedingungen ganz gezielt in bestimmte Zelltypen differenziert werden können (Vescovi et al. 1993). Entsprechend zeigen aktuelle Studien, dass neurale Stammzellen über eine Ko-Kultivierung mit sogenannten embryoid bodies aus embryonalen Stammzellen zu einer Expression immunologische Marker nicht-neuronaler Zellen induziert werden (Denham et al. 2006).

## 1.1.3.2 Neurale Stammzellen in vivo

Um das Integrations- und Differenzierungspotential neuraler Stammzellen unter normalen und pathologischen Bedingungen zu untersuchen, werden Transplantationsstudien an Tiermodellen durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz bietet die Möglichkeit, das Verhalten der Stammzellen *in vivo* unter verschiedensten Umgebungsbedingungen und in Abhängigkeit von unterschiedlichen epigenetischen Faktoren zu analysieren. Dazu können die *in vitro* unter unterschiedlichen Kulturbedingungen charakterisierten, expandierten und eventuell manipulierten Zellen in verschiedene Tiermodelle des sich entwickelnden, adulten oder pathologisch veränderten Nervensystems transplantiert werden.

Um das mögliche therapeutische Potential neuraler Stammzellen für die Behandlung von Myelinerkrankungen zu untersuchen, wurden beispielsweise EGF- und FGF-2expandierte neurale Stammzellen aus dem embryonalen Nervensystem in das dysmyelinisierte zentrale Nervensystem junger und adulter Mäuse transplantiert (Ader et al. 2001; Ader et al. 2004). Dabei zeigte sich nach einer intrazerebroventrikulären Transplantation der Zellen in junge Mäuse eine ausgedehnte Integration der Spenderzellen (Ader et al., 2001). Dagegen zeigten die Zellen nach einer intrazerebroventrikulären Injektion in adulte Tiere eine nur begrenzte Integration,

während nach direkter intraparenchymaler Injektion der Zellen in die dysmyelinisierten Fasertrakte eine massive Integration der Zellen zu beobachten war (Ader et al., 2004). Die Mehrheit der Spenderzellen zeigte dabei sowohl in jungen als auch in adulten Empfängertieren eine Differenzierung in Oligodendrozyten, die die Axone des Empfängergewebes effizient myelinisierten (Ader et al. 2001; Ader et al. 2004). Auch an Tiermodellen mit dystrophen Erkrankungen der Netzhaut wurde das Integrationsund Differenzierungsverhalten EGF- und FGF-2-expandierter embryonaler neuraler Stammzellen untersucht (Pressmar et al. 2001). Dabei fanden sich in den dystrophen Netzhäuten adulter Empfängertiere bedeutend mehr integrierte Spenderzellen als in gesunden Netzhäuten adulter Empfängertiere. Sowohl in dystrophen als auch in gesunden Netzhäuten differenzieren die transplantierten Zellen aber ausschließlich in Astrozyten und Oligodendrozyten, nicht aber in Nervenzellen (Pressmar et al. 2001). Obwohl zahlreiche Studien beschreiben, dass transplantierte neurale Stammzellen besser in pathologisch verändertes als in gesundes Nervengewebe integrieren, sind die zellulären und molekularen Grundlagen dieser ausgeprägteren Integration in pathologisch veränderte Nervengewebe bisher noch ungeklärt.

Verglichen mit der begrenzten Integration in adultes gesundes Nervengewebe zeigen transplantierte neurale Stammzellen in embryonalen Nervengeweben eine massive detaillierte Integration, wodurch Analysen des Integrationsund Differenzierungsverhaltens neuraler Stammzellen in vivo erleichtert werden. Nach Transplantation embryonaler neuraler Stammzellen aus unterschiedlichen Hirnregionen in embryonales murines Empfängergewebe, zeigte sich eine ausgedehnte Inkorporation der Zellen in die verschiedensten Regionen der Empfängergehirne (Winkler et al. 1998). Die integrierten Spenderzellen differenzierten dabei sowohl in gliale (Winkler et al. 1998) als auch in verschiedene und der jeweiligen Hirnregion entsprechende neuronale Zelltypen (Brustle et al. 1995). Beim Integrationsmuster der Zellen konnte keine Präferenz zu den Regionen des Empfängergehirns festgestellt werden, aus denen die Zellen jeweils isoliert wurden. Neurale Stammzellen scheinen diesen Ergebnissen zufolge keine irreversible regionale Determinierung aufzuweisen, sondern in ihrem Migrations- und Differenzierungsverhalten durch lokale Einflussfaktoren des sie umgebenden Empfängergewebes beeinflusst zu werden. Diese Schlussfolgerung wird durch Transplantationsstudien gestützt, in denen eventuelle regionale Spezialisierungen früher Stammzellen aus der Subventrikularzone untersucht wurden. Während der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems entsteht die Subventrikularzone,

die neurogene Region des embryonalen ZNS, die auch in adulten Säugern als neurogene Zone persistiert. Aus den basalen Anteilen der Subventrikularzone entsteht das Striatum, während der Cortex cerebri aus den dorsalen Anteilen gebildet wird. Um zu untersuchen, ob Stammzellen aus diesen Bereichen der Subventrikularzone bereits eine regionale Spezialisierung aufweisen, wurden frisch isolierte Stammzellen der basalen striatalen Subventrikularzone entweder zurück in ihre ursprüngliche striatale Umgebung oder in die dorsal gelegene kortikale Subventrikularzone transplantiert (Fishell 1995). Die in das Striatum transplantierten Subventrikularzellen differenzierten in Nervenzellen mit einer striatalen Morphologie, während dieselben Zellen nach Transplantation in die kortikale Subventrikularzone phänotypische Eigenschaften kortikaler Nervenzellen aufwiesen. Auch in diesen Experimenten zeigt sich, dass die jeweilige Umgebung wesentlichen Einfluss auf die phänotypische Differenzierung unreifer Stammzellen nimmt (Fishell 1995). Dies zeigen auch Experimente von Eriksson und Mitarbeitern aus dem Jahr 2003, in denen in vitro expandierte neurale Stammzellen aus striatalen Regionen in verschiedene Hirnregionen neonataler Ratten transplantiert wurden. Die Zellen differenzierten hier überwiegend in gliale, aber auch neuronale Zelltypen und differenzierten in Regionen-spezifische reife Zellen mit für die verschiedenen Hirnregionen jeweils morphologischen Charakteristika (Eriksson et al. 2003). Auch diese Experimente zeigen, dass die zellulären und molekularen Eigenschaften des Empfängergewebes einen stärkeren Einfluss auf die Integration und Differenzierung neuraler Stammzellen haben, als die charakteristischen Eigenschaften des Spendergewebes, aus dem die Zellen isoliert wurden (Cao et al. 2002).

Welche zellulären und molekularen Faktoren des Empfängergewebes das Integrationsund Differenzierungspotential transplantierter Stammzellen beeinflussen, ist noch weitgehend unklar. Systematisch untersucht wurde diese Frage am Opossum (Van Hoffelen et al. 2003). Bei dieser Beuteltierart findet die retinale Entwicklung überwiegend postnatal statt, so dass eine Transplantation neuraler Stammzellen in eine noch extrem unreife und noch neurogene Netzhaut bei postnatalen Tieren möglich war. Auch hier konnte eine massive Integration der Spenderzellen nur in den Netzhäuten neonataler Empfängertiere beobachtet werden, nicht jedoch bei adulten Tieren. Interessanterweise differenzierten die transplantierten Zellen ausschließlich in Nervenzellen, unter anderem auch in Retina-spezifische Nervenzelltypen (Van Hoffelen et al. 2003). Um das maximale Differenzierungspotential von neuralen Stammzellen Empfängertiere eine geeignete Methode zu sein, da im sich entwickelnden Nervensystem aktive Neuro- und Gliogenese stattfinden. Die zu untersuchenden Zellen sind so endogenen Faktoren ausgesetzt, die eine Differenzierung in verschiedenste Zelltypen stimulieren können.

## 1.1.3.4 Adulte neurale Stammzellen

Die bemerkenswerten plastischen Eigenschaften neuraler Stammzellen scheinen nicht nur auf Stammzellen aus dem embryonalen Gehirn beschränkt zu sein. Vielmehr scheinen auch neurale Stammzellen aus dem adulten Gehirn eine ähnlich große Plastizität aufzuweisen. Neurale Stammzellen aus dem Hippokampus der adulten Ratte können beispielsweise an verschiedenste Umgebungsfaktoren adaptieren und in Zelltypen mit entsprechenden Phänotypen differenzieren. Nach Transplantation neuraler Stammzellen aus dem adulten Hippokampus in den Glaskörper adulter oder neugeborener Ratten formierten sich die Zellen im adulten Auge zu einer festen Schicht, die der inneren Grenzmembran der Retina unmittelbar anlag (Takahashi et al. 1998). Im sich entwickelnden Auge zeigte sich dagegen eine intensive Integration der adulten Zellen in die Retina, wobei die Spenderzellen die spezifische Morphologie verschiedener retinaler Neurone und astroglialer Zellen aufwiesen (Takahashi et al. 1998). Durch Transplantationen adulter neuraler Stammzellen konnte weiterhin eine Remyelinisierung und eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten von Ratten mit geschädigtem Rückenmark erreicht werden (Karimi-Abdolrezaee et al. 2006). Nach einer subakuten Rückenmarksläsion waren die transplantierten adulten neuralen Stammzellen vornehmlich in der weissen Substanz der Empfängertiere zu finden, wo sie in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen oder reife Oligodendrozyten differenzierten und einen engen Kontakt zu den Axonen und endogenen Oligodendrozyten des Empfängergewebes aufwiesen. Nach Transplantationen adulter neuraler Stammzellen in Empfängertiere mit chronischen Rückenmarks-Läsionen konnten dagegen kaum integrierte Spenderzellen identifiziert werden (Karimi-Abdolrezaee et al. 2006). Diese Daten deuten an, dass auch das Integrations- und Differenzierungspotential adulter neuraler Stammzellen durch die spezifischen Eigenschaften des pathologisch veränderten Empfängergewebes beeinflusst wird.

Interessanterweise kann durch geeignete Manipulation der Zellen vor der Transplantation eine gezielte Differenzierung adulter neuraler Stammzellen in spezifische neurale Zelltypen erreicht werden. So können beispielsweise adulte neurale Stammzellen aus der Subventrikularzon durch die gezielte Überexpression des

Transkriptionsfaktors Nurr1 in reife dopaminerge Neurone differenziert werden, die nach Transplantation in das Striatum eines Rattenmodells für Morbus Parkinson eine Verbesserung der Symptomatik bewirken (Shim et al. 2007). Darüber hinaus zeigt eine Studie von Clarke et al. aus dem Jahr 2000, dass mit neuralen Stammzellen der adulten Maus chimäre Hühnchen- und Mausembryonen generiert werden können. Chimäre Hühnchenembryonen wurden durch Injektion der Stammzellen in die Amnionhöhle generiert, chimäre Mausembryonen durch direkte Injektion der Zellen in die Blastozyste. Dabei resultierten aus der Injektion ganzer Neurosphären wesentlich mehr chimäre Embryonen als aus der Injektion dissoziierter Zellen. Die adulten Stammzellen integrierten in die sich entwickelnden Embryonen, differenzierten in verschiedenste Zellen und generierten zusammen mit den endogenen Zellen des Embryos Gewebe und Organe aller drei Keimblätter (Clarke et al. 2000). Von den adulten neuralen Stammzellen abstammende Zellen konnten also nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch in mesodermalen oder entodermalen Geweben gefunden werden. Diese lassen den Schluss dass adulte Stammzellen über Ergebnisse zu, ein Differenzierungspotential verfügen, das unter bestimmten experimentellen Bedingungen dem embryonaler Stammzellen ähnlich ist. Auch hier muss jedoch der Vorbehalt gemacht werden, dass diese Beobachtungen möglicherweise geltend durch Fusionsereignisse Interessanterweise erklärbar sein könnten. konnten im hämatopoetischen System der chimären Embryonen keine von den neuralen Stammzellen abstammende Zelltypen identifiziert werden (Clarke et al. 2000). Dagegen differenzierten adulte neurale Stammzellen nach Transplantation in bestrahlte Mäuse in verschiedene hämatopoetische Zellen, darunter Zellen des lymphatischen und myeloischen Systems sowie in frühe hämatopoetische Vorläuferzellen (Bjornson et al. 1999). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass adulte Stammzellen über ein weitaus größeres Integrations- und Differenzierungspotential verfügen, als bisher angenommen wurde. Möglicherweise differenzieren neurale Stammzellen nicht nur in Umgebungsbedingungen neurale Zelltypen, sondern unter adäquaten durch Transdifferenzierung auch in Zelltypen anderer Gewebe oder sogar anderer Keimblätter (Galli et al. 2003). Ursächlich hierfür ist vermutlich eine Entdifferenzierung der determinierten adulten Stammzellen, gefolgt von einer erneuten durch das Umgebungsgewebe stimulierten Differenzierung.

Die funktionelle Bedeutung endogener adulter neuraler Stammzellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Subventrikularzone des lateralen Ventrikels enthält eine kontinuierlich proliferierende Zellpopulation, aus der über die gesamte Lebenszeit Neuroblasten hervorgehen. Diese wandern kontinuierlich innerhalb des sogenannten rostralen Migrationsstroms zum olfaktorischen Bulbus, um dort letztendlich zu Interneuronen zu differenzieren. Möglicherweise verfügen endogene Stammzellen des adulten Nervensystems unter physiologischen Bedingungen über ein limitiertes Potential zur Selbsterneuerung, das auch bei normalen Funktionen wie Lernen und Erinnerung ein Rolle spielt (Gage 2000). So befindet sich im Gyrus Dentatus, einer Struktur des Hippocampus, welcher maßgeblich an Lernprozessen beteiligt ist, eine weitere sich fortwährend teilende Zellpopulation, aus der Körnerzellen (Neurone) hervorgehen. Weiterhin konnte bei verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems eine Zunahme der Anzahl adulter Stammzellen im Gehirn festgestellt werden, die jedoch nicht ausreichend zu sein scheint, um die Progression einer Erkrankung zu verhindern. Bei einem Tiermodell für Morbus Huntington konnte nach Beginn der Symptomatik eine signifikante Expansion striataler neuraler Stammzellen festgestellt werden, die in großer Anzahl in die geschädigten Hirnareale migrierten (Batista et al. 2006). Trotz dieser Aktivierung endogener neuraler Stammzellen bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems ist ihre regenerative Kapazität limitiert. Mit dem gezielten Einsatz von Wachstumsfaktoren und genetischer Manipulation könnten diese Einschränkungen jedoch teilweise überwunden werden. Möglicherweise können also endogene adulte neurale Stammzellen durch geeignete Manipulation so stimuliert werden, dass degenerierte Nerven- und Gliazellen in einem funktionell relevanten Ausmaß ersetzt werden.

#### 1.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen stellen einen ganz neuen, interessanten und therapeutisch viel versprechenden Ansatz in der Stammzell-Forschung dar (Geoghegan and Byrnes 2008; Scholer et al. 2009; Shevchenko et al. 2009). Unter induzierten pluripotenten Stammzellen versteht man pluripotente Stammzellen, die durch Reprogrammierung aus nicht-pluripotenten somatischen Zellen abgeleitet wurden. Diese Reprogrammierung wird dabei durch die Expression bestimmter Transgene induziert. Die erstmalige Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen gelang Takahashi und Kollegen im Jahr 2006. Sie exprimierten über eine Transduktion mit einem Retrovirus verschiedene Transkriptionsfaktoren, die in embryonalen Stammzellen eine zentrale Rolle spielen, in murinen Fibroblasten. Insgesamt 24 Transkriptionsfaktor-Gene wurden auf diese Weise untersucht. Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die kombinierte Expression von 4 Transkriptionsfaktoren Sox-2, Oct-4, c-Myc, und Klf4 eine Reprogrammierung von einigen somatischen Zellen in pluripotente Zellen bewirkte (Takahashi and Yamanaka 2006). Interessanterweise zeigten die Experimente, dass das "Nanog"-Gen, welches für die Fähigkeit von Stammzellen zur Selbsterneuerung essentiell ist, für die Reprogrammierung zu pluripotenten Zellen nicht notwendig war (Takahashi and Yamanaka 2006). In Folge-Experimenten gelang auch der Nachweis, dass aus den erzeugten Zellen nach Injektion in murine Blastozysten lebensfähige Chimären entstehen konnten (Okita et al. 2007). Auch aus humanen somatischen fetalen, neonatalen und adulten Zellen wurden bereits induzierte pluripotenten Stammzellen erzeugt, aus denen dann Zelltypen aller drei Keimblätter abgeleitet werden konnten (Park et al. 2008). Dabei zeigten die erzeugten induzierten pluripotenten Stammzellen starke Ähnlichkeiten zu natürlichen embryonalen Stammzellen und waren selbst ultrastrukturell kaum von ihnen zu unterscheiden (Scholer et al. 2009).

Ziel aller Forschungen an induzierten plurioptenten Stammzellen ist die mögliche therapeutische Anwendbarkeit an Menschen. Als wesentliches Hindernis hat sich bisher die Tatsache herausgestellt, dass über die Einschleusung der retroviralen Vektoren in die Zellen das Genom der Zellen verändert wird, was die Entstehung von Tumoren zur Folge haben kann. Verstärkt wird das Risiko der Tumorentstehung noch dadurch, dass ein verwendetes Transgen, c-Myc, ein Onkogen ist. Aus diesem Grund beschäftigen sich nun viele Experimente mit der Verringerung der notwendigen Faktoren zur Reprogrammierung von somatischen Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (Kim et al. 2008). Alternativ werden Adenoviren statt Retroviren verwandt, die nicht in das Genom der Zielzelle integrieren und zu einer transienten Expression der 4 Transkriptionsfaktoren Sox-2, Oct-4, c-Myc und Klf4 in der Zelle führen (Stadtfeld et al. 2008). Auch ohne die Verwendung viraler Vektoren ist bereits eine Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen gelungen. Hierbei wurden die für die 4 Transkriptionsfaktoren Sox-2, Oct-4, c-Myc und Klf4 kodierenden Gene mit nichtviralen Expressionsvektoren transient in somatischen Zellen exprimiert (Okita et al. 2008; Gonzalez et al. 2009). Eine alternative Methode zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen ohne das Genom der Zielzellen zu verändern stellt die Protein-Transduktion dar (Kim et al. 2009).

Induzierte pluripotente Stammzellen haben nach aktuellen Erkenntnissen ein großes Potential zur medizinisch-therapeutischen Anwendung. Ausserdem bestehen im Gegensatz zu humanen embryonalen Stammzellen gegenüber dem Einsatz induzierter pluripotenter Stammzellen weder ethische noch juristische Bedenken. Dennoch weisen sie augenscheinlich die wichtigste Fähigkeit von Stammzellen, die diese für Zellersatzstrategien so interessant macht, auf: Sie verfügen dank der eingeschleusten Genprodukte über die Fähigkeit zur Pluripotenz. Mit ihrer Hilfe lassen sich prinzipiell aus den betroffenen Patienten selber pluripotente Stammzellen herstellen. Solche Zellen könnten dann in autologen Transplantationen eingesetzt werden, und auf diese Weise könnte das bei Zellersatztherapien mit allogenen Stammzellen vorhandene Problem der Immunabwehr umgangen werden kann.

#### 1.2 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Neurale Stammzellen zeichnen sich als gewebespezifische Stammzellen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz aus. In der vorliegenden Arbeit wurden Stammzellen Nervensystem EGFP-transgener neurale aus dem zentralen Mausembryonen isoliert und in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 als schwimmende Neurosphären kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen frei expandierte neurale Stammzellen lassen sich in vitro sowohl in neuronale als auch gliale Zellen - die prinzipiellen Zelltypen des zentralen Nervensystems - differenzieren (Reynolds and Weiss 1996; Maric et al. 2003). Anhand von Transplantationsstudien mit Empfängertieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien oder verschiedener pathologischer Veränderungen Nervensystems das des zentralen kann Differenzierungspotential dieser Zellen *in vivo* untersucht werden. Dabei zeigen neurale Stammzellen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Empfängergewebes ein stark variirendes Integrations- und Differenzierungspotential. Werden die in dieser Arbeit untersuchten EGF/FGF-2-expandierten neuralen Stammzellen in das Nervensystem adulter Empfängertiere transplantiert, zeigen sie ein nur begrenztes Integrationsund Differenzierungspotential. Die überwiegende Anzahl der transplantierten Zellen differenziert unter diesen Bedingungen in gliale Zelltypen (Pressmar et al. 2001; Ader et al. 2004). Transplantationsstudien an embryonalen Geweben bieten sich daher für eine Analyse des maximalen Differenzierungspotentials neuraler Stammzellen in vivo an (Van Hoffelen et al. 2003).

Um Einfluss Faktoren auf den epigenetischer das Integrationsund Differenzierungspotential neuraler Stammzellen zu untersuchen, sollten in der vorliegenden Arbeit die in vitro expandierten neuralen Stammzellen in das embryonale, noch neurogene Gehirn von Hühnchenembryonen transplantiert werden. Dazu sollte zunächst eine Methode etabliert werden, die eine Transplantation dieser Zellen in ovo erlaubt. Eine routinemässig durchführbare Transplantationsmethode von Zellen in Hühnchenembryonen ermöglicht die schnelle und effektive Analyse des Integrationsund Differenzierungspotentials verschiedenster Stammzelltypen oder genetisch manipulierter Stammzellen in einem embryonalen und noch neurogenen Nervengewebe. Aufgrund des noch nicht entwickelten Immunsystems der Hühnchenembryonen bietet dieses Transplatationsparadigma ausserdem die Möglichkeit, das Integrations- und Differenzierungspotential von Stammzellen unterschiedlicher Spezies – einschliesslich humaner Stammzellen – zu analysieren. Zur Durchführung der Transplantationsstudien sollten die neuralen Stammzellen in die Hirnbläschen der Hühnchenembryonen transplantiert werden. Nach einer Entwicklungszeit von 7 - 14 Tagen sollten Integration und Differenzierung der neuralen Stammzellen in dem embryonalen Empfängergewebe untersucht werden. Die Verwendung neuraler Stammzellen aus transgenen, das Reportergen EGFP exprimierenden Mäusen, sollte dabei der Identifizierung der Spenderzellen im Empfängergewebe dienen. Die Differenzierung der transplantierten Zellen in neuronale und gliale Zellen sollte mittels Immunhistochemie und nichtradioaktiver *in situ* Hybridisierung analysiert werden. Dabei sollte die Differenzierung der murinen Stammzellen im Nervengewebe der Hühnchenembryonen entweder über Spezies-spezifische Antikörper und cRNA Proben oder über Ko-Lokalisationsstudien des Reportergens EGFP mit zelltypspezifischen Antigenen analysiert werden. Zusätzlich sollte die Möglichkeit zur Transplantation der neuralen Stammzellen in die Augenanlagen der Hühnchenembryonen evaluiert werden.

#### 1.3 Theoretische Grundlagen

## 1.3.1 EGFP-exprimierende Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden neurale Stammzellen aus dem Striatum und Rückenmark von transgenen Mäusen isoliert, die das Reportergen "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) exprimieren. EGFP ist das Protein, das für die Fluoreszenz der Qualle *Aequora victoria* verantwortlich ist. Dieses Protein wird in den transgenen Mäusen unter der Kontrolle des β-Aktin-Promotors des Hühnchens ubiquitär exprimiert (Okabe et al. 1997). Die stabile Expression des Reportergens EGFP in den hier verwendeten transgenen Zellen ermöglicht ihre Identifikation nach Transplantation im Empfängergewebe. Darüber hinaus ermöglicht die zytoplasmatische Lokalisation von EGFP eine Charakterisierung der Morphologie und Zytoarchitektur der transplantierten Zellen im Gewebeverband der Empfängertiere.

## 1.3.2 Zelltypen des zentralen Nervensystems und zelltypspezifische Proteine

Das Nervengewebe besteht aus Neuronen und Gliazellen. Neurone sind die eigentlichen Funktionseinheiten des Nervensystems. Für ihre Funktion sind die Gliazellen unentbehrlich. Die Gliazellen des zentralen Nervensystems können in Makro- und Mikroglia unterteilt werden. Die Makroglia ist ektodermaler Herkunft und entstammt dem Neuralrohr; während die Mikroglia mesenchymalen Ursprungs ist. Die wichtigsten Zelltypen der Makroglia sind Astrozyten (u.a. mechanische und metabolische Aufgaben), Oligodendroyzten (Myelinscheidenbildung) und Ependymzellen (Auskleidung der inneren Liquorräume). Die Mikrogliazellen dienen der Abwehr. In der vorliegenden Arbeit wurden Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten über ihre Expression charakteristischer, zelltypspezifischer Proteine identifiziert.

