

Aus dem Zentrum Anatomie der Universität zu Köln
Institut I für Anatomie
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Addicks

**Humane Amniozyten zeigen neuronale
Eigenschaften nach adenoviraler Transformation
in vitro und *in vivo***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von

Carola Post
aus Mülheim an der Ruhr

Promoviert am 7. Oktober 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter:

 Universitätsprofessor Dr. med. vet. Dr. rer. medic. S. Arnhold

2. Berichterstatter:

 Universitätsprofessor Dr. med. J. Hescheler

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter oder Benutzung anderer Hilfsmittel als die angegebenen angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. K. Addicks

Universitätsprofessor Dr. med. vet. Dr. rer. medic. S. Arnhold

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch in dieser Form noch nicht veröffentlicht.

Mülheim, den 15.5.2009

Carola Post

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden ohne meine Mitarbeit von der ZMMK Nachwuchsgruppe der Universität zu Köln aufbereitet und mir zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Dr. Arnhold und den medizinisch-technischen Assistenten Frau J. Kozlowski und Herrn C. Hoffmann von mir selbst ausgeführt worden.

Die Operationen an den Versuchstieren wurden von Herrn Professor Dr. Dr. Arnhold und mir gemeinsam durchgeführt. Die Perfusion der Tiere erfolgte durch den medizinisch-technischen Assistenten Herrn C. Hoffmann.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. K. Addicks für die Möglichkeit, diese Forschungsarbeit am Institut I für Anatomie der Universität zu Köln durchführen zu können.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. vet. Dr. rer. medic. S. Arnhold danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die tatkräftige Unterstützung, die Geduld, die konstruktive Kritik, all die investierte Zeit und besonders das Vertrauen, welches mir entgegen gebracht wurde.

Mein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für Anatomie I der Universität zu Köln.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau J. Kozlowski und Herrn C. Hoffmann an dieser Stelle für die technische Unterstützung und die gute Stimmung während der Arbeit bedanken.

Ich danke meinen Freunden und Kommilitonen, die mich in den letzten sechs Jahren an der Uni begleitet und diese Zeit so unvergesslich schön und einzigartig gemacht haben.

Der größte Dank gilt meiner Mutter. Danke für deine Unterstützung, danke für dein Vertrauen, danke für deine Liebe.

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	12
1.1 Allgemeine Einführung.....	12
1.2 Aufbau der Plazenta und Gewinnung der Amniozyten durch Amniozentese	14
1.3 Allgemeine Eigenschaften und Charakteristika von Stammzellen	17
1.4 Eigenschaften und Charakteristika neuraler Stammzellen	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Feinchemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
2.1.2 In der Zellkultur verwendete Wachstumsfaktoren und Zusätze	23
2.1.3 Puffer und Stammlösungen	25
2.1.4 Fixierlösungen und Behandlung der Zellen/des Gewebes	26
2.2 Zellkultur	26
2.2.1 Gewinnung der humanen Amniozyten und Immortalisierung.....	26
2.2.2 Kultivierung	27
2.2.3 Medienwechsel	27
2.2.4 Passagieren der Zellen.....	28
2.2.5 Kryokonservierung	29
2.2.6 Auftauen der kryokonservierten Zellen	30
2.2.7 Differenzierungsversuche	31
2.2.8 Kultivierung und Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen.....	32
2.2.9 Untersuchung zum Proliferationsverhalten.....	33
2.2.10 Lichtmikroskopie	33
2.3 Zellfixation mit Paraformaldehyd (PFA).....	34
2.4 Immunzytochemie, Prinzip und Durchführung.....	34
2.4.1 Allgemeine Einführung.....	34
2.4.2 Versuchsbeschreibung	35
2.4.3 Von den verwendeten Antikörpern erkannte Proteine	37
2.5 Molekularbiologische Methoden	41
2.5.1 RNA-Isolierung.....	41
2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.5.3 DNase-Verdau.....	42
2.5.4 Reverse Transkription (RT)	43
2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.5.6 Zu detektierende Gene bzw. Genabschnitte	45

2.6 ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	47
2.6.1 Ziel der ELISA Untersuchungen.....	47
2.6.2 Allgemeine Einführung und Versuchsbeschreibung	47
2.6.3 Detailliertes Versuchsprotokoll nach dem E _{max} ® ImmunoAssay System am Beispiel von BDNF	48
2.6.4 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung am Beispiel des Protokolls für den BDNF E _{max} ®Immunoassay	50
2.6.5 Verwendete Substanzen, Puffer und Lösungen.....	51
2.6.6 Für die E _{max} ®ImmunoAssays verwendete Proben.....	51
2.7 Stereotaktische Implantation	53
2.7.1 Vorbereitung der Zellen und Markieren mit GFAP	53
2.7.2 Durchführung.....	54
2.7.3 Succrose-Einbettung	55
3. ERGEBNISSE.....	56
3.1 Zellkultur.....	56
3.1.1 Zellmorphologie der Amniozyten in Standardmedium	56
3.1.2 Verhalten und Morphologie nach erneuter Kryokonservierung und anschließendem Auftauen.....	57
3.1.3 Untersuchung des Differenzierungsverhaltens in Bezug auf die Zellmorphologie in den neuronalen Medien	58
3.1.3.1 Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF.....	58
3.1.3.2 Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF-8 und Retinsäure.....	58
3.1.4 Proliferationsergebnisse.....	60
3.1.4.1 Proliferation in Standardmedium unter Normalbedingungen und Hypoxie	61
3.1.4.2 Proliferation in den neuronalen Differenzierungsmedien unter Normalbedingungen und Hypoxie	65
3.1.4.3 Vergleich der Proliferationsergebnisse innerhalb aller eingesetzten Medien.....	71
3.1.4.4 Untersuchung zum Proliferationsverhalten nach Kryokonservierung.....	72
3.2 Charakterisierung der Zellen mittels Immunzytochemie.....	72
3.2.1 Charakterisierung der Zellen in Standardkulturmedium.....	73
3.2.2 Charakterisierung nach Induktion der Differenzierung.....	76
3.3 Ergebnisse der RT-PCR	87
3.3.1 Nachweis der Transkripte der Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Sox-2	87
3.3.2 Nachweis der Transkripte der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, GDNF und NT-3...88	
3.4. Auswertung des ELISA-Assay	89
3.4.1 Untersuchung und Quantifizierung von NGF	89
3.4.2 Untersuchung und Quantifizierung von BDNF	94
3.5 Stereotaktische Implantation der Amniozyten	98

3.5.1 Beurteilung der Integration der mit GFP markierten Zellen im Striatum.....	98
3.5.2 Untersuchungen der Zellen nach Transplantation.....	98
4. DISKUSSION.....	101
4.1 Zielsetzung der Dissertation.....	101
4.2 Kritik der Methode.....	102
4.3 Diskussion der Befunde	104
4.4 Schlussfolgernde Betrachtungen	114
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	117
7. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN.....	131

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einführung

Aus der heutigen medizinischen Forschung sind die Untersuchungen und Experimente an Stammzellen nicht mehr wegzudenken. Stammzellen bieten ein fast unerschöpfliches Potential bei der Behandlung vielerlei Krankheiten. So könnten zum Beispiel Zellen zur Erneuerung bei degenerativen Prozessen jeglicher Art wie Alzheimer, Knorpelschäden, Bandläsionen, nach Schlaganfällen, Herzinfarkten überall dort eingesetzt werden, wo es durch Gewebs- bzw. Zelluntergänge zu irreversibler Schädigung gekommen ist. Mit der Möglichkeit, solche Pathologien direkt im Ursprung behandeln zu können, ergäben sich für den Patienten ganz neue Perspektiven. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die gesamte Stammzellforschung in den letzten Jahren massiv an Bedeutung gewonnen hat.

Zellen mit dem gesamten Entwicklungspotential stellen embryonale Stammzellen dar. Allerdings verankert die Bundesrepublik Deutschland im Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen in Paragraph §1: „Zweck dieses Gesetzes ist es, im Hinblick auf die staatliche Verpflichtung, die Menschenwürde und das Recht auf Leben zu achten und zu schützen und die Freiheit der Forschung zu gewährleisten: 1. die Einfuhr und die Verwendung embryonaler Stammzellen grundsätzlich zu verbieten, 2. zu vermeiden, dass von Deutschland aus eine Gewinnung embryonaler Stammzellen oder eine Erzeugung von Embryonen zur Gewinnung embryonaler Stammzellen veranlasst wird, und 3. die Voraussetzungen zu bestimmen, unter denen die Einfuhr und die Verwendung embryonaler Stammzellen ausnahmsweise zu Forschungszwecken zugelassen sind.“¹ Es ist also notwendig, Alternativen zu finden und als Forschungsgrundlage einzusetzen.

¹ Stammzellgesetz vom 28.Juni 2002, zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 14. August 2008, Auszug aus dem BGBl. I S.2277, StZG

Amniozyten stellen eine solche alternative Stammzellquelle dar. Sie entstammen direkt der embryonalen Zellreihe, aber nicht dem Embryo selbst, und sind gut zugänglich, da sie in ausreichender Menge in der Amnionflüssigkeit vorkommen. Gewonnen werden sie mittels Amniozentese (s.u.). Die Amnionflüssigkeit enthält eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen. Dort kommen fetale Zellen wie Zellen der Haut, des Verdauungstrakts, der Atem- und Harnwege und auch Abschlüpfungen der Plazenta vor (Priest et al., 1978; Tyden et al., 1981).

Unterschiedliche morphologische Aspekte, biochemische Eigenschaften und auch das Wachstumsverhalten in Kultur haben dazu geführt, dass man heute drei grosse Gruppen von Zellen des Fruchtwassers klassifizieren kann. Dabei handelt es sich um epitheloide E-Zellen, fibroblast-ähnliche Typ-F Zellen und die für die Amnionflüssigkeit spezifischen AF-Zellen. Bei den F-Zellen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellen aus der Familie der dermalen Fibroblasten, da sie Fibroblasteneigenschaften aufweisen und sich bei ihnen extrazelluläre Kollagenfasern nachweisen lassen, wie sie beispielsweise in Fibroblasten der Haut vorkommen (Priest et al., 1978). Für die Forschung von besonderer Bedeutung sind die AF- oder AFDS² Zellen, die ein großes Differenzierungspotential aufweisen. Sie machen lediglich 1% aller in der Amnionflüssigkeit enthaltenen Zellen aus und zeigen Charakteristika, die schon von embryonalen und adulten Stammzellen bekannt sind (De Coppi et al., 2007; Prusa and Hengstschlager, 2002). Die Zellen sind weitestgehend multipotent. Ihnen wurde schon die Fähigkeit nachgewiesen, sich in Derivate aller drei Keimblätter inklusive Zellen der adipogenen, osteogenen, myogenen, endothelialen, hepatogenen und neuronalen Zelllinien differenzieren zu können (De Coppi et al., 2007). In dieser Arbeit werden die AFDS aus dem Zellpool isoliert und verwendet, ihre Stammzeleigenschaften mittels verschiedenster Verfahren untersucht und ihre neuronale Differenzierung induziert.

² Amnion fluid derived stem cells

1.2 Aufbau der Plazenta und Gewinnung der Amniozyten durch Amniozentese

Die menschliche Plazenta ist im ausgereiftem Zustand circa 600g schwer. Sie bildet sich nach der Nidation der Blastozyste im Uterus und entsteht aus fetalen Trophoblasten und mütterlichem Endometrium. Auf der fetalen Seite der Plazenta sitzt das weißlich-trübe Amnionepithel der Chorionplatte und Nabelschnur auf und bedeckt diese vollständig. Da es sich beim Amnion um eine embryonale Struktur handelt, ist das Amnionepithel ebenfalls rein embryonalen bzw. fetalen Ursprungs. Zwischen der mütterlichen Basalplatte, der Dezidua, und der Chorionplatte befindet sich der mit mütterlichem Blut gefüllte intervillöse Raum. Aus dem Chorion wachsen Primärzotten in den villösen Raum, die sich dann in Sekundärzotten verzweigen. Durch das Einsprossen von Kapillaren wird aus der Sekundär- eine Tertiärzotte und bildet damit die Basis des Sauerstoffaustausches (s. Villus in Abb.1). Der Sauerstoffaustausch zwischen Mutter und Kind erfolgt sowohl über Diffusion als auch Pinozytose und wird über spezifische Rezeptoren vermittelt (Gynäkologie und Geburtshilfe, Manfred Stauber, 2007, Thieme Verlag, Stuttgart).

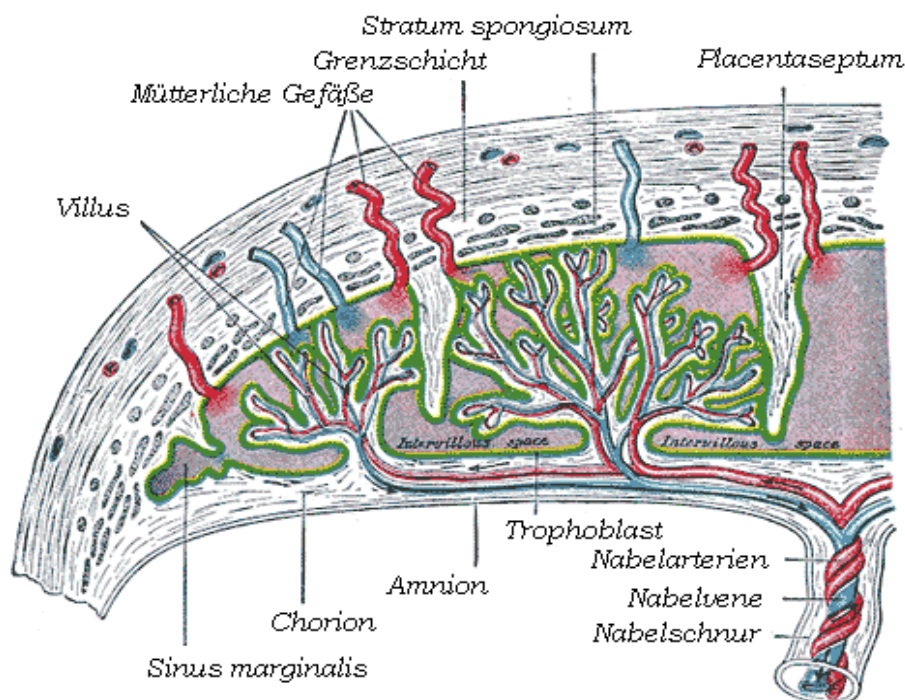


Abb.1: Schematischer Aufbau der Plazenta (Bildquelle: www.wikipedia.de)

Die Amniozyten werden bei der Amniozentese gewonnen. Darunter wird eine Punktion der Fruchtblase unter sonographischer Kontrolle verstanden. Nach Ermittlung der kindlichen Lageverhältnisse im Uterus wird eine dünne Nadel durch die Bauchdecke der Schwangeren gestoßen und bis in die Fruchtblase vorgebracht. Der das Kind umgebende Fruchtwassersack wird als Amnion bezeichnet. Daraus werden 10-15 ml Fruchtwasser entnommen, welches kindliche Zellen, beispielsweise abgestoßene Hautzellen, Zellen des Magen-Darm-Trakts, Zellen der Niere o.ä. und die gewünschten Amnionzellen enthält. Im Labor lassen sich dann schließlich die Amnionzellen selektionieren und weiter kultivieren.