#### 1.3.2.1 Neurone

### **ß-Tubulin Typ III:**

Mikrotubuli des Zytoskeletts bestehen aus den globulären Proteinmolekülen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die sich zu einem Dimer zusammenlagern. Sie dienen als mechanische Stützen, Transportschienen und bilden die Mitosespindel.  $\beta$ -Tubulin existiert in verschiedenen Isotypen, die durch posttranslationale Modifikationen entstehen (Alexander et al. 1991). Einer dieser Isotypen,  $\beta$ -Tubulin Typ III, wird im Nervensystem höherer Vertebraten ausschließlich von Neuronen exprimiert. Dabei ist eine Expression von β-Tubulin Typ III bereits in jungen postmitotischen Neuronen nachweisbar, die mit zunehmender Differenzierung ansteigt (Lee et al. 1990).

#### 1.3.2.2 Astrozyten

## "Glial fibrillary acidic protein" (GFAP):

"glial fibrillary acidic protein" gehört zur heterogenen Gruppe Das der Intermediärfilamente. Intermediärfilamente, Mikrotubuli, Myosinfilamente und Aktinfilamente sind Protein-Filamente, die das Zytoskelett einer Zelle bilden und ihr Form und Beweglichkeit verleihen. Es gibt über 50 verschiedene Intermediärfilamente, von denen viele für ein bestimmtes Grundgewebe charakteristisch sind. Die Intermediärfilamente, die charakteristisch für Astrozyten des zentralen Nervensystems sind, bestehen aus GFAP (Uyeda et al. 1972; Eng et al. 2000). Sie werden hier als Gliafilamente bezeichnet. GFAP findet sich dabei sowohl in protoplasmatischen, als auch in fibrösen Astrozyten. Protoplasmatische Astrozyten exprimieren wenig GFAP, fibröse hingegen weisen im Zellkörper und in den Fortsätzen eine hohe GFAP Expression auf (Bignami et al. 1972). GFAP wird als spezifischer Marker für Astrozyten angesehen (Reske-Nielsen et al. 1987a; Reske-Nielsen et al. 1987b).

#### 1.3.2.3 Oligodendrozyten

## "Platelet derived growth factor receptor α (PDGF α):

"Platelet derived growth factor" (PDGF) stellt einen wichtigen Wachstumsfaktor für mesenchymale und gliale Zellen dar (Ross et al. 1986). Er besteht aus einer A- und B-Untereinheit, die drei verschiedene Dimere des Wachstumsfaktors bilden können (PDGF-AA, -AB und –BB). Diese binden mit unterschiedlicher Affinität an zwei Rezeptortypen (PDGFR- $\alpha$  und – $\beta$ ) (Hart et al. 1988). Der Rezeptortyp PDGFR- $\alpha$  spielt bei der Entwicklung von Oligodendrozyten eine wichtige Rolle und dient als sehr spezifischer Marker für Oligodendrozyten-Vorläufer im embryonalen Nervensystem. Werden PDGFR- $\alpha$ -positive Zellen aus dem embryonalen ZNS isoliert und *in vitro* kultiviert, differenzieren sie ausnahmslos in Oligodendrozyten (Hall et al. 1996).

#### "Proteolipid protein" (PLP):

"Proteolipid protein" (PLP) macht mit ca. 50% den größten Anteil der Proteinfraktion des Myelins im zentralen Nervensystem aus. Es tritt in zwei Isoformen auf: Es existiert eine 25 kDa großen Isoform und eine Splicing-Variante DM-20 mit 20 kDa. Diese macht im adulten ZNS 10 - 20% des PLP aus (Nave et al. 1987; Peyron et al. 1997). PLP ist sowohl im Zytoplasma reifer Oligodendrozyten als auch in den Membranen der Myelinscheiden lokalisiert. Nach Abschluss der aktiven Myelinproduktion nimmt die zytoplasmatische Lokalisation von PLP allerdings stark ab. Im Bereich der Myelinscheiden ist PLP als integrales Membranprotein an der Membranstabilisierung beteiligt (Popot et al. 1991). So produzieren Mäuse mit einer Mutation des PLP-Gens Myelinscheiden, die eine deutlich reduzierte physikalische Stabilität aufweisen (Klugmann et al. 1997)

#### "Myelin basic protein" (MBP):

"Myelin basic protein" ist eines der Hauptproteine des Myelins im zentralen Nervensystem. Es besteht aus verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die durch alternatives Splicing entstehen (de Ferra et al. 1985). Das MBP-Gen ist Bestandteil einer größeren Transkriptionseinheit, dem sogenannten Golli (gene expressed in the oligodendrocyte lineage) -MBP-Gen (Campagnoni et al. 1993). MBP ist in unreifen Oligodendrozyten im gesamten Zellkörper zu finden. Nach Beginn der Myelinisierung befindet es sich auch im Zytoplasma der Zellfortsätze der Oligodendrozyten. Auch MBP dient der Membranstabilisierung in den Myelinscheiden (Pfeiffer et al. 1993).

## "Myelin associated glycoprotein" (MAG):

associated glycoprotein" (MAG) ist Adhäsionsmolekül "Myelin ein der Immunglobulin-Superfamilie und macht mit nur 1% einen kleinen Anteil der Myelinproteine aus. Es tritt in zwei Isoformen auf: L (large) - und S (small) -MAG. Es der besteht als integrales Membranprotein Oligodendrozyten aus einer membrandurchspannenden Domäne, sowie einer intra- und extrazellulären Domäne, die ausgeprägte Ähnlichkeiten mit verschiedenen Immunglobulinen aufweist (Salzer et al. 1987). MAG spielt eine Rolle bei der Bildung der kompakten Myelinschicht (Bartsch et al. 1989; Li et al. 1994) und bei der Kontaktaufnahme von Oligodendrozyten mit Axonen der Nervenzellen (Meyer-Franke and Barres 1994). Dabei funktioniert MAG Adhäsionsmolekül als neurales (Poltorak et al. 1987) für bestimmte Zelloberflächenproteine. Als Liganden konnten verschiedene durch Neurone exprimierte Ganglioside identifiziert werden (Yang et al. 1996).
# 2. Material und Methoden

# 2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

# Tabelle 1: Chemikalien

Agar	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
5-Bromo-4-chloro-3-indolylophosphat	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
(BCIP)	
Blocking Reagens	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
"bovine serum albumin" (BSA)	SAFC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Penzberg
3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
(DAB) Substrat	
Denhards Reagens	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ditiotheitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulphoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetra-Essigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
Ethanol	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Fast green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
Fungizid	Biocidal ZF, WAK-Chemie Medical
	GmbH, Steinbach
Salzsäure (HCl)	Merck KG, Darmstadt
"Hank's balanced salt solution" (HBSS)	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
Hi Speed Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Levamisol	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
Methanol	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Kochsalz (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsuhe

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Parafin	Histologie Labor des Institutes
Paraformaldehyd	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
"phosphate buffered saline" (PBS) steril	Gibco Invitrogen life technologies,
	Carlsbad, CA, USA
Poly-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
QIA Quick PCR Purifikation Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Triethanolamin	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
Triton x 100	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Chemie
	GmbH, Steinheim
Transfer ribonuclein acid (tRNA)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vactastain "avidin biotinylated enzyme	Vector Laboratories, Burlingame, CA,
complex" (ABC) Kit Elite PK 6100	USA
Standard	

# Tabelle 2: Medien, Supplemente, Wachstumsfaktoren

B27 Supplement	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
DMEM/F12 1:1 -L-Glutamine	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
"epidermal growth factor" (EGF)	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
"fibroblast growth factor-2" (FGF-2)	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutamin	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-1-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

ethansulfonsäure (HEPES)	
N2 Supplement	Gibco Invitrogen Life Technologies,
	Karlsruhe
Natriumbikarbonat	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching

# Tabelle 3: primäre Antikörper

anti-Calbindin (polyklonal, Kaninchen)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-Calbindin (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-Calretinin (monoklonal, Ziege)	Chemicon International, Millipore,
	Billerica, MA, USA
anti-"enhanced green fluorescent protein"	Chemicon International, Millipore,
(EGFP) (polyklonal, Hühnchen)	Billerica, MA, USA
anti-"enhanced green fluorescent protein"	Chemicon International, Millipore,
(EGFP) (polyklonal, Kaninchen)	Billerica, MA, USA
anti-"growth associated protein" (GAP) 43	Chemicon International, Millipore,
(monoklonal, Maus)	Billerica, MA, USA
anti-"glial fibrillary acidic protein"	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
(GFAP) (polyklonal, Kaninchen)	
anti-"glial fibrillary acidic protein"	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(GFAP) (monoklonal, Maus)	
anti-"microtubule associated protein"	Chemicon International, Millipore,
(MAP) 2 a/b (monoklonal, Maus)	Billerica, MA, USA
anti-"myelin basic protein" (MBP)	Chemicon International, Millipore,
(monoklonal, Ratte)	Billerica, MA, USA
anti-"neuronal nuclear antigene (NeuN)	Chemicon International, Millipore,
(monoklonal, Maus)	Billerica, MA, USA
anti-O1 (monoklonal, Maus)	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-Parvalbumin (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-PGP 9.5 (polyklonal, Kaninchen)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
anti-RT 97 (monoklonal, Maus)	DSHB, Developmental Studies Hybridoma
	Bank at the University of Iowa
anti-Synaptophysin (monoklonal, Maus)	Chemicon International, Millipore,

	Billerica, MA, USA
anti-Tubulin III (polyklonal, Kaninchen)	Covance Research Produkts, Berkeley, CA,
	USA
anti-Tubulin III (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-,,myelin associated glycoprotein"	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
(MAG) (monoklonal, Maus)	

# Tabelle 4: sekundäre Antikörper

anti-Hühnchen-Cyanin (Cy 2) (polyklonal,	Dianova, Hamburg
Esel)	
anti-Hühnchen-Biotin (polyklonal, Ziege)	Linaris Biologische Produkte GmbH,
	Wertheim-Bettingen
anti-Kaninchen-Indocarbocyanin (Cy 3)	Jackson Immuno Research Laboratories
(polyklonal, Ziege)	Inc., Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-Biotin (polyklonal, Ziege)	Linaris Biologische Produkte GmbH,
	Wertheim-Bettingen
anti-Maus-Indocarbocyanin (Cy 3)	Jackson Immuno Research Laboratories
(polykonal, Ziege)	Inc., Dianova, Hamburg
anti-Ratte-Indocarbocyanin (Cy 3)	Jackson Immuno Research Laboratories
(polyklonal, Ziege)	Inc., Dianova, Hamburg
anti-Ziege-Indocarbocyanin (Cy 3)	Jackson Immuno Research Laboratories
(polyklonal, Esel)	Inc., Dianova, Hamburg

# Tabelle 5: Geräte

Binokular	Möller-Wedel international, Wedel
Brutschrank (Hühnereier)	KB-53, WTW, Weilheim
Brutschrank (Zellkultur)	Hera Cell 240, Kendro Laboratory, Thermo
	electron corporation, Waltham, MA, USA
Brutschrank (Zellkultur)	CO2-Auto-Zero, Heraeus Products, Kendro
	Laboratory, Thermo electron corporation,
	Waltham, MA, USA
Heizplatte	Ikamag RCT, Ika Werke GmbH & Co,
	Staufen

Sterile Werkbank	Steril Card Hood, the Baker Company Inc.,
	Sanford, Maine
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss, Jena
	Olympus IX51, Olympus Deutschland,
	Hamburg
pH-Meter	inoLab, WTW, Weilheim
Vibratom	VT 1000S, Leica, Wetzlar
Waage	Explorer, OHAUS, Giessen
	Adventurer, OHAUS, Giessen
Wasserbad	Medingen, Firmengruppe Preiss-Daimler,
	Dresden
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus Products,
	Thermo electron corporation, Waltham,
	MA, USA

# Tabelle 6: Gebrauchswaren

Aquapolymount	Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA
Deckgläschen	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-
	Königshofen
Eppendorf-Röhrchen 0,5 – 2 ml	Eppendorf References, Hamburg
Falcon-Röhrchen 15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht / greiner bio-one,
	Frickenhausen
Gewebe-Klebeband	Tesa AG, Hamburg
Kanülen Gr.1 0,9 x 40 mm	Sterican, B.Braun Melsungen AG,
	Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc Brand Products, Wiesbaden
Objektträger	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-
	Königshofen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI,
	USA
Pipetten	Eppendorf References, Hamburg
	LabMate, Abimed
	Falcon GmbH, Düsseldorf

	Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte,
	Eberstadt
Skalpelle	Cutfix Surgical Disposable Scalpel, B.
	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen 5 ml	Original Perfusor Spritze, B. Braun
50 ml	Melsungen AG, Melsungen
Multi-Well-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz

# Tabelle 7: Versuchstiere

Befruchtete Hühnereier	Lohmann, Cuxhafen
EGFP-transgene Mäuse	Tierhaltung des Institutes

# Tabelle 8: Software

Analysis	
Microsoft Office XP	
Adobe Photoshop CS2	

# 2.2 Verwendete Lösungen

Phosphate Buffered Saline (10 x PBS):

80 g/l NaCl 17,99 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l KCl 2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dd H<sub>2</sub>0 (pH 7,4

PBS mit 4% Paraformaldehyd (PA):

4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,3)

Grundmedium:

DMEM/F12 (Konz 1:1) 10 ml/l Glucose 10 ml/l Glutamin 5 ml/l HEPES (1M) 10 ml/l Pen/Strep 3,34 ml/l Natrium-Bikarbonat

Expansionmedium:

Grundmedium
2% B27-Supplement (primäre Kulturen) bzw. 1%
N2-Supplement
10 ng/ml EGF und 10 ng/ml FGF-2 bzw.
10 ng/ml FGF-2 und 2 ng/ml Heparin

Differenzierungsmedium:

Grundmedium1% N2-Supplement bzw.1% N2-Supplement und 1% FCS

Hühnchen-Ringer-Lösung:

7,2 g/l NaCl 0,212 g/l CaCl x H<sub>2</sub>O 0,37 g/l KCl (pH 7,2)

Blocking Puffer:	
	0,5% Triton und
	0,1% BSA in PBS (pH 7,4)
20 000	
<u>20 x SSC:</u>	
	3 M NaCl
	$0,3 \text{ M C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \text{ x } 2\text{H}_2\text{O} \text{ (pH 7,4)}$
<u>1x P1 DIG:</u>	
	157,6 g/l Tris
	87,7 g/l NaCl (pH 7,5)
P2 DIG:	
	1% Blocking Reagens in P1 DIG
	für In-Situ-Hybridisierung mit 0,5% BSA Fraktion
V	
P3 DIG:	
	100 mM TrisHCl
	100 mM NaCl
	50 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 9,5)
P4 DIG:	
	10 mM TrisHCl
	1 mM EDTA (pH 8,0)
Prähybridisationslösung:	
	50% deionisiertes Formamid
	2,5 x Denhards Reagens
	25 mM EDTA
	50 mM TrisCl (pH 7,6)
	20 mM NaCl
	0,25 mg/ml tRNA
	dd H2O

Grundmix für Hybridisationslösung:

0,2 M TrisCl (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 8,0) 10x Denhards Reagens 5 mg/ml tRNA 1 mg/ml Poly-A in dd H<sub>2</sub>0

Hybridisationslösung:

x Grundmix
 50% deionisiertes Formamid
 0,33 M NaCl
 0,1 M Ditiothreitol
 10% Dextransulfat in dd H<sub>2</sub>O

NBT/BCIP Lösung:

10 mg/ml NBT in 70% DMF 50 mg/ml BCIP in 70% DMF 250 mg/ml Levamisol in P3DIG

*in situ* Hybridisierung: Linearisierung der amplifizierten Plasmid-DNA: 15 μg Plasmid-DNA 3 μl Restriktionsenzym (Fermentas)

5 µl Puffer (Restriktionsenzym beiliegend)

ad 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

*in situ* Hybridisierung: *in vitro* Transkription mit Digoxigenin-Labeling: x μl Template DNA (1 μg Plasmid-DNA) 2 μl Digoxigenin RNA Labeling Mix 10x 2 μl Transkriptionspuffer 10x 2 μl RNA-Polymerase ad 20 μl ddH<sub>2</sub>O

Für alle pH-Kalibrierungen wurden HCL und NaOH benutzt.

#### 2.3 Versuchstiere

#### 2.3.1 EGFP-transgene Mäuse

Für die Transplantationsversuche wurden neurale Stammzellen aus transgenen Mausembryonen isoliert, in denen unter der Kontrolle des ß-Aktin Promotors des Hühnchens ubiquitär das "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) exprimiert wird (Okabe et al. 1997). Die Zucht dieser transgenen Mauslinie erfolgte mittels eines terminierten Verpaarungsschemas, bei welchem ein heterozygot transgenes Tier mit einem Wildtyp-Tier verpaart wurde. Die Trächtigkeit der Weibchen wurde anhand des Vorhandenseins eines Vaginalpfropfs festgestellt und mit Hilfe von regelmäßigen Gewichtskontrollen überwacht. Die transgenen EGFP-exprimierenden Mäuse wurden in herkömmlichen Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten und von der Instituts-Tierhaltung gepflegt. Alle wissenschaftlichen Eingriffe an den Tieren wurden unter Beachtung und Einhaltung des deutschen Tierschutz-Gesetzes durchgeführt.

#### 2.3.2 Hühnchenembryonen

Befruchtete Hühnereier wurden bis zum Beginn der Experimente über einen Zeitraum von maximal einer Woche in einem Kühlschrank bei 12°C gelagert. Vor Beginn der Inkubation in einem Brutschrank wurden die Eier zweimalig mit einem Fungizid (Biocidal ZF) sterilisiert und 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die befruchteten Hühnereier wurden dann in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37,4 – 37,8°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 65% inkubiert.

# 2.3.3 Transplantationen von neuralen Stammzellen in das Gehirn von Hühnchenembryonen

Zur Vorbereitung auf die nachfolgende Transplantation wurden die bebrüteten Eier nach einer der zwei folgenden Methoden behandelt:

Methode 1: Am zweiten Tag nach Beginn der Inkubation (E 2) wurden die Eier für die später erfolgende in ovo Manipulation vorbereitet: Hierzu wurde zunächst die Schale mit 80% Ethanol desinfiziert. Um die Schale bruchsicher zu machen, wurde auf die Längsseite der Eier ein autoklavierter 4-5 cm langer Gewebeband-Klebestreifen geklebt. Mit einer in 80% Ethanol sterilisierten Mikroschere wurde dann durch das Klebeband am spitzen Ende des Eis ein Loch gebohrt und vorsichtig mit einer 5 ml Spritze und einer sterilen Kanüle ein Volumen von ca. 3 ml Albumin entnommen. Anschließend wurde mit der Mikroschere ausgehend von einem weiteren Loch am stumpfen Ende des Eis ein ovales Fenster von ca. 3 cm Länge und 1,5 cm Breite als Zugang zu den Embryonen geschnitten. Die Vitalität der Embryonen wurde anhand der Ausbildung des Gefäßnetzes der Chorio-Allantois-Membran beurteilt. Um konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden nur normal entwickelte Embryonen weiter verwendet. Eier mit normal entwickelten Embryonen wurden wieder sorgfältig mit Klebeband verschlossen und die Inkubation unter den oben beschriebenen Bedingungen fortgesetzt.

Bei einigen der eröffneten Eier wurde mit einer sterilen Pipette 1 ml steriles Grundmedium bzw. 1 ml sterile Hühnchen-Ringer-Lösung (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) auf den Embryo aufgetropft, um eine Austrocknung des Embryos zu verhindern.

Zur Transplantation der EGFP-exprimierenden neuralen Stammzellen wurden die Eier am fünften (E 5) oder siebten Tag (E 7) der Inkubation im Brutschrank erneut eröffnet. Dazu wurde das mit Klebestreifen verschlossene Fenster in der Eierschale mit einem sterilen Skalpell geöffnet. Erneut wurde die Vitalität und Entwicklung der Embryonen beurteilt. Für die Transplantationsexperimente wurden ausschließlich Embryonen verwandt, die für die entsprechende Inkubationszeit ein normales Entwicklungsstadium aufwiesen (Hamburger and Hamilton 1951). Das Fenster im manipulierten Ei wurde nach erfolgter Transplantation wieder mit Klebebandstreifen verschlossen.

Methode 2: Alternativ wurden den zur Transplantation vorgesehenen Bruteiern bereits vor Beginn der Inkubation im Brutschrank Albumin entnommen, um so die Anzahl der Manipulationen nach Beginn der Embryonalentwicklung möglichst gering zu halten. Hierzu wurde nach der oben beschriebenen Sterilisation und Lagerung der Eier bei Raumtemperatur am spitzen Ende des Eis mit einer sterilen Mikroschere ein Loch in die Schale gebohrt und ein Albuminvolumen von ca. 2 ml entnommen. Das Ei wurde dann mit auf 70°C erhitztem flüssigem Parafin verschlossen. Die Fensterung der Eier erfolgte bei diesem Vorgehen erst zum Zeitpunkt der Transplantation. Die Inkubation wurde hier ebenfalls unter gleichbleibenden Bedingungen fortgesetzt. Bei dieser alternativ angewandten Methode wurde die Schale der über fünf Tage inkubierten Hühnereier mit autoklaviertem Gewebeband abgeklebt und wie oben beschrieben ein Fenster angebracht, welches nach erfolgter *in-ovo*-Manipulation mit einem Stück autoklavierten Parafilm und flüssigem Parafin verschlossen wurde.

Die Transplantation der Stammzellen erfolgte unter Verwendung einer sterilen, fein ausgezogenen Glas-Mikropipette, die über einen Silikonschlauch mit einer luftgefüllten 50 ml-Spritze verbunden war. Jeweils 2 µl der vorbereiteten Zellsuspension (50000 Zellen/µl) wurden intrazerebroventrilulär injiziert. Zur visuellen Kontrolle der Injektionen wurde die Zellsuspension zuvor mit 5% steriler Fast Green Lösung versetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4°C gelagert und vor jeder Injektion tituriert, um während des ganzen Transplantationsvorgangs eine Einzelzellsuspension zu gewährleisten.

An einigen Empfängertieren wurden die Zellen intravitreal in das rechte Auge injiziert. Anschließend wurden die Eier wie oben beschrieben wieder verschlossen für die gewünschte Zeitspanne weiter inkubiert.

#### 2.3.4 Präparation der Gewebe

Nach einer Überlebenszeit von 7 - 14 Tagen nach der Transplantation (E 12 bis E 19) wurden die Embryonen durch Dekapituation getötet und die Schädeldecke zur schnellen Immersonsfixierung der Gehirne mit einer Mikroschere und einer Pinzette geöffnet. Die Fixierung erfolgte bei 4°C über mindestens 24 Stunden in PBS mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,3; siehe 2.2 verwendete Lösungen).

#### 2.3.5 Herstellung der Gewebeschnitte

Die in 4% PA fixierten Gehirne der transplantierten Hühnchenembryonen wurden freipräpariert. Dazu wurden zunächst mit Pinzette und Mikroschere die Schädel vollständig eröffnet und so die Gehirne freigelegt. Unterhalb des Cerebellums wurde die Medulla oblongata durchtrennt, so dass das Gehirn vorsichtig aus der Schädelkalotte gehoben werden konnte. Anschließend wurde das Gehirn in 6% Agar in PBS eingebettet, der Gewebeblock mit einer Rasierklinge in eine Pyramidenform gebracht und mit Acrylatsekundenkleber auf dem Objekttisch des Vibratoms befestigt. Mit dem Vibratom wurden frontale Gehirnschnitte mit einer Dicke von 70 µm hergestellt und mit einer Pinzette in eine 24-well-Platte mit frischem 4% PA überführt. In den Multiwell-Platten wurden dann die einzelnen Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie auf erfolgte Integration der EGFP-exprimierenden Spenderzellen überprüft. Schnitte mit integrierten EGFP-transgenen Zellen wurden selektioniert und weiter mittels Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierung analysiert (siehe unten).

#### 2.4 EGFP-exprimierende neurale Stammzellen

#### 2.4.1 Isolation der Zellen

Die für die Transplantationsversuche verwendeten neuralen Stammzellen wurden aus dem Rückenmark und Striatum von 14 Tage alten transgenen Mausembryonen mit einer ubiquitären Expression von EGFP isoliert.

Dazu wurden die trächtigen Weibchen durch Genickbruch getötet. Die zur Entnahme des graviden Uterus verwendeten Präparationsgeräte wurden mit 80% Ethanol sterilisiert. Die Tiere wurden in Rückenlage gebracht und die Bauchdecke mit 80% Ethanol desinfiziert. Mittels einer Mikroschere wurde der gravide Uterus freigelegt, entnommen, kurz in 70% Ethanol getaucht und unmittelbar danach mehrfach mit sterilem PBS mit 0,6% Glucose, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 mg/ml) gewaschen. Die Embryonen wurden dem Uterus entnommen, dekapitiert und in eine weitere Petrischale mit sterilem PBS überführt. Zur Genotypisierung wurde den Embryonen eine Extremität abgetrennt und zur Überprüfung der EGFP-Expression mit dem Fluoreszenz-Mikroskop auf einen Objektträger überführt. Die auf diese Weise ermittelten EGFP-transgenen Embryonen wurden erneut in frisches PBS überführt. Nach Abtrennung des Kopfes wurden die Embryos zur Präparation des Rückenmarks in Bauchlage gebracht, die Haut über der Wirbelsäule mit einer Mikroschere aufgeschnitten und das Rückenmark aus der Wirbelsäule präpariert. Zur Präparation des Striatums wurde die Schädelkalotte mit einer Mikroschere eröffnet, das Gehirn aus dem Schädel entnommen und das Telencephalon horizontal aufgeschnitten. Das auf dem Boden der so eröffneten Ventrikel liegende Striatum wurde mit einer Mikroschere herausgeschnitten und in sterilem PBS gesammelt.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter einer sterilen Zellkultur-Werkbank. Nach kurzer Zentrifugation bei 900 rpm für 5 Minuten wurde das PBS abgesaugt. Die Gewebe wurden in 1 ml sterilem DMEM/F12 aufgenommen und durch vorsichtige Tituration in Einzelzellen dissoziiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 5µl einer 0,4% Trypanblau-Lösung versetzt und 10 µl dieser Mischung in die Zählkammer überführt. Trypanblau kann nur die Membranen toter Zellen passieren, die daher dunkelblau angefärbt werden, während sich lebende Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop rund und leuchtend weiß darstellen. Die primären Zellsuspensionen wurden mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen pro ml Medium in unbeschichtete Zellkulturflaschen in DMEM/F12-Grundmedium (siehe 2.2 verwendete Lösungen) ausgesät und in

Gegenwart von B27-Supplement (2%), "epidermal growth factor" (EGF, 10 ng/ml) und "fibroblast growth factor –2"(FGF-2, 10 ng/ml) (Ciccolini and Svendsen 1998) oder "fibroblast growth factor-2" (20 ng/ml) und Heparin (2 ng/ml) kultiviert (Expansionsmedium; siehe 2.2 Verwendete Lösungen).

## 2.4.2 Kultivierung der Zellen

# 2.4.2.1 Neurosphärenkulturen

Nach ca. 5 bis 7 Tagen bilden sich aus den Einzelzellen sogenannte Neurosphären, frei schwimmende runde Zellaggregate. Diese sogenannten Neurosphären bestehen aus Stammzellen und einer großen Zahl determinierter Vorläuferzellen (Reynolds et al. 1992; Reynolds and Weiss 1996). Sie zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine starke und ubiquitäre EGFP-Fluoreszenz. Zum Passagieren wurden die Kulturen bei 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die Neurosphären wurden dann in 1 ml sterilem Grundmedium aufgenommen und mechanisch zu einer Einzelzellsuspension tituriert. Alternativ wurden die Neurosphären mit dem Enzym Accutase für ca. 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend durch Titurieren in Einzelzellen dissoziiert. Mit einer Dichte von 70.000 Zellen pro ml Medium wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät und in Gegenwart von N2-Supplement (1%), EGF und FGF-2 (je 10 ng/ml) bzw. FGF-2 (20 ng/ml) und Heparin (2 ng/ml) kultiviert. Weitere Passagen der Neurospärenkulturen wurden wie oben beschrieben in Abhängigkeit der Größe der Neurosphären alle 4 bis 7 Tage vorgenommen.

# 2.4.2.2 In vitro Differenzierung von adhärent wachsenden Kulturen

Die zu Neurosphären gewachsenen Kulturen wurden zentrifugiert und in einer 12-well-Platte auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläschen (15 mm Durchmesser) in einer Dichte von 60.000 Zellen/well ausplattiert und in 1ml Differenzierungsmedium pro well (DMEM/F12 mit 1% N2 bzw. 1% N2 und 1% FCS; siehe 2.2 Verwendete Lösungen) für 7 Tage kultiviert. Nach ca. 4 Tagen wurde das Medium gewechselt. Dazu wurden je 500 µl pro well des alten Mediums entfernt und durch 500 µl frischen mit 1% N2 bzw. 1% N2 und 1% FCS versetztem Medium ersetzt.

#### 2.4.3 Vorbereitung der Zellen zur Transplantation

Die Neurosphärenkulturen wurden 4 Tage nach der letzten Passage zentrifugiert, die Neurosphären mit 1ml Accutase dissoziiert und erneut zentrifugiert. Mittels steriler Hank's balanced salt solution oder sterilem Grundmedium wurde eine Zellsuspension mit einer Dichte von ca. 50000 Zellen/µl Medium hergestellt (Ader et al. 2000). Diese wurde zur besseren Sichtbarkeit bei der Transplantation in den Hühnchenembryonen mit 5% steriler fast green Lösung angefärbt.

## 2.4.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Kulturen zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml Grundmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt, mit 10% DMSO versetzt und sofort bei –80°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurden die bei –80°C eingefrorenen Zellen unmittelbar nach dem Auftauen der Zellsuspension in ca. 10 ml steriles Grundmedium überführt und bei 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das DMSO-haltige Medium wurde unverzüglich entfernt und die Zellen in entsprechendem Expansionsmedium aufgenommen.

### 2.5 Färbungsmethoden

# 2.5.1 Immunhistochemie

# 2.5.1.1 Immunzytochemie an in vitro differenzierten Zellen

Zur Analyse des Differenzierungspotentials der neuralen Stammzellen *in vitro* wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei wurden zur Identifikation von neuronalen Zelltypen anti-β-Tubulin Typ III-spezifische Antikörper (Lee et al. 1990; Alexander et al. 1991) eingesetzt. Zur Detektion von Astrozyten wurden anti-GFAP-Antikörper (Reske-Nielsen et al. 1987a; Reske-Nielsen et al. 1987b), zur Detektion von Oligodendrozyten anti-MBP- (Pfeiffer et al. 1993), O1- (Bansal et al. 1989) und anti-MAG-spezifische Antikörper (Poltorak et al. 1987; Bartsch et al. 1989; Ader et al. 2000) eingesetzt (

Tabelle 9, Tabelle 10).

Die Deckgläschen mit den darauf für 7 Tage in Differenzierungsmedium adhärent kultivierten Zellen wurden für 30 Minuten in 4% PA fixiert und anschließend für 10 Minuten mit 100% Methanol bei –20°C inkubiert. Anschliessend folgte eine Inkubation über 30 Minuten in Blocking Puffer (0,5% Triton und 0,1% BSA in PBS; pH 7,4). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in mit Parafilm ausgekleideten eckigen Petrischalen; zunächst wurde auf jedes Coverslip 80 µl des primären Antikörpers gegeben. Dazu wurden die primären Antikörper wie in

Tabelle 9 spezifiziert in PBS verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation erfolgten 3 Waschschritte mit frischem PBS, gefolgt von einer Inkubation mit je 80 µl des sekundären Fluorochrom-konjugierten Antikörpers über 60 Minuten. Die verwendeten sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 in PBS eingesetzt (Tabelle 10). Abschließend wurden 3 bis 5 weitere Waschschritte mit PBS durchgeführt und schließlich die Deckgläschen mit Aqua Polymount auf Objektträgern eingedeckelt.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung
anti-MBP	monoklonal	Ratte	1:500
anti-Tubulin III	polyklonal	Kaninchen	1 :2000
anti-GFAP	polyklonal	Kaninchen	1:2000
anti-513	monoklonal	Maus	unverdünnt
anti-O1	monoklonal	Maus	1:100

Tabelle 9: für immunzytochemische Färbungen verwendete primäre Antikörper

Antikörper	mono-/	Spezies	Verdünnung	Konjugat
	polyklonl			
anti-Ratte	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Maus	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)

Tabelle 10: Für immunzytochemische Färbungen verwendete sekundäre Antikörper

## 2.5.1.2 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Zunächst wurden alle verwendeten primären und sekundären Antikörper (Tabelle 11, Tabelle 12) sowohl auf Gehirnschnitten der Maus als auch des embryonalen Hühnchens angewendet. Hiermit sollte zum einen die erwartete spezifische Reaktion der Antikörper mit Mausgewebe nachgewiesen und zum anderen eine eventuelle Kreuzreaktion der Antikörper mit den homologen endogenen Hühnchen-Proteinen überprüft werden. An Gewebeschnitten erfolgreich transplantierter Hühnchenembryonen wurden immunhistochemische Färbungen mit anti-EGFP Antikörpern vorgenommen, die mit Cy2-konjugierten sekundären Antikörpern visualisiert wurden, um so die transplantierten EGFP exprimierenden neuralen Stammzellen deutlicher sichtbar und das EGFP-Signal haltbarer zu machen. Hierdurch wurde die quantitative Einschätzung erfolgreich integrierter transplantierter Zellen vereinfacht. Weitere immunhistochemische Färbungen dienten der qualitativen Analyse der transplantierten neuralen Stammzellen. Hierzu wurden Doppelfärbungen mit EGFP-spezifischen und verschiedenen Zelltyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt, die eine Identifizierung der verschiedenen neuralen Zelltypen ermöglichten.

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden in 4% PA fixierte Gewebeschnitte für 30 - 60 Minuten in Blocking Puffer (0,1% BSA und 0,5% Triton in PBS; pH 7,4; siehe 2.2 Verwendete Lösungen) inkubiert. Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS, gefolgt von drei 5-minütigen Waschschritten in PBS. Für 2 - 3 Stunden wurden dann die Gewebeschnitte mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (1:200 in PBS) inkubiert und im

Anschluss 3 x für 20 Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht, mit Aqua Polymount eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung
anti-EGFP	polyklonal	Hühnchen	1:500
anti-Tubulin III	polyklonal	Kaninchen	1:1000/1:2000
anti-Tubulin III	monoklonal	Maus	1:200/1:400
anti-GFAP	polyklonal	Kaninchen	1:1000
anti-GFAP	monoklonal	Ratte	1:500
anti-MBP	Monoklonal	Maus	1:200/1:500
anti-RT 97	monoklonal	Maus	1:1000/1:2000
anti-PGP 9.5	polyklonal	Kaninchen	1:1000/1:2000
anti-NeuN	monoklonal	Maus	1:1000/1:2000
anti-GAP 43	monoklonal	Maus	1:1000/1:2000
anti-Calbindin	polyklonal	Kaninchen	1:500/1:2000
anti-Calbindin	monoklonal	Maus	1:1000/1:2000
anti-MAP 2a/b	monoklonal	Maus	1:100/1:500
anti-Calretinin	monoklonal	Ziege	1:1000/1:2000
anti-Parvalbumin	monoklonal	Maus	1:500/1:2000
anti-Synaptophysin	monoklonal	Maus	11000/1:2000

Tabelle 11: für immunhistochemische Färbungen verwendete primäre Antikörper

# Tabelle 12: für immunhistochemische Färbungen verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	mono-/	Spezies	Verdünnung	Konjugat
	polykional			
anti-Maus	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Ratte	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Ziege	polyklonal	Esel	1:200	Indocarbocyanin
				(Cy3)
anti-Hühnchen	polyklonal	Esel	1:200	Cyanin (Cy2)

# 2.5.1.3 HRP-Färbungen auf Gewebeschnitten

Mit der "horse radish peroxidase" (HRP) -Färbung wurde eine weitere immunhistochemische Methode zur Detektierung des "enhanced green fluorescent protein" der transplantierten Zellen angewendet. Diese Methode wurde angewendet, weil sie eine besonders detaillierte Visualisierung der Zytoarchitektur der Spenderzellen erlaubt.

Die in 4% PA gelagerten Gewebeschnitte wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidaseakivität für 30 Minuten in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, dann 5 Minuten in PBS gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blocking Puffer (1% BSA und 0,5% Triton in PBS; siehe 2.2 Verwendete Lösungen) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x für 10 Minuten in PBS gewaschen und schließlich über Nacht mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-EGFP- oder Hühnchen-anti-EGFP-Antikörper in PBS inkubiert (Tabelle 13). Vor der Inkubation mit dem sekundären Biotin-gekoppelten Antikörper (biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper bzw. biotinylierter anti-Hühnchen-Antikörper, Tabelle 14) in PBS über Nacht erfolgten 3 Waschschritte für je 10 Minuten in PBS. Diese wurden nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wiederholt und die Schnitte dann 1,5 bis 3 Stunden in ABC Elite Reagenz (Avidin/Biotinylated Enzyme Complex) inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten für jeweils 10 Minuten in PBS erfolgte die Farbreaktion mit dem DAB Enzym-Substrat (3,3'Diamnobenzidin-Tetrahydrochlorid). Die Farbreaktion wurde unter dem Binokularmikroskop kontrolliert und nach ca. 2 bis 10 Minuten in PBS gestoppt. Abschließend erfolgten 3 weitere Waschgänge mit PBS. Die Schnitte wurden mit Aqua Polymount auf Objektträger aufgezogen.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung
anti-EGFP	polyklonal	Kaninchen	1:4000
anti-EGFP	polyklonal	Hühnchen	1:4000

Tabelle 13: für HRP-Färbungen verwendete primäre Antikörper

Tabelle 14: für HRP-Färbungen	verwendete sekundäre Antik	örper
-------------------------------	----------------------------	-------

Antikörper	mono-/	Spezies	Verdünnung	Konjugat
	polyklonal			
anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	1:800	Biotin
anti-Hühnchen	polyklonal	Ziege	1:8000	Biotin

#### 2.5.2 nicht-radioaktive in situ Hybridisierung

Herstellung der Digoxigenin-markierten cRNA Proben:

Die RNA-in situ Hybridisierung erlaubt die spezifische, histologische Lokalisation von mRNA-Transkripten innerhalb eines komplexen Gewebeverbundes (Bartsch et al. 1992; Dorries et al. 1993). Für die Detektion der verschiedenen Zelltyp-spezifisch exprimierten Transkripte wurden Digoxigenin-markierte anti-sense cRNA Sonden (Riboproben) hergestellt, die die entsprechenden mRNAs spezifisch erkennen. Als Negativkontrolle dienten jeweils entsprechende sense cRNA Proben. Die für die Herstellung der Sonden notwendige Menge an entsprechender cDNA wurde durch die Amplifikation von entsprechenden DNA-Plasmid-Konstrukten in DHa5 kompetenten Zellen (Gibco Invitrogen Life Technologies) erreicht. Nach Amplifikation wurden die Plasmide über ein Plasmid-Isolationskit (HiSpeed Plasmid Midi/Maxi Kit, Qiagen GmbH) gemäß Herstelleranleitung aus den Zellen isoliert. Anschließend wurde der cDNA-Gehalt im entstandenen Isolat mit einem Photometer bestimmt und die cDNA durch Restriktionsverdau linearisiert. Bei der anschließend durchgeführten in vitro Transkription mit Digoxigenin-Labeling generierte eine RNA-Polymerase cRNA Transkripte der eingesetzten cDNA, die mit Digoxigenin markiert sind. Digoxigenin kann schließlich durch einen Antikörper nachgewiesen werden und in einer Farbreaktion immunhistochemisch lokalisiert werden. Die entstandenen Riboproben wurden nach einer Aufreinigung getestet und in den durchgeführten in situ Hybridisierungen in entsprechenden Verdünnungen verwendet (Tabelle 15).

cRNA-Probe	Verdünnung
Calbindin	1:1000 1:2000
Calretinin	1:2000
CHL 1	1:500
CRX	1:1000
GFAP	1:1000
GLAST	1:1000 bzw. 1:2000
KCC2	1:1000
L 1	1:500
MBP	1:1000
Nestin	1:500 bzw. 1:1000
NF	1:1000

 Tabelle 15: für in situ Hybridisierung verwendete cRNA Proben

Olig 2	1:1000
PDGF Rα	1:1000
PLP	1:1000 bzw. 1:2000
Prominin	1:1000
Recoverin	1:1000 bzw. 1:2000
Rhodopsin	1:1000 bzw. 1:2000
Sox 2	1:1000
Sox 10	1:1000
Syntaxin	1:500
Tubulin Typ III	1:1000
Vimentin	1:2000

## Waschen und Permeabilisieren:

Die in 4 % PA fixierten Schnitte wurden zunächst 3x 5 - 10 Minuten in RNAse freiem PBS, dann 10 Minuten in 70% Ethanol und schließlich 2x für 5 - 10 Minuten mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten zum Ansäuern in 0,1M HCl gegeben. Vor der Permeabilisierung erfolgten 2 weitere Waschschritte in RNAse freiem PBS. Die Permeabilisierung erfolgte in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) mit Essigsäureanhydrid. Nach zweimaligem Waschen für 5 Minuten in RNAse freiem PBS wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 100% Ethanol für je 5 Minuten) dehydriert.

#### Prähybridisierung:

Vor der Hybridisierung mit den Sonden wurden durch eine Prähybridisierung unspezifische RNA-Bindungsstellen im Gewebe mit tRNA gesättigt. Die Prähybridisierungslösung (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) wurde vor Gebrauch auf 37°C gebracht und die Schnitte in der Lösung für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### Hybridisierung:

Zur Hybridisierung wurden die jeweiligen Digoxigenin-markierten cRNA Sonden (Tabelle 15) in geeigneter Verdünnung der Hybridisierungslösung (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) beigesetzt (Tabelle 15) und die Lösung auf 65°C vorgewärmt. Die Schnitte wurden in der Hybridisierungslösung über Nacht bei 65°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte 3x für 30 Minuten in 0,2 x SSC (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) bei 65°C, anschließend 4x für 60 Minuten in 0,2 x SSC/50% Formamid bei 65°C gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt: 10 Minuten Inkubation in 0,2 x SSC, 10 Minuten Äquilibration in 1 x P1DIG (siehe 2.2 Verwendete Lösungen), anschließend 60 Minuten Blockierung in P2 DIG mit 0,5% BSA-V Fraktion. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit anti-Digoxigenin Fab- Fragmenten (1:2000 verdünnt in P2DIG; siehe 2.2 Verwendete Lösungen) über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

#### Farbreaktion:

Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x für 60 Minuten in P1DIG gewaschen und anschließend 2 Minuten in P3 DIG (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) äquilibriert. Schließlich wurden die Schnitte zur Farbreaktion in der NBT/BCIP Lösung (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde über eine Inkubation der Schnitte in P4DIG (siehe 2.2 Verwendete Lösungen) gestoppt. Zuletzt wurden die Schnitte in PBS überführt und anschließend mit Aqua Polymount auf Objektträgern eingedeckelt.

### 2.6 Mikroskopie und Bilddokumentation

Die Vibratomschnitte transplantierter Empfängergehirne wurden in eine 12-well-Platte in 4 % PA überführt und mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops auf integrierte EGFPexprimierende Spenderzellen untersucht. Gewebsschnitte mit integrierten EGFPpositiven Spenderzellen wurden der weiteren Analyse mittels Immunohistochemie und *in-situ*-Hybridisierung zugeführt.

Die mittels Immunohistochemie mit Fluorochrom-markierten sekundären Antikörpern gefärbten Gewebsschnitte wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

Mit dem Phasenkontrastmikroskop erfolgte die Auswertung von Gewebsschnitten, an denen eine HRP-Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierungen durchgeführt wurden.

Die Photografien und 3D-Dekonvolutionsaufnahmen der Präparate wurden unter Verwendung der Software Analysis durchgeführt. Mit Hilfe der 3D-Dekonvolution konnten Aufnahmen einzelner immunhistochemisch markierter transplantierter Zellen erstellt werden, die es im Gegensatz zu einfachen Photografien ermöglichten, die Zelle fokussiert in ihrer gesamten Ausdehnung mit allen Zellfortsätzen im Gewebeverband darzustellen. Hierbei konnten die Zellen in der Z-Achse über eine maximale Strecke von bis zu 60µm rekonstruiert werden. Zusätzlich ermöglichte die Errechnung des dreidimensionalen Bildes eine Darstellung ohne störende Hintergrund-Signale des umgebenden Gewebes.

#### 3. Ergebnisse

### 3.1 Murine neurale Stammzellen

#### 3.1.1 Neurosphärenkulturen

Die neuralen Stammzellen wurden aus dem Striatum und Rückenmark von 14 Tage alten transgenen, ubiquitär EGFP exprimierenden, Mausembryonen isoliert und konnten in Gegenwart von EGF und FGF-2 effizient expandiert werden: Innerhalb von ca. 5 bis 7 Tagen entstanden dabei aus den Einzelzellkulturen frei schwimmende Neurosphären, Aggregate aus Stammzellen, neuralen Vorläuferzellen und einigen differenzierten neuralen Zelltypen (Reynolds et al. 1992). Sämtliche Einzelzellen in diesen Neurosphären wiesen eine ausgeprägte EGFP-Fluoreszenz auf (Abbildung 3). Diese primären Neurosphären wurden nach einer Kulturdauer von 5 bis 7 Tagen dissoziiert und die Einzelzellen erneut in Expansionsmedium ausgesät. Dabei zeigte sich, dass einige der Einzelzellen starben, viele Zellen jedoch zu neuen, sekundären Neurosphären heran wuchsen. Dieser Vorgang war bis zu hohen Passagezahlen möglich und zeigte, dass zumindest ein Teil der Zellen in diesen Kulturen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufwiesen, eine wichtige Eigenschaft von Stammzellen (McKay 1997; Gage 1998).

Die expandierten Neurosphären-Kulturen konnten in einem mit 10% DMSO versetzten Zellkulturmedium über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten bei -80°C gelagert werden, ohne dass sich bei der Rekultivierung der Zellen ein Verlust der Fähigkeit zur Selbsterneuerung zeigte. Die rekultivierten Einzelzellen wuchsen in Gegenwart von EGF und FGF-2 innerhalb von ca. 5 Tagen erneut zu Neurosphären heran und konnten über einen Zeitraum von mindestens 10 Passagen weiter expandiert werden (weitere Passagen wurden nicht versucht). Auch die immunzytochemische Analyse dieser Zellkulturen zeigte keine Unterschiede im Differenzierungsverhalten der Zellen im Vergleich zu nicht kryokonservierten Kulturen (siehe unten).



Abbildung 3: Neurale Stammzellen wurden aus dem Striatum und Rückenmark EGFP-transgener Mausembryonen isoliert und *in vitro* kultiviert. Nach ca. 5-7 Tagen entstanden frei schwimmende Neurosphären mit einer intensiven EGFP-Fluoreszenz in allen Einzelzellen (a, c). Die Abbildungen a) und b) zeigen Neurosphären aus dem embryonalen Striatum nach der 10. Passage; die Abbildungen c) und d) neurale Stammzellen aus dem embryonalen Rückenmark nach der 7. Passage. a) und c) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, b) und d) die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Vergrößerung: (a - d) x20.

## 3.1.2 Immunzytochemische Analyse zur Differenzierung der Zellen in vitro

Um das Differenzierungspotential der striatalen Neurosphärenkulturen zu analysieren, wurden Neurosphären der 2. bis 4. Passage auf PLO-beschichteten coverslips in einem Medium kultiviert, dass keine Wachstumsfaktoren, aber N2 und FCS enthielt. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurden die Kulturen mit Zelltyp-spezifischen Antikörpern zur Identifikation neuronaler und glialer Zelltypen immunzytochemisch untersucht. Zur Identifikation von Nervenzellen wurden Antikörper gegen das Neuronen-spezifische Protein 
ß-Tubulin Typ III verwandt. Gliale Zelltypen wurden mit anti-,,glial fibrillary acidic protein" (GFAP) Antikörpern (Astrozyten) und anti-,,myelin basic protein" (MBP) Antikörpern oder anti-"myelin associated glycoprotein" (MAG) Antikörpern (Oligodendrozyten) identifiziert. Dabei zeigte sich, dass unter den spezifischen Kultivierungsbedingungen die Mehrzahl der Zellen in GFAP-positive Astrozyten (Reske-Nielsen et al. 1987a; Reske-Nielsen et al. 1987b) differenziert war (Abbildung 4 a - c). Darüber hinaus enthielten die Kulturen viele  $\beta$ -Tubulin Typ IIIpositive (Lee et al. 1990; Alexander et al. 1991) Neurone (Abbildung 4 d - f). Ebenso konnten einige ausgereifte Oligodendrozyten über ihre MAG-Expression (Poltorak et al. 1987; Bartsch et al. 1989; Ader et al. 2000) und ihre MBP-Expression (Pfeiffer et al. 1993) identifiziert werden. Die in dieser Arbeit zur Transplantation verwendeten neuralen Stammzellen ließen sich also in vitro nicht nur effizient expandieren, sondern auch in Nerven- und Gliazellen differenzieren. Sie verfügen damit über die für Stammzellen typischen Eigenschaften der Selbsterneuerung und Multipotenz (McKay 1997; Gage 1998).