Ziel der eigentlichen Amniozentese ist die Bestimmung kindlicher Fehlentwicklungen. So können ZNS-Fehlentwicklungen, verschiedene Erbkrankheiten, einige chromosomale Aberrationen und Syndrome mit nahezu 100%-iger Sicherheit diagnostiziert werden (Molekulare Humangenetik, Andrew P. Read, Spektrum akademischer Verlag, 2005). Da die Amniozentese ein Eingriff ist, der selbstverständlich auch eine Anzahl an Risiken birgt, u.a. Induktion von Fehlgeburten in circa 1-3% der Fälle, sind zur Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen die Eingriffe nicht nur aus Forschungszwecken durchgeführt worden. Vielmehr hat man die Zellen bei indizierten Amniozentesen gewonnen, um unnötigen Schaden von Mutter und Kind abzuwenden. Die Entnahme ist über einen Ethikantrag abgesichert gewesen.

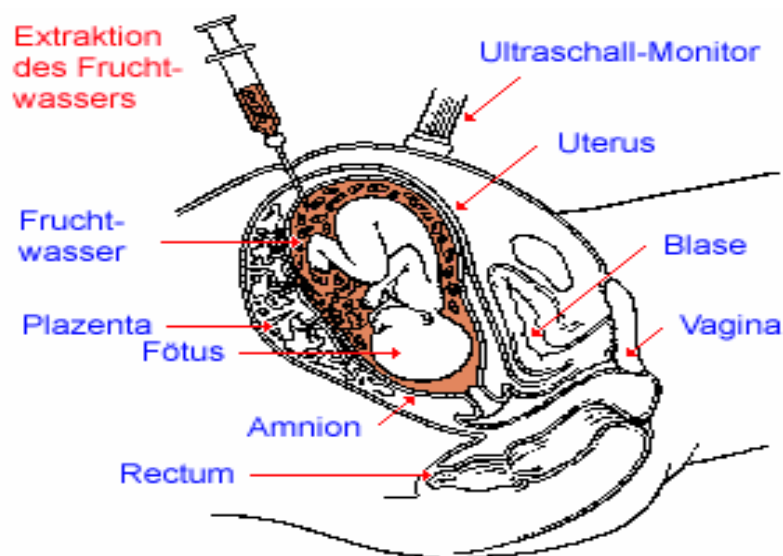


Abb.2: Schematische Darstellung der Amniozentese (Bildquelle: www.zum.com)

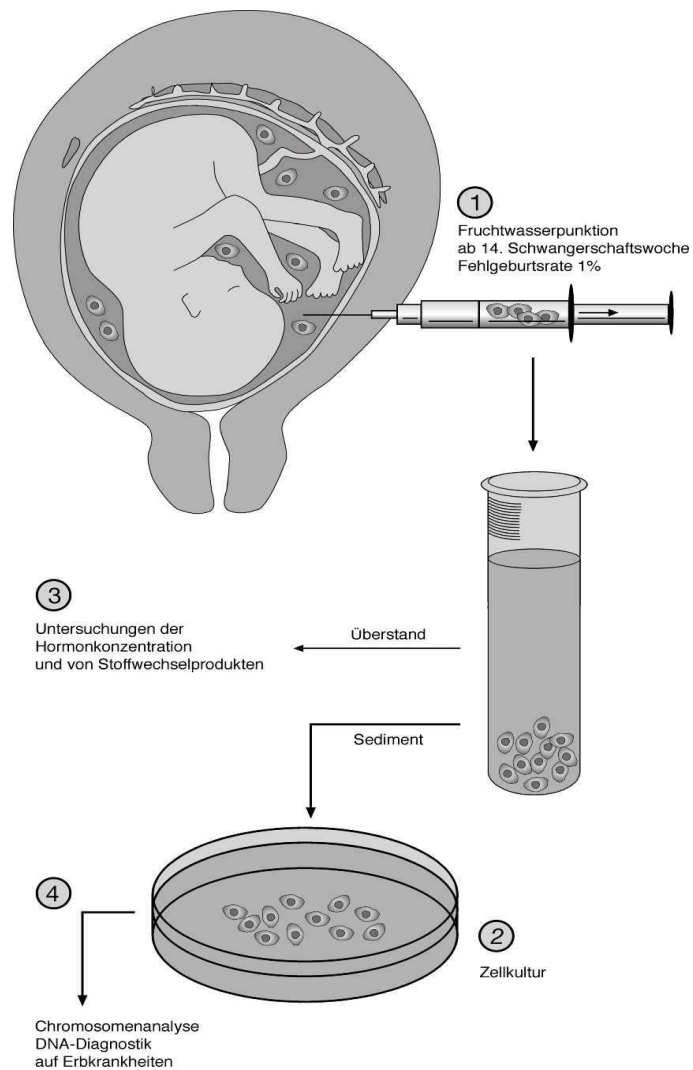


Abb.3: Schematische Darstellung der Gewinnung der Zellen mittels Amniozentese und anschließendes Verbringen in Kultur. Zugehöriges Ultraschallbild s. unten.

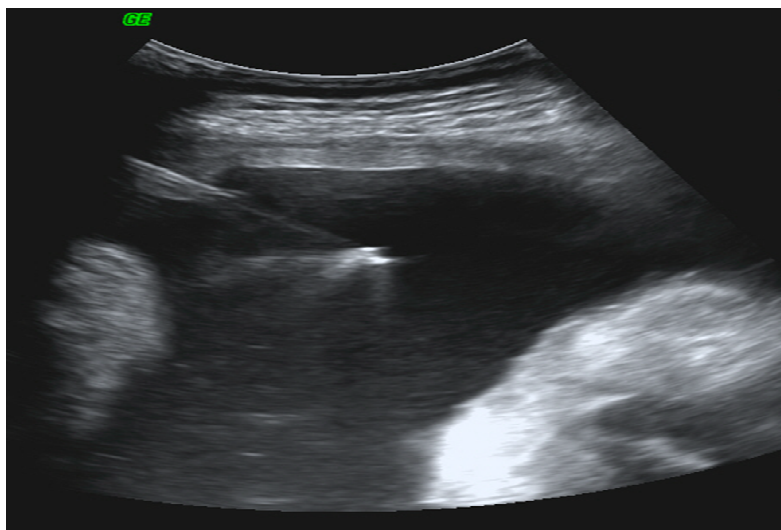


Abb.4: Ultraschallbild einer Amniozentese

1.3 Allgemeine Eigenschaften und Charakteristika von Stammzellen

Eine Stammzelle kann sowohl symmetrische als auch asymmetrische Zellteilungen durchführen. Dies bedeutet, sie besitzt die Fähigkeit zu extensiver Selbsterneuerung und Bildung differenzierter Nachkommen. Die Art der Nachkommen wird durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Rezeptoranlagen und Proteine beeinflusst (Hall, 1989). Eine embryonale Stammzelle kann sich uneingeschränkt in alle Arten von Zellen differenzieren. Stammzellen können in den Geweben in einem mitotisch ruhenden Zustand vorliegen oder sich mit unterschiedlich schneller Geschwindigkeit teilen (Hall and Watt, 1989; Morrison et al., 1997). Zum Beispiel teilen sich Knochenmarksstammzellen langsam und selten (Morrison and Weissman, 1994), wohingegen intestinale Krypten-Stammzellen mit einer Generationsverdopplungszeit von 12 Stunden eine vergleichsweise schnelle Teilungsrate aufweisen (Potten and Loeffler, 1990). Vorläuferzellen einer Zellreihe sind in ihrer Entwicklungskapazität bereits eingeschränkt und in der Differenzierungsrichtung spezialisiert (Temple, 2001; Temple, 2001).

In der Literatur werden, wie aus dem hämatopoetischen System bekannt, vier Kategorien von Zellen benannt (Morrison et al., 1997): Totipotente, pluripotente oder multipotente, oligopotente und unipotente Zellen. Unter einer totipotenten Zelle versteht man eine Zelllinie, die die Fähigkeit besitzt, alle Zell- und Gewebetypen eines Organismus hervorzubringen und damit den Organismus ebenfalls komplett zu generieren. Zu diesen Zelltypen zählen Zellen der Keimbahn und embryonale Stammzellen³. Aus embryonalen totipotenten Stammzellen können neurale pluripotente Stammzellen hervorgehen (Okabe et al., 1996), die sich dann *in vitro* oder nach Transplantation in den Embryo weiterdifferenzieren und unterschiedliche terminal differenzierte Zelltypen hervorbringen können (Dinsmore et al., 1996; Renoncourt et al., 1998). Pluri- oder multipotent ist eine Zelle, wenn sie unterschiedliche Zelltypen hervorbringen kann, ihre Differenzierungskapazität insofern aber eingeschränkt ist, als dass sie sich in verschiedenartige Zellen differenzieren kann, allerdings nicht mehr in alle.

³ ES-Zellen

Findet ausgehend von der Pluripotenz eine weitere Reduktion der Entwicklungsfähigkeit statt, spricht man von oligopotenten Zellen. Dabei handelt es sich um Zellen, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen, in ihrer Differenzierungsrichtung aber stark eingeschränkt sind (Trentin et al., 2004). Unipotente Zellen können sich nur noch in einen definierten Zelltyp differenzieren, wie zum Beispiel neuronale Vorläuferzellen (Doetsch et al., 1997) oder im hämatopoetischen System die unipotenten Vorläufer, die T- und B- Zellen generieren (Katsura and Kawamoto, 2001).

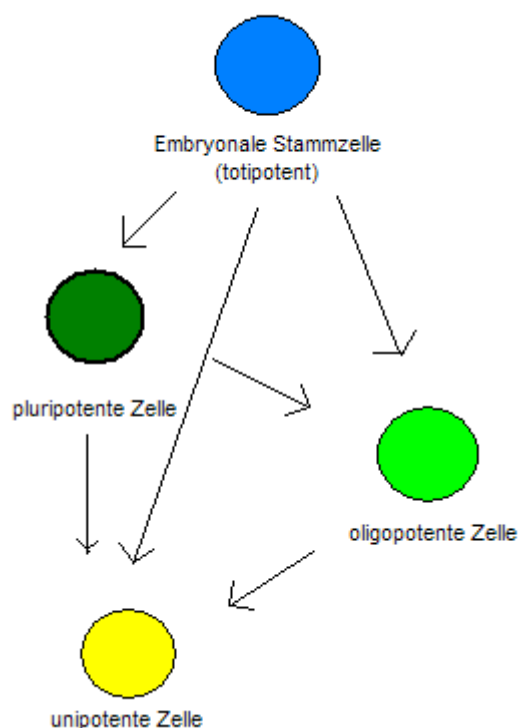


Abb.5: Ausgehend von einer ES-Zelle generieren sich pluripotente, oligopotente und unipotente Zellen. Eine pluripotente Zelle kann bspw. eine oligo- oder unipotente Zelle hervorbringen, umgekehrt aber nicht.

Findet eine unterschiedliche Verteilung von Determinanten auf zwei aus einer Zellteilung hervorgehende Tochterzellen statt, spricht man von asymmetrischer Zellteilung. Sie legt die Entwicklungsrichtung der Zelle fest. In Stammzellen und multipotenten Neuroblasten werden asymmetrische Zellteilungen beschrieben (Doe, 1996). So weist beispielsweise die eine Tochterzelle weiterhin

Vorläuferzellcharakteristika, die andere nur noch eine eingeschränkte Differenzierungskapazität auf (Miyata et al., 2001; Qian et al., 2002).

1.4 Eigenschaften und Charakteristika neuraler Stammzellen

Die unterschiedliche Verteilung eines EGF-Rezeptors beispielsweise beeinflusst die unterschiedliche Differenzierung von Tochterzellen einer Stammzelle (Sun et al., 2005). Im sich entwickelnden und adulten Zentralnervensystem wurde bereits in den frühen 1990er Jahren die Existenz multipotenter neuraler Vorläuferzellen beschrieben (Kilpatrick et al., 1993; Reynolds and Weiss, 1992; Temple, 1989). Später wurde gezeigt, dass es sich bei diesen isolierten Zellen um multipotente neurale Vorläuferzellen handelt (Gage et al., 1995).

Untersuchungen an Mäusen und Ratten konnten zeigen, dass 90% der Zellen der Neuralplatte während der Periode der neuralen Induktion Stammzeleigenschaften aufweisen (Cai et al., 2002). Die Neuralplatte durchläuft, um das Neuralrohr zu bilden, nach der neuralen Induktion eine Reihe von morphologischen Veränderungen. Kurz nach dieser Bildung beginnt die Neurogenese des aus stark proliferierenden neuralen Vorläuferzellen bestehenden Neuroepithels. Dabei wird die regionale Identität der neuralen Vorläuferzellen durch ihre Position entlang der rostro-caudalen und dorso-ventralen Achse festgelegt. Dieser Identifikationsprozess, der die Grundlage für die später entstehenden neuronalen Zelltypen bildet, wird durch die Wirkung von unterschiedlichen induzierenden extrinsischen und intrinsischen Signalen bestimmt (Altmann et al., 2001; O'Leary and Nakagawa, 2002).

Die Zellen des Neuralrohrs lassen sich eindeutig als Stammzellen beschreiben. Neben den oben erwähnten Eigenschaften kann man sie außerdem aufgrund der Expression mehrerer Proteine und ihrer Wachstumsfaktorspezifität charakterisieren. Eine homogene Population FGF-2-abhängiger pluripotenter Stammzellen, die nach einer Isolation nur mit FGF-2 und nicht mit EGF als Mitogen *in vitro* proliferieren, bildet im frühen Entwicklungsstadium das Neuralrohr. Sie exprimieren exklusiv den FGF-R-Typ 3, Frizzled 9 und Sox 2

(Cai et al., 2002). Eine EGF- oder TGF- α -abhängige weitere Population multipotenter Stammzellen wurde erstmals von Reynolds und Weiss im Jahr 1992 isoliert und unterscheidet sich so von der neuroepithelialen Stammzelle. Beide Stammzelltypen exprimieren das Intermediärfilament Nestin (Rao, 1999; Okano et al., 2005). Während der Entwicklung nimmt das quantitative Verhältnis der neuroepithelialen Stammzellen ab, da eine Differenzierung in weiter spezialisierte Vorläuferzellpopulationen stattfindet (Mayer-Proschel et al., 1997). Neben Nestin exprimieren die neuronalen, glialen und Oligodendrozyten-spezifischen Vorläuferzellen auch ps-NCAM (NRP) und A2B5 (Cai et al., 2002). Vorläuferzellen mit diesen Expressionseigenschaften von Oberflächenmolekülen lassen sich durch Verfahren wie Immunzytochemie nachweisen und Durchflusszytometrie (Maric et al., 2003; Nunes et al., 2003) selektionieren.

Wie oben beschrieben, wird die Entwicklung von Stamm- oder Vorläuferzellen durch extrinsische und intrinsische Faktoren beeinflusst. Zu den extrinsischen Faktoren gehören unter anderem FGF-2 (Kilpatrick und Bartlett, 1993), TGF- α (Santa-Ollala und Covarrubias, 1995; Irvin et al., 2003) und EGF (Reynolds und Weiss, 1992; Louis und Reynolds, 2005), die für die Proliferation und Selbsterneuerung der Stammzellen verantwortlich sind. Intrinsischer Faktor bei der Differenzierung ist beispielsweise die DNA-Methylierung, welche eine regulierende Funktion bei der Astrozytendifferenzierung einnimmt (Takizawa et al., 2001).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Feinchemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien werden in Analysequalität (p.A.) oder in Einzelfällen in Synthesequalität bezogen, alle wässrigen Lösungen mit destilliertem Wasser aus der hauseigenen Anlage Milli-RX 20 von Millipore angesetzt. Wachstumsfaktoren werden in 2x deionisiertem Wasser, Dimethylsulfoxid oder Tris-Puffer, (pH 8.0) gelöst.