Abbildung 4: Immunzytochemische Analyse von *in vitro* differenzierten striatalen neuralen Stammzellen aus EGFP-transgenen Mäusen. Die Mehrzahl der Zellen entwickelte sich zu GFAPpositiven Astrozyten (a, b, und c). In den Kulturen waren ausserdem einige ß-Tubulin IIIexprimierende Neurone nachweisbar (Abbildungen d, e und f). Vergrößerungen: (a, d): x10; (b, e): x20; Abbildungen (c, f): x40.



Abbildung 5: Immunzytochemische Identizierung reifer, *in vitro* differenzierter Oligodendrozyten in Kulturen striataler neuraler Stammzellen über ihre Expression von MAG (a- c) und MBP (d- f). Vergrößerungen: (a, d): x10; (b, e): x20; Abbildungen (c, f): x40.

# 3.2 Intrazerebroventrikuläre Transplantation von murinen neuralen Stammzellen in das Gehirn von Hühnchenembryonen

Die EGFP-exprimierenden neuralen Stammzellen wurden *in ovo* in die Hirnbläschen von 5 bis 7 Tage alten Hühnerembryonen transplantiert (Abbildung 6). Zur visuellen Kontrolle der Zelltransplantation wurden die Zellsuspensionen mit Fast Green versetzt (Abbildung 6 b, siehe auch 2.4.3, Vorbereitung der Zellen zur Transplantation). Nach 7 bis 14 Tagen wurde das Empfängergewebe präpariert, fixiert und in 70 µm dicke Vibratomschnitte geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf das Vorhandensein integrierter Spenderzellen überprüft. Die Identifizierung der transplantierten Stammzellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops über den Nachweis ihrer Expression des Reportergens "enhanced green fluorescent protein".



Abbildung 6: Hühnchenembryonen zum Zeitpunkt der Transplantation. Die murinen neuralen Stammzellen wurden intraventrikulär in die Hirnbläschen von 5 Tage alten Embryonen injiziert. Zur visuellen Kontrolle der Injektion wurde die Zellsuspension zuvor mit steriler Fast Green Lösung angefärbt (Pfeilspitze in b).

Insgesamt wurde an 512 Hühnchenembryonen eine *in ovo* Transplantation muriner neuraler Stammzellen in die Hirnbläschen und/oder Augenanlagen vorgenommen. 53 Empfängerembryonen überlebten die *in ovo* Transplantation der Stammzellen bis zum Zeitpunkt der Gewebepräparation und Fixierung. An insgesamt 48 dieser überlebenden Embryonen war eine intrazerebroventrikuläre Injektion der Spenderzellen durchgeführt worden, 7 Embryonen erhielten sowohl eine intrazerebroventrikuläre als auch eine intravitreale Transplantation. 5 Hühnchenembryonen wurden ausschließlich in die

Augenanlagen transplantiert. In den Gehirnen von insgesamt 16 der intrazerebroventrikulär transplantierten Hühnchenembryonen konnte eine positive Integration der murinen striatalen und spinalen Spenderzellen festgestellt werden (Tabelle 16). Die Transplantation der murinen neuralen Stammzellen wurde an Hühnchenembryonen unterschiedlichen Alters (5, 6 und 7 Tage alte Embryonen) durchgeführt und die Empfängertiere wurden nach unterschiedlichen Überlebenszeiten (8 bis 14 Tage nach der Transplantation) auf das Vorhandensein integrierter Spenderzellen analysiert (Tabelle 16). Bei diesen Experimenten zeigte sich kein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Integration von Spenderzellen und dem Alter der Versuchstiere bei Zeitpunkt der Transplantation oder der Überlebensdauer der Hühnchenembryonen nach der Transplantation (Tabelle 16).

Nr.	Zeitpunkt der	Überlebenszeit nach	Integration (siehe	Neurale
	Transplantation	Transplantation (Tage)	Legende)	Spenderzellen
1	Embryonaltag (E) 7	8	+	spinal
2	Embryonaltag (E) 7	8	+	spinal
3	Embryonaltag (E) 7	8	+++	spinal
4	Embryonaltag (E) 6	13	++	spinal
5	Embryonaltag (E) 6	13	++	spinal
6	Embryonaltag (E) 5	12	+++	spinal
7	Embryonaltag (E) 5	13	++	striatal
8	Embryonaltag (E) 5	14	++	striatal
9	Embryonaltag (E) 5	14	(+)	striatal
10	Embryonaltag (E) 5	14	(+)	striatal
11	Embryonaltag (E) 5	14	(+)	striatal
12	Embryonaltag (E) 5	14	++	striatal
13	Embryonaltag (E) 5	14	(+)	striatal
14	Embryonaltag (E) 5	7	+ *	striatal
15	Embryonaltag (E) 5	10	+++	striatal
16	Embryonaltag (E) 5	13	+++	striatal

Tabelle 16: Hühnchenembryonen mit integrierten EGFP-transgenen neuralen Stammzellen

Integration: (+) : minimale Integration (weniger als 10 Einzelzellen)

+ : geringe Integration (mehr als 10 Einzelzellen)

++ : ausgeprägte Integration

+++ : massive Integration

: initiale Zellintegration vom Ventrikelrand ausgehend (siehe auch Abbildung 7)

Um das Integrationspotential der intrazerebroventrikulär transplantierten murinen neuralen Stammzellen in den Gehirnen der Hühnchenembryonen zu analysieren, wurden die Gehirne der Empfängertiere seriell geschnitten. Die Spenderzellen konnten in diesen Gewebeschnitten aufgrund ihrer Expression des Reportergens "enhanced green fluorescent protein" identifiziert werden. Um das EGFP-Fluoreszenezsignal zu verstärken, wurden die Schnitte der Empfängertiere zusätzlich immunhistochemisch mit anti-EGFP Antikörpern angefärbt. Die Anzahl der integrierten Zellen variierte sehr stark zwischen den individuellen Empfängertieren. In einigen Empfängergehirnen konnten nur einzelne EGFP exprimierende Zellen nachgewiesen werden, in anderen Empfängergehirnen konnte dagegen eine massive Integration der transplantierten Zellen beobachtet werden. Zur Analyse des Integrationspotentials der Spenderzellen wurden alle Empfängertiere mit positiver Integration der transplantierten murinen Stammzellen herangezogen. Einige Empfängerembryonen wiesen nur eine begrenzte Integration von Spenderzellen im Hirnparenchym auf. Hier fanden sich nur wenige Zellen in unmittelbarer Umgebung des Ventrikelsystems. Ausserdem konnten im Ventrikellumen Spenderzell-Aggregate mit morphologischer Ähnlichkeit zu Neurosphären gefunden werden (Abbildung 7). Diese Zellaggregate hafteten häufig den Ventrikelwänden an und in vielen Fällen konnte eine von den Zellaggregaten ausgehende Integration von EGFP-transgenen Spenderzellen in das umgebende Hirnparenchym beobachtet werden (Abbildung 7). In den meisten Empfängergehirnen befanden sich jedoch massive Ansammlungen von transplantierten Zellen in der periventrikulären Region, von der aus eine Integration zahlreicher Spenderzellen in das umgebende Gehirnparenchym zu beobachten war (Abbildung 8).

Um zu analysieren, wann die Integration der transplantierten Zellen aus dem Ventrikellumen in das Gehirnparenchym beginnt, und wie die transplantierten Zellen aus dem Ventrikellumen in das Hirnparenchym gelangen, wurde bei einigen Transplantationsexperimenten die Überlebenszeit der Hühnchenembryonen nach der Transplantation auf 7 Tage verkürzt. Anschließend wurden die Hirnbläschen der 12 Tage alten Embryonen auf die Integration EGFP exprimierender Zellen untersucht. Hierbei konnte eine initiale Integration einzelner Zellen aus dem Ventrikellumen durch die Ependymschicht des Ventrikelrandes beobachtet werden (Abbildung 9). Diese Zellen wiesen eine radiale Morphologie unreifer Zellen auf (Abbildung 9). Eine

immunhistochemische Untersuchung dieser Spenderzellen ergab, dass diese Zellen noch keine Antigene exprimierten, die für ausdifferenzierte neurale Zelltypen charakteristisch sind. Innerhalb des tieferen Hirnparenchyms fanden sich 7 Tage nach Transplantation noch keine Spenderzellen.



Abbildung 7: Zellaggregat nach intraventrikulärer Injektion von EGFP-transgenen neuralen Stammzellen aus dem Striatum in der Ventrikelwand des embryonalen Empfängergewebes (Pfeil in a und b). Einzelne EGFP-transgene Spenderzellen mit komplexen Zellfortsätzen sind im Hirnparenchym nachweisbar (Pfeilspitzen in a). Die Inkubationszeit nach erfolgter Transplantation am 5. Embryonaltag betrug 10 Tage. Abbildung b) ist die entsprechende Phasenkontrastaufnahme von a). Vergrößerung: (a, b): x20.



Abbildung 8: Integrationsverhalten intraventrikulär transplantierter muriner neuraler Stammzellen aus dem Striatum im Gehirn von Hühnchenembryonen. Die Abbildungen zeigen eine massive periventrikuläre Integration der transplantierten Zellen, von der die weitere Migration der Spenderzellen ins umliegende Hirnparenchym ausgeht. Die Transplantationen wurde am 5. a) bzw. am 7. b-d) Embryonaltag vorgenommen; die Überlebenszeit der Embryonen nach erfolgter Transplantation betrug jeweils 10 Tage. Das Fluoreszenz-Signal der transgenen Spenderzellen wurde durch immunhistochemische Färbung mit EGFP-spezifischem Antikörper verstärkt. Das Ventrikellumen in (a-d) ist mit einem Stern gekennzeichnet. Vergrößerungen: a, b): x10; c, d): x4

An den Empfängergehirnen mit massiv erfolgter Integration transplantierter Zellen konnte die Verteilung und Dichte der Spenderzellen im Empfängergewebe genauer untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die murinen Spenderzellen in weiten Bereichen und verschiedenen Hirnregionen der Empfängerembryonen zu finden waren. Dabei waren die EGFP exprimierenden Zellen gleichmäßig im Gehirn des Empfängertieres verteilt (Abbildung 10). Einige Gehirne wiesen eine Migration der Spenderzellen ausgehend vom Ventrikelrand bis an die äußeren Grenzen auf (Abbildung 10), eine Distanz von mehreren Millimetern. Hier differenzierten sie sich in morphologisch komplexe Zelltypen (Abbildung 10; siehe unten). Die Empfängergehirne zeigten auch in Bereichen mit einer massiven Integration von Spenderzellen eine normale Histoarchitektur. Hinweise für die Ausbildung von Tumoren konnten in

keinem der Hühnchenembryonen gefunden werden. Insgesamt integrierten die Spenderzellen also über das Ependym in das Hirnparenchym der Empfängertiere, ohne die Entwicklung des embryonalen Nervengewebes dabei nachweisbar zu beeinträchtigen. In dem Hirnparenchym der Empfängertiere die wanderten transplantierten Zellen über beachtliche Strecken und differenzierten in morphologisch komplexe Zelltypen.

Über die langfristige Überlebens- und Proliferationsfähigkeit der transplantierten und integrierten Zellen im Empfängergewebe lässt sich hier nur bedingt eine Aussage treffen, da die Versuchsdauer in diesem Experiment auf die Embryonalphase der Empfängertiere beschränkt war und sich somit über lediglich 14 Tage erstreckte.



Abbildung 9: Initiale Integration muriner neuraler striataler Stammzellen 7 Tage nach einer Injektion in die Hirnventrikel von Hühnchenembryonen. EGFP-exprimierende Spenderzellen sind in der Nähe des Ventrikellumens zu finden. Die Mehrzahl der Spenderzellen weist eine radiale Zytoarchitektur auf. Eine weitere Integration in das umliegende Hirnparenchym und eine Differenzierung in morphologisch komplexe Zelltypen ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar. Die Zelltransplantation wurde am 5. Embryonaltag vorgenommen. Vergrößerung: (a, b): x40 (3D-Dekonvolutionstechnik)



Abbildung 10: 10 Tage nach einer intraventrikulären Injektion EGFP-transgener neuraler striataler Stammzellen sind zahlreiche, einzeln liegende EGFP-positive Zellen in weiten Bereichen des embryonalen Empfängergehirns nachweisbar. Die intraventrikuläre Transplantation wurde am 7. Embryonaltag vorgenommen. Die EGFP-Fluoreszenz der Spenderzellen wurde durch eine immunhistochemische Färbung mit EGFP-spezifischen Antikörpern verstärkt. Vergrößerung: (a, b) x4
# 3.2.2 Analyse der Morphologie transplantierter Spenderzellen mittels HRP-Färbungen

Zusätzlich zur Analyse des Integrationsverhaltens der neuralen Stammzellen im embryonalen Nervengewebe mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden die transplantierten striatalen Zellen für eine detaillierte Visualisierung ihrer Morphologie auch mittels HRP-Färbung im Empfängergewebe dargestellt. In diesen Experimenten wurden ebenfalls EGFP-spezifische primäre Antikörper zum Nachweis der EGFPtransgenen Spenderzellen verwendet, die dann über HRP-Konjugate detektiert wurden. Auch mit dieser Darstellungsmethode konnten zahlreiche Spenderzellen in den Gehirnen der Hühnchenembryonen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Praktisch alle Spenderzellen wiesen eine komplexe Morphologie mit mehreren teilweise fein verästelten Fortsätzen auf (Abbildung 11). Während zahlreiche Spenderzellen morphologische Ähnlichkeiten zu Astrozyten zeigten (Abbildung 11 a -c), konnten auch einige Spenderzellen mit morphologischen Ähnlichkeiten zu Neuronen nachgewiesen werden (Abbildung 11 d).



Abbildung 11: EGFP-transgene striatale Spenderzellen wurden 14 Tage nach einer intraventrikulären Transplantation im Hirnparenchym der Hühnchenembryonen immunhistochemisch mit einer HRP-Färbung sichtbar gemacht. Die Spenderzellen zeigen die typische Zytoarchitektur differenzierter neuraler Zelltypen mit zahlreichen fein verästelten Fortsätzen. Die EGFP-transgenen neuralen Stammzellen wurden in die Hirnbläschen 5 Tage alter Hühnchenembryonen injiziert. Vergrößerung: a, b): x20, c, d): x40

**3.2.3 Differenzierung der transplantierten murinen neuralen Stammzellen** *in vivo* Die transplantierten murinen neuralen Stammzellen differenzierten in den Gehirnen der Hühnchenembryonen in eine Reihe morphologisch unterschiedlicher Zelltypen (Abbildung 12 - 16). Dabei wiesen praktisch alle EGFP exprimierenden Spenderzellen eine komplexe Zytoarchitektur auf und bildeten mehrere, zum Teil fein verzweigte Zellfortsätze aus, die scheinbar in Kontakt zu den Blutgefäßen oder zu endogenen Zellen der Empfängergewebe standen.

#### 3.2.3.1 Immunhistochemische Analyse der Zelldifferenzierung in vivo

Um die Differenzierung der murinen neuralen striatalen Stammzellen nach Transplantation in embryonale Gehirne in gliale und neuronale Zelltypen zu analysieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit Zelltyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei sollte die Verwendung Spezies-spezifischer Antikörper, die mit dem entsprechenden Antigen der Maus, nicht aber den homologen Antigenen des Hühnchens reagieren, eine eindeutige Identifikation der murinen Spenderzellen im Empfängergewebe der Hühnchen gewährleisten. Eine vorhergehende Testung der verwendeten Antikörper auf Gewebsschnitten von nicht-transplantiertem Hühnchen-Nervengewebe ergab jedoch, dass fast alle getesteten Antikörper eine deutliche, wenn auch meist unspezifische Reaktion mit dem Hühnchengewebe aufwiesen. Ein Teil der Maus-spezifischen Antikörper schien zudem spezifisch mit den jeweiligen homologen Antigenen des Hühnchens zu reagieren (Tabelle 17). Eine eindeutige Identifikation von aus murinen Spenderzellen abstammenden Astrozyten, Oligodendrozyten oder Neuronen in den Hühnchengehirnen war damit durch immunhistochemische Analysen mit der alleinigen Verwendung Maus-spezifischer Antikörper nicht durchführbar. Es wurden daher Doppelfärbungen mit EGFP- und Zelltyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt und die Analyse der Differenzierung der Spenderzellen in vivo über ihre Koexpression von EGFP- und Zelltyp-spezifischen Proteinen vorgenommen.

getesteter	verwendetes	Kreuzreaktivität	Alter der
Antikörper	Hühnchengewebe		Hühnchenembryonen in
			Tagen
anti-Tubulin III, pk	Cerebellum, Retina	++	17 / 19
anti-Tubulin III, mk	Cerebellum,	++	17 / 19
	Retina, Vorderhirn		
anti-GFAP, pk	Cerebellum, Retina	++	17 / 19
anti-GFAP, mk	Cerebellum, Retina	-	19
anti-MBP, mk	Cerebellum, Retina	++	17 / 19
anti-RT 97, mk	Cerebellum	++	17 / 19
anti-PGP 9.5, pk	Cerebellum, Retina	++	19
anti-NeuN, mk	Cerebellum, Retina	++	19
anti-GAP 43, mk	Cerebellum,	-	19
	Retina, Vorderhirn		
anti-Calbindin, pk	Vorderhirn	+	19
anti-Calbindin, mk	Vorderhirn	++	19
anti-MAP 2a/b, mk	Vorderhirn	+	19
anti-Calretinin, mk	Vorerhirn	+	19
anti-Parvalbumin,	Vorderhirn	++	19
mk			
anti-Synaptophysin,	Vorderhirn	-	19
mk			
Kreuzreaktivität •	- · keine Kreuz	reaktivität•	

Tabelle 17: getestete Maus-spezifische Antikörper und beobachtete Kreuzreaktivitäten mit embryonalem Hühnchengewebe

: diffuse Kreuzreaktivität;

+ : Kreuzreaktivität mit homologen Antigenen ++

Um zu untersuchen, ob die transplantierten neuralen Stammzellen aus dem Striatum in Gliazellen differenziert waren, wurden anti-GFAP (für die Identifizierung von Astrozyten) bzw. anti-MBP Antikörper (für die Identifizierung von Oligodendrozyten) eingesetzt. Gleichzeitig mit den anti-GFAP und anti-MBP Antikörpern wurden die Gewebeschnitte der embryonalen Hühnchengehirne mit anti-EGFP Antikörpern inkubiert. Eine Kolokalisation des EGFP-Signals mit dem GFAP- bzw. MBP-Signal in einer Zelle identifizierte sie eindeutig als einen aus den Spenderzellen entstandenen Astrozyten bzw. Oligodendrozyten.

Der Vergleich von EGFP- und GFAP-Immunreaktivität zeigte eine Koexpression von beiden Proteinen in einer Vielzahl von Spenderzellen. Diese Zellen konnten somit eindeutig als von den murinen Spenderzellen abstammende Astrozyten identifiziert werden (Abbildung 12). Die murinen Astrozyten fanden sich in allen Bereichen der transplantierten Hühnchengehirne und waren sowohl periventrikulär als auch in der Peripherie des Gewebes zu finden. Die EGFP-/GFAP-positiven Zellen hatte einen kleinen Zellkörper und zahlreiche, reich verästelte Fortsätze und entsprachen damit nicht nur von ihrem Antigenprofil, sondern auch von ihrer Morphologie typischen Astrozyten (Abbildung 12). Viele dieser Zellen wiesen ausserdem mit ihren Fortsätzen einen engen Kontakt zu Blutgefäßen auf (Abbildung 12 d, e, f). Diese Charakteristika wiesen gemeinsam mit dem Nachweis der GFAP-Expression die Zellen als morphologisch und möglicherweise auch funktionell intakte Astrozyten aus, denen es möglich war ohne Störung der Gewebsarchitektur in das Empfängergewebe zu integrieren.



Abbildung 12: Differenzierung neuraler Stammzellen aus dem Striatum in GFAP-positive Astrozyten nach Transplantation in die Hirnbläschen von 5 Tage alten Hühnchenembryonen. Die von den Spenderzellen abstammenden Astrozyten wurden 14 Tage nach der Transplantation mittels Immunhistochemie über ihre Koexpression von EGFP (a, b) und GFAP (b, e) identifiziert. (c) und (f) zeigen Überlagerungen des EGFP- und GFAP-Signals von (a, b) und (d, e). Einige der von den transplantierten Stammzellen abstammenden Astrozyten weisen mit ihren Fortsätzen einen engen Kontakt zu den Blutgefäßen des Empfängergewebes auf (Pfeilspitzen in d, f) . Vergrößerung: a-c): x40 (3D-Dekonvolutionstechnik), d-f: x20.

Weiterhin wurde untersucht, ob die striatalen Spenderzellen fähig waren, sich in den embryonalen Empfängergehirnen in myelinbildende Oligodendrozyten zu differenzieren. Eine entsprechende EGFP-positive Zellpopulation mit charakteristischer Zytoarchitektur konnte in den Empfängergeweben dargestellt werden. Diese Zellen sich in den normalerweise fanden zumeist myelinisierten Trakten der Empfängergewebe, die aufgrund der Kreuzreaktivität der Maus-spezifischen anti-MBP Antiköper mit den endogenen Oligodendrozyten und dem Myelin des Hühnchengehirns dargestellt werden konnten. Die MBP-positiven Zellen bildeten lange gerade Fortsätze aus, die parallel zueinander orientiert waren und in direktem Kontakt zu den Axonen in den myelinisierten Trakten verliefen. Eine Doppel-Immunhistochemie mit anti-EGFPund anti-MBP-Antikörpern identifizierte einen Teil der EGFP-positiven Zellen über ihre als Oligodendrozyten (Abbildung 13). Da auch MBP-Expression endogene aufgrund myelinbildende Oligodendrozyten des Hühnchengewebes der oben eindeutige und zelltypspezifische beschriebenen Kreuzreaktivität eine MBP-Immunreaktivität aufwiesen, zeigte sich in vielen Gewebsschnitten eine unmittelbare Nachbarschaft der aus Spenderzellen entstandenen Oligodendrozyten mit endogenen Oligodendrozyten (Abbildung 13). Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass ein Teil der murinen Stammzellen in den embryonalen Hühnchengehirnen in reife Oligodendrozyten differenziert waren. Diese murinen Oligodendrozyten waren nicht nur präferentiell in Regionen zu finden, in denen auch endogene Oligodendrozyten lokalisiert waren (myelinisierte Fasertrakte), sondern sie waren offenbar auch in der Lage, mit Axonen der Hühnchenembryonen zu interagieren und diese zu myelinisieren.



Abbildung 13: Differenzierung muriner neuraler striataler Stammzellen in MBP-positive Oligodendrozyten nach Transplantation in die Hirnbläschen 5 Tage alter Hühnchenembryonen. Die von den transplantierten Zellen abstammenden Oligodendrozyten wurden 14 Tage nach Transplantation durch ihre Ko-Expression von EGFP (a, d) und MBP (b, e) identifiziert. Die Überlagerung des EGFP- und MBP-Signals (c für a und b; f für d und e) zeigen eine MBP-Immunreaktivität der EGFP-positiven langen, gerade und parallel zueinander verlaufenden Fortsätze der Spenderzellen (Pfeilspitzen in c und f). Das MBP-Signal auf den EGFP-positiven Zellfortsätzen deutet an, dass die murinen Spender-Oligodendrozyten Axone des Empfänfergehirns myelinisiert haben. Ausserdem sind zahlreiche endogene myelinisierte Axone des Hühnchenembryos zu erkennen. Vergrößerung (a-f): x4 (3D-Dekonvolutionstechnik)

Um zu untersuchen, ob die transplantierten murinen striatalen Stammzellen in den Hühnchengehirnen auch in Nervenzellen differenzieren, wurden Doppelfärbungen mit anti-EGFP-Antikörpern und verschiedenen Neuron-spezifischen Antikörpern, insbesondere mit anti-β-Tubulin Typ III Antikörpern, durchgeführt. Zur weiteren Identifizierung von Neuronen wurden die Antikörper anti-PGP 9.5, anti-Neu N, anti-RT 97, anti-Synaptophysin, anti-GAP 43, anti-Calbindin, anti-Map 2 a/b, anti-Calretinin und anti-Parvalbumin Antikörper verwendet.