1-0 Polysorb Faden	Syneture, Norwalk, CT, USA
96er –Wells	Promega, Mannheim, Germany
100 bp DNA Ladder	Genecraft, Lüdinghausen, Germany
2-Propanol	VWR, Darmstadt, Germany
Accutase	PAA, Cölbe, Germany
Agarose-Gel	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Alpha Modification of Eagle's Medium	PAA, Cölbe, Germany
Aqua Poly/ Mount	Polyscience Inc., Eppelheim, Germany
BacilloI®	Bode, Hamburg, Germany
BioDocII-Transilluminator	Biometra, Göttingen, Germany
Biotherm DNA- Polymerase	Genecraft, Lüdinghausen, Germany
Bisbenzimid Hoechst Dye 33342	Sigma, Deisenhofen, Germany
Bovines Serumalbumin (BSA)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Germany
Chloroform	Sigma, Deisenhofen, Germany
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau, Germany
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Germany
Cyclosporin A	Novartis, Barleben, Germany
Dentalbohrer	Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Di-Natrium-carbonat (Na ₂ CO ₃)	VWR, Darmstadt, Germany
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	VWR, Darmstadt, Germany
DMSO (Dimethylsulfoxide/C ₂ H ₆ OS)	Sigma, Deisenhofen, Germany
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Desoxyribonucleotid (dNTP) - Mix	Genecraft, Lüdinghausen, Germany
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Dulbecco's modified eagle medium ⁴	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen, Germany
Eppendorfgefäß	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendor fzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Germany
Einwegskalpell	Sigma, Deisenhofen, Germany

⁴ DMEM (low glucose)

Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Germany
Ethanol (75%)	VWR, Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid	VWR, Darmstadt, Germany
First-Strand Buffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Fluoreszenz- Mikroskop, Axiovert	Zeiss, Oberkochen, Germany
Falkon Röhrchen, steril, 10ml	VWR, Darmstadt, Germany
Falkon Röhrchen, steril, 15ml	VWR, Darmstadt, Germany
Fluoreszenz-Mikroskop, Axiophot	Zeiss, Oberkochen, Germany
Fluoreszenz-Mikroskop, Axiovert	Zeiss, Oberkochen, Germany
Fötale Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuailé, France
Fungizone (Amphotericin B)	Sigma, Deisenhofen, Germany
Glycerin	Sigma, Deisenhofen, Germany
HCl	VWR, Darmstadt, Germany
Heparin	Sigma, Deisenhofen, Germany
Inversmikroskop (Axiovert 100)	Zeiss, Oberkochen, Germany
Isopropanol	VWR, Darmstadt, Germany
Kalium-Chlorid (KCl)	VWR, Darmstadt, Germany
Ketamin	Ratiopharm, Ulm, Germany
Kryostat (Jung Frigocut 2800E)	Leica, Wetzlar, Germany
Laborfuge 400	Heraeus, Hanau, Germany
Lamina	Heraeus, Hanau, Germany
L-Glutamine 200 mM 100x	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Magnesium-Chlorid (MgCl ₂)	VWR, Darmstadt, Germany
Methanol (CH ₄ O)	Roth, Karlsruhe, Germany
Mikropipetten/Variopipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
M- MLV Reverse Transcriptase+Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Multischalen 6 Well	Nunc, Wiesbaden, Germany
N ₂ -Supplement 100x	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Na ₂ HPO ₄	VWR, Darmstadt, Germany
NaH ₂ PO ₄	VWR, Darmstadt, Germany
NaOH	VWR, Darmstadt, Germany
Natrium-Chlorid (NaCl)	VWR, Darmstadt, Germany
Na-dihydrogenphosphatmonohydrat	VWR, Darmstadt, Germany
Natrium-hydrogen-carbonat (NaHCO ₃)	VWR, Darmstadt, Germany
Nebacetin Wundsalbe	AstellasPharma, München, Germany
Neubauer-Zählkammer	Schmidt, Berlin, Germany
Objektträger	VWR, Darmstadt, Germany
Oligo(dT)-Primer	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Paraformaldehyd ((CH ₂ O) _n) (PFA)	VWR, Darmstadt, Germany
Pasteurpipetten (Glas)	Labomedic, Bonn, Germany
PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biowest, Nuailé, France
Penicillin- Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Poly-L-Lysine 0,01 %	Sigma, Deisenhofen, Germany
Rasterschalen 35mm (Falkon)	VWR, Darmstadt, Germany
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner, Fracht, Germany
Rekombinantes FGF-8	PeproTech., Rocky Hill, NJ, USA
Rekombinantes humanes EGF	Tebu-bio, Offenbach, Germany
Rekombinantes humanes bFGF	Tebu-bio, Offenbach, Germany
Retinsäure	Sigma, Deisenhofen, Germany

Stereotaxierrahmen	Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Germany
Sterilfilter 0,2 µm Porendurchmesser	Schleicher & Schuell, Dassel, Germany
Succrose	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Taq- Polymerase + Puffer	Gencraft, Lüdinghausen, Germany
Thermocycler Primus 96 ^{plus}	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
TriFast (peqGOLD)	peqLab-Biotech, Erlangen, Germany
Triton X- 100	Serva, Heidelberg, Germany
Trypsin	Sigma, Deisenhofen, Germany
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen, Germany
Xylazine	Ratiopharm, Ulm, Germany
Zellkulturschalen 100 mm	Nunc, Wiesbaden, Germany
Zentrifuge (Varifuge RF)	Heraeus, Hanau, Germany

Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Software:

Meta-Imaging-Series, Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA , USA

Für die Vitalmikroskopie verwendete Software:

Image-Pro-Express Version 4.5.1.3 media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA

2.1.2 In der Zellkultur verwendete Wachstumsfaktoren und Zusätze

Die zur Rekonstitution der lyophilisierten Wachstumsfaktoren und Zusätze verwendeten Substanzen werden vor Verwendung sterilfiltriert. Alle Wachstumsfaktoren sind bei –20°Celsius zu lagern.

*Rekombinanter humaner basic-fibroblast-growth-factor (bFGF⁵)

(Tebu-bio, Offenbach, Germany)

Stammkonzentration 100 µg/ml, gelöst in ddH₂O

*Rekombinanter humaner fibroblast-growth-factor (FGF8)

(PeproTechInc., NJ, USA)

Stammkonzentration 10 µg/ml, gelöst in 10mM Tris pH 8.0

bFGF und FGF8 gehören zur Gruppe der fibroblast-growth-factors⁶, Faktoren, die in Wundheilungsprozesse und embryonale Entwicklung involviert sind. Die FGFs sind heparinbindende Proteine, deren Signaltransduktion über Interaktionen mit an der Zelloberfläche gebundenen Heparansulfat-Proteoglykanen abläuft. Sie wurden zuerst in Kuhhirnen gefunden, extrahiert,

⁵ Auch FGF-2 genannt

⁶ FGF

dann ihre fibroblastenproliferative Wirkung (Gospodarowicz, 1991) und später auch ihre Fähigkeit zur neuronalen Induktion nachgewiesen (Qian et al., 1997).

*Rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

(Tebu-bio, Offenbach, Germany)

Stammkonzentration 100µg/ml, gelöst in ddH₂O

EGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Regulation des Zellwachstums, die Proliferation und die Differenzierung. Er wirkt über den EGF-Rezeptor an der Zelloberfläche und stimuliert so die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors. Dadurch wird eine Signalkaskade induziert, die eine Vielzahl von biochemischen Veränderungen innerhalb der Zelle in Gang setzt: ein Anstieg des intrazellulären Calciumlevels, gesteigerte Glykolyse, Proteinsynthese und Genexpression. Dies führt zum Zellwachstum.

FGF und EGF werden in dieser Arbeit jeweils in den neuronalen Differenzierungsmedien eingesetzt, denn FGF (Drago et al., 1991; Kilpatrick et al., 1993) und EGF (Louis and Reynolds, 2005; Reynolds et al., 1992) gehören zu den am besten untersuchten Mitogenen, die die Expansion und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen unterstützen. Aber die FGF- und EGF-Rezeptorliganden beeinflussen nicht nur die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen: beide Faktoren üben auch verschiedene Effekte unter anderem auf Tochterzellen einer Vorläuferzelle aus. Sie stellen Mitogene für Astrozyten dar und fördern auf diesem Weg die Astrozytendifferenzierung. Des Weiteren üben sie durch Förderung des Überlebens und der Differenzierung eine neurotrophe Wirkung aus (Kornblum et al., 1998; Morrison and Hof, 1997). Dabei führen unterschiedliche Konzentrationen von FGF zu verschiedenen Wirkungen auf die Differenzierungsrichtung von frühen embryonalen Vorläuferzellen: so fördern niedrige Konzentrationen die Neurogenese, wohingegen hohe FGF-Konzentrationen die Gliogenese unterstützen (Qian et al., 1997).

Retinsäure (RS)

(Sigma, Deisenhofen, Germany)

Stammkonzentration 10^{-2} mol/l in DMSO

Retinsäure ist Induktor der neuronalen Differenzierung, fördert das Motoneuronen-Wachstum und prägt entscheidend das Vernetzungsmuster von Nervenzellen. Selbst wenn die Entwicklung des Nervensystems beendet ist, spielt RS eine entscheidende Rolle, zum Beispiel in der Regeneration von Nervenzellen. Wird die Retinsäuresekretion verringert, kann dies sogar zu degenerativen Prozessen der Motoneurone, der Entwicklung von Alzheimer und vermutlich sogar zur Manifestation von Parkinson führen (Maden, 2007). Retinsäure wird hier zu dem neuronalen Differenzierungsmedium NM2 gegeben. Damit soll die Induktion zur Differenzierung der Zellen eingeleitet und herausgefunden werden, inwieweit die Zellen unter RS-Zugabe in der Lage sind, sich in die neuronale Richtung auszudifferenzieren.

2.1.3 Puffer und Stammlösungen

PBS 0,1 M (phosphate-buffered saline, pH 7.4)

81 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-di-hydrat
19 mM Natrium-di-hydrogenphosphatmonohydrat
150mM NaCl
in dH₂O lösen, einstellen auf pH 7,4

Für die Zellkultur wurde PBS 0.1M ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Biowest, Nuaille, France) verwendet.

TBS 0,05 M

50 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris)
150 mM Natriumchlorid,
in dH₂O lösen, einstellen auf pH 7,6

2.1.4 Fixierlösungen und Behandlung der Zellen/ des Gewebes

4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA)

4% (w/v) Paraformaldehyd in 0,1 M PBS lösen, auf pH 7,6 einstellen

Die Fixierung der Rattenhirne wird in 4%-igem (w/v) Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4°C durchgeführt. Nach dem Auswaschen der Fixierlösung folgt für 24 Stunden eine Inkubation in 18%-iger (w/v) Succrose.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Gewinnung der humanen Amniozyten und Immortalisierung

Bei einer schwangeren Frau wurde nach der 15. Schwangerschaftswoche eine Amniozentese durchgeführt. Es folgte die Entnahme von Amnionflüssigkeit im Rahmen dieser routinemäßigen, pränatalen Diagnostik und daraus die Gewinnung und Separierung der in dieser Arbeit verwendeten für die Amnionflüssigkeit spezifischen Zellen. Es wird in den folgenden Untersuchungen nur mit Zellen gearbeitet, die sich in der zytogenen Analyse als karyotypisch normal zeigten und somit funktionell als „gesunde“ Zellen einzustufen waren.

Die Transformation der Amniozyten wurde wie von Schiedner beschrieben, durchgeführt (Schiedner et al., 2000). Das bedeutet in Kürze zusammengefasst, dass ein Plasmid (pSTK146) zur Transformation der AFDS verwendet wurde, welches eine E1 Region von Ad5 von nt 505 bis 3522 beinhaltet. E1 wird von einem Phosphoglyceratkinase-Promoter, E1B von einem natürlichen E1B Promoter gesteuert. Das E1B Intron, der Splice-Acceptor und das Polyadenylatsignal wurden durch die entsprechenden Abschnitte eines SV40, simian virus 40, ersetzt. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und mir für die weiteren Versuche freundlicherweise von Herrn Dr. Volpers, ZMMK Nachwuchsgruppe der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Kultivierung

Standard-Kulturmedium der AFDS (pro 100ml)

10 ml Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco 10120-152)

1ml L-Glutamin (100x) (Gibco 25030-024)

1ml Penicillin/Streptomycin (50U/ml) (Gibco 15070-063)

Alpha Modification of Eagle's Medium⁷ (1x) (PAA E 15-832) ad 100ml

Unter einer Lamina (Heraeus, Hanau, Germany) werden alle in Folge beschriebenen Versuche unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Materialien sind ebenfalls steril verpackt, die Arbeitsgeräte autoklaviert. Um eine Kontamination mit Keimen zu vermeiden, werden vor Verwendung unter der Lamina alle Materialien und Geräte noch einmal mit Bacillol® desinfiziert. Kultiviert werden die humanen Amniozyten in 10% α MEM, d.h. sie werden in diesem Medium im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Germany) in 100 mm Schalen (Nunc, Wiesbaden, Germany) unter konstanten Bedingungen gelagert: 10 ml Medium pro 100 mm Schale, die Temperatur beträgt 37°C, der Kohlendioxidgehalt 5% und der Sauerstoffgehalt 21% bei normaler Luftfeuchtigkeit. Angesetzte Medien halten sich bei 4°C circa 14 Tage. Bei ihrer Verwendung sollten sie auf Brutschrankbedingungen, d.h. auf 37°C, erwärmt werden.

2.2.3 Medienwechsel

Alle zwei Tage ist ein Mediumwechsel notwendig. Das alte, verbrauchte Medium wird abgesaugt und unmittelbar danach 10 ml des auf Raumtemperatur erwärmten neuen Mediums auf die Zellen gegeben. Um ein Ablösen der Zellen zu verhindern, sollte dieses besonders vorsichtig erfolgen. Der Wechsel des Mediums dient dazu, die Zellen von Abfallprodukten, die im Zellstoffwechsel anfallen, und von dem nach einiger Zeit toxisch wirkenden, im Medium enthaltenen Glutamin zu befreien und dafür zu sorgen, dass immer genug Medium in der Schale vorhanden ist, da die Zellen sonst nicht ausreichend versorgt sind und absterben können. Das frisch hinzugefügte Medium liefert den Zellen außerdem neue Nährstoffe. Im Rahmen des Medienwechsels wird bei einigen Schalen vor dem Absaugen eine 500 μ l Probe des Mediums

⁷ α MEM

abgenommen, um damit weitere Untersuchungen durchführen zu können. Der Überstand wird z.B. für die ELISA Untersuchungen benötigt.

2.2.4 Passagieren der Zellen

Das Verbringen der Zellen in die nächsthöhere Passage dünnt sie aus, um wieder ein besseres Wachstum zu gewährleisten. Da die Zellen bei zu großer Dichte in der Schale durch übermäßig vorhandene Zell-zu-Zellkontakte evtl. dazu neigen weiter auszudifferenzieren und somit ihr mögliches Stammzellpotential verloren geht, wird spätestens dann passagiert, wenn der Boden der Petrischale zu 80% bedeckt ist. Ein früheres Passagieren ist auch problemlos möglich. Die Häufigkeit des Passagierens richtet sich somit nicht nur nach der Anzahl der ausplattierten Zellen, sondern auch nach deren Proliferationsverhalten in Kultur. Hier werden die Zellen alle 4 bis 6 Tage passagiert und zum Ablösen die enzymatische Methode mit Hilfe von Accutase (PAA, Cölbe, Deutschland) angewendet.

Zunächst wird das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS (Biowest, Nuaille, France) gewaschen, um Zellrückstände und eventuelle Zelltrümmer zu entfernen. Der Puffer sorgt weiterhin dafür, dass das nun folgende Enzym richtig wirken kann, da im Kulturmedium enthaltene Calcium- und Magnesium-Ionen die in der Accutase enthaltenen Proteasen inhibieren und so die enzymatische Wirkung verhindern würden. Nach Absaugen des Puffers werden 2 ml Accutase zugesetzt und die Schale bei 37°C 3 min. im Brutschrank oder 5 min. bei RT inkubiert. Die Zeit reicht aus, um die Zellen vom Boden der Schale abzulösen. Nach der mikroskopischen Kontrolle, zum Nachweis, dass sich die Zellen abgelöst haben, werden diese in ein Falconröhrchen überführt, in dem 6 ml Medium vorgelegt sind. Dies geschieht, indem jeweils immer 1.000 µl der Zellsuspension in der Schale aufgenommen und über deren Boden herunter pipettiert werden, um auch noch evtl. verbliebene Zellen abzulösen. Sind alle Zellen in der Suspension, wird diese komplett in das Falconröhrchen verbracht. Dieses wird mit entsprechendem Gegengewicht bei Raumtemperatur 5 min. lang bei 800 rpm zentrifugiert (Varifuge RF, Heraeus, Hanau, Germany). Dieser Schritt ist notwendig, um ein Zellpellet am Boden des Röhrchens zu erhalten. Außerdem werden die Zellen

somit auch von der Accutase befreit, um in der neuen Schale wieder adhärent werden zu können. Nach der Zentrifugation ist ein Zellpellet am Boden des Falconröhrchens deutlich zu erkennen. Der aus Medium und Accutase bestehende Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen werden in die Neubauer-Zählkammer verbracht, um die Gesamtzellzahl in einem Milliliter Suspension zu bestimmen. Anschließend werden 2.000 Zellen/cm² in frischem Medium unter evtl. Zugabe von Wachstumsfaktoren ausgesät; das sind bei einer 100 mm Schale 113.400 Zellen. Die Schale wird im Brutschrank noch einmal leicht geschwenkt, um gleichmäßiges Verteilen des Mediums und der Zellen in der Schale zu gewährleisten und einem eventuellen Verklumpen der Zellen vorzubeugen. Im Rahmen des Passagierens wird bei einigen Schalen ebenfalls vor dem Absaugen eine 500 µl Probe des Mediums entnommen, um damit weitere Untersuchungen durchzuführen. Damit Veränderungen dokumentiert werden können, wird die Morphologie der Zellen und deren Wachstum regelmäßig unter dem Mikroskop visuell kontrolliert und im Anschluss fotografiert.

2.2.5 Kryokonservierung

Um die Zellen dauerhaft zu lagern, bietet sich die Methode der Kryokonservierung an. Hierbei werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wird zunächst wie unter 1.3 verfahren. Anstatt die Zellen dann aber nur mit dem Kulturmedium zu resuspendieren, wird jetzt sogenanntes "Freezingmedium" verwendet. Dieses besteht aus Kulturmedium und 10%-igem (v/v) Dimethylsulfoxid⁸ (Sigma, Deisenhofen, Germany), das vor Verwendung portioniert und bei -20°C eingefroren worden ist. DMSO ist eine Substanz, die die Zellen beim Einfrieren schützt, sogenannte Kryoprotektion. Das DMSO/Medium-Gemisch wird unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut und muss bei Benutzung eiskalt sein, d.h. um 0°C. Das Pellet wird mit der oben genannten Lösung resuspendiert und dann in ein Kryoröhrchen überführt. In einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter werden die Zellen jetzt vorsichtig um ein Grad Celsius pro Minute bis auf -80°C heruntergekühlt, bevor sie in einem Tank, der mit Flüssigstickstoff gefüllt ist, bei -196°C gelagert werden können.

⁸ DMSO

Die Kryokonservierung wird mit Zellen in allen Medien durchgeführt. Aber die Zellen sollen so nicht nur gelagert werden: um festzustellen, ob erneute Kryokonservierung an dem Verhalten der Zellen in Vergleich zur ebenfalls kryokonservierten Ursprungspopulation etwas ändert oder keinen Einfluss hat, werden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und für die folgenden Versuche verwendet.

2.2.6 Auftauen der kryokonservierten Zellen

DMSO schützt die Zellen zwar beim Einfrieren, wirkt allerdings zelltoxisch, wenn es in warmem Zustand mit ihnen in Berührung kommt. Daher sollte vom Moment des Auftauens der Zellen bis zu deren erneutem Ausplattieren nicht allzu viel Zeit vergehen. Das Kryoröhrchen wird dem Stickstofftank entnommen, circa eine Minute lang im Wasserbad erwärmt und der Inhalt, bestehend aus Zellen in Freezingmedium, sofort in ein Falconröhrchen, welches bereits 10 ml Kulturmedium enthält, überführt. Bei 800 rpm und Raumtemperatur wird die Suspension 5 min. lang zentrifugiert, bis sich am Boden des Röhrchens wieder ein Zellpellet absetzt. Für das weitere Vorgehen siehe 1.3.

2.2.7 Differenzierungsversuche

Um neben den Stammzeleigenschaften der Amniozyten auch deren Differenzierungspotential zu untersuchen, werden die Zellen mit unterschiedlichen Differenzierungsmedien inkubiert. In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf dem neuronalen Differenzierungsverhalten der Zellen, bzw. ob die neuronale Differenzierung stimuliert werden kann. Zu diesem Zweck werden hier zwei Kulturmedien mit unterschiedlichen Zusätzen verwendet:

Neuronales Differenzierungsmedium⁹ A (NM1): (pro 100ml)

10 ml Fetal Calf Serum (FCS) (Gold)
1 ml L-Glutamin (100x) (Gibco 25030-024)
1 ml Penicillin/Streptomycin (50 U/ml) (Gibco 15070-063)
1 ml N2 Supplement (Gibco 17502-048)
1 ml Fungizone (Sigma 1397-89-3)

Dulbecco's modified eagle medium¹⁰ (low glucose) / F12 (Verhältnis 1:1) ad 100 ml (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)

- unter Zugabe von je 2 µl EGF und bFGF pro 10 ml Medium direkt in die Kulturschale -

Neuronales Differenzierungsmedium¹¹ B: (pro 100ml)

10 ml Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco 10120-152)
1 ml L-Glutamin (100x) (Gibco 25030-024)
1 ml Penicillin/Streptomycin (50 U/ml) (Gibco 15070-063)
1 ml Fungizone (Sigma 1397-89-3)

Dulbecco's modified eagle medium (low glucose) / F12 (Verhältnis 1:1) ad 100ml

- unter Zugabe von 2,5 µl Retinsäure und 1 µl FGF8 pro 10 ml Medium direkt in die Kulturschale -

Diese Medien sollen auch hinsichtlich ihrer Differenzierungserfolge untereinander verglichen werden. Die Zellen werden wie unter 1.3 passagiert. Der einzige Unterschied besteht darin, dass sie dann in den oben aufgeführten Medien weiterkultiviert werden, es wird also jeweils eine 100 mm Schale mit NM1 und eine mit NM2 als Kulturmedium versetzt. Die Differenzierungsversuche (pro Medium n=3) laufen jeweils über einen Zeitraum

⁹ Zur Vereinfachung wird hierfür der Name mit NM1 (Nährmedium1) eingeführt

¹⁰ DMEM

¹¹ Zur Vereinfachung wird hierfür der Name mit NM2 (Nährmedium 2) eingeführt

von 4 Wochen, in denen die Zellen unter diesen Kulturbedingungen wachsen und sich differenzieren sollen. Innerhalb dieser 4 Wochen werden die Zellen weiterhin alle 4-6 Tage passagiert, ein Medienwechsel aber nur im Rahmen jeder neuen Passage durchgeführt, weitere Medienwechsel erfolgen nicht. Bei der letzten Passage innerhalb der 4-wöchigen Differenzierungszeit werden die Zellen nicht wie bisher in 100 mm Schalen gegeben, sondern für darauf folgende immunzytochemische Untersuchungen in 6er-Multischalen (Nunc, Wiesbaden, Germany) mit 1000 Zellen pro cm^2 ausplattiert. Täglich wird kontrolliert, wie dicht die Schalen bewachsen sind. Bei circa 60% Konfluenz werden die Zellen mittels Paraformaldehyd (VWR, Darmstadt, Germany) in 0,1M PBS fixiert und damit der jeweilige Differenzierungsversuch abgestoppt (siehe 2.1).

2.2.8 Kultivierung und Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen

Um einen zusätzlichen Einblick in das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellen in Kultur unter unterschiedlichen Bedingungen zu erhalten, werden zu den Kulturbedingungen, wie unter 1.2 beschrieben, zusätzlich noch hypoxische Bedingungen geschaffen, d.h. nach dem Passagieren der Zellen wird eine Schale in einer Atmosphäre mit einem erniedrigten Sauerstoffgehalt (3%) inkubiert. Dies geschieht mit Zellen in allen drei beschriebenen Medien.

Den erniedrigten Sauerstoffgehalt in der Umgebungsluft erreicht man, indem die Schalen in eine abgedichtete Gaskammer (Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA) verbracht werden. Mit einem Druck von 20 mbar und 15 l/min flutet man diese Kammer mit einem Gasgemisch, bestehend aus 3%O₂/5%CO₂/sowie N₂, täglich 10 min. lang und stellt sie danach in den Brutschrank. So wird ein ständiger Sauerstoffgehalt von 3% für die Zellen gewährleistet. Alle 3-4 Tage wird auch hier das Medium gewechselt bzw. passagiert und danach mit den Schalen wie oben geschildert erneut verfahren.

2.2.9 Untersuchung zum Proliferationsverhalten

Um eine vergleichbare Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Passagen, Kulturbedingungen und in unterschiedlichen Medien treffen zu können, wird jeweils ein Teil der Zellen im Rahmen des Passagierens in 32er Rasterschalen der Firma Nunc (8,8 cm², 220 Kästchen) mit einer Zellzahl von 500/cm² ausplattiert, dies entspricht einer absoluten Zellzahl von 4.400 Zellen zu Beginn der Untersuchungen. Am Boden der Schalen werden nach dem Zufallsprinzip vier Kästchen markiert, in denen die Zellen in regelmäßigen Abständen, circa alle 24 Stunden, ausgezählt werden. Zur Berechnung der Verdopplungszeit ist nicht nur die Zellzahl, sondern zusätzlich der genaue Zeitpunkt (in Stunden) seit der Aussaat zu dokumentieren. Zusätzlich wird auch noch die Zellmorphologie beurteilt, da nur morphologisch unauffällige, lebendige Zellen in die Auswertung mit einzubeziehen sind. Das Proliferationsverhalten lässt sich dann mittels Verdopplungszeit bestimmen, die anhand folgender Formel berechnet werden kann:

Verdopplungszeit =

$\ln(2) \times \text{Stunden in Kultur} / [\ln(\text{Zellzahl am Ende}) - \ln(\text{Zellzahl zu Beginn})]$

[Stunden in Kultur = ab Zeitpunkt 0 = Zeitpunkt der Aussaat

Zellzahl zu Beginn = 500/cm² = 4.400

Zellzahl am Ende = Mittelwert aus den 4 ausgezählten Kästchen x 220]

Auf diese Weise lassen sich problemlos direkte Vergleiche zwischen den einzelnen Kulturbedingungen und -medien und dem darin stattfindenden Zellwachstum ziehen.

2.2.10 Lichtmikroskopie

Alle in Kultur befindlichen Zellen werden regelmäßig hinsichtlich ihrer Morphologie, Proliferation und Differenzierung untersucht. Das geschieht an einem Inversmikroskop (Axiovert 100) der Firma Zeiss (Oberkochen, Germany).

2.3 Zellfixation mit Paraformaldehyd (PFA)

Das Fixieren der Zellen mit 4%igem PFA in 0,1 M PBS bereitet diese auf die folgenden immunzytochemischen Untersuchungen vor. Das Prinzip der Fixation beruht auf der Vernetzung von NH_2 -Gruppen membranöser und zellulärer Proteine durch Aldehyde. Diese beeinflussen die Zellstruktur nicht, so dass die Zellen in ihrer Struktur vollständig erhalten bleiben. Das Medium der in 6-Well ausplattierten Zellen wird vollständig abgesaugt. Nach Zugabe der 4%-igen PFA-Lösung werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C mindestens 20 min. fixiert und danach dreimal für jeweils 5 min. mit 0,05 M TBS gewaschen. Die fixierten Zellen lassen sich bei Bedarf in 0,05 M TBS bei 4°C über Nacht im Kühlschrank aufbewahren.

2.4 Immunzytochemie, Prinzip und Durchführung

2.4.1 Allgemeine Einführung

Die Immunzytochemie bezeichnet einen Prozess, bei dem Proteine eines bestimmten Typs in dem zu untersuchenden Gewebe lokalisiert und nachgewiesen werden können; hierbei binden speziell eingesetzte Antikörper¹² an diverse Antigene im Gewebe. Die Antikörper können mono- und polyklonalen Ursprungs sein. Primärantikörper richten sich gegen das zu detektierende Antigen und sind typischerweise unkonjugiert, während der Sekundärantikörper, an den in diesem Fall ein Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, gezielt an den Primärantikörper bindet und so unter dem Mikroskop sichtbar macht, ob das erwünschte Antigen tatsächlich in den Zellen vorhanden ist und nachgewiesen werden kann. Der Sekundärantikörper muss gegen das Immunglobulin G der Tierspezies gerichtet sein, in der der AK gezüchtet worden ist; dies sind hier, je nach AK, Maus oder Kaninchen (Tabelle 2.2). Die beschriebene Methode wird als indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet.

¹² abgekürzt mit AK

2.4.2 Versuchsbeschreibung

Um die Zellmembran für die Antikörper durchgängig zu machen, werden die Zellen für 15 min. mit einer Lösung aus 0,25%-igem Triton-X-100 (Serva, Heidelberg, Germany) in 0,05 M TBS behandelt. So können die Antikörper ins Zellinnere gelangen. Anschließend erfolgt ein erneuter dreimaliger Waschschrift mit 0,05 M TBS für jeweils 5 min. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, werden die Zellen mindestens 40 min. lang mit einer 5%-igen Rinderserumalbuminlösung (BSA) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in 0,05 M TBS inkubiert. Nun sind die Zellen so vorbereitet, dass die Zugabe des ausgewählten Primärantikörpers erfolgen kann.

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Anti-Nestin	Chemicon, Temecula, CA, USA	Monoklonal Maus	1:500
Anti-β3-Tubulin	Covance, Richmond, CA, USA	Polyklonal Kaninchen	1:4000
Anti-GFAP	Sigma, Deisenhofen, Germany	Monoklonal Maus	1:1000
Anti-Thy-1 (CD90)	Abcam, Cambridge, UK	Monoklonal Maus	1:800
Anti-α-Internexin	NovusBiologicals, Littleton, Co, USA	Polyklonal Kaninchen	1:2000
Anti-CD15	ATTC,Manassas, Virginia, USA	Polyklonal Kaninchen	1:10
Anti-A2B5	ATTC,Manassas, Virginia, USA	Monoklonal Maus	1:10
Anti-HNK 1	ATTC,Manassas, Virginia, USA	Monoklonal Maus	1:10
Anti-CD117(c-kit)	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Polyklonal Kaninchen	1:200
Anti-Vimentin	Sigma, Deisenhofen, Germany	Monoklonal Maus	1:100
Anti-E-Cadherin	CellSignaling Technology, Boston, MA, USA	Polyklonal Kaninchen	1:100
Anti- Neurofilament	Biogenics, Napa, Kanada	Monoklonal Maus	1:250
Anti-Cytokeratin	Sigma, Deisenhofen, Germany	Monoklonal Maus	1:1000
Tab. 2.1 : Für die immunzytochemischen Untersuchungen verwendeten primären Antikörper			

Die Antikörper werden entsprechend Tabelle 2.1 mit 0,8%-iger BSA-Lösung in 0,05 M TBS verdünnt und mit den Zellen inkubiert. Die Inkubation erfolgt entweder für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Nach ausreichend langer Inkubationszeit wird der restliche ungebundene Primärantikörper gut ausgewaschen, und zwar mindestens drei- bis viermal pro Minute mit 0,05 M TBS. Jetzt wird der Sekundärantikörper, in 0,05 M TBS verdünnt (siehe Tabelle 2.2), für 45 min. auf die Zellen gegeben und diese während der Einwirkzeit lichtgeschützt aufbewahrt.