Bei den Doppelfärbungen mit den verschiedenen Antikörpern zeigten einige der Spenderzellen eine Koexpression von EGFP und  $\beta$ -Tubulin Typ III (Abbildung 14). Die EGFP-/ß Tubulin Typ III-positiven Spenderzellen hatten einen kleinen rundlichen Zellkörper mit fein verzweigten Fortsätzen, die in das Hirnparenchym projizierten. Über die langen und stark verzweigten Fortsätze schienen einige der Zellen miteinander in Verbindung zu stehen (Abbildung 14 d, e, f). Insgesamt zeigten diese Zellen weder morphologische Ähnlichkeiten zu Astrozyten noch zu Oligodendrozyten. Eine genaue Analyse der Lokalisation EGFP-/ß-Tubulin Typ III-positiver Zellen ergab ausserdem, dass diese Zellen vorzugsweise in der grauen Substanz der Empfängergehirne zu finden waren. Lokalisation, Morphologie und die Expression von  $\beta$ -Tubulin Typ III diese Spenderzell-Population eindeutig identifizierten als Zellen. die nach Transplantation in das embryonale und noch neurogene Nervensystem von Hünchenembryonen in Neurone differenziert waren.

Eine Immunreaktivität EGFP-positiver Spenderzellen mit den anderen eingesetzten Neuron-spezifischen Antikörpern (s.o.) konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Negativergebnis erklärt sich möglicherweise durch die Tatsache, dass die weiteren Neuron-spezifischen Antikörper entweder nur gegen Antigene gerichtete sind, die von spezifischen Subpopulationen von Neuronen exprimiert werden, oder gegen Antigene gerichtete sind, die nur von voll ausdifferenzierten Nervenzellen exprimiert werden.



Abbildung 14: Differenzierung muriner neuraler Stammzellen aus dem Striatum in  $\beta$ -Tubulin Typ III-positive Neurone nach Transplantation in die Hirnbläschen 5 Tage alter Hühnchenembryonen. Nach 10 (d-f) bzw. 13 (a-c) Tagen nach der Transplantation wurden die von den transplantierten neuralen Stammzellen abstammenden Neurone über ihre Ko-Expression von EGFP (a, d) und ß-Tubulin Typ III (b, e) identifiziert. Die Überlagerungen des EGFP- und ß-Tubulin Typ III-Signals (c für a und b; f für d und e) zeigen Spender-Nervenzellen mit zahlreichen, komplex verzweigten Fortsätzen, von denen einige miteinander in Kontakt stehen (Pfeilspitzen in d und f). Vergrößerungen: Abbildungen a-c: x40 (3D-Dekonvolutionstechnik), d-f: x20.

## 3.2.3.2 Analyse der Zelldifferenzierung in vivo mit in situ Hybridisierung

In Ergänzung zu den immunhistochemischen Analysen wurden Untersuchungen zum Differenzierungspotential muriner neuraler spinaler Stammzellen im Gehirn von Hühnchenembryonen auch mittels in situ-Hybridisierungen durchgeführt. Hierbei wurden Gewebeschnitte der Empfängergewebe mit Digoxigenin-markierten cRNA Proben hybridisiert, die jeweils Zelltyp-spezifische Transkripte detektieren. Auch bei dieser Methode wurden Maus-spezifische Proben zur Zellcharakterisierung eingesetzt, um so die von den transplantierten murinen neuralen Stammzellen abstammenden neuralen Zelltypen sicher identifizieren und von den endogenen Zellen des Hühnchengewebes unterscheiden zu können. Analog zur immunhistochemischen Analyse wurde auch für diese Experimente zunächst die Spezies-Spezifität der einzusetzenden Maus-spezifischen Riboproben an untransplantiertem Hühnchengewebe überprüft, um so eventuelle Hybridisierungen der cRNA Proben mit endogenen Transkripten in neuralen Zelltypen des Empfängergewebes auszuschließen. Mausspezifische GFAP-spezifische cRNA Proben (zur Identifizierung von Astrozyten), PDGFa-spezifische cRNA Proben (zur Identifizierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen; (Hart et al. 1988; Hall et al. 1996)) und PLP- und MBP-spezifische cRNA Proben (zur Identifizierung von reifen Oligodendrozyten; (Nave et al. 1987; Peyron et al. 1997) reagieren nicht mit dem Hühnchengewebe. Eine eindeutige Identifizierung von aus Spenderzellen abstammenden Astrozyten und Oligodendrozyten konnte damit über die in situ Hybridisierung durchgeführt werden (siehe unten). Eine eindeutige Identifikation von aus Spenderzellen abstammenden Nervenzellen konnte mittels in situ Hybridisierung allerdings nicht gewährleistet werden, da verschiedene Maus-spezifische ß-Tubulin Typ III-spezifische cRNA Proben mit Hühnchengewebe reagierten.

*In situ* Hybridisierungen von transplantierten Empfängergeweben mit GFAPspezifischen cRNA Proben bestätigten die immunhistochemisch beobachtete Differenzierung von zahlreichen Spenderzellen in Astrozyten (Abbildung 15). Wie auch in den immunhistochemisch untersuchten Gewebsschnitten wurden aus Spenderzellen entstandene Astrozyten in weiten Bereichen der Empfänger-Gehirne gefunden und waren sowohl direkt periventrikulär als auch in der Peripherie des Gehirnparenchyms nachweisbar.



Abbildung 15: *in situ* Hybridisierungen mit GFAP-spezifischen cRNA Proben 10 Tage nach einer Transplantation muriner neuraler spinaler Stammzellen in die Hirnbläschen von 7 Tage alten Hühnchenembryonen zeigen die Differenzierung zahlreicher Spenderzellen in GFAP exprimierende Astrozyten (a, b). Endogene Astrozyten des Hühnchenembryos wurden von der Spezies-spezifischen GFAP-cRNA Probe nicht erkannt. Vergrößerung (a, b): x20.

Zum Nachweis der Differenzierung transplantierter Stammzellen in Myelin bildende Oligodendrozyten wurden mehrere Spezies- und Zelltyp-spezifische cRNA Proben eingesetzt. Mit Hilfe von MBP- und PLP- (Nave et al. 1987; Peyron et al. 1997) spezifischen Riboproben wurden reife myelinbildende Oligodendrozyten detektiert. Zur Charakterisierung von unreifen Oligodendrozyten-Vorläufern wurde eine PDGF aspezifische cRNA-Probe (Hart et al. 1988; Hall et al. 1996) verwendet. Mit allen eingesetzten Proben konnten im Empfängergewebe eindeutig aus murinen Spenderzellen entstandene Oligodendrozytenpopulationen identifiziert werden. Es fanden sich sowohl zahlreiche reife myelinbildende MBP- (Abbildung 16 a, b) bzw. PLP-exprimierende (Abbildung 16 c, d) als auch zahlreiche unreife PDGFR $\alpha$ -positive (Abbildung 16 e, f) Oligodendrozytenvorläuferzellen in den Empfängergehirnen. Obwohl in diesen Experimenten keine spezifische Darstellung des endogenen Myelins in den Empfängergeweben erfolgte, zeigten Analysen der Gewebeschnitte im Phasenkontrast, dass die von den Spenderzellen abstammenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und reife Oligodendrozyten überwiegend in der weissen Substanz der Hühnchengehirne zu finden waren.



Abbildung 16: in situ Hybridisierungen 10 Tage nach einer Transplantation von murinen neuralen Stammzellen aus dem Rückenmark in die Hirnbläschen von 7 Tage alten Hühnchenembryonen zeigen eine Differenzierung der Spenderzellen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und reife Oligodendrozyten. Reife murine Oligodendrozyten im Hirnparenchym der Empfängerembryonen wurden mit MBP-(a, b) und PLP-spezifischen (c, d) cRNA Proben identifiziert. Mit PDGF $\alpha$ spezifischen cRNA Proben konnte ausserdem eine Differenzierung zahlreicher Spenderzellen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden (e, f). Endogene Oligodendrozyten-Vorläufer und endogene reife Oligodendrozyten der Hühnchenembryonen wurden von den benutzten Spezies-spezifischen cRNA Proben nicht erkannt. Vergrößerung: (a- e und g): x4; (c, f, h, i): x10

# 3.3 Transplantation muriner neuralen Stammzellen in die Augenanlagen von Hühnchenembryonen

An insgesamt 12 Hühnchenembryonen wurde am 5. bis 7. und 13. Embryonaltag eine intravitreale Injektion der murinen neuralen Stammzellen aus dem Rückenmark in die Augenbläschen vorgenommen. Die Empfängeraugen wurden analog zu den transplantierten Gehirnen nach einer Überlebenszeit der Embryonen von 6 bis 12 Inkubationstagen fixiert, mit dem Vibratom geschnitten und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop auf das Vorhandensein von EGFP-exprimierenden Spenderzellen untersucht. Bei diesen Experimenten konnten bei der Mehrzahl der untersuchten Gewebeschnitte keine Spenderzellen identifiziert werden. In einigen Schnitten konnten aber transplantierte Spenderzellen im Glaskörper gefunden werden. Eine Integration der Stammzellen in die embryonale Retina konnte jedoch in keinem der manipulierten Augen nachgewiesen werden. Die extrem feste Konsistenz des Glaskörpers der Hühnchen-Augen könnte eine mechanische Migrationsbarriere für die intravitreal transplantierten Stammzellen darstellen und so die fehlende Integration der Stammzellen in die embryonale Netzhaut erklären.

Nummer	Zeitpunkt der	Überlebenszeit nach	Integration (siehe
	Transplantation	Transplantation (Tage)	unten)
1	Embryonaltag (E) 7	10	++
2	Embryonaltag (E) 7	10	+
3	Embryonaltag (E) 6	6	-
4	Embryonaltag (E) 13	6	+
5	Embryonaltag (E) 5	12	-
6	Embryonaltag (E) 5	12	-
7	Embryonaltag (E) 5	12	-
8	Embryonaltag (E) 5	12	-
9	Embryonaltag (E) 5	12	-
10	Embryonaltag (E) 5	12	-
11	Embryonaltag (E) 5	12	-
12	Embryonaltag (E) 5	12	-

Tabelle 18: Transplantation muriner neuraler spinaler Stammzellen in die Augenanlagen von Hühnchenembryonen

Integration:

: keine Spenderzellen

+

: vereinzelte Zellen in Glaskörper

++ : viele Zellen in Glaskörper

#### 4. Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Neurale Stammzellen lassen sich nach Isolation aus embryonalen und adulten Geweben in Anwesenheit definierter Wachstumsfaktoren effizient expandieren und können in *vitro* unter kontrollierten Bedingungen gezielt in verschiedene reife Zelltypen mit einem glialen oder neuronalen Phänotyp differenziert werden. Nach Transplantationen zeigen neurale Stammzellen in vivo in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Empfängergewebes ein unterschiedlich ausgeprägtes Integrationsund Migrationspotential: Im Gegensatz zur intensiven Integration neuraler Stammzellen in embryonale Empfängergewebe, ist in adulten Empfängergehirnen eine nur begrenzte Integration neuraler Stammzellen zu beobachten. Außerdem weisen transplantierte Stammzellen in jungen Empfängergeweben verglichen neurale zu adulten Empfängergeweben ein breiteres Differenzierungspotential auf, was sich insbesondere in einer effizienteren Differenzierung in Nervenzellen zeigt. Aus diesen Gründen sind Transplantationsstudien an embryonalen Geweben besonders geeignet, das maximale Integrations- und Differenzierungspotential neuraler Stammzellen in vivo zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss epigenetischer Faktoren, die im embryonalen Nervengewebe Neurogenese und Gliogenese stimulieren, auf das Integrations- und Differenzierungspotential transplantierter neuraler Stammzellen untersucht. Dazu wurden murine neurale Stammzellen aus dem Striatum und dem in Rückenmark EGFP-transgener embryonaler Mäuse Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 als Neurosphären kultiviert und expandiert, und anschließend intraventrikulär in die Hirnanlagen von Hühnchenembryonen injiziert. Neben dem Integrationsverhalten der neuralen Stammzellen in den embryonalen Empfängergehirnen wurde mit diesem xenogenen Transplantationsparadigma außerdem das Differenzierungspotential dieser Zellen in gliale und neuronale Zelltypen untersucht.

#### 4.2 Xenotransplantation muriner neuraler Stammzellen in Hühnchenembryonen

In der vorliegenden Studie wurden neurale Stammzellen aus dem zentralen Nervensystem von Mausembryonen isoliert, in vitro als Neurosphären expandiert, und anschließend in das sich entwickelnde Gehirn von Hühnchenembryonen transplantiert. Hühnchenembryonen bieten im Vergleich zu Säugerembryonen einen vergleichsweise einfachen experimentellen Zugang zu den embryonalen Umgebungsbedingungen (Olivier et al. 2001; Galileo 2003), unter deren Einfluss das Differenzierungspotential der neuralen Stammzellen untersucht werden sollte. Sie sind in ovo leicht für Manipulationen zugänglich, was die Transplantation der Zellen in die Hirnanlagen von lebenden und sich weiter entwickelnden Empfängertieren ermöglicht. Zudem wurde in verschiedenen Studien über die Generierung entsprechender chimärer Embryonen bereits gezeigt, dass die Entwicklung neuraler Stammzellen im embryonalen Gewebe beider Spezies ähnlichen Kontrollmechanismen unterliegen (Fontaine-Perus et al. 1997; White and Anderson 1999). Fontain-Perus et al. demonstrierten beispielsweise, dass neurale Zellen aus der ZNS-Anlage embryonaler Mäuse nach Transplantation in Hühnchenembryonen in das sich entwickelnde zentrale und periphere Nervensystem der Empfängertiere integrierten (Fontaine-Perus et al. 1997).

In den hier durchgeführten xenogenen Transplantationsexperimenten erwies sich allerdings die Überlebensrate der transplantierten Hühnchenembryonen über die analysierte Zeitspanne von bis zu 14 Tagen als gering. In dieser Arbeit wurde jede in ovo Manipulationsserie mit 30 befruchteten Hühnereiern begonnen. Zur Transplantation am 5. bzw. 7. Tag nach Beginn der Inkubation konnten bereits nur zwischen 20 und 50% (6 - 15 von 30 Eiern) der Eier genutzt werden, da bereits abgestorbene, schwach entwickelte oder missgebildete Embryonen aus den Versuchen ausgeschlossen wurden. Ein wesentlicher Grund für die geringe Überlebensrate der Embryonen in der vorliegenden Versuchsanordnung war der notwendige lange Überlebenszeitraum der Tiere von bis zu 14 Tagen nach Transplantation. In vergleichbaren Studien, in denen ebenfalls Xenotransplantationen von murinen Zellen in Hühnchenembryonen durchgeführt wurden und die Überlebensrate deutlich besser war, erstreckte sich die Überlebenszeit der Embryonen nach erfolgter Manipulation meist nur über wenige Tage (Fontaine-Perus et al. 1997; Durbec and Rougon 2001; White et al. 2001). Auch eigene stichprobenartige Untersuchungen zur Anzahl überlebender Embryonen an verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Transplantation zeigten, dass die Überlebensrate der manipulierte Embryonen mit zunehmender Inkubationszeit massiv

abnahm. Bis zum Ende der erforderlichen Inkubationszeit überlebten in den einzelnen Transplantationsserien entsprechend nur zwischen 0 und 20% der Embryonen (0 – 6 von 30). Insgesamt wurde an 512 Empfängerembryonen eine *in ovo* Transplantation in die Hirnbläschen und/oder Augenanlagen durchgeführt, davon überlebten nur 53 der manipulierten Hühnchenembryonen bis zum Zeitpunkt der Gewebepräparation und Auswertung, die 7 bis 14 Tage nach der Transplantation erfolgte. Ursächlich hierfür kann eine Vielzahl von einzelnen oder zusammenwirkenden Faktoren während der langwierigen Manipulations- und Inkubationsvorgänge an den Hühnereiern sein. Einfluss nehmende Faktoren können beispielsweise die Inkubationstemperatur und Luftfeuchtigkeit, der Verschluss der Manipulationsfenster in der Eierschale, die Lagerungsposition der Eier im Brutschrank, die zur Manipulation notwendige Entnahme von Albumin, die Verwendung einer Ringer-Lösung usw. darstellen. Einzelne, sich ursächlich auswirkende Faktoren, konnten nicht eindeutig identifiziert und die Versuchsdurchführung und Überlebensrate der Embryonen daher nicht weiter optimiert werden.

Zur Untersuchung des Integrationsverhaltens und des Differenzierungspotentials der transplantierten Stammzellen unter dem Einfluss der im Empfängergewebe stattfindenden Neurogenese war eine langfristige Überlebenszeit der manipulierten Tiere nach der Transplantation notwendig. Aus diesem Grund konnte die Überlebensrate der Embryonen nicht durch eine einfache Verkürzung der Überlebenszeit werden. So verbessert wurde beispielsweise in einer Transplantationsserie die Überlebenszeit der Embryonen nach der Transplantation auf 7 Tage begrenzt und das Gewebe bereits zu diesem Zeitpunkt auf eine erfolgte Zellintegration und -differenzierung untersucht (siehe 3.2.1.1). Hierbei war eine gerade beginnende transependymale Integration der transplantierten Zellen in die Empfängergehirne zu beobachten. Eine ausgeprägte Integration der Spenderzellen in das Hirnparenchym der Empfängertiere oder eine Differenzierung der transplantierten neuralen Stammzellen in reife Zelltypen war noch nicht festzustellen (siehe Ergebnisse 3.2.1.1, Abbildung 10).

Insgesamt bietet das in dieser Arbeit etablierte xenogene Transplantationssystem von murinen neuralen Stammzellen in das Gehirn von Hühchenembryonen mehrere Vorteile. Wie bereits diskutiert, sind *in ovo* Manipulationen von Hühnchenembryonen im Vergleich zu *in utero* Manipulationen von Säugern experimentell vergleichsweise einfach durchführbar. Ein weiterer Vorteil der Xenotransplantation ist die Möglichkeit, durch den Einsatz Spezies-spezifischer Antikörper oder cRNA Proben gegen Zelltypspezifische Antigene oder Transkripte zwischen den Spenderzellen und den endogenen Zellen des Empfängergewebes zu unterscheiden. Schließlich ist bei Hühchenembryonen das Immunsystem noch nicht entwickelt, und es ist daher aufgrund der fehlenden Immunreaktion der Empfängergewebe möglich, Spezies-verschiedene Stammzellen (oder andere Zelltypen) zu transplantieren, ohne dass eine Immunsupression notwendig ist.

# 4.3 Integration der murinen Spenderzellen im embryonalen Empfängergewebe des Hühnchens

Nach Präparation und histologischer Auswertung der manipulierten Empfängergehirne konnten in insgesamt 16 der 48 überlebenden intrazerebroventriklär transplantierten Hühnchenembryonen murine Spenderzellen detektiert werden. Dabei konnten die murinen Stammzellen in den Gehirnen der Hühnchenembryonen aufgrund ihrer Expression des Reportergens EGFP identifiziert werden, und die Verteilung EGFPpositiver Zellen im Empfängergewebe damit zur Abschätzung des Integrationspotentials der Stammzellen herangezogen werden. Außerdem wurde über immunhistochemische Färbungen mit anti-EGFP Antikörpern und Fluochrom- oder HRP-konjugierten sekundären Antikörpern das EGFP-Signal verstärkt und so die Identifikation der Spenderzellen weiter optimiert (siehe Ergebnisse 3.2.1.2, Abbildung 10). In diesen Experimenten konnten in einigen Empfängertieren große Anzahlen transplantierter Zellen in weiten Bereichen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. In anderen Embryonen war dagegen nur eine begrenzte Integration von nur wenigen Einzelzellen zu beobachten. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Umfang der erfolgten Zellintegration und dem Transplantationszeitpunkt konnte dabei nicht festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.2.1, Tabelle 16). So wurden beispielsweise Hühnchenembryonen am Embryonaltag 5, 6 oder 7 transplantiert. Zu allen Altersstufen war eine Integration von Spenderzellen zu beobachten, wobei auch zwischen Tieren, die im gleichen Alter transplantiert wurden, erhebliche Unterschiede im Ausmaß der Zell-Integration festzustellen waren. Auch die Überlebenszeit der Empfängertiere nach Injektion der Zellen hatte keinen Einfluss auf die Anzahl integrierter Stammzellen im Empfängergewebe. Der früheste Zeitraum nach Transplantation, zu dem eine beginnende Integration der Spenderzellen im Empfängergewebe festzustellen war, betrug 7 Tage. Bei Überlebenszeiten zwischen 8 und 14 Tagen nach erfolgter Stammzelltransplantation war unabhängig von der jeweiligen Überlebenszeit in den verschiedenen Tieren eine Zellintegration unterschiedlichen Ausmaßes zu beobachten.

Systematisch untersucht wurde der Einfluss des Entwicklungsstadiums eines Empfängerorganismus auf das Integrationsverhalten transplantierter neuraler Stammzellen über Transplantationen in das Auge vom Opossum. Diese Tierart ist für derartige Experimente prädestiniert, da die Tiere in einem extrem unreifen Zustand geboren werden. In diesen Transplantationsexperimenten an unterschiedlich alten Tieren zeigten sich deutliche Unterschiede des Integrationsund Differenzierungsverhaltens der transplantierten Zellen in Abhängigkeit vom Alter des Empfängertieres. Das ausgeprägteste Integrationspotential wiesen die Stammzellen auf, die in die jüngsten Empfängertiere transplantiert wurden (Van Hoffelen et al. 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transplantation der neuralen Stammzellen in extrem unreife embryonale Empfängergehirne. Im Hirnparenchym einiger Empfängertiere konnte eine massive periventrikuläre Integration EGFP-exprimierender Zellen festgestellt werden. Ausgehend von diesen Ansammlungen fand sich eine ausgeprägte Spenderzellmigration in das umliegende Hirnparenchym. In einigen Gewebeschnitten konnte sogar eine gleichmäßige Verteilung EGFP-exprimierender Spenderzellen über das gesamte Parenchym des transplantierten Gehirns beobachtet werden. Diese ausgedehnte Einwanderung der Spenderzellen in verschiedenste Regionen des Empfängergehirns ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die intraventrikulär injizierten Zellen sich zunächst im Ventrikellumen verteilt haben, und anschließend auf unterschiedlichen Ebenen des Empfängergehirns durch das Ependym in das Parenchym eingewandert sind (Brustle et al. 1998; Flax et al. 1998; Brustle 1999). In den Empfängertieren, die bereits 7 Tage nach der Transplantation histologisch untersucht wurden, konnte diese transependymale Infiltration der intraventrikulär injizierten Spenderzellen beobachtet werden. Hier fanden sich im Hirnparenchym noch keine EGFP-exprimierenden Zellen, während direkt in der den Ventrikel begrenzenden Ependymzellschicht Spenderzellen identifiziert werden konnten, die scheinbar gerade aktiv in die Empfängergehirne einwanderten (siehe Ergebnisse 3.2.1.1, Abbildung 9). Eine transependymale Infiltration von intrazerebroventrikulär injizierten neuralen Stammzellen konnte auch bei jungen Mäusen - nicht jedoch bei adulten Mäusen beobachtet werden (Brustle et al. 1998; Flax et al. 1998; Brustle 1999; Ader et al. 2001; Ader et al. 2004). Bei inflammatorischen Erkrankungen des adulten zentralen Nervensystems nimmt die Möglichkeit intraventrikulär transplantierter Stammzellen zur transependymalen Infiltration in die Empfängergehirne jedoch wieder deutlich zu. experimenteller Neurale Stammzellen, die intraventrikulär in Tiere mit Autoimmunenzephalomyelitis transplantiert wurden, konnten effizient in das Hirnparenchym der Empfängertiere einwandern. Sie migrierten vor allem in erkrankte Bereiche der weißen Substanz und differenzierten in oligodendrogliale Phänotypen (Ben-Hur et al. 2003; Einstein et al. 2003). Welche Faktoren des inflammatorischen Gewebes diese effiziente Integration und gezielte Stammzellmigration in die geschädigten Regionen des Empfängerorgans induzieren, ist jedoch noch unbekannt. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte ausgedehnte und gleichmäßige Verteilung Spenderzellen im Empfängergewebe mit beträchtlicher Entfernung zum der Ventrikelsystem zeigt außerdem die Fähigkeit der Spenderzellen, im embryonalen Nervengewebe über große Distanzen aktiv zu migrieren. Welche Mechanismen und Substrate des Empfängergewebes die Zellen hierbei beeinflussen ist noch unklar. Ader et al. vermuteten, dass neurale Stammzellen nach einer Transplantation in die dysmyelinisierten Gehirne junger Mausmutanten vor allem die unmyelinisierten Axone in der weißen Substanz als Migrationssubstrat nutzen. Entsprechend fanden die Autoren die überwiegende Anzahl EGFP-positiver Spenderzellen in Bereichen der weißen Substanz (Ader et al. 2004). Bereits zuvor wurde vermutet, dass neurale Stammzellen überwiegend entlang myelinisierter Fasertrakte im zentralen Nervensystem migrieren (Brustle et al. 1998). Diese Beobachtung kann anhand der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten nicht nachvollzogen werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Gliogenese nach der Neurogenese stattfindet und sich über die späte Embryonal- bis in die frühe Postnatalphase erstreckt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stammzellen Empfängertiere sehr früher Entwicklungsstadien transplantiert und das in Nervengewebe bereits in der späten Embryonalphase auf die Integration transplantierter Spenderzellen untersucht. Möglicherweise war der Höhepunkt der Gliogenese im Empfängergewebe zum Zeitpunkt der Gewebepräparation noch nicht erreicht. Welche zellulären und molekularen Eigenschaften des Gewebes oder intrinsische Eigenschaften der Zellen die Migration der Stammzellen im embryonalen Gewebe beeinflussen, konnte hier nicht geklärt werden. Die Spenderzellen integrierten ohne sichtbare Störung der Zytoarchitektur des Empfängergewebes in das embryonale Gehirn der Empfängertiere. Einzelne Zellen wiesen einen engen Kontakt zu endogenen Zellen und Blutgefäßen des Empfängergewebes auf. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass die Spenderzellen zum Teil über erhebliche Strecken in das Hirnparenchym eingewandert waren, lassen vermuten, dass die Zellen radiale Glia und/oder das Gefäßsystem der Empfängergehirne als Migrationssubstrat genutzt haben. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die murinen neuralen Stammzellen während ihrer Migration und Integration im Hirnparenchym der Hühnchenembryonen fähig waren, auf molekulare Signale des Empfängergewebes zu reagieren und sich in die Gewebearchitektur der Empfängergehirne einzufügen.