Sekundärer Fluoreszenzantikörper	Verdünnung
Fluorolink™ Cy™3 gekoppelt goat anti-Maus IgG (H + L); Amersham, Piscataway, NJ, USA	1: 1000
Cy™3 gekoppelt goat anti-Kaninchen IgG (H + L); Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK	1: 2000
Tab.2.2: Verwendete sekundäre Antikörper mit der entsprechend eingesetzten Verdünnung	

Nach erneuter Waschung erfolgt die Markierung der Zellkerne mit dem Kernmarker Bisbenzimid Hoechst (HD) 33342 in der Endkonzentration 1 µg/ml in 0,05 M TBS für 10 min. Es handelt sich bei Hoechst Dye um einen spezifischen Farbstoff, der in doppelsträngiger DNA an adenin- und thymineiche Sequenzen bindet und dann blau fluoresziert, wenn man das zu untersuchende Material schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels eines HD-Filters betrachtet. Mit dieser Methode kann man lebende Zellen anhand ihres DNA-Gehaltes sortieren und bestimmen (Arndt-Jovin and Jovin, 1977).

Hoechst Dye muss auf Grund seiner teratogenen Wirkung nach der Inkubationszeit mit besonderer Sorgfalt ausgewaschen und gesondert entsorgt werden. Nun können die Zellen mit dem wässrigen Eindeckmedium Aqua Poly/Mount benetzt und mit einem Deckgläschen in der Multischale eingedeckt werden. Sie werden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany) betrachtet.

2.4.3 Von den verwendeten Antikörpern erkannte Proteine

*Anti-Cytokeratin:

Im intrazytoplasmatischen Zytoskelett von epithelialen Geweben wird dieses Intermediärfilament aus der Gruppe der Keratine gefunden. Anhand unterschiedlicher Cytokeratintypen lässt sich auf den Typ, die Entwicklungsstufe und den Differenzierungsgrad einer epithelialen Zelle schließen. Anti-Cytokeratin detektiert hier Cytokeratin als Marker für epitheliales Zellwachstum.

*Anti-Cadherin:

Cadherine sind calciumabhängige Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine. Sie bewirken Zellkontakte in verschiedenen Geweben und kommen in Desmosomen und Adhering junctions vor. Das hier im speziellen markierte E-Cadherin kommt ausschließlich in epithelialen Zellen vor und dient somit als spezifischer Nachweis von Zellkontakten epithelialen Gewebes.

*Anti-Vimentin:

Ein Mitglied der Familie der Intermediärfilamente. Es bildet zusammen mit Mikrotubuli und Aktin-Mikrofilamenten das Grundgerüst des Zytoskeletts. Vimentin ist die entscheidende Zytoskelettkomponente, wenn es um das Aufrechterhalten der Zellform, die Integrität des Zytoplasmas und die Stabilität von zytoskelettalen Interaktionen geht. Daher kann Vimentin im Zellverband der hier untersuchten AFDS in Kultur bei gemeinsamem Vorkommen mit Cytokeratin auch als Marker für das epitheliale Wachstum dieser Zellen gelten. Des Weiteren wird Vimentin als Marker für gliale Vorläuferzellen verwendet (Chu et al., 2006)

*Anti-CD 15 / Lewis X¹³ / SSEA-1¹⁴ :

Ein Kohlenhydratadhäsionsmolekül, welches u.a. Phagozytose und Chemotaxis vermittelt. CD15 ist ein Marker für pluripotente und multipotente Stammzellen, die aus der Keimzelle stammen, und weiterhin nützlicher Marker, um humane embryonale Stammzellen und ihre differenzierten Derivate, humane primordiale

¹³ Le(X)

¹⁴ Stage specific embryonic antigen 1

Keimzellen und embryonale Stammzellen der Maus zu detektieren (Fenderson et al., 2006; Muramatsu and Muramatsu, 2004; Yanagisawa and Yu, 2007). Ebenso wurde die SSEA-1 Expression in humanen embryonalen neuronalen Stammzellen nachgewiesen (Klassen et al., 2001).

*Anti-Thy-1¹⁵:

Ein Glycophosphatidylinositol (GPI) verankertes Zelloberflächenprotein mit einer einzelnen V-förmigen Immunglobulindomäne. Den Namen Thy-1 erhielt das Protein, da es ursprünglich als Thymozytenantigen entdeckt wurde. Thy-1 oder CD 90 gilt als spezifischer Oberflächenmarker für eine Vielzahl von Stammzellen und wird zusätzlich auch auf den Oberflächen von neuronalen Zellen und Gliazellen exprimiert (Kemshead et al., 1982).

*Anti-CD 117 / c-kit / SCF-Rezeptor :

CD 117 ist ein transmembranöser Rezeptor mit Thyrosinkinase-Aktivität. Er kommt u.a. in Gliazellen vor. Signaltransduktion, ausgelöst durch SCF¹⁶, erfolgt über Second-Messenger innerhalb der Zelle und spielt eine Rolle für deren Überleben, Proliferation und Differenzierung. Der CD 117 AK wird für die Detektion von Stammzellen, multipotenten Progenitorzellen und neuronalen Vorläuferzellen verwendet (Luo et al., 2003; Motohashi et al., 2007).

*Anti-Nestin:

Ein Intermediärfilamentprotein vom Typ 6, welches in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen vorkommt (Dahlstrand et al., 1995; Lendahl et al., 1990). Es wird in Nervenzellen in der Wachstumsphase der Axone exprimiert. Die Expression, die charakteristischerweise besonders in neuronalen Vorläuferzellen der subventrikulären Zone zu beobachten ist, ist lediglich transient und persistiert in der Regel nicht. Auch in frühen Entwicklungsstadien von ZNS und PNS (Dahlstrand et al., 1995; Sultana et al., 2000), Myoblasten (Kachinsky et al., 1994; Zimmerman et al., 1994), Skelettmuskelzellen (Sejersen and Lendahl, 1993) und Odontoblasten (About et al., 2000) lässt sich Nestin nachweisen. Die Nestinexpression wird herunterreguliert je weiter die

¹⁵ auch CD 90

¹⁶ cytokine stem cell factor

Differenzierung der einzelnen Zelltypen voranschreitet und dann durch andere gewebspezifischere Intermediärfilamentproteine ersetzt; während der Neuro- und Gliogenese z.B. durch zelltypcharakteristische Intermediärfilamente wie GFAP oder Neurofilament (Lendahl et al., 1990; Messam et al., 2000).

Interessanterweise lässt sich eine erneute Nestinexpression beobachten, wenn es durch pathologische Prozesse, wie z.B. ZNS-Verletzungen (Sahin et al., 1999) oder Epilepsie (Kruglyakova et al., 2005) im Hippocampusbereich zu Glianarben kommt. Trotz all dieser zusätzlichen Eigenschaften wird Nestin als genereller Marker für die Identifikation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen herangezogen.

*Anti- α -Internexin:

Dieses Typ-4-Intermediärfilamentprotein findet sich unter anderem während der frühen neuronalen Entwicklung (Wang et al., 2006).

*Anti-HNK1:

Das HNK-1 Kohlenhydrat wird charakteristischerweise auf einer Reihe von Zelladhäsionsmolekülen exprimiert, insbesondere ist die Expression zeitlich während der Entwicklung des Nervensystems reguliert und spielt eine wichtige Rolle in der Zellformation (Kleene and Schachner, 2004). Die Expression steigt während der Synaptogenese an und gilt somit als wichtiger Marker für Neurone, neuronale Zellinteraktionen und besonders für neuronale Vorläuferzellen.

Die Enzyme Glucosyltransferase GlcAT-P und GlcAT-S sind Schlüsselenzyme in der Biosynthese von HNK-1, und Mutationen in den entsprechenden Genloci werden sogar als Ursache für schizophrene Psychosen angenommen (Jeffries et al., 2003).

*Anti-A2B5 :

Ein Oberflächenmarker von Gliazellen, bzw. von Vorläuferzellen von Typ 2 Astrozyten und oligodendroglialen Vorläuferzellen (Cai et al., 2002).

*Anti-β-3-Tubulin:

Wird als neuronales Markerprotein verwendet. Die β-3-Tubulin mRNA ist exklusiv in den Zellkörpern vorhanden, während sich das Protein sowohl in Axonen als auch in Dendriten befindet.

*Anti-GFAP¹⁷:

Das saure Gliafaserprotein ist ein Typ-3-Intermediärfilamentprotein, das als Astrozyten- und Gliazellmarker verwendet wird (Eng et al., 2000). In unreifen Gliazellen und gliösen Tumoren ist GFAP mit Vimentin, einem anderen Typ-3-IF, co-lokalisiert. Im ZNS wird GFAP von Astrozyten exprimiert (Fuchs et al., 1994).

*Anti-Neurofilament:

Ein Intermediärfilament, welches in Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen vorkommt. Die Neurofilament-Expression nimmt mit steigendem neuronalen Differenzierungsgrad zu und ist am stärksten in reifen Nervenzellen ausgeprägt; daher gilt Anti-Neurofilament als Marker und Nachweis von Nerven- und Gliazellen (Baharvand et al., 2007; Portier et al., 1993).

¹⁷ GFAP: glial fibrillary acidic protein

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA- Isolierung

Die Gesamt-RNA der kultivierten Amniozyten in Standardmedium, NM1 und NM2 wird mit dem peqGOLD TriFast™-System der Firma peqlab-Biotechnologie (Erlangen, Germany) isoliert. Das System basiert auf der optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Extraktions-Methode. Die Zellen werden mit zunächst mit Accutase für 5 min. bei 37°C inkubiert, somit abgelöst, und anschließend zentrifugiert. Die weitere RNA-Gewinnung und Aufreinigung erfolgt nach dem Standardprotokoll der Firma peqLab für peqGOLD TriFast:

- Suspension bzw. eingefrorenes Pellet lysieren in 1ml TriFast pro $5-10 \times 10^6$ Zellen
- Wenn nötig, mit Spritze und Kanüle (20 G) homogenisieren
- 5 min. bei RT stehen lassen
- 200 µl Chloroform pro 1 ml TriFast dazugeben, kräftig schütteln (per Hand, ca. 15 sec.)
- 3-10 min. bei RT inkubieren (5 min.)
- Zentrifugieren: 12.000 g, 5 min., RT
- Drei Phasen: unten (rot): Phenol-Chloroform (DNA, Proteine),
Interphase (DNA, Proteine)
oben (farblos): wässrige Phase: RNA
- Obere, wässrige Phase abnehmen
- In ein neues Tube überführen (hier 500 µl Isopropanol pro 1 ml TriFast vorlegen)
- Vortexen
- 5-15 min. bei RT stehen lassen (10 min.)
- Zentrifuge kühlen (4°C)
- Zentrifugieren: 12.000 g, 10 min., 4°C
- Pellet sollte sichtbar sein
- Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Waschen: 2x1 ml EtOH (75%) pro 1 ml TriFast
- Vortexen

- Zentrifugieren: 12.000 g, 10 min., 4°C
- Ethanol abnehmen
- RNA bei RT trocknen lassen

Die gereinigte Gesamt-RNA wird in mit Diethylpyrocarbonat¹⁸ versetztem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren in Lösung ihr Absorptionsmaximum. Die Konzentration der Lösung ist proportional zur gemessenen Extinktion und kann unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung berechnet werden. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Durch Berechnung des $A_{260/280}$ -Quotienten lassen sich Verunreinigungen erkennen, die von in Lösung befindlicher DNA oder Proteinen stammen. Die Lösung sollte einen $A_{260/280}$ -Quotienten von 1,6- 1,8 aufweisen.

2.5.3 DNase-Verdau

DNase-I ist ein Enzym, das in der Lage ist, einzel- und doppelsträngige DNA abzubauen, ohne die während der Reaktion vorhandene RNA zu schädigen. Zur Beseitigung von möglichen DNA-Kontaminationen in der isolierten Gesamt-RNA wird daher ein DNase-Verdau durchgeführt. 2 µg Gesamt-RNA werden in 1x DNase-I-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit 2 U DNase-I (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms werden anschließend 2 µl EDTA (25 mM) zugesetzt. Die RNA kann dann direkt in der Reverse-Transkriptions-(RT)-Reaktion eingesetzt werden. Die Ausbeute von Gesamt-RNA aus den jeweiligen Kulturschalen ergibt zwischen 1.2 µg/ml und 2.6 µg/ml und liegt damit in ausreichender Menge für die Untersuchungen vor. Der $A_{260/280}$ -Quotient der Proben liegt zwischen 1,59 und 1,73; somit sind die Proben rein genug, um für die weitere Analyse verwendet zu werden.

¹⁸ DEPC

2.5.4 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird aus der RNA codogene DNA synthetisiert, die anschließend als Template für die PCRs dienen soll. 2 µg mit DNase-I verdaute Gesamt-RNA wird zur Aufhebung von Sekundärstrukturen zunächst in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel, Primus 96^{plus} (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) für 10 min. bei 65°C denaturiert und anschließend für genau 2 min. auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des RT-Mixes erfolgt bei 37°C im Thermocycler innerhalb von 60 min. die Synthese des komplementären codogenen DNA-Stranges durch das Enzym „Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase¹⁹“ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Als Primer werden Oligo-(dT)₁₈-Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) verwendet (siehe Tab 2.3).

Primer	Sequenz
Oct-4	sense 5'-GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA- 3' antisense 5'-TTCTGGCGCCCGTTACAGAACCA- 3'
Nanog	sense 5'-CGCAAAAAAGGAAGACAAGG- 3' antisense 5'-TGGTGGTAGGAAGAGTAGAGG- 3'
Sox-2	sense 5'-AGAGGAGAGAGAAAGAAAGGG- 3' antisense 5'-TGGGGGAAAAAAGAGAGAGG- 3'
NGF	sense 5'-ATACAGGCGGAACCACACTCAG- 3' antsense 5'-GTCCACAGTAATGTTGCGGGTC- 3'
BDNF	sense 5'-AGAGGCTTGACATCATTGGCTG- 3' antisense 5'-CAAAGGCACTTGACTACTGAGCATC- 3'
GDNF	sense 5'-CACCAGATAAAACAAATGGCAGTGC- 3' Antisense 5'-CGACAGGTCATCATCAAAGGCG- 3'
NT-3	sense 5'-GGGAGATCAAAACGGGCAAC- 3' antisense 5'-ACAAGGCACACACACAGGAC- 3'
Tab 2.3	Bei der RT verwendete Oligo-(dT) ₁₈ -Primer (MWG, Biotech, Ebersberg, Germany)

Zur Inaktivierung des Enzyms und zur Denaturierung des RNA/DNA-Doppelstranges wird der RT-Ansatz anschließend für 5 min. auf 90°C erhitzt. Die erhaltene cDNA kann dann sofort für die unterschiedlichen PCR-Experimente verwendet werden.

¹⁹ M- MLV RT

Zusammensetzung des RT- Mixes:

2 µg	RNA
1x	First- Strand Buffer (5x) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
10 mM	dNTP- Mix (Genecraft, Lüdinghausen, Germany)
0,5 µg	Oligo dT (MWG Biotech, Ebersberg, Germany)
0,1 M	DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
200 U	M-MLV- RT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
ad 50 µl	RNAse freies Wasser

2.5.5 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis der Transkripte unterschiedlicher Gene wird die PCR im Thermocycler nach dem unten angegebenen Programm durchgeführt. 4 µl des RT-Ansatzes werden mit genspezifischen Primern (Sequenzen siehe Tab 2.3) in der PCR eingesetzt. Die Reaktion wird mit 34 Zyklen von je 1 min. Denaturierung bei 94°C, 45 sec. Annealing bei 60°C und 1,5 min. Verlängerung bei 72°C durchgeführt. Der letzten PCR Amplifikation folgt ein erneutes Verlängern um 10 min. bei 72°C. Nach der Amplifikation werden die Transkripte mit 5x-DNA-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) versetzt und in einem 2%-igem (w/v) Agarose-Gel (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) elektrophoretisch aufgetrennt, welchem zusätzlich Ethidiumbromid (VWR, Darmstadt, Germany) in der Konzentration 670 ng/ml zugefügt wurde. Zur Bestimmung der Fragmentgröße der aufgetrennten PCR-Produkte wird zusätzlich ein 100 bp DNA-Marker (Genecraft, Lüdinghausen, Germany) bei jeder Elektrophorese aufgetragen. Als Housekeeping-Gen wird β -Aktin verwendet. Das Sichtbarmachen und die Dokumentation der Banden erfolgt unter UV-Licht (BioDoc II Transilluminator, Biometra, Göttingen, Germany).

PCR- Ansatz:

4 µl	RT- Ansatz (2 µg RNA in RT-Reaktion eingesetzt)
1x	PCR- Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
10 nM	dNTP-Mix (Genecraft, Lüdinghausen, Germany)
je x pmol	antisense/ sense genspezifische Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany)
2,5 U	Biotherm DNA-Polymerase (Genecraft, Lüdinghausen, Germany)
ad 50 µl	H ₂ O

PCR- Programm im Thermocycler:

94°C 10 min.
94°C 1 min.
Annealing 45 sec.
72°C 90 sec.
72°C 10 min.

DNA- Probenpuffer (5x):

25 mm Tris/ HCL (pH 7,0)
150 mm EDTA (Sigma, Deisenhofen, Germany)
0,05% Bromphenolblau (Sigma, Deisenhofen, Germany)
25% Glycerin (Sigma, Deisenhofen, Germany)

Zielgen- Primer	Konzentration	Annealing- Temperatur	Zyklen
β-Aktin-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
Oct-4-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
Nanog-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
Sox-2-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
NGF-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
BDNF-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
GDNF-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
NT-3-F/R	Je 25 pmol	60°C	34
Tab. 2.4: PCR- Bedingungen und Primerkombinationen			

2.5.6 Zu detektierende Gene bzw. Genabschnitte

*Oct-4:

Die Abkürzung Oct-4 steht für den Transkriptionsfaktor Octamer-4. Es handelt sich hierbei um einen Faktor, der an der Erneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen beteiligt ist. Oct-4 wird als Marker für undifferenzierte Zellen verwendet und gilt somit als Nachweis von Stammzellen (Niwa et al., 2000; Prusa et al., 2003).

*Nanog:

Ein Gen, welches in embryonalen Stammzellen exprimiert wird. Es stellt einen Schlüsselfaktor dar, der es Zellen möglich macht, ihre Pluripotenz zu erhalten. Dieser Marker ist zusammen mit Oct-4 einer der wichtigsten Stammzellmarker

für Zellen, die in der Lage sind, sich *in vivo* und *in vitro* in Derivate aller drei Keimblätter zu differenzieren (Zhang et al., 2006). Ein Verlust von Nanog führt zur Differenzierung von Stammzellen in andere Zelltypen (Li et al., 2006).

*Sox-2:

Essenzieller Transkriptionsfaktor für embryonale Stammzellen. Er gilt als Charakteristikum für pluripotente Zellen und wird deshalb als Stammzellmarker verwendet (Qi and Pei, 2007). Des Weiteren ist Sox-2 ein Marker für multipotente neuronale Stammzellen (Ellis et al., 2004), neurale Vorläuferzellen (Graham et al., 2003) und Astrozyten (Komitova and Eriksson, 2004).

*BDNF, NGF, NT-3:

Die Neurotrophine BDNF²⁰, NGF²¹ und NT-3²² sind aus dem menschlichen Gehirn stammende Proteine, welche untereinander deutliche Sequenzhomologie aufweisen und viele Neuronenarten im ZNS beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass sie an dem Überleben und Wachstum von sensiblen Ganglienzellen, dopaminergen, cholinergen und GABA-ergen Neuronen und Motoneuronen beteiligt sind (Henderson, 1996). BDNF wird vorwiegend in Gehirn und Rückenmark von Gliazellen produziert (Leibrock et al., 1989), aber auch Schwannzellen, die mit peripheren Motoneuronen assoziiert sind, zeigen eine deutliche BDNF-Produktion (Acheson et al., 1991).

Das Vorkommen dieser Neurotrophine ist also ein deutlicher Indikator für das Differenzierungspotential in eine Nervenzelle oder dementsprechend für das Vorliegen einer ausdifferenzierten neuronalen Zellpopulation (Tolkovsky, 1997).

*GDNF:

Der sogenannte "Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor" wurde 1993 von Lin entdeckt und nachgewiesen, dass er einen potenten Überlebensfaktor für dopaminerge Neurone darstellt (Lin et al., 1993). Seitdem wurde weiter gezeigt, dass es sich bei GDNF zusätzlich um einen lebensnotwendigen Wachstumsfaktor für spinale Motoneurone (Henderson et al., 1994;

²⁰ brain-derived-neurotrophic-factor

²¹ Nerve Growth Faktor

²² Neurotrophin-3

Oppenheim et al., 1995), für noradrenerge Neurone im Bereich des Nucleus coeruleus (Arenas et al., 1995) und für Gruppen von peripher sensorischen, sympathischen und parasympathischen Neuronen handelt (Buj-Bello et al., 1995). Wie die oben aufgeführten Neurotrophine ist also auch GDNF ein selektiver Faktor, den nur Nervenzellen oder deren Vorläuferzellen produzieren können.

2.6 ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

2.6.1 Ziel der ELISA Untersuchungen

Um neben der qualitativen Aussage der RT-PCR auch noch eine quantitative Aussage treffen zu können, werden per ELISA NGF und BDNF quantitativ analysiert, stellvertretend für die in der RT-PCR detektierten neurotrophen Faktoren.

2.6.2 Allgemeine Einführung und Versuchsbeschreibung

Bei dem verwendeten E_{max}[®] ImmunoAssay System (Promega, Mannheim, Germany) handelt es sich um das sogenannte Sandwich-ELISA-System, dem die sensitive (Minimum 15,6 pg/ml der gesuchten Faktors) und spezifische Detektion der gewünschten Substanz, hier der neurotrophen Faktoren NGF und BDNF, im Sandwich-Format zu Grunde liegt. Die gewünschten Faktoren werden mit einer Spezifität von mehr als 97 % detektiert, da es in weniger als 3% zu Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen neurotrophen Faktoren kommt.

96er-Wells (Promega, Mannheim, Germany, # 7630) werden zunächst mit Anti-NGF oder Anti-BDNF-Antikörper beschichtet, der dann den in den unterschiedlichen Proben enthaltenen Faktor bindet. Die restlichen freien Bindungsstellen in der Platte werden anschließend mit Sample-(1x)-Puffer blockiert, um falsch-positiven Ergebnissen vorzubeugen. Dann werden die Proben zugegeben, der gesuchte Faktor gebunden und mit einem weiteren spezifischen Antikörper (AK) markiert. Dieser AK wiederum bindet einen Spezies-spezifischen Antikörper, an den Horseradish-Peroxidase (HRP)

gekoppelt ist. Inkubiert man nun den Inhalt der Wells mit einem chromogenen Substrat, hier TMB-One-Lösung, findet eine Reaktion mit der HRP statt und es entsteht eine Farbveränderung, anhand derer man den Gehalt des gesuchten Faktors messen kann; dieser ist proportional zur Farbveränderung, ausgelöst durch die Red-Ox-Reaktion der Peroxidase mit der TMB-One-Lösung. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird die jeweilige Absorption der Probe gemessen und mit der parallel dazu hergestellten Standardkurve verglichen. So lässt sich der exakte Gehalt des gesuchten Faktors bestimmen.

2.6.3 Detailliertes Versuchsprotokoll nach dem E_{max}[®] ImmunoAssay System am Beispiel von BDNF

- Beschichtung der Platte: 5 µl Anti-BDNF mAK in 5 ml Coating-Buffer lösen, davon in jedes Well 100 µl geben
- Über Nacht bei 4°C inkubieren
- Platte ausklopfen und 1 x mit TBST waschen
- Blocken der Platte: 42,4 ml H₂O dest. und 10,6 ml Block-and-Sample Buffer²³-(5X) steril entnehmen, mischen und 200 µl dieser BaSB-(1X) Lösung in jedes Well geben
- Bei RT für 60 min. inkubieren
- Platte ausklopfen, 1 x mit TBST waschen und Standardkurve zugeben
- Präparieren der Standardkurve: BDNF Standard in BaSB 1:2000 verdünnen,
in die ersten Wells 200 µl zugeben, die restlichen mit 100 µl BaSB füllen und dann jeweils 100 µl aus den vorigen Wells den nachfolgenden zufügen, so entstehen die nachfolgenden Konzentrationen (Grafik 2.5).
- Zugabe der Proben: In Reihe A 100 µl unverdünnte Proben zugeben und dann jeweils mit BaSB-(1X) im Verhältnis 1:2 und 1:4 verdünnen und in B und C geben (Restliche Probenverteilung siehe 2.6.5)
- Für 2 Std. bei RT auf Schüttler inkubieren
- 5 x für 2 min. mit TBST waschen, Platte jeweils ausklopfen
- Anti-BDNF pAK zugeben: 10 µl Anti-BDNF in 4.990 µl BaSB-(1X) lösen und dann je 100 µl/Well auf die Platte geben

²³ BaSB

- 5 x für 2 min mit TBST waschen, Platte ausklopfen
- Zugabe von Anti-IgY-HRP-Konjugat: 25 µl Anti-IgY-HRP-Konjugat in 4.975 µl BaSB-(1X) lösen und 100 µl in jedes Well geben
- Für 1 Std. bei RT auf Schüttler inkubieren
- 5 x für 2 min. mit TBST waschen, Platte ausklopfen
- Entwickeln der Farbe: 100 µl von der auf RT erwärmten TMB-One-Lösung in jedes Well geben, bei RT auf Schüttler 10 min. inkubieren → Inhalt der Wells wird blau. Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1N HCl abstoppen → Inhalt der Wells wird gelb
- Absorptionsmessung: bei 450 nm innerhalb von 30 min. nach Reaktionsende die Absorption der unterschiedlichen Proben messen

Für die Absorptionsmessung verwendete Software:

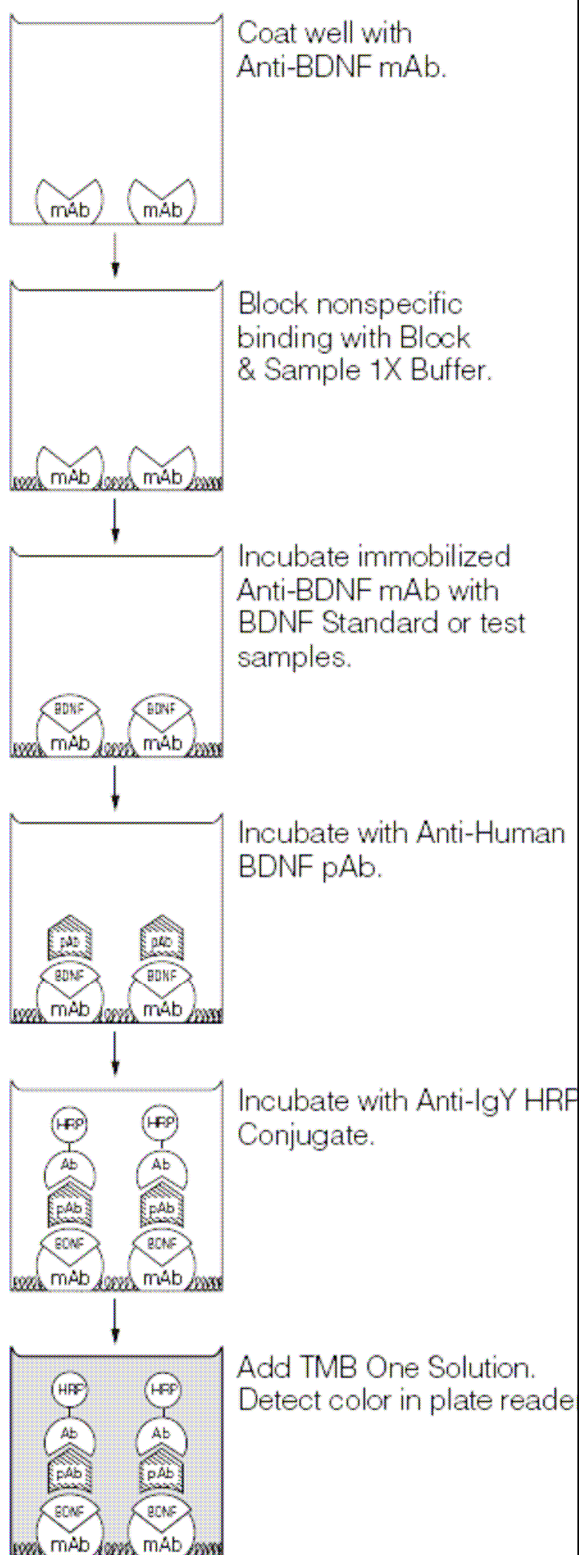
Revelation (Version 4.2.1), Dynex Technologies, Chantilly,VA,USA

	Test Samples										BDNF Standard Curve		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	pg/ml
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	500
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	250
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	125
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	62.5
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	31.3
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	15.6
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	7.8
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0

Abb. 2.5 ELISA-Platte für Standardkurve und Proben
© Promega, Mannheim, Germany

Der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung des NGF-E_{max}®Immunoassay (Promega, Mannheim, Germany) unterscheidet sich nur geringfügig von dem oben aufgeführten Protokoll, so dass ich an dieser Stelle auf www.promega.com, NGF-E_{max}®Immunoassay Technical Bulletin #226 verweisen möchte.