# 4.4 Gliale und neuronale Differenzierung der murinen neuralen Spenderzellen in den embryonalen Empfängergehirnen

Die komplexe Zytoarchitektur der in die Empfängergewebe integrierten EGFPexprimierenden Spenderzellen deutet an, dass die Stammzellen auch *in vivo* über die Fähigkeit verfügen, in verschiedene reife neurale Zelltypen zu differenzieren. So konnten in den embryonalen Gehirnen EGFP-positive Spenderzellen mit unterschiedlichsten morphologischen Charakteristika identifiziert werden. Vielfältige Variationen fanden sich in Größe und Form der Zellkörper, in Anzahl, Länge und Verzweigungsmuster der Zellfortsätze und in der Assoziation der Spenderzellen zu endogenen Gewebsbestandteilen wie Blutgefäßen oder myelinisierten Axonen.

Zur Identifikation der einzelnen aus den transplantierten neuralen Stammzellen entstandenen neuralen Zelltypen wurden immunhistochemische Färbungen oder in situ Hybridisierungen mit Antikörpern oder cRNA Proben gegen Zelltyp-spezifische Marker durchgeführt (siehe Ergebnisse 3.2.2). Über die Verwendung Spezies-spezifischer Proben bzw. Doppelfärbungen mit Zelltyp- und EGFP-spezifischen Antikörpern konnte hierbei eindeutig belegt werden, dass es sich bei den dargestellten Zelltypen um aus Spenderzellen entstandene Zellen handelte. Die so erhobenen Daten zeigen, dass die neuralen Stammzellen nicht nur fähig waren, in das embryonale Nervensystem der Empfängertiere zu integrieren, sondern darüber hinaus sowohl in gliale als auch neuronale Zelltypen zu differenzieren. So konnte im Empfängergewebe mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen mit GFAPund EGFP-spezifischen Antikörpern eindeutig eine aus Spenderzellen entstandene EGFP-exprimierende Zellpopulation identifiziert werden, die in reife Astrozyten differenziert war. Über die Kolokalisation beider Proteine in den Zellen konnten diese aus Spenderzellen entstandene Astrozyten sicher identifiziert werden (siehe Ergebnisse 3.2.2.1, Abbildung 11 und 12). Die über GFAP detektierten Gliafilamente sind charakteristisch für Astrozyten den zentralen Nervensystems und werden als eindeutiger Marker für diese gliale Zellpopulation angesehen (Reske-Nielsen et al. 1987a; Reske-Nielsen et al. 1987b). Der immunhistochemische Nachweis einer astrozytären Differenzierung der Spenderzellen konnte über in situ Hybridisierungs-Experimente mit GFAP-spezifischen cRNA Proben bestätigt werden (siehe Ergebnisse 3.2.2.2, Abbildung 15). Hierbei konnte über die Verwendung Spezies-spezifischer cRNA-Proben ein weiterer und unabhängiger Beweis für eine Differenzierung transplantierter muriner Zellen in Astrozyten erbracht werden. Diese aus den Spenderzellen entstandenen Astrozyten

94

waren in verschiedenen Hirnregionen der transplantierten Hühnchenembryonen zu finden, und waren sowohl als isoliert liegende Einzelzellen als auch als Gruppen von Zellen nachweisbar. Die Mehrzahl der GFAP-expimierenden Zellen wiesen eine charakteristische sternförmige Zellmorphologie mit fein verzweigten Fortsätzen auf. Einige der aus Spenderzellen entstandenen Astrozyten bildeten dabei Zellfortsätze aus, die in direktem Kontakt zu Blutgefäßen des Empfängergewebes zu enden schienen. Winkler et al. untersuchten bereits 1998 das Integrations- und Differenzierungsverhalten EGF-expandierter neuraler Stammzellen nach Transplantation in das Nervensystem embryonaler Ratten. Sie fanden hier eine überwiegende Differenzierung der Stammzellen in gliale Zellen des astrozytären Typs (Winkler et al. 1998), während in der vorliegenden Arbeit auch oligodendrogliale und neuronale Zellen identifiziert wurden. Zu beachten ist hierbei jedoch der Einfluss der Kulturbedingungen, unter denen die transplantierten Zellen in vitro expandiert wurden, auf das Differenzierungsverhalten der Zellen in vivo. In Gegenwart des Wachstumsfaktors EGF lassen sich neurale Stammzellen effizient expandieren. Dabei entstehen durch die Proliferation der Zellen aus Einzelzellen sogenannte Neurosphären. Durch symmetrische Zellteilungen nimmt hierbei die Anzahl enthaltener multipotenter Stammzellen zu. Asymmetrische Zellteilungen bzw. Reifungsteilungen führen zur Entstehung reiferer Vorläufer verschiedener Zelllinien. Schließlich bestehen die so generierten Zellkulturen aus einer heterogenen Mischung von wenigen multipotenten Stammzellen und neuralen Vorläuferzellen (Reynolds and Weiss 1996). In vitro differenzieren diese Zellen ebenfalls überwiegend in gliale Zelltypen, darunter v.a. Astrozyten. Möglicherweise war also in dieser Studie ein Teil der Zellkultur zum Zeitpunkt der Transplantation in embryonales Empfängergewebe bereits zur glialen Differenzierung determiniert (Winkler et al. 1998). Werden Neurosphären dagegen wie in der vorliegenden Arbeit in Gegenwart von EGF und FGF-2 bzw. FGF-2 und Heparin kultiviert, zeigen sie in vitro eine ausgeprägtere neuronale Differenzierung als Kulturen, die mit EGF expandiert wurden (Kilpatrick and Bartlett 1993; Whittemore et al. 1999). Interessanterweise differenzieren EGF/FGF-2 expandierte neurale Stammzellen nach Transplantation in verschiedene Tiermodelle degenerativer Myelinerkrankungen vorwiegend in gliale Zellen des oligodendroglialen Phänotyps. Diese Zellen sind fähig, ultrastrukturell intakte Myelinscheiden um unmyelinisierte Axone des Empfängergewebes zu bilden. Eine neuronale Differenzierung der Spenderzellen in postnatalen oder adulten Empfängergeweben wurde dabei nicht beobachtet (Ader et al.

2001; Ader et al. 2004). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass ein großer Anteil der in die embryonalen Empfängergehirne integrierten Stammzellen in oligodendrogliale Zellen differenziert war. In immunhistochemischen Färbungen wurden die aus den Spenderzellen entstandenen Oligodendrozyten über ihre Koexpression von EGFP und MBP identifiziert (siehe Ergebnisse 3.2.2.1, Abbildung 13). MBP ist eines der Hauptproteine des Myelins im zentralen Nervensystem und findet sich nach Beginn der Myelinisierung im Zytoplasma der Zellkörper und Fortsätze der myelinisierenden Oligodendrozyten (Pfeiffer et al. 1993). Entsprechend war es möglich, über MBP-Immunfärbungen die Morphologie dieser Zellpopulation detailliert darzustellen. Die murinen Oligodendrozyten wiesen in den Hühnchengehirnen die charakteristische Morphologie dieses Gliazelltyps mit langen und parallel verlaufenden Zellfortsätzen auf. Da der eingesetzte anti-MBP Antikörper sowohl mit dem murinen als auch mit dem endogenen MBP reagierte, konnten die transplantierten murinen und endogenen Oligodendrozyten unmittelbar miteinander verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die murinen Oligodendrozyten präferentiell in der weißen Substanz des Empfängergewebes nachweisbar waren. Die Fortsätze der aus Spenderzellen entstandenen Oligodendrozyten verliefen ähnlich wie die Fortsätze der endogenen Oligodendrozyten über lange Strecken parallel zu den Axonen des Empfängergewebes, ein Indiz, dass die murinen Gliazellen in der Lage waren, die Axone der Hühnchenembryonen zu myelinisieren. Die transplantierten Stammzellen waren also embryonalen Empfängergewebe in scheinbar funktionell intakte differenzieren. zu In Regionen des die kein endogenes Myelin enthielten. keine waren

fähig, im myelinisierende Oligodendrozyten Empfängergewebes, oligodendroglial differenzierten Spenderzellen nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass lokale Umgebungsfaktoren des Gewebes, möglicherweise der Axone, signifikanten Einfluss auf die Differenzierung multipotenter Stammzellen ausüben. Ähnlich wie bei der astrozytären Differenzierung konnte die oligodendrogliale Differenzierung der murinen Stammzellen über in situ Hybridisierungen mit verschiedenen cRNA Proben gegen Transkripte bestätigt werden, die spezifisch in Oligodendrozyten oder Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert werden. Neben cRNA Proben zur Detektierung von MBP-Transkripten wurden auch PLP-spezifische cRNA Proben zur Identifikation reifer muriner Oligodendrozyten verwandt (siehe Ergebnisse 3.2.2.2, Abbildung 16). PLP macht einen wesentlichen Anteil des Proteins im Myelin des zentralen Nervensystems aus und dient als integrales Membranprotein

der Stabilisierung der Membran (Popot et al. 1991; Peyron et al. 1997). Während MBP und PLP Marker für terminal differenzierte Oligodendrozyten sind, wurden unreife Oligodendrozytenvorläuferzellen mit PDGFRa-spezifischen cRNA Proben detektiert (siehe Ergebnisse 3.2.2.2, Abbildung 16). Der Wachstumsfaktor PDGF spielt bei der Entwicklung der Oligodendrozyten eine bedeutende Rolle und der  $\alpha$ -Rezeptor auf ihrer Oberfläche dient als hoch spezifischer Marker für die Vorläuferstufen dieses Gliazelltyps (Hall et al. 1996). Der Nachweis von murinen Oligodendrozyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigt, dass die transplantierten Stammzellen fähig sind, im Empfängergewebe zu proliferieren und zu migrieren. Die Tatsache, dass eine oligodendrozytäre Differenzierung der transplantierten neuralen Stammzellen präferentiell in der weissen Substanz der Empfängergehirne zu beobachten war, zeigt darüber hinaus, dass die Spenderzellen "adäquat" auf Faktoren des Empfängergewebes reagieren und entsprechend differenzieren. Insgesamt scheinen zelluläre oder molekulare Signale der im embryonalen Nervengewebe stattfindenden Gliogenese auch das Differenzierungsverhalten der transplantierten neuralen Stammzellen zu beeinflussen.

Neben der Identifikation von Spenderzellen mit einer glialen Differenzierung konnten in der vorliegenden Arbeit auch Spenderzellen mit einer neuronalen Differenzierung nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Färbungen konnten die aus den Spenderzellen entstandenen Nervenzellen über ihre Expression von ß-Tubulin Typ III identifiziert werden. ß-Tubulin Typ III wird im Nervensystem höherer Vertebraten ausschließlich von Neuronen exprimiert (Lee et al. 1990) und entsprechend als spezifischer Marker für diesen Zelltyp angesehen. Über die Kolokalisation der ß-Tubulin Typ III- und EGFP-Expression konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass diese Nervenzellpopulation aus transplantierten Stammzellen entstanden war. Die murinen Neurone hatten einen kleinen rundlichen Zellkörper, und einige schienen über feine, verzweigte Fortsätze miteinander in Verbindung zu stehen. Sie waren ausschließlich in der Peripherie des Hirnparenchyms lokalisiert. Die vorliegenden Daten zeigen damit, dass die unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF bzw. FGF und Heparin kultivierten neuralen Stammzellen im embryonalen Nervensystem nicht nur glial, sondern auch neuronal differenzieren können. Unter diesen Kulturbedingungen expandierte neurale Stammzellen differenzierten auch in vitro in gliale und neuronale Zelltypen (siehe auch Ergebnisse 3.1.2, Abbildung 4). Da identisch kultivierte neurale Stammzellen nach Transplantation in adultes Nervengewebe

ausschließlich in Gliazellen differenzierten (Pressmar et al. 2001; Ader et al. 2004) ist zu vermuten, dass epigenetische Faktoren in den embryonalen Gehirnen der Hühnchenembryonen eine neuronale Differenzierung begünstigen oder zumindest nicht inhibieren. In analoger Weise konnten andere Studien zeigen, dass embryonale neurale Stammzellen und Vorläuferzellen ohne vorherige Kultivierung in vitro nach Retransplantation in embryonales Nervengewebe fähig sind, in dieses zu integrieren und in vivo neurale Zellen glialen und neuronalen Phänotyps zu bilden (Brustle et al. 1995: Fishell 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren nun, dass auch in vitro unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 expandierte neurale Stammzellen über diese Fähigkeit verfügen. Möglicherweise stimulieren epigenetische Faktoren des embryonalen noch neurogenen Empfängergewebes die in den transplantierten Neurosphären-Kulturen enthaltenen multipotenten Stammzellen zur neuronalen Differenzierung. Auch nach Transplantation von so expandierten Neurosphären-Kulturen in neonatale Empfängertiere konnte bereits eine neuronale Differenzierung der Zellen beobachtet werden. Die Mehrzahl der Zellen zeigte hier zwar eine astrozytäre Differenzierung, ein kleiner Anteil exprimierte jedoch Neuronenspezifische Proteine (Eriksson et al. 2003). Schließlich wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit nach einer Transplantation neuraler Stammzellen in die sehr unreife Netzhaut des jungen Opossums eine ausgeprägte neuronale Differenzierung der Spenderzellen beschrieben (Van Hoffelen et al. 2003).

## 4.5 Einflussfaktoren auf die Differenzierung transplantierter Stammzellen

Das Integrations- und Differenzierungsverhalten transplantierter neuraler Stammzellen wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst: Intrinsische Eigenschaften der Zellen nehmen wie zelluläre und molekulare Eigenschaften ebenso des Empfängergewebes Einfluss auf das Schicksal der Zellen; aber auch die spezifischen Methoden der vorhergehenden Kultivierung und Expansion der Zellen in vitro beeinflussen das Verhalten transplantierter Stammzellen im Empfängergewebe. Neurale Stammzellen aus verschiedenen Regionen des Nervensystems lassen sich in vitro expandieren und gezielt in verschiedene reife Zelltypen des Nervensystems differenzieren. Definierte Wachstumsfaktoren stimulieren dabei die Proliferation der multipotenten Zellen und beeinflussen wesentlich ihre Differenzierung in reife gliale bzw. neuronale Zelltypen. Werden *in vitro* expandierte Stammzellen zur Analyse ihres Differenzierungspotentials in vivo in das Nervensystem eines Empfängertieres transplantiert, kann auch hier ein Einfluss der in vitro verwendeten Mitogene auf die Zelldifferenzierung festgestellt werden. So differenzieren EGF-expandierte Neurosphärenkulturen Transplantation embryonales nach in Nervensystem ausschließlich in gliale Zelltypen (Winkler et al. 1998), während Neurosphärenkulturen, die in Gegenwart von EGF und FGF-2 expandiert wurden, in vivo auch in reife Zellen mit einem neuronalem Phänotyp differenzieren (Brustle et al. 1995). Werden Stammzellkulturen vor Transplantationsstudien *in vitro* expandiert, führt dies dazu, dass die Zellkulturen zum Zeitpunkt der Transplantation aus einer heterogenen Mischung unterschiedlicher Reifestadien bestehen. Die von Zellen Expansion reiner Stammzellkulturen (ohne kontaminierende determinierte Vorläuferzellen oder ausdifferenzierte Zelltypen) erwies sich mit Ausnahme der embryonalen Stammzellen als sehr problematisch. Die Expansion gewebespezifischer Stammzellen in vitro war bisher in allen Fällen mit einer gleichzeitig stattfindenden Reifung und Differenzierung eines großen Anteils der kultivierten Zellen verbunden. Entsprechend bestehen als Neurosphären kultivierte neurale Stammzellenkulturen sowohl aus multipotenten Stammzellen, als auch aus reiferen glialen und neuronalen Vorläuferzellen (Reynolds and Weiss 1996). Welche Zellpopulationen in diesen Kulturen nach Transplantationsexperimenten tatsächlich in die Empfängergewebe integrieren und dort überleben und schließlich differenzieren, kann aufgrund der Komplexität solcher Experimente nicht eindeutig geklärt werden. So sind die in den Neurosphären enthaltenen Stammzellen beispielsweise nicht über spezifische Marker direkt identifizierbar. Aus Spenderzellen entstandene neuronale und gliale Zelllinien stammen also möglicherweise von multipotenten neuralen Stammzellen ab, möglicherweise aber auch von reiferen bereits determinierten Vorläuferzellen verschiedener neuraler Zelllinien. Conti et al. gelang es erstmals, auch außerhalb der komplexen zellulären Umgebung der Neurosphären neurale Stammzellen effizient in vitro zu expandieren. Allein Kultivierungsbedingungen Anwesenheit durch adhärente in der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 konnten aus neuralen Stammzellen, die entweder von embryonalen Stammzellen oder Neurosphärenkulturen abgeleitet waren, reine neurale Stammzellkulturen mit sich kontinuierlich symmetrisch teilenden Zellen etabliert werden. Die so generierten neuralen Stammzellen ähnelten morphologisch und molekular radialen Gliazellen, aus denen während der Neuro- und Gliogenese des ZNS Neurone und Gliazellen entstehen. Entsprechend waren sie fähig sowohl in vitro als auch nach Transplantation in vivo effizient in Neurone und Astrozyten zu differenzieren (Conti et al. 2005). Solche homogenen und reinen Stammzellkulturen ermöglichen erstmalig die biochemische und molekulare Charakterisierung von gewebespezifischen Stammzellen. Auch Transplantationsstudien zur Analyse des Integrations- und Differenzierungspotentials neuraler Stammzellen wären bei der Verwendung von reinen Stammzellkulturen unter definierteren Bedingungen durchführbar. Nicht nur die Kultivierungsbedingungen während der Expansion oder die Kultivierung der neuralen Stammzellen als freischwimmende Neurosphären oder adhärent wachsende Einzelzellen beeinflusst das Integrationsund Differenzierungsverhalten der Zellen im Empfängergewebe, sondern auch die Aufbereitung der Zellkulturen für die Transplantation: Clarke et al. transplantierten als Neurosphären kultivierte adulte embryonale Stammzellen in embryonale Mäuse und Hühnchen. Nach Transplantation ganzer Neurosphären integrierten wesentlich mehr Zellen in das embryonale Empfängergewebe als nach Transplantation von dissoziierten Einzelzellsuspensionen (Clarke et al. 2000).

Neben diesen methodischen Aspekten der Kultivierung stellen auch intrinsische Eigenschaften der neuralen Stammzellen mögliche einflußnehmende Faktoren für die Differenzierung transplantierter Stammzellen dar. Vermutlich verfügen Stammzellen aus Spenderorganismen unterschiedlicher Entwicklungsstadien über unterschiedliche intrinsische Eigenschaften. So verändert sich z.B. die Anzahl bestimmter Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf der Oberfläche der Stammzellen während ihrer Reifung und Differenzierung (Temple 2001a). Entsprechend kann auch *in vitro* eine

Veränderung der Ansprechbarkeit der Stammzellen für bestimmte Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Spendergewebes festgestellt werden. In vivo wird die Neurogenese durch intrinsische Eigenschaften der Zellen in Zusammenspiel mit lokalen Umgebungsbedingungen des Gewebes bestimmt. Ähnliches lässt sich auch bei kultivierten Zellen in vitro beobachten. Aus embryonalen neuralen Vorläuferzellen lassen sich in vitro multiple reife Neurone verschiedenen Phänotyps generieren. Während ihrer Reifung weisen diese Vorläuferzellen eine unterschiedliche Reaktivität auf bestimmte Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren auf (Kalyani et al. 1998). Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch die Differenzierung transplantierter Stammzellen in vivo teilweise von intrinsischen Eigenschaften der Zellen entsprechend des Entwicklungsstadiums ihres Spenderorganismus bestimmt werden. Verschiedene Transplantationsstudien untersuchten eine mögliche regionale Determinierung von aus unterschiedlichen Hirnregionen isolierten neuralen Stammzellen und erzielten zum Teil unterschiedliche Resultate (Campbell et al. 1995; Fishell 1995; Eriksson et al. 2003). Die Ergebnisse der meisten Studien sprechen jedoch dafür, dass zelluläre und molekulare Eigenschaften Empfängergewebes des das Integrationsund Differenzierungsverhalten von transplantierten neuralen Stammzellen wesentlich stärker beeinflussen, als die charakteristischen Eigenschaften des jeweiligen Spendergewebes (Cao et al. 2002). Trotz der beachtlichen endogenen Plastizität, die neurale Stammzellen aufweisen, wird ihre Differenzierung nach Transplantation im Wesentlichen durch lokale Signale ihrer unmittelbaren Umgebung bestimmt. Sowohl embryonale als auch adulte neurale Stammzellen differenzieren überwiegend oder ausschließlich in Gliazellen, wenn sie in nicht-neurogene Regionen des adulten ZNS transplantiert werden (Chow et al. 2000; Shihabuddin et al. 2000). Weiterhin weisen neurale Stammzellen in pathologisch veränderten Empfängergeweben ein wesentlich höheres Integrationspotential auf als in gesunden Empfängergeweben. Interessanterweise weisen hier die transplantierten Stammzellen in ihrem Integrationsverhalten zumeist eine Präferenz für die erkrankten Bereiche des Empfängergewebes auf (Ader et al. 2001; Pressmar et al. 2001; Ader et al. 2004). Dabei ist noch nicht genau bekannt, welche veränderten zellulären oder molekularen Eigenschaften des pathologischen Gewebes die Integration und Differenzierung der Stammzellen stimulieren. Ricci-Vitiani et al. untersuchten den Einfluss lokaler Umgebungsfaktoren des pathologisch veränderten Empfängergewebes auf die Differenzierung transplantierter neuraler Stammzellen. Sie stellten fest, dass im verletzten Rückenmark im Gegensatz zum intakten RückenmarksGewebe die inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) exprimiert werden. *In vitro* werden neurale Stammzellen durch eine Kombination dieser Zytokine zu einer astrozytären Differenzierung stimuliert. Auch *in vivo* nach Transplantation in das verletzte Rückenmark differenzieren die Stammzellen ausschließlich in Astrozyten (Ricci-Vitiani et al. 2006). Die im verletzten Gewebe exprimierten inflammatorischen Zytokine lenken also möglicherweise die Differenzierung der transplantierten Stammzellen in Astrozyten und gehören damit zu den Faktoren im Empfängergewebe, die unter *in vivo* Bedingungen Einfluss auf die Zelldifferenzierung nehmen.