2.6.4 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung am Beispiel des Protokolls für den BDNF E_{max}®Immunoassay



Schematische Darstellung des BDNF ImmunoAssay aus Technical Bulletin #257,
© Promega, Mannheim, Germany

2.6.5 Verwendete Substanzen, Puffer und Lösungen

BDNF Assay (#G7610)

Anti-BDNF mAb
Block-and-Sample-(5x)-Buffer
BDNF-Standard
Anti-human-BDNF pAb
Anti-IgY HRP Conjugate
TMB-One-Solution

NGF Assay (#G7630)

Anti-NGF pAb
Block-and-Sample-(5x)-Buffer
NGF-Standard
Anti-NGF mAb
Anti-Rat IgG, HRP Conjugate
TMB-One-Solution

Alle Substanzen für den BDNF- und NGF-Assay stammen von Promega, Mannheim, Germany

Carbonate Coating Buffer, pH 9.7

0,025 M	Natriumbicarbonat
0,025 M	Natriumcarbonat
mit 1 N	HCl oder 1N NaOH auf pH 9.7 einstellen

TBST Wash Buffer, pH 7.6

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
0.05% (v/v)	Tween® 20

2.6.6 Für die E_{max}® ImmunoAssays verwendete Proben

Um herauszufinden, ob und in welchem Maße die immortalisierten AFDS neurotrophe Faktoren sezernieren, werden zu verschiedenen Passagen in den jeweiligen Medien die Überstände gesammelt und bei –80°C eingefroren. Untereinander verglichen werden soll die neurotrophe Sekretion der Zellen in den verschiedenen Medien (Standardmedium, NM1 und NM2). Die Überstände werden bei dem Standardmedium in den Passagen 2, 6, 10 und 13 und bei NM1 und NM2 in den Passagen 2, 8 und 13 abgenommen. Als Positivkontrolle wird Astrozytenüberstand verwendet. Die Verteilung der Proben (siehe auch Grafik 2.5) lautet dann:

Standardmedium (10 ml FCS, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Penicillin/Streptomycin, α MEM)

StP02	unverdünnt	→ A1+2
StP02	Verdünnung 1:2	→ B1+2
StP06	unverdünnt	→ C1+2
StP06	Verdünnung 1:2	→ E1+2
StP10	unverdünnt	→ F1+2
StP10	Verdünnung 1:2	→ G1+2
StP13	unverdünnt	→ A3+4
StP13	Verdünnung 1:2	→ B3+4
StP13	Verdünnung 1:4	→ C3+4

NM1 (10 ml FCS, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Pen/Strep, DMEM/Ham`sF12, 1 ml N2+EGF+bFGF)

NM1P02	unverdünnt	→ E 3+4
NM1P02	Verdünnung 1:2	→ F 3+4
NM1P02	Verdünnung 1:4	→ G 3+4
NM1P08	unverdünnt	→ A 5+6
NM1P08	Verdünnung 1:2	→ B 5+6
NM1P08	Verdünnung 1:4	→ C 5+6
NM1P13	unverdünnt	→ E 5+6
NM1P13	Verdünnung 1:2	→ F 5+6
NM1P13	Verdünnung 1:4	→ G 5+6

NM2 (10 ml FCS, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Pen/Strep, DMEM/Ham`sF12+RA+FGF-8)

NM2P02	unverdünnt	→ A 7+8
NM2P02	Verdünnung 1:2	→ B 7+8
NM2P02	Verdünnung 1:4	→ C 7+8
NM2P08	unverdünnt	→ E 7+8
NM2P08	Verdünnung 1:2	→ F 7+8
NM2P08	Verdünnung 1:4	→ G 7+8
NM2P13	unverdünnt	→ A 9+10
NM2P13	Verdünnung 1:2	→ B 9+10
NM2P13	Verdünnung 1:4	→ C 9+10

Astrozytenüberstand als Positivkontrolle

AÜ	unverdünnt	→ E 9+10
AÜ	Verdünnung 1:2	→ F 9+10
AÜ	Verdünnung 1:4	→ G 9+10
AÜ	Verdünnung 1:8	→ H 9+10

Standardkurve

Von A bis H 11+12, Konzentrationen siehe Grafik 2.5

2.7 Stereotaktische Implantation

2.7.1 Vorbereitung der Zellen und Markieren mit GFAP

Ein adenoviraler Vektor der dritten Generation wird nach der Beschreibung von Dinser (Dinser et al., 2001) generiert. Der Vektor HC-Ad.FK7 exkrimiert GFP²⁴. 48 Stunden vor der Injektion werden die Zellen mit einer Virusstocklösung inkubiert, die eine Konzentration von 2×10^6 infektiösen Einheiten/ μ l enthält (ca. 50 MOI²⁵ pro Einzelzelle). Dazu wird der Vektor einfach der Kulturschale mit den mit Medium bedeckten Zellen zugesetzt, es handelt sich hierbei um die AFDS in Standardmedium.

24 Stunden nach der Infektion wird die Transduktionseffizienz bestimmt, indem die EGFP-positiven Zellen unter der Fluoreszenzlampe im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl, sichtbar gemacht durch Hoechst Dye Kernfärbung, ausgezählt werden (siehe Kapitel Immunzytochemie). Diese ist ausreichend, und so können die Zellen für den Injektionsversuch verwendet werden.

Unmittelbar vor der Injektion werden die Zellen von Medium befreit und durch Inkubation mit Accutase (PAA, Cölbe, Germany) abgelöst. In 8 ml Kulturmedium aufgenommen (Standardmedium: 10% FCS, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Penicillin/Streptomycin, α MEM), werden die Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 U/min 5 min. lang zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in 1 ml Basalmedium (Alpha Modification of Eagle's Medium (PAA, Cölbe, Germany)) ohne weitere Zusätze wie FCS oder Antibiotika resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt, das Volumen, welches 60.000 Zellen enthält errechnet, aus der Suspension abpipettiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt, erneut zentrifugiert, bis sich ein Zellpellet abgesetzt hat, dann in 5 μ l Basalmedium resuspendiert und sofort auf Eis gelegt; pro durchgeführter Injektion werden 60.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 5 μ l benötigt.

²⁴ enhanced green-fluorescent Protein – EGFP

²⁵ multiplicities of infection

2.7.2 Durchführung

Für die Injektion werden sechs 8-12 Wochen alte Wistar-Ratten (250-300g schwer) verwendet. Anästhesiert mit einem Gemisch aus 6 mg/kgKG²⁶ Xylazine und 60 mg/kgKG Ketamin (Ratiopharm, Ulm, Germany) werden die Ratten vorsichtig in einen Stereotaxierrahmen (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) eingespannt, nachdem sichergestellt ist, dass die Narkosetiefe ausreicht (Verlust der Nozizeption). Der Schädel wird präzise fixiert, das Schädeldach plan ausgerichtet, der Kopf über dem Scheitel geschoren und anschließend desinfiziert. Es erfolgt eine 0,2-0,5 mm lange Inzision mittels Einwegskalpell genau 2 mm lateral des Bregmas der Ratte und die Entfernung des Periosts. Mit Hilfe des Stereotaxierrahmens wird nun die Position für die Trepanation der Schädeldecke eingestellt, indem die Spritzenkanüle genau über dem Bregma in Position 0 gebracht wird. Von dort aus lassen sich die exakten Koordinaten für die Injektion ausrichten. In diesem Fall werden die Zellen ins rechte Striatum injiziert, daraus ergibt sich folgende Einstellung laut stereotaktischem Rattenanatomieatlas von Paxinos und Watson (1996):

Bregma = 0

AP (anterior-posterior): 0mm

ML (medio-lateral): -3.5 mm (rechts)

DV (dorso-ventral): -5.4 mm

Mit Hilfe eines Dentalbohrers wird exakt über dem angegebenen Punkt ein Loch durch die Schädeldecke gebohrt, ohne die Hirnhaut zu verletzen. Die in Suspension befindlichen GFP-markierten Zellen (5 µl) werden in eine Spritze aufgezogen, die Kanüle vorsichtig aufgesetzt und, ausgehend von der Dura, langsam 5,4 mm ventral in das Gehirn vorgeschoben. Ist das Striatum erreicht, werden den Tieren diese 60.000 Zellen über einen Zeitraum von 5 min injiziert. Nach der Injektion wird die Kanüle noch 2 min. in ihrer Position belassen, um ein Angleichen an den finalen Injektionsdruck zu ermöglichen, dann vorsichtig und langsam aus dem Gewebe entfernt. Die Hautwunde wird mit einem monifilen 1-0 Polysorb Faden in Einzelnahttechnik vernäht und Nebacetin® Wundsalbe auf die Wunde gegeben. Präventiv erfolgen täglich Cyclosporin-A-Injektionen (10 mg/kgKG) zur Immunsuppression, um das Abstoßen der Zellen zu verhindern und Infektionen vorzubeugen. Nach 14 (n=3) und 30 (n=3) Tagen

²⁶ mg pro kg Körpergewicht

werden die Tiere in tiefer Narkose (s.o.) durch intrakardiale Perfusion getötet. Zur Perfusion werden PBS, Heparin und Procainhydrochlorid, gefolgt von gepuffertem PFA (4%-ig), verwendet.

Alle oben beschriebenen Tierversuche werden nach den Richtlinien der Bundesrepublik Deutschland und nach bestem Wissen und Gewissen mit ausdrücklicher Genehmigung der Universität zu Köln durchgeführt.

2.7.3 Succrose-Einbettung

Die Gehirne werden nach der Perfusion in toto entnommen und dann für 24 Stunden bei 4°C in 4%-igem PFA nachfixiert. Zum Auswaschen der Fixierlösung werden die Gehirne anschließend am nächsten Tag mehrmals mit 0,1 M PBS (pH 7,4) gewaschen und darin auch über Nacht belassen. Um die Struktur des Gewebes durch Reduktion von Kristallbildung besser erhalten zu können, wird es 24 Stunden lang bei 4°C in einer 18 %-igen Succroselösung in 0,1 M PBS inkubiert und dann in Aluminiumfolie bei -80°C eingefroren. Anschließend werden mit einem Kryostaten (Jung, Frigocut 2800E, Leica) 8 µm dünne Transversalschnitte 5 mm vor und hinter der Injektionsstelle angefertigt, um die Integration, Migration und Differenzierung der intrastrial injizierten AFDS beurteilen zu können. Die Schnitte werden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (zur besseren Haftung des Gewebes) verbracht und können nun bei -20°C für die Immunzytochemie aufbewahrt werden. Für das weitere immunzytochemische Vorgehen siehe 2.4.2.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellmorphologie der Amniozyten in Standardmedium

Um die immortalisierten, vorher kryokonservierten AFDS morphologisch zu charakterisieren, werden diese regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert und fotografiert. Die hier aufgeführten Zellen werden in Standardmedium, 10%-igem α MEM, kultiviert. Mit voranschreitender Kulturdauer verdichtet sich sichtbar die Zellzahl in den Kulturschalen und es erfolgt eine deutlichere Ausprägung der Zellkontakte der einzelnen Zellen untereinander, siehe Abbildung 7 im Vergleich zu Abbildung 6. Interessanterweise können die Zellen stetig weiter passagiert werden und weisen durch die Immortalisierung keine Limitation hinsichtlich ihrer Passagenanzahl auf.

Des Weiteren zeigen die Zellen unabhängig von der Passagenummer ein morphologisch identisches Wachstum, und auch in ihrem Verhalten in Kultur fallen keine gravierenden Unterschiede auf.

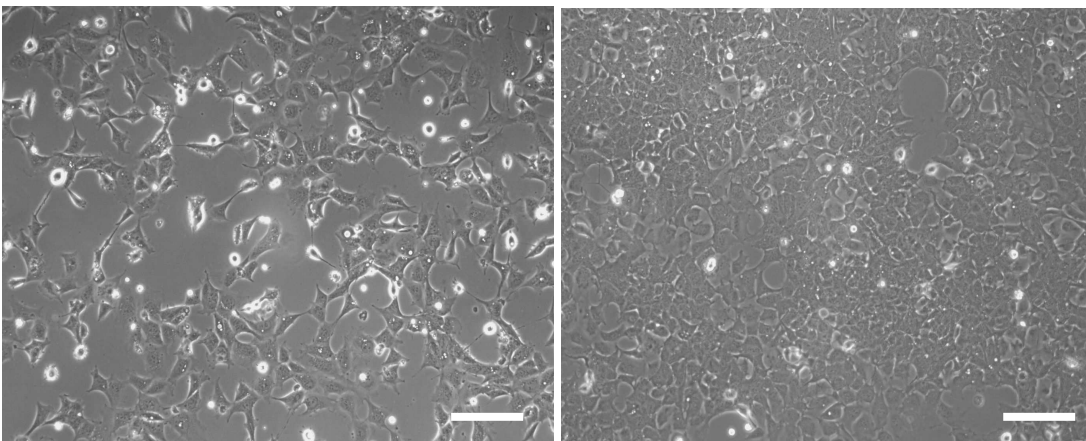


Abb.6: Zelldichte nach 3 Tagen in Kultur **Abb.7:** Zelldichte nach 6 Tagen in Kultur
AFDS in Standardmedium, P3 (200x bzw. 100x)

Die Untersuchung dieser undifferenzierten Zellen ergeben, dass diese homogen die typische Form epithelialen Wachstums *in vitro* aufweisen.
(Maßstab: Balkenlänge = 10mm)

Weiterhin zeigen die Zellen charakteristischerweise inselartiges, in Gruppen zusammenhängendes Wachstum polygonaler Morphologie. Es kommt zur Ausbildung deutlicher Zellkontakte zu benachbarten Zellen, welche sich mit zunehmender Dauer der Kultur immer stärker ausprägen.

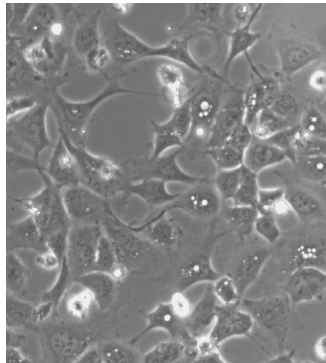


Abb.8: Zelldichte nach 5 Tagen in Kultur. AFDS in Standardmedium, Passage 3 (200x). Sichtbar sind hier besonders die polygonale Form der Zellen und die Zellkontakte.

3.1.2 Verhalten und Morphologie nach erneuter Kryokonservierung und anschließendem Auftauen

Die Zellen werden in kryokonserviertem Zustand vom Labor für Zellbiologie entgegengenommen und weiterkultiviert. Dennoch ist es interessant zu erfahren, ob wiederholtes Einfrieren das Zellverhalten und die Morphologie verändert oder ob es kein Problem darstellt, die Zellen mehrfach zu kryokonservieren und aufzutauen. Zu diesem Zweck werden diese Versuche durchgeführt. Als Ergebnis zeigt sich, dass die Zellen unabhängig von der Anzahl der Kryokonservierungen oder anschließendem Auftauen stets ihre typisch inselartige, polygonale Charakteristik beibehalten und somit keine Alteration vorliegt.

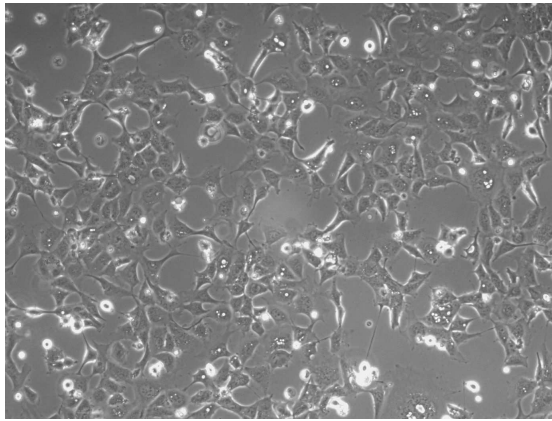


Abb.9: AFDS in Standardmedium nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen. Im direkten Vergleich mit Abb. 1-3 findet sich kein morphologischer Unterschied.

3.1.3 Untersuchung des Differenzierungsverhaltens in Bezug auf die Zellmorphologie in den neuronalen Medien

3.1.3.1 Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF

Die Zellen werden auch hinsichtlich ihrer Morphologie in dem neuronalen Differenzierungsmedium A (NM1) untersucht und mit den Zellen im Standardmedium verglichen.

Die Zellen in NM 1 formieren sich in Zellgruppen und zeigen typische Phänotypen epithelialer Zellen. Zu beobachten ist jedoch, dass sich mit zunehmender Passagenzahl, und somit Dauer der Kultur im Differenzierungsmedium, die überwiegend polygonalen epithelialen Morphologien zugunsten von eher typisch glialen Morphologien ändern, was sich durch zahlreiche Fortsätze an den Zellkörpern verdeutlicht. Hier lässt sich bereits visuell feststellen, dass die Zellen ausdifferenzieren.

3.1.3.2 Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF-8 und Retinsäure

Die gleichen Beobachtungen wie unter 3.1.3.1 lassen sich ebenfalls unter Zugabe des Differenzierungsmediums B (NM2) machen. Es sind Fortsätze am Zellkörper zu erkennen, und es zeigt sich eher gliale Charakteristik. Auch hier verändern die Zellen ihre Form im Zuge der beginnenden Ausdifferenzierung. Die Unterschiede in der Morphologie verdeutlichen die Abbildungen 10-13.

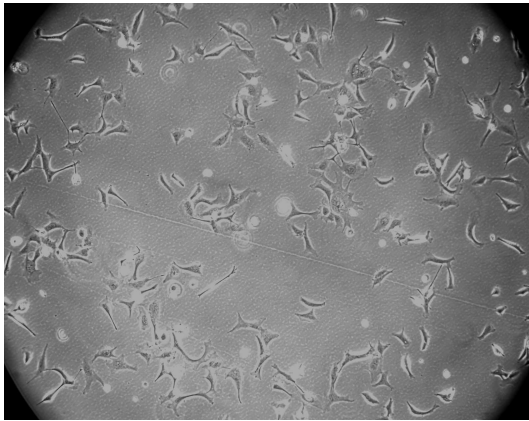


Abb.10

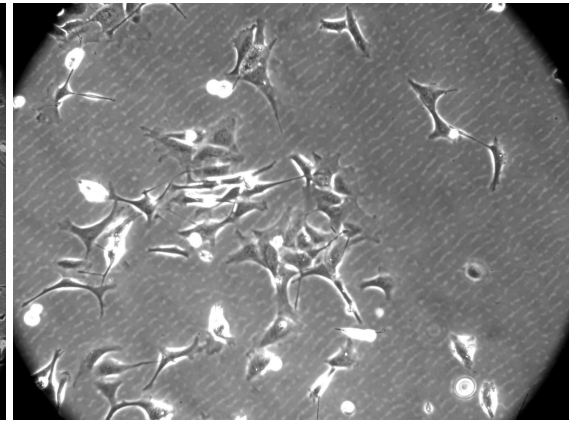


Abb.11

AFDS in den jeweiligen Differenzierungsmedien in P4 (Abb. 5 in NM1 [100x]; Abb. 6 in NM2 [200x]) zu Beginn der Differenzierungsversuche.

Die Zellen zeigen, wie auch die AFDS in Standardmedium, polygonales Wachstum und formieren sich in Zellgruppen. Ein morphologischer Unterschied im direkten Vergleich der beiden Differenzierungsmedien miteinander ist visuell nicht auszumachen.

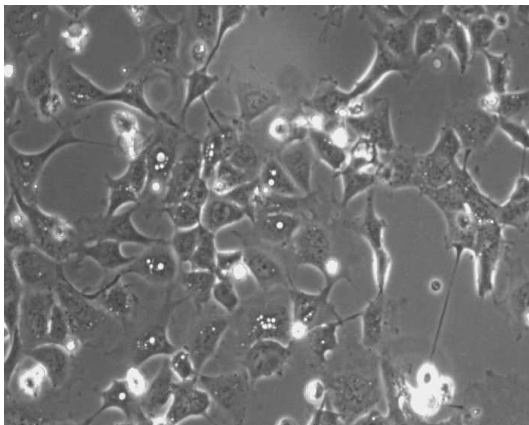


Abb.12: AFDS in NM1 (200x)

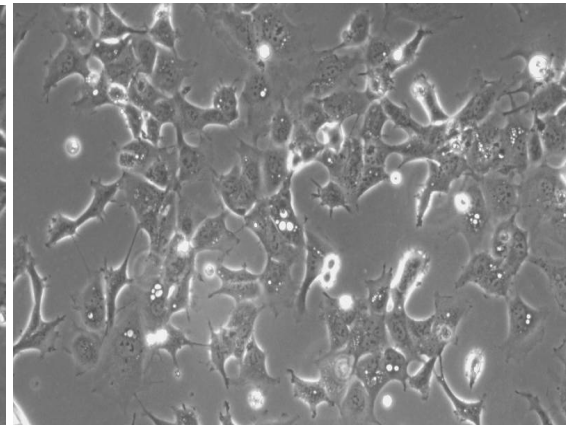


Abb.13: AFDS in NM2 (200x)

Zum Zeitpunkt n=14 Tage lassen sich in beiden Differenzierungsmedien teilweise gliaartige Fortsätze an den Zellkörpern erkennen, die Zellen sehen im Vergleich zu vorher und im Vergleich zum Standardmedium deutlich verändert aus.

Bei näherer Betrachtung eines Zellclusters von Zellen 14 Tage nach Differenzierungsinduktion am Beispiel von NM1 fällt deutliches Auswachsen von glia-artigen Fortsätzen aus den Zellkörpern auf. Auch der direkte Vergleich mit den oben präsentierten Abbildungen in Standardmedium wirft deutliche Unterschiede im Bereich der Morphologie auf. Diese Zellen (Abb.14) haben ihre typische polygonale Form und ausschließlich epitheliale Charakteristik verloren und beginnen sich in die neuronale Richtung zu differenzieren.

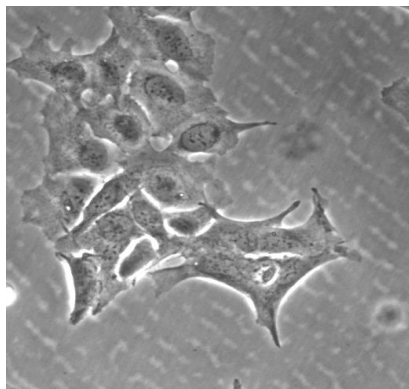


Abb.14: Zellcluster 14 Tage nach Differenzierungsinduktion (NM1), (300x). Die glia-artigen Fortsätze sind deutlich zu sehen.

3.1.4 Proliferationsergebnisse

Unter unterschiedlichen Kulturbedingungen wird das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Es erfolgen Gegenüberstellungen jeweils von Standard- und hypoxischen Bedingungen (siehe Material und Methoden) innerhalb eines Mediums. Später sollen auch die einzelnen Medien untereinander verglichen werden.

Die Zellen werden zu den angegebenen Stunden genau ausgezählt, die Zellzahl bestimmt und der Zeitpunkt seit der Aussaat gegen die Gesamtzellzahl aufgetragen. Anschließend können dann die Verdopplungszeiten nach der unter 2.2.9 angegebenen Formel exakt berechnet und miteinander verglichen werden.

Nach Auswertung dieser Daten lässt sich das Wachstumsverhalten der Zellen genau analysieren. Man erhält Aufschluss, welche Zellpopulation in welchem

Medium unter welchen Kulturbedingungen am besten oder schlechter bzw. gar nicht wächst. Die Versuche werden pro Versuchsansatz und Medium jeweils mehrfach durchgeführt. Da sich die Ergebnisse allerdings nur minimal unterscheiden, wird für das Proliferationsverhalten in allen Medien jeweils Passage 6 graphisch ausgewertet. Für die Verdopplungsraten werden die Passagen 2, 4, 8 und 13 in den neuronalen Medien und 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 13 im Standardmedium stellvertretend für alle Passagen, in denen die Versuche ebenfalls stattfanden, zur graphischen Auswertung herangezogen.

3.1.4.1 Proliferation in Standardmedium unter Normalbedingungen und Hypoxie

Die hypoxischen Bedingungen werden geschaffen, um das Proliferationsverhalten einmal unter weniger Sauerstoff zu beobachten und mit den Normalbedingungen vergleichen zu können. Es wird angenommen, dass sich die Zellen unter Hypoxie schneller vermehren können, da sie aufgrund ihrer natürlichen Herkunft an eine Umgebung niedrigen Sauerstoffgehaltes adaptiert sein müssen. Um dies genauer zu untersuchen und dann entweder widerlegen oder bestätigen zu können, werden die nun folgenden Versuche exakt gleich, nur mit der Vorgabe des unterschiedlichen Sauerstoffgehalts, durchgeführt.

Wie oben erwähnt, unterscheiden sich die Versuchsergebnisse der Kulturen zu unterschiedlichen Passagen untereinander nicht nennenswert, deshalb die nähere Betrachtung von Passage 6. Zunächst wird das Zellwachstum im Standardmedium (10 % α MEM) unter den jeweiligen Bedingungen verglichen.

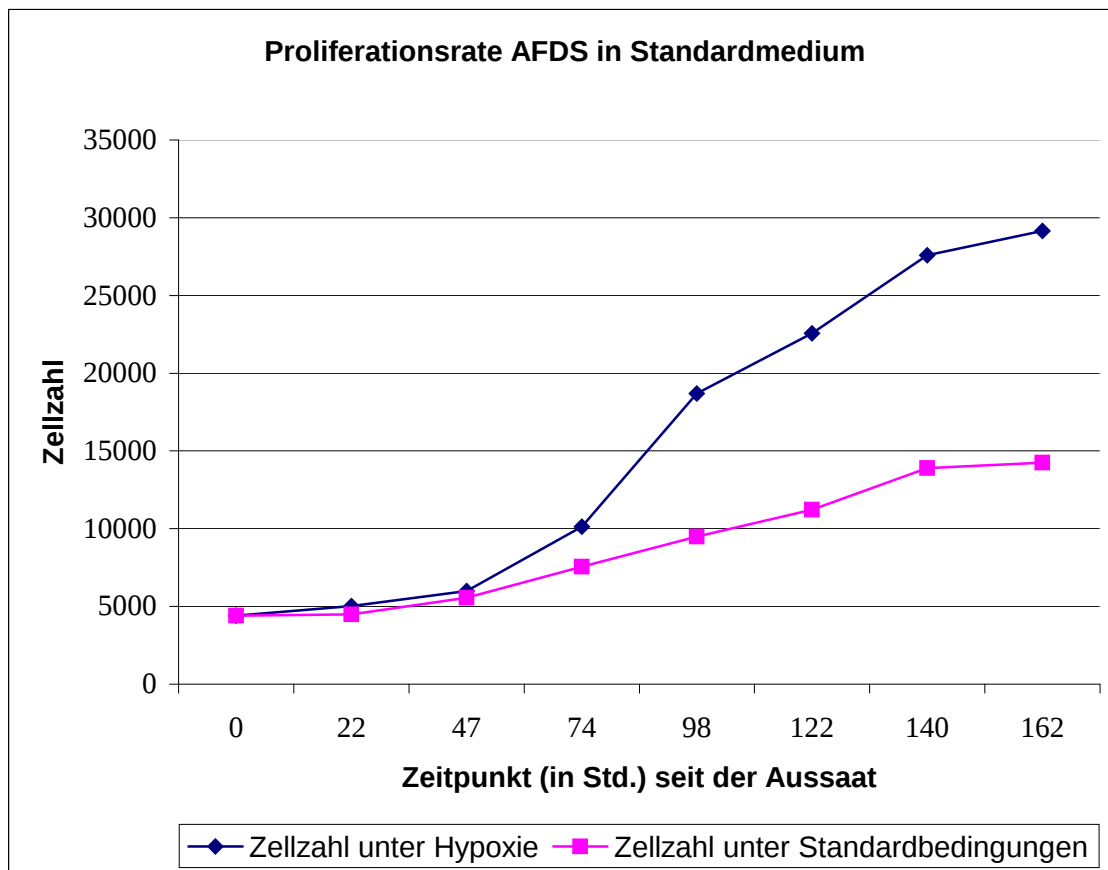


Abb.15: Proliferationsrate der AFDS in Passage 6

Während sich unter Normalbedingungen die ursprünglich 4.400 ausplattierten Zellen zu circa 14.200 Zellen vermehrt haben, weisen die unter Hypoxie kultivierten Zellen eine deutlich stärkere Proliferation auf. Sie haben sich mit 29.100 Zellen in der gleichen Zeit um mehr als das Doppelte im Vergleich zu den Normalbedingungen vermehrt. Das bedeutet eine Wachstumszunahme um 105 % (Abb. 15). Es lässt sich, betrachtet man den Kurvenverlauf, wie erwartet ein exponentielles Wachstum nachweisen.

Weiterhin soll auch die Verdopplungszeit bestimmt werden. Dazu werden die Passagen, in denen die Versuche stattfinden, in Bezug auf die Gesamtzellzahl am Ende des Versuchs und die Dauer der Beobachtungen miteinander verglichen. Es ergeben sich folgende Werte, siehe Abbildung 16:

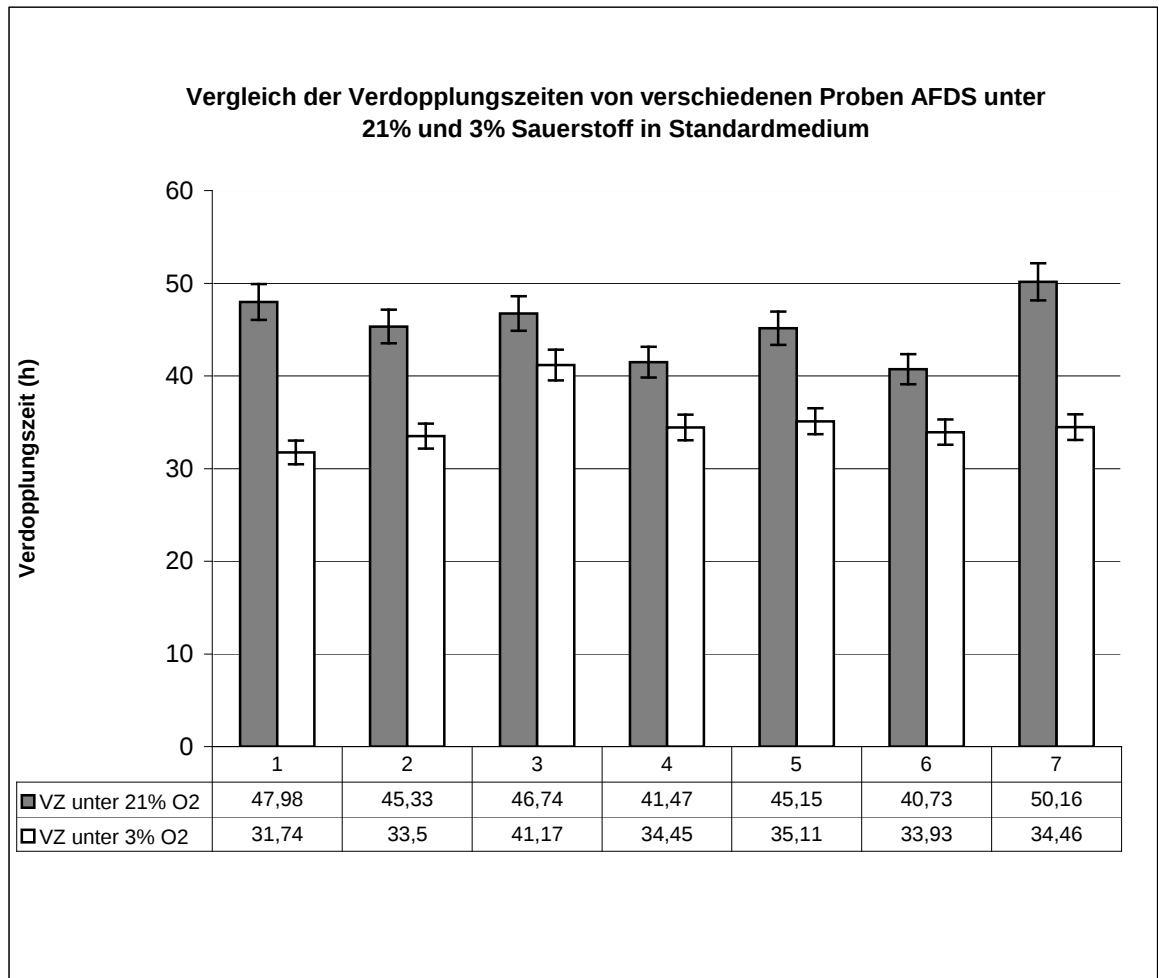


Abb.16: Proben 1-7 von AFDS in Standardmedium. Die Proben repräsentieren die Passagen 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13

Werden die Verdopplungszeiten gemittelt, siehe Abbildung 17, ergeben sich für die AFDS unter Normalbedingungen $45,43 \pm 3,37$ Stunden und unter Hypoxie im Vergleich $34,91 \pm 2,92$ Stunden.