Anders als in pathologisch veränderten Empfängergeweben ist in gesunden adulten Empfängergeweben nur eine limitierte Integrationsfähigkeit transplantierter neuraler Stammzellen festzustellen. Anzunehmen ist, dass im reifen und intakten Gewebe keine Umgebungsfaktoren vorhanden sind, die eine Integration der Spenderzellen stimulieren. Im adulten Gewebe ist die Neurogenese außerhalb des Hippokampus und der Subventrikularzone, in der sie lebenslang persistiert, abgeschlossen. Dagegen sind im neurogenen embryonalen Empfängergewebe epigenetische Faktoren vorhanden, die endogene Stammzellpopulationen des Gewebes zur Neuro- und Gliogenese stimulieren. Nach Transplantation neuraler Stammzellen in embryonales Empfängergewebe wirken diese auch als Stimuli, die eine Integration der transplantierten Zellen fördern. Verschiedene Transplantationsstudien demonstrierten bereits diese Zusammenhänge (Winkler et al. 1998). Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass in vitro in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 expandierte Stammzellen effizient in das Gehirn embryonaler Empfängertiere integrieren und sowohl in gliale als auch Zelltypen differenzieren. Möglicherweise stimulieren dabei neuronale also epigenetische Faktoren des embryonalen noch neurogenen Empfängergewebes die in den transplantierten Neurosphären-Kulturen enthaltenen multipotenten Stammzellen zur neuronalen Differenzierung.

Durch pharmakologische und genetische Manipulation der Stammzellen vor der Transplantation kann die Differenzierung der Zellen in bestimmte Zelltypen gezielt gelenkt werden. Einige Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF), Neurotrophin-3 und Retinsäure induzieren *in vitro* eine überwiegende neuronale Differenzierung. Für solche Wachstumsfaktoren kodierende Gene können beispielsweise über Retroviren in das Genom der Stammzellen eingeschleust werden (Park et al. 2006). Nach erfolgter Transplantation dieser manipulierten Zellen wird *in*  *vivo* über die verstärke Expression dieser Wachstumsfaktoren die Differenzierung der Zellen in den gewünschten Zelltyp gelenkt. Genetisch manipulierte neurale Stammzellen können auch dazu genutzt werden, bestimmte fehlende oder therapeutisch wirksame Genprodukte wie Wachstumsfaktoren oder anti-angiogene Faktoren in pathologisch veränderte Empfängergewebe einzuschleusen. Neurale Stammzellen sind damit nicht nur für den Aufbau von Zellersatztherapien sondern auch für den Aufbau von *ex vivo* Gentherapien interessante Kandidatenzellen.

#### 4.6 Therapeutische Anwendbarkeit von Stammzellen

Die Eigenschaften, die Stammzellen *in vitro* und *in vivo* aufweisen, demonstrieren ihr großes Potential zur klinisch-therapeutischen Anwendung. Transplantationsstudien, die die Möglichkeit bieten, Stammzellen *in vivo* zu untersuchen, zeigten bereits, dass verschiedenste pathologische Veränderungen des adulten Empfängergewebes zu einer ausgeprägteren Integration der neuralen Stammzellen führen. Dies ermöglicht die Analyse einer möglichen therapeutischen Nutzbarkeit der Stammzellen über Transplantationsexperimente an genetisch oder akut induzierten Tiermodellen für humane Erkrankungen.

pluripotente Zellen vielfältige Gerade embryonale Stammzellen bieten als Ansatzmöglichkeiten für den Aufbau Stammzell-basierter Therapien zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen. Die Generierung spezifischer glialer oder neuraler Zelltypen aus embryonalen Stammzellen über epigenetische oder genetische Differenzierungsprotokolle ist bereits gelungen. So wurden beispielsweise aus embryonalen Stammzellen Oligodendrozytenvorläuferzellen abgeleitet, die nach Transplantation in ein Tiermodell für eine humane Myelinerkrankung in Oligodendrozyten differenzierten, die wiederum die Axone des Empfängergewebes effizient myelinisierten (Brustle et al. 1999). Die klinische Anwendbarkeit embryonaler Stammzellen zur Therapie von Dysmyelinisierungen oder Demyelinisierungen ist jedoch in hohem Maße von der Möglichkeit abhängig, gliale Vorläuferzellen in hoher Reinheit und hoher Anzahl generieren zu können. Entsprechend entwickelten Glaser et al im Jahr 2005 ein Differenzierungsprotokoll zur Herstellung nahezu reiner Oligodendozytenvorläufer-Kulturen aus murinen embryonalen Stammzellen. Die selektionierten glialen Vorläufer differenzierten nach Entzug der Wachstumsfaktoren in reife Oligodendrozyten. Nach Transplantation in Myelin-defiziente (md) Ratten bildeten diese Zellen intaktes Myelin im Empfängergewebe (Glaser et al. 2005). Da aus

embryonalen Stammzellen bereits auch erfolgreich ganz spezifische Nervenzelltypen abgeleitet werden konnten, weisen diese Stammzellen auch für neurodegenerative Erkrankungen ein hohes therapeutisches Potential auf. So konnten aus murinen embryonalen Stammzellen dopaminerge abgeleitet die Neurone werden. elektrophysiologische Eigenschaften funktionsfähiger Nervenzellen aufwiesen. Transplantationsversuche am Tiermodell für Morbus Parkinson zeigten, dass es sich hierbei um funktionsfähige dopaminerge Neurone handelt (Kim et al. 2002).

Gewebespezifische Stammzellen verfügen als multipotente Zellen definitionsgemäß über geringeres Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen. ein Experimentelle Studien an Tiermodellen verschiedener humaner Erkrankungen haben v.a. Knochenmarks-Stammzellen ein aber gezeigt, dass unerwartet hohes Differenzierungspotential aufweisen, und in Zelltypen anderer Gewebe oder sogar Keimblätter differenzieren können (Kopen et al. 1999). Sie bieten damit potentiell die Möglichkeit zur vielfältigen therapeutischen Nutzbarkeit. So zeigen die Ergebnisse einer Studie, dass Knochenmarks-Stammzellen nach Transplantation in Empfängertiere mit einem fokal geschädigtem ZNS in die lädierten Regionen migrieren und dort in neurale Zellentypen, Astrozyten und Nervenzellen, differenzieren (Lee et al. 2003). Auch nach intraventrikulärer Transplantation in neugeborene Mäuse zeigten mesenchymale Stammzellen scheinbar die Fähigkeit, in neurale Zelltypen zu differenzieren. Diese in vitro und in vivo erzielten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks möglicherweise eine zur neuralen Differenzierung aufweisen Prädisposition und bei Exposition entsprechender Umgebungsfaktoren im sich entwickelnden Gehirn in eine Reihe von neuralen Zelltypen differenzieren (Deng et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit humanen mesenchymalen Stammzellen erzielt werden. So konnte die eindeutige Expression von 12 neuralen Proteinen, von denen 8 zum neuro-dopaminergen System zählen, und die Expression von 11 neuralen Transkriptionsfaktoren in adulten humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Blondheim et al. 2006). Einige Studien deuten an, dass mesenchymale Stammzellen auch für den Aufbau zellbasierter Therapien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen des Auges interessante Kandidatenzellen sein könnten. So wurden beispielsweise zur Untersuchung des Differenzierungspotentials von Knochenmarks-Stammzellen in retinale Nervenzelltypen Transplantationen in pathologisch veränderte Netzhäute vorgenommen. Nach Transplantation von Knochenmarks-Stammzellen in die mechanisch lädierte Retina

adulter Ratten wurden vor allem in der äußeren nukleären Retinaschicht Spenderzellen identifiziert. Diese exprimierten Proteine, die für gliale Zellen, retinale Interneurone und Photorezeptoren charakteristisch sind (Tomita et al. 2002). Im Jahr 2006 publizierten Tomita et al. eine Studie, in der das neuronale Differenzierungspotential und das Integrationspotential von Knochenmarks-Stammzellen und retinalen Vorläuferzellen in Ko-Kulturen mit dystrophen Netzhäuten verglichen wurde. Sowohl die mesenchymalen Stammzellen als auch die retinalen Vorläuferzellen wurden dazu in Gegenwart bestimmter Wachstumsfaktoren kultiviert, um eine neuronale Differenzierung zu induzieren, und dann mit Explantaten von dystrophen Netzhäuten aus Rhodopsindefizienten Mäusen ko-kultiviert. Beide Zelltypen migrierten in die Netzhautexplantate. Ausserdem exprimierten die Knochenmarks-Stammzellen in dieser Versuchsanordnung und retinale Proteine, während Rhodopsin, ein für Photorezeptoren neuronale spezifisches Protein, nur von den retinalen Vorläuferzellen exprimiert wurde. (Tomita et al. 2006). Diese und ähnliche Resultate deuten die interessante Möglichkeit an, dass mesenchymale Stammzellen möglicherweise für den Aufbau zellbasierter Therapieansätze zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen nutzbar sind. Da Stammzellen aus dem Knochenmark anders als beispielsweise neurale Stammzellen vergleichsweise einfach aus betroffenen Patienten isoliert werden könnten, wären diese Zellen für autologe Transplantationen verfügbar. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Knochenmark-Stammzellen möglicherweise nur "scheinbar" in neurale Zelltypen differenzieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen in Purkinjezellen des Kleinhirns zunächst fälschlicherweise als "Transdifferenzierung" interpretiert wurde, in Realität aber ein Fusionsereignis zwischen Knochenmark-Stammzellen und endogenen Purkinjezellen darstellt. Ausserdem ist bekannt, das aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen in vitro bereits ohne den Einfluss spezifischer Differenzierungsfaktoren verschiedene Proteine exprimieren, die allgemein als spezifische Marker für neurale Zelltypen angesehen wurden (Wislet-Gendebien et al. 2003; Blondheim et al. 2006). Weitere Untersuchungen müssen daher zeigen, ob Knochenmark-Stammzellen tatsächlich das Potential aufweisen, in spezifische und funktionale neurale Zelltypen zu differenzieren.

Gerade für Stammzell-basierte Therapien neurodegenerativer Erkrankungen sind neurale Stammzellen als gewebespezifische Stammzellen des ZNS mit dem Potential in alle drei prinzipiellen Zelltypen des zentralen Nervensystems zu differenzieren, von besonderer Bedeutung. Auch ihr therapeutisches Potential wird intensiv durch Transplantationsexperimente an Tiermodellen für humane neurologische Erkrankungen untersucht. So wurde beispielsweise das Verhalten von in vitro expandierten embryonalen neuralen Stammzellen nach Transplantation in das durch Ischämie geschädigte Gehirn neugeborener Mäuse untersucht (Park et al. 2006). Hierbei zeigte sich eine intensive Migration der Spenderzellen in die ischämischen Gebiete der geschädigten Hemisphäre. Einige Spenderzellen differenzierten nach der Transplantation in diesen Bereichen in Neurone und Oligodendrozyten, also in die durch zerebrale Ischämien typischerweise geschädigten Zelltypen. Transplantierte neurale Stammzellen in intakten Bereichen des Empfängergewebes zeigten dagegen keine Differenzierung in neuronale oder oligodendrogliale Zelltypen. Durch genetische Manipulation der Stammzellen vor der Transplantation konnte die Differenzierung der Zellen in neuronale Zelltypen weiter erhöht werden. Dazu wurde über einen Retrovirus ein für Neurotrophin 3 kodierendes Gen in das Genom der Zellen eingeschleust. In vitro wird durch die Exposition neuraler Stammzellen mit Neutrotrophin 3 eine überwiegende Differenzierung der Zellen in Neurone erreicht. Nach Transplantation dieser Zellen in das ischämisch geschädigte Gehirn konnte eine effiziente Expression von Neurotrophin 3 durch die manipulierten Stammzellen festgestellt werden, was eine wesentliche Zunahme der Differenzierung in neuronale Zelltypen zur Folge hatte (Park et al. 2006).

Naturgemäß sind humane neurale Stammzellen im Kontext zellbasierter Therapieansätze von besonders hohem Interesse. Nach Transplantation humaner fetaler Stammzellen in das Gehirn neonataler Mäuse waren die humanen Zellen an der normalen Entwicklung des Empfängergewebes beteiligt: Sie migrierten in verschiedene Teile des zentralen Nervensystems und differenzierten in unterschiedliche Zelltypen, die für die jeweilige Hirnregion und das jeweilige Entwicklungsstadium der Empfängertiere typisch waren (Brustle et al. 1998; Flax et al. 1998). Die Integration und Differenzierung der transplantierten Zellen scheint auch hier eher durch lokale Umgebungsfaktoren des Empfängergewebes als durch intrinsische Eigenschaften der Stammzellen beeinflusst zu werden. Die Generierung von Chimären aus humanen und tierischen Zellen ermöglicht die detaillierte Untersuchung der Eigenschaften humaner neuraler Stammzellen und ihrer möglichen klinischen Anwendbarkeit zur Behandlung von Erkrankungen des humanen Nervensystems. So konnte gezeigt werden, dass humane neurale Stammzellen nach Transplantation in Ratten mit traumatischen

Hirnläsionen fähig waren, in die Empfängergehirne zu integrieren und in Nervenzellen zu differenzieren. Darüber hinaus exprimierten sie einen neurotrophen Faktor, der möglicherweise das Empfängergewebe vor weiterem sekundärem Zellverlust schützen und das geschädigte Gewebe zur Regeneration stimulieren kann. Zusätzlich konnte nach Transplantation der humanen Stammzellen eine deutliche Verbesserung der kognitiven Funktion der Tiere festgestellt werden (Gao et al. 2006). Solche neuroprotektiven Wirkungen von transplantierten humanen neuralen Stammzellen konnten auch an einem Tiermodell für Morbus Parkinson beobachtet werden. Die Transplantation humaner neuraler Stammzellen hatte hier, neben einer Differenzierung der Spenderzellen in reife Neurone, eine signifikante Verbesserung der krankheitsbedingten Verhaltenssymptomatik und eine Aktivierung der endogenen Neurogenese zur Folge (Yasuhara et al. 2006). Diese Ergebnisse zeigen am Tiermodell verschiedener Erkrankungen des zentralen Nervensystems die möglichen neuroprotektiven Effekte einer Transplantation humaner neuraler Stammzellen.

Die Mechanismen, die im Säugergehirn die Differenzierung endogener Stammzellen in bestimmte reife neurale Zelltypen lenken, sind noch weitestgehend unbekannt. Weitere Experimente zur Charakterisierung von neuralen Stammzellen *in vitro* und *in vivo* können hier zu neuen Erkenntnissen führen. Diese scheinen notwendig, um das Integrations- und Differenzierungsverhalten neuraler Stammzellen so weit kontrollieren und optimieren zu können, dass ihr Einsatz zur Therapie spezifischer degenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems möglich wird. Eine effektive therapeutische Anwendung neuraler Stammzellen wird nur möglich sein, wenn die transplantierten Zellen nicht nur im Empfängergewebe überleben, sondern auch gezielt in die geschädigten Hirnregionen einwandern und dort in die defekten Zelltypen des Gewebes differenzieren bzw. endogene Stammzellen zur entsprechenden Differenzierung stimulieren. Wenn diese Ziele erreicht sind, muss gezeigt werden, dass sich die transplantierten Stammzellen auch funktionell in pathologisch veränderte Hirnregionen integrieren und therapeutisch relevante Verbesserungen der Krankheitssymptome bewirken.

#### 5. Zusammenfassung

Adulte Säuger verfügen über eine nur stark limitierte Regenerationsfähigkeit des zentralen Nervensystems. Die Therapiemöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen sind daher limitiert, so dass Zellersatztherapien mit dem Einsatz von Stammzellen, die über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz verfügen, einen viel versprechenden Behandlungsansatz darstellen. Neurale Stammzellen verfügen als gewebespezifische Stammzellen über das Potential, in die verschiedenen neuralen Zelltypen zu differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden neurale Stammzellen aus dem zentralen Nervensystem EGFP-transgener Mausembryonen in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 als frei schwimmende, sogenannte Neurosphären kultiviert. Die unter diesen Bedingungen expandierten neuralen Stammzellen ließen sich in vitro sowohl in neuronale als auch in gliale Zelltypen differenzieren, die mittels immunzytochemischer Untersuchungen mit Zelltyp-spezifischen Antikörpern identifiziert wurden. Die Mehrzahl der neuralen Stammzellen differenzierte in GFAPpositive Astrozyten. Ein Anteil differenzierte in reife Oligodendrozyten, die über ihre MAG- und MBP-Expression identifiziert wurden. Schließlich konnten in den differenzierten Stammzell-Zellkulturen auch ein Teil der Zellen als ß-Tubulin Typ IIIpositive Nervenzellen identifiziert werden. Anhand von Transplantationsexperimenten mit Hühnchenembryonen wurde das Integrations- und Differenzierungspotential der in murinen neuralen Stammzellen vivo untersucht. Dazu wurde eine Transplantationsmethode etabliert, die eine Transplantation von Zellen in das zentrale Nervensystem von Hühnchenembryonen in ovo erlaubt. In den Transplantationsexperimenten wurden die in vitro expandierten neuralen Stammzellen in die Hirnbläschen von 5 bis 7 Tage alten Hühnchenembryonen transplantiert und nach einer Überlebenszeit von 7 bis 14 Tagen mittels Immunhistochemie und in situ Hybridisierung auf ihr Integrationspotential und Differenzierungsverhalten in den 48 Hühnchengehirnen untersucht. Insgesamt konnten die Gehirne von Hühnchenembryonen nach erfolgter intrazerebroventrikulärer in ovo Transplantation einer detaillierten Analyse zugeführt werden. Dabei wurden bei insgesamt 16 Hühnchenembryonen in die Empfängergehirne integrierte murine neurale Stammzellen gefunden. Die Spenderzellen wurden dabei in den Gewebeschnitten der Empfängergehirne aufgrund ihrer Expression des Reportergens EGFP identifiziert und von endogenen Zelltypen unterschieden. Insgesamt zeigte die Analyse des Integrationsverhaltens der transplantierten Zellen, dass die murinen neuralen

Stammzellen nach intraventrikulärer Transplantation über das Ependym in das Hirnparenchym der Empfängertiere einwanderten, ohne dabei die Entwicklung des embryonalen Nervengewebes sichtbar zu beeinträchtigen. Im Hirnparenchym der Empfängertiere wanderten die transplantierten Zellen teilweise über beachtliche Strecken und differenzierten in morphologisch komplexe Zelltypen mit fein verzweigten Zellfortsätzen, die scheinbar in Kontakt zu den Blutgefäßen oder zu endogenen Zellen der Empfängergewebe standen. Bei diesen Untersuchungen war zwischen dem Ausmaß der Integration der Spenderzellen und dem Alter der Versuchstiere beim Zeitpunkt der Transplantation bzw. der Überlebensdauer der Hühnchenembryonen nach der Transplantation kein deutlicher Zusammenhang zu erkennen. Die Analyse des Differenzierungspotentials der Spenderzellen in vivo erfolgte mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen mit EGFP- und Zelltyp-spezifischen Antikörpern sowie mittels in situ Hybridisierungen mit Spezies-spezifischen Riboproben zum Nachweis Zelltyp-spezifischer Transkripte. In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die murinen neuralen Stammzellen in den Gehirnen der Hühnchenembryonen in sämtliche neurale Zelltypen des zentralen Nervensystems -Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen – differenziert waren. Über ihre Expression von GFAP konnten einige der murinen Spenderzellen als morphologisch und möglicherweise auch funktionell intakte Astrozyten identifiziert werden. Diese Astrozyten wiesen zahlreiche reich verästelte Fortsätze auf, von denen einige in engem Kontakt zu Blutgefäßen des Empfängergewebes standen. Ebenso fanden sich in den Hühnchengehirnen terminal differenzierte, MBP- und PLP-exprimierende murine Oligodendrozyten. Neben terminal differenzierten Oligodendrozyten wurden auch unreife Oligodendrozytenvorläuferzellen über ihre PDGFRα-Expression detektiert. Die Spender-Oligodendrozyten waren präferentiell in Regionen myelinisierter Fasertrakte nachweisbar, in denen auch endogene Oligodendrozyten lokalisiert waren. Einige dieser Spender-Oligodendrozyten waren offenbar auch in der Lage, mit den Axonen der Hühnchenembryonen zu interagieren und diese zu myelinisieren. Über ihre ß-Tubulin Typ III-Expression konnten schließlich einige, vorzugsweise in der grauen Substanz der Empfängergehirne liegende, Spenderzellen als Neurone identifiziert werden. Diese Spender-Nervenzellen wiesen fein verzweigte Fortsätze auf, die in das Hirnparenchym projizierten und über die die Spenderzellen mit anderen Zellen in Verbindung zu stehen schienen.
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass murine neurale Stammzellen nach intraventrikulärer Transplantation in das embryonale und noch neurogene Nervensystem von Hünchenembryonen durch das Ependym in das Parenchym der Empfängergehirne integrieren, ohne dabei die Histoarchitektur der Empfängergehirne nachweislich zu beeinträchtigen. Die transplantierten murinen neuralen Stammzellen differenzierten in morphologisch intakte neurale Zelltypen, die über ihr Antigenprofil als Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die hier aufgebaute in ovo Transplantationsmethode aufgrund des noch nicht entwickelten Immunsystems der die Hühnchenembryonen Möglichkeit bietet, das Integrationsund Differenzierungspotential von Stammzellpopulationen verschiedener Spezies effizient in vivo zu analysieren.

#### 6. Literaturverzeichnis

- Ader, M., J. Meng, et al. (2000). "Formation of myelin after transplantation of neural precursor cells into the retina of young postnatal mice." <u>Glia</u> **30**(3): 301-10.
- Ader, M., M. Schachner, et al. (2001). "Transplantation of neural precursor cells into the dysmyelinated CNS of mutant mice deficient in the myelin-associated glycoprotein and Fyn tyrosine kinase." <u>Eur J Neurosci</u> 14(3): 561-6.
- Ader, M., M. Schachner, et al. (2004). "Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into the dysmyelinated central nervous system of adult mice." <u>Eur J Neurosci</u> 20(5): 1205-10.
- Ahmad, I., C. M. Dooley, et al. (1999). "In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia." <u>Brain Res</u> 831(1-2): 1-10.
- Ahmad, I., L. Tang, et al. (2000). "Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 270(2): 517-21.
- Alexander, J. E., D. F. Hunt, et al. (1991). "Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 88(11): 4685-9.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." <u>Nature</u> 425(6961): 968-73.
- Angenieux, B., D. F. Schorderet, et al. (2006). "Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro." <u>Stem Cells</u> 24(3): 696-706.
- Arnhold, S., H. Klein, et al. (2004). "Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 45(12): 4251-5.
- Arnhold, S., D. Lenartz, et al. (2000). "Differentiation of green fluorescent proteinlabeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum." J Neurosurg 93(6): 1026-32.
- Baker, P. S. and G. C. Brown (2009). "Stem-cell therapy in retinal disease." <u>Curr Opin</u> <u>Ophthalmol</u> **20**(3): 175-81.
- Banin, E., A. Obolensky, et al. (2006). "Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells." <u>Stem Cells</u> 24(2): 246-57.

- Bansal, R., A. E. Warrington, et al. (1989). "Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development." <u>J Neurosci Res</u> 24(4): 548-57.
- Bartsch, S., U. Bartsch, et al. (1992). "Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex." <u>J Neurosci</u> 12(3): 736-49.
- Bartsch, U., F. Kirchhoff, et al. (1989). "Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice." <u>J Comp Neurol</u> 284(3): 451-62.
- Bartsch, U., W. Oriyakhel, et al. (2008). "Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice." <u>Exp Eye Res</u> 86(4): 691-700.
- Batista, C. M., T. E. Kippin, et al. (2006). "A progressive and cell non-autonomous increase in striatal neural stem cells in the Huntington's disease R6/2 mouse." J <u>Neurosci</u> 26(41): 10452-60.
- Ben-Hur, T., O. Einstein, et al. (2003). "Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis." <u>Glia</u> 41(1): 73-80.
- Ben-Hur, T. and S. A. Goldman (2008). "Prospects of cell therapy for disorders of myelin." <u>Ann N Y Acad Sci</u> 1142: 218-49.
- Bignami, A., L. F. Eng, et al. (1972). "Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence." <u>Brain Res</u> 43(2): 429-35.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, et al. (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." <u>Science</u> 283(5401): 534-7.
- Blondheim, N. R., Y. S. Levy, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition." <u>Stem Cells Dev</u> 15(2): 141-64.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, et al. (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." <u>Science</u> 290(5497): 1775-9.
- Brustle, O. (1999). "Building brains: neural chimeras in the study of nervous system development and repair." Brain Pathol **9**(3): 527-45.
- Brustle, O., K. Choudhary, et al. (1998). "Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats." <u>Nat Biotechnol</u> 16(11): 1040-4.
- Brustle, O., K. N. Jones, et al. (1999). "Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants." <u>Science</u> 285(5428): 754-6.

- Brustle, O., U. Maskos, et al. (1995). "Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain." <u>Neuron</u> **15**(6): 1275-85.
- Brustle, O., A. C. Spiro, et al. (1997). "In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94(26): 14809-14.
- Burns, C. J., S. J. Persaud, et al. (2006). "Diabetes mellitus: a potential target for stem cell therapy." <u>Curr Stem Cell Res Ther</u> 1(2): 255-66.
- Caldwell, M. A., X. He, et al. (2001). "Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres." <u>Nat Biotechnol</u> **19**(5): 475-9.
- Campagnoni, A. T., T. M. Pribyl, et al. (1993). "Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 268(7): 4930-8.
- Campbell, K., M. Olsson, et al. (1995). "Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle." <u>Neuron</u> 15(6): 1259-73.
- Canola, K., B. Angenieux, et al. (2007). "Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 48(1): 446-54.
- Cao, Q., R. L. Benton, et al. (2002). "Stem cell repair of central nervous system injury." <u>J Neurosci Res</u> 68(5): 501-10.
- Castro, R. F., K. A. Jackson, et al. (2002). "Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo." <u>Science</u> **297**(5585): 1299.
- Chacko, D. M., J. A. Rogers, et al. (2000). "Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> 268(3): 842-6.
- Chen, H. I., A. Bakshi, et al. (2007). "Neural stem cells as biological minipumps: a faster route to cell therapy for the CNS?" <u>Curr Stem Cell Res Ther</u> **2**(1): 13-22.
- Chow, S. Y., J. Moul, et al. (2000). "Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord." <u>Brain Res</u> 874(2): 87-106.
- Ciccolini, F. and C. N. Svendsen (1998). "Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2." J Neurosci 18(19): 7869-80.

- Clarke, D. L., C. B. Johansson, et al. (2000). "Generalized potential of adult neural stem cells." <u>Science</u> **288**(5471): 1660-3.
- Cogle, C. R., A. T. Yachnis, et al. (2004). "Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study." <u>Lancet</u> **363**(9419): 1432-7.
- Coles, B. L., B. Angenieux, et al. (2004). "Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(44): 15772-7.
- Conti, L., E. Cattaneo, et al. (2008). "Novel neural stem cell systems." <u>Expert Opin Biol</u> <u>Ther</u> **8**(2): 153-60.
- Conti, L., S. M. Pollard, et al. (2005). "Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell." <u>PLoS Biol</u> **3**(9): e283.
- de Ferra, F., H. Engh, et al. (1985). "Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein." <u>Cell</u> 43(3 Pt 2): 721-7.
- Deng, J., B. E. Petersen, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation." <u>Stem Cells</u> 24(4): 1054-64.
- Denham, M., T. Huynh, et al. (2006). "Neural stem cells express non-neural markers during embryoid body coculture." <u>Stem Cells</u> 24(4): 918-27.
- Desbaillets, I., U. Ziegler, et al. (2000). "Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis." <u>Exp Physiol</u> **85**(6): 645-51.
- Doe, C. Q., S. Fuerstenberg, et al. (1998). "Neural stem cells: from fly to vertebrates." J <u>Neurobiol</u> **36**(2): 111-27.
- Dorries, U., U. Bartsch, et al. (1993). "Adaptation of a non-radioactive in situ hybridization method to electron microscopy: detection of tenascin mRNAs in mouse cerebellum with digoxigenin-labelled probes and gold-labelled antibodies." <u>Histochemistry</u> **99**(3): 251-62.
- Durbec, P. and G. Rougon (2001). "Transplantation of mammalian olfactory progenitors into chick hosts reveals migration and differentiation potentials dependent on cell commitment." <u>Mol Cell Neurosci</u> 17(3): 561-76.
- Dwain, I., Y. Xiangpeng, et al. (2006). "Neural stem cells--a promising potential therapy for brain tumors." <u>Curr Stem Cell Res Ther</u> 1(1): 79-84.
- Einstein, O., D. Karussis, et al. (2003). "Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis." <u>Mol Cell Neurosci</u> 24(4): 1074-82.

- Emsley, J. G., B. D. Mitchell, et al. (2005). "Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells." <u>Prog Neurobiol</u> 75(5): 321-41.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, et al. (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirtyone years (1969-2000)." Neurochem Res 25(9-10): 1439-51.
- Eriksson, C., A. Bjorklund, et al. (2003). "Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions." <u>Exp Neurol</u> 184(2): 615-35.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrowderived myogenic progenitors." <u>Science</u> 279(5356): 1528-30.
- Fishell, G. (1995). "Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues." <u>Development</u> 121(3): 803-12.
- Flax, J. D., S. Aurora, et al. (1998). "Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes." <u>Nat</u> <u>Biotechnol</u> 16(11): 1033-9.
- Fontaine-Perus, J., P. Halgand, et al. (1997). "Mouse-chick chimera: a developmental model of murine neurogenic cells." <u>Development</u> **124**(16): 3025-36.
- Gage, F. H. (1998). "Stem cells of the central nervous system." <u>Curr Opin Neurobiol</u> **8**(5): 671-6.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." <u>Science</u> 287(5457): 1433-8.
- Galileo, D. S. (2003). "Spatiotemporal gradient of oligodendrocyte differentiation in chick optic tectum requires brain integrity and cell-cell interactions." <u>Glia</u> 41(1): 25-37.
- Galli, R., A. Gritti, et al. (2003). "Neural stem cells: an overview." <u>Circ Res</u> **92**(6): 598-608.
- Gao, J., D. S. Prough, et al. (2006). "Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury." <u>Exp</u> <u>Neurol</u> 201(2): 281-92.
- Gensburger, C., G. Labourdette, et al. (1987). "Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro." <u>FEBS Lett</u> 217(1): 1-5.
- Geoghegan, E. and L. Byrnes (2008). "Mouse induced pluripotent stem cells." <u>Int J Dev</u> <u>Biol</u> **52**(8): 1015-22.

- Glaser, T., A. Perez-Bouza, et al. (2005). "Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells." <u>Faseb J</u> **19**(1): 112-4.
- Gonzalez, F., M. Barragan Monasterio, et al. (2009). "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 106(22): 8918-22.
- Gregory-Evans, K., F. Chang, et al. (2009). "Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF-secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration." Mol Vis **15**: 962-73.
- Gross, R. E., M. F. Mehler, et al. (1996). "Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells." <u>Neuron</u> 17(4): 595-606.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." <u>Nature</u> **401**(6751): 390-4.
- Hagg, T. (2007). "Endogenous regulators of adult CNS neurogenesis." <u>Curr Pharm Des</u> 13(18): 1829-40.
- Hall, A., N. A. Giese, et al. (1996). "Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors." <u>Development</u> 122(12): 4085-94.
- Hamburger, V. and H. Hamilton (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." J. Morphol. 88: 49-92.
- Hara, A., M. Niwa, et al. (2004). "Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in the adult mouse retina." <u>Brain Res</u> 999(2): 216-21.
- Hart, C. E., J. W. Forstrom, et al. (1988). "Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF." <u>Science</u> 240(4858): 1529-31.
- Hitoshi, S., V. Tropepe, et al. (2002). "Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain." <u>Development</u> 129(1): 233-44.
- Jagatha, B., M. S. Divya, et al. (2009). "In vitro differentiation of retinal ganglion-like cells from embryonic stem cell derived neural progenitors." <u>Biochem Biophys</u> <u>Res Commun</u> 380(2): 230-5.
- Kalyani, A. J., D. Piper, et al. (1998). "Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture." <u>J Neurosci</u> 18(19): 7856-68.

- Karimi-Abdolrezaee, S., E. Eftekharpour, et al. (2006). "Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury." <u>J Neurosci</u> 26(13): 3377-89.
- Kilpatrick, T. J. and P. F. Bartlett (1993). "Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation." <u>Neuron</u> 10(2): 255-65.
- Kim, D., C. H. Kim, et al. (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." <u>Cell Stem Cell</u> 4(6): 472-6.
- Kim, J. B., H. Zaehres, et al. (2008). "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors." <u>Nature</u> 454(7204): 646-50.
- Kim, J. H., J. M. Auerbach, et al. (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." <u>Nature</u> 418(6893): 50-6.
- Klassen, H., D. S. Sakaguchi, et al. (2004). "Stem cells and retinal repair." <u>Prog Retin</u> <u>Eye Res</u> 23(2): 149-81.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa, et al. (1996). "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts." <u>J Clin Invest</u> 98(1): 216-24.
- Klugmann, M., M. H. Schwab, et al. (1997). "Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein." <u>Neuron</u> 18(1): 59-70.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(19): 10711-6.
- Lagasse, E., H. Connors, et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." <u>Nat Med</u> **6**(11): 1229-34.
- Lamba, D. A., J. Gust, et al. (2009). "Transplantation of human embryonic stem cellderived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice." <u>Cell Stem Cell</u> 4(1): 73-9.
- Lamba, D. A., M. O. Karl, et al. (2006). "Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 103(34): 12769-74.
- Le Belle, J. E. and C. N. Svendsen (2002). "Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here?" <u>BioDrugs</u> **16**(6): 389-401.

- Lee, J., S. Kuroda, et al. (2003). "Migration and differentiation of nuclear fluorescencelabeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice." <u>Neuropathology</u> 23(3): 169-80.
- Lee, M. K., J. B. Tuttle, et al. (1990). "The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis." <u>Cell Motil Cytoskeleton</u> 17(2): 118-32.
- Li, C., M. B. Tropak, et al. (1994). "Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein." <u>Nature</u> 369(6483): 747-50.
- Li, W., W. Q. Cai, et al. (2006). "Repair of spinal cord injury by neural stem cells modified with BDNF gene in rats." <u>Neurosci Bull</u> 22(1): 34-40.
- Lim, D. A., Y. C. Huang, et al. (2007). "The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies." <u>Neurosurg Clin N Am</u> 18(1): 81-92, ix.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 90(5): 2074-7.
- Lu, B., C. Malcuit, et al. (2009). "Long-term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration." <u>Stem</u> <u>Cells</u>.
- Lumelsky, N., O. Blondel, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." <u>Science</u> **292**(5520): 1389-94.
- MacLaren, R. E., R. A. Pearson, et al. (2006). "Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors." <u>Nature</u> 444(7116): 203-7.
- Mapara, K. Y., C. B. Stevenson, et al. (2007). "Stem cells as vehicles for the treatment of brain cancer." <u>Neurosurg Clin N Am</u> 18(1): 71-80, ix.
- Maric, D., I. Maric, et al. (2003). "Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation." J Neurosci 23(1): 240-51.
- McDonald, J. W., X. Z. Liu, et al. (1999). "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord." <u>Nat Med</u> 5(12): 1410-2.

- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." <u>Science</u> **276**(5309): 66-71.
- McKay, R. (2000). "Mammalian deconstruction for stem cell reconstruction." <u>Nat Med</u> **6**(7): 747-8.
- Mehler, M. F., P. C. Mabie, et al. (2000). "Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate." <u>Dev Neurosci</u> 22(1-2): 74-85.
- Meyer-Franke, A. and B. Barres (1994). "Axon myelination. Myelination without myelin-associated glycoprotein." <u>Curr Biol</u> **4**(9): 847-50.
- Morrison, S. J., N. M. Shah, et al. (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." <u>Cell</u> 88(3): 287-98.
- Nagy, A., E. Gocza, et al. (1990). "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." <u>Development</u> **110**(3): 815-21.
- Nagy, A., J. Rossant, et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 90(18): 8424-8.
- Nave, K. A., C. Lai, et al. (1987). "Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **84**(16): 5665-9.
- Nygren, J. M., S. Jovinge, et al. (2004). "Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation." <u>Nat Med</u> **10**(5): 494-501.
- Ohori, Y., S. Yamamoto, et al. (2006). "Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord." J Neurosci 26(46): 11948-60.
- Okabe, M., M. Ikawa, et al. (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." <u>FEBS Lett</u> **407**(3): 313-9.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." <u>Nature</u> **448**(7151): 313-7.
- Okita, K., M. Nakagawa, et al. (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors." <u>Science</u> 322(5903): 949-53.

- Olivier, C., I. Cobos, et al. (2001). "Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo." <u>Development</u> **128**(10): 1757-69.
- Osakada, F., H. Ikeda, et al. (2008). "Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells." <u>Nat</u> <u>Biotechnol</u> **26**(2): 215-24.
- Ostenfeld, T., E. Joly, et al. (2002). "Regional specification of rodent and human neurospheres." <u>Brain Res Dev Brain Res</u> **134**(1-2): 43-55.
- Park, I. H., R. Zhao, et al. (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." <u>Nature</u> 451(7175): 141-6.
- Park, K. I., B. T. Himes, et al. (2006). "Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: Evidence from engraftment of Neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury." <u>Exp</u> Neurol **199**(1): 179-90.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." <u>Science</u> 284(5417): 1168-70.
- Peyron, F., S. Timsit, et al. (1997). "In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP." <u>J Neurosci Res</u> 50(2): 190-201.
- Pfeiffer, S. E., A. E. Warrington, et al. (1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes." <u>Trends Cell Biol</u> **3**(6): 191-7.
- Poltorak, M., R. Sadoul, et al. (1987). "Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuronoligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction." <u>J Cell Biol</u> 105(4): 1893-9.
- Popot, J. L., D. Pham Dinh, et al. (1991). "Major myelin proteolipid: the 4-alpha-helix topology." <u>J Membr Biol</u> 123(3): 278.
- Pressmar, S., M. Ader, et al. (2001). "The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> 42(13): 3311-9.
- Reske-Nielsen, E., M. Gregersen, et al. (1987a). "Astrocytes in the postnatal central nervous system. From birth to 14 years of age. An immunohistochemical study on paraffin-embedded material." <u>Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]</u> 95(6): 347-56.

- Reske-Nielsen, E., S. Oster, et al. (1987b). "Astrocytes in the prenatal central nervous system. From 5th to 28th week of gestation. An immunohistochemical study on paraffin-embedded material." <u>Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]</u> 95(6): 339-46.
- Reubinoff, B. E., P. Itsykson, et al. (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." <u>Nat Biotechnol</u> **19**(12): 1134-40.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, et al. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." <u>J Neurosci</u> 12(11): 4565-74.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." <u>Science</u> 255(5052): 1707-10.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." <u>Dev</u> <u>Biol</u> 175(1): 1-13.
- Ricci-Vitiani, L., P. Casalbore, et al. (2006). "Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord." <u>Neurol Res</u> 28(5): 488-92.
- Richards, L. J., T. J. Kilpatrick, et al. (1992). "De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 89(18): 8591-5.
- Ross, R., E. W. Raines, et al. (1986). "The biology of platelet-derived growth factor." <u>Cell</u> **46**(2): 155-69.
- Salzer, J. L., W. P. Holmes, et al. (1987). "The amino acid sequences of the myelinassociated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily." J <u>Cell Biol</u> 104(4): 957-65.
- Scholer, H., D. Zeuschner, et al. (2009). "Induced Pluripotent Stem Cells at Nano Scale." <u>Stem Cells Dev</u>.
- Schuldiner, M., R. Eiges, et al. (2001). "Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells." <u>Brain Res</u> 913(2): 201-5.
- Sher, F., V. Balasubramaniyan, et al. (2008). "Oligodendrocyte differentiation and implantation: new insights for remyelinating cell therapy." <u>Curr Opin Neurol</u> 21(5): 607-14.

- Shetty, A. K. (2004). "Progenitor cells from the CA3 region of the embryonic day 19 rat hippocampus generate region-specific neuronal phenotypes in vitro." Hippocampus 14(5): 595-614.
- Shevchenko, A. I., S. P. Medvedev, et al. (2009). "[Induced pluripotent stem cells]." <u>Genetika</u> **45**(2): 160-8.
- Shihabuddin, L. S., P. J. Horner, et al. (2000). "Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus." J Neurosci 20(23): 8727-35.
- Shim, J. W., C. H. Park, et al. (2007). "Generation of Functional Dopamine Neurons from Neural Precursor Cells Isolated from the Subventricular Zone and White Matter of the Adult Rat Brain using Nurr1 Overexpression." <u>Stem Cells</u>.
- Smith, A. G. (1992). "Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation." <u>Semin Cell Biol</u> 3(6): 385-99.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." <u>Science</u> 322(5903): 945-9.
- Stemple, D. L. and D. J. Anderson (1992). "Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest." <u>Cell</u> 71(6): 973-85.
- Suter, D. M. and K. H. Krause (2008). "Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy." <u>J Pathol</u> 215(4): 355-68.
- Svendsen, C. N. and M. A. Caldwell (2000). "Neural stem cells in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation." Prog Brain Res 127: 13-34.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." <u>Cell</u> 126(4): 663-76.
- Takahashi, M., T. D. Palmer, et al. (1998). "Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina." <u>Mol Cell</u> <u>Neurosci</u> 12(6): 340-8.
- Taylor, H. and S. L. Minger (2005). "Regenerative medicine in Parkinson's disease: generation of mesencephalic dopaminergic cells from embryonic stem cells." <u>Curr Opin Biotechnol</u> 16(5): 487-92.

Temple, S. (2001a). "The development of neural stem cells." <u>Nature</u> 414(6859): 112-7.

Temple, S. (2001b). "Stem cell plasticity--building the brain of our dreams." <u>Nat Rev</u> <u>Neurosci</u> **2**(7): 513-20.

- Terada, N., T. Hamazaki, et al. (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." <u>Nature</u> 416(6880): 542-5.
- Tomita, M., Y. Adachi, et al. (2002). "Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina." <u>Stem Cells</u> **20**(4): 279-83.
- Tomita, M., T. Mori, et al. (2006). "A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells." <u>Stem Cells</u> **24**(10): 2270-8.
- Tondeur, S., S. Assou, et al. (2008). "[Biology and potential of human embryonic stem cells]." <u>Ann Biol Clin (Paris)</u> **66**(3): 241-7.
- Tropepe, V., B. L. Coles, et al. (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." <u>Science</u> **287**(5460): 2032-6.
- Uyeda, C. T., L. F. Eng, et al. (1972). "Immunological study of the glial fibrillary acidic protein." <u>Brain Res</u> **37**(1): 81-9.
- Van Hoffelen, S. J., M. J. Young, et al. (2003). "Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina." <u>Invest Ophthalmol Vis</u> <u>Sci</u> 44(1): 426-34.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, et al. (1993). "bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells." <u>Neuron</u> 11(5): 951-66.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, et al. (2002). "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells." <u>Science</u> 297(5590): 2256-9.
- Wataya, T., K. Muguruma, et al. (2008). "[Human pluripotent stem cell and neural differentiation]." <u>Brain Nerve</u> 60(10): 1165-72.
- Weiss, S., C. Dunne, et al. (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." <u>J Neurosci</u> 16(23): 7599-609.
- White, P. M. and D. J. Anderson (1999). "In vivo transplantation of mammalian neural crest cells into chick hosts reveals a new autonomic sublineage restriction." <u>Development</u> 126(19): 4351-63.
- White, P. M., S. J. Morrison, et al. (2001). "Neural crest stem cells undergo cellintrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals." <u>Neuron</u> 29(1): 57-71.

- Whittemore, S. R., D. J. Morassutti, et al. (1999). "Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations." <u>Exp Cell Res</u> 252(1): 75-95.
- Wiles, M. V. and G. Keller (1991). "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture." <u>Development</u> 111(2): 259-67.
- Winkler, C., R. A. Fricker, et al. (1998). "Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain." <u>Mol Cell Neurosci</u> 11(3): 99-116.
- Wislet-Gendebien, S., P. Leprince, et al. (2003). "Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells." <u>J Cell Sci</u> 116(Pt 16): 3295-302.
- Yang, L. J., C. B. Zeller, et al. (1996). "Gangliosides are neuronal ligands for myelinassociated glycoprotein." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 93(2): 814-8.
- Yang, P., M. J. Seiler, et al. (2002a). "Differential lineage restriction of rat retinal progenitor cells in vitro and in vivo." <u>J Neurosci Res</u> 69(4): 466-76.
- Yang, P., M. J. Seiler, et al. (2002b). "In vitro isolation and expansion of human retinal progenitor cells." <u>Exp Neurol</u> 177(1): 326-31.
- Yasuhara, T., N. Matsukawa, et al. (2006). "Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease." J Neurosci 26(48): 12497-511.
- Zhang, F. and K. B. Pasumarthi (2008). "Embryonic stem cell transplantation: promise and progress in the treatment of heart disease." <u>BioDrugs</u> 22(6): 361-74.
- Zhang, S. C., M. Wernig, et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." <u>Nat Biotechnol</u> 19(12): 1129-33.
- Zhao, X., J. Liu, et al. (2002). "Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 297(2): 177-84.
- Zweigerdt, R. (2009). "Large Scale Production of Stem Cells and Their Derivatives." <u>Adv Biochem Eng Biotechnol</u>.

# 7. Anhang

# 7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
ABC Substrat	<u>Avidin Biotinylated Enzyme Complex</u>
BCIP	5- <u>B</u> romo-4- <u>c</u> hloro-3- <u>i</u> ndolyl <u>p</u> hosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine
bzw.	beziehungsweise
Ca++	Kalzium
CaCl	Kalziumchlorid
cDNA	copy Desoxyriobnucleinacid
CHX 10	Transkriptionsfaktor retinaler Vorläuferzellen
Cy 2	Cyanin
Су 3	Indocarbocyanin
DAB	3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dd H <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMEM/F 12	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Mix F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green flourescent protein
Fab	fragment antigene binding
FCS	fetal calf serum
GAP 43	growth associated protein
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
HBSS	Hank's balanced salt solution

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	horse radish peroxidase
KCC 2	Kalium-Chlorid-Cotransporter
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Potassiumphosphat
MAP 2 a/b	microtubule associated protein
MBP	myelin basic protein
mg	Milligramm
Mg++	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonuclein acid
Na <sub>3</sub> citrat	Natriumcitrat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NeuN	neuronal nuclear antigene
NF	Neurofilament
01	Oberflächenprotein auf Oligodendrozyten-Vorläufern
Olig 2	Trankriptionsfaktor von Oligodendrozyten
P 1	Puffer 1
P 3	Puffer 2
P 4	Puffer 3
P 2	Puffer 4
РА	Paraformaldehyd
PBS	phosohate buffered saline
PCR	polymerase chain reaktion
PDGF α	platelet derived growth factor $\alpha$ -receptor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pН	Potentia hydrogenii
PLP	Proteolipid-Protein
RNA	ribonuclein acid

rpm	rotation per minute
RT 97-Antikörper	Anti-Neurofilamet-Antikörper
Sox 2	Transkriptionsfaktor von neuralen und embryonalen
	Stammzellen
SSC	Standard-Salz-Zitratlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	transfer ribonuclein acid
ZNS	Zentralnervensystem

#### 7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Udo Bartsch für seine wissenschaftliche Betreuung und seine stetige Unterstützung, die ich als überaus hilfreich und motivierend empfunden habe.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. med. Ines Richard, der die Idee zu dieser Arbeit zu verdanken ist, und mit deren Unterstützung ich die initialen Experimente zur *in ovo* Manipulation durchgeführt habe.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Transplantationslabores möchte ich dafür danken, dass sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vor allem Sabine Helbing und Elke Becker.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund.

# 7.3 Lebenslauf

Marion Christiane Mayr Geboren am 16.01.1982 in Bochum

Schulbildung	
1988 – 1992	Gräfin-Imma-Grundschule in Bochum
1992 – 2001	Graf-Engelbert-Gymnasium in Bochum, Hochschulreife
Hochschulstudium	
2001-2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
September 2003	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Physikum
April 2008	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation
	Famulaturen
März 2004	Klinik für Chirurgie, Universitätsklinik Bergmannsheil,
	Bochum
September 2004	Praxisklinik für plastische Operationen, Altstadtklinik
	Hattingen
September 2005	Albertinen-Haus, Zentrum für Geriatrie, Hamburg
Oktober 2006	Augenklinik, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg
	Praktisches Jahr
2007	Innere Medizin, Universitätskrankenhaus Hamburg
	Eppendorf;
	Augenheilkunde, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg;
	Chirurgie, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
	Wissenschaftliche Ausbildung
März 2002	Zusatzqualifikation molekulare Medizin des Fachbereichs
	Medizin, UKE: Einstiegspraktikum Molekularbiologie
März 2003	Zusatzqualifikation molekulare Medizin des Fachbereichs
	Medizin, UKE: Praktikum molekulare Zellbiochemie und
	zelluläre Signaltransduktion

Seit Oktober 2004	Doktorarbeit im Transplantationslabor der Klinik für
	Augenheilkunde, Universitätskrankenhaus Hamburg
	Eppendorf
Ärztliche Weiterbildung	
Seit Juli 2008	Assistenzärztin in der Facharztweiterbildung, Augenklinik
	der städtischen Kliniken Dortmund Mitte

### 7.4 Eidesstattliche Versicherung

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.

Unterschrift: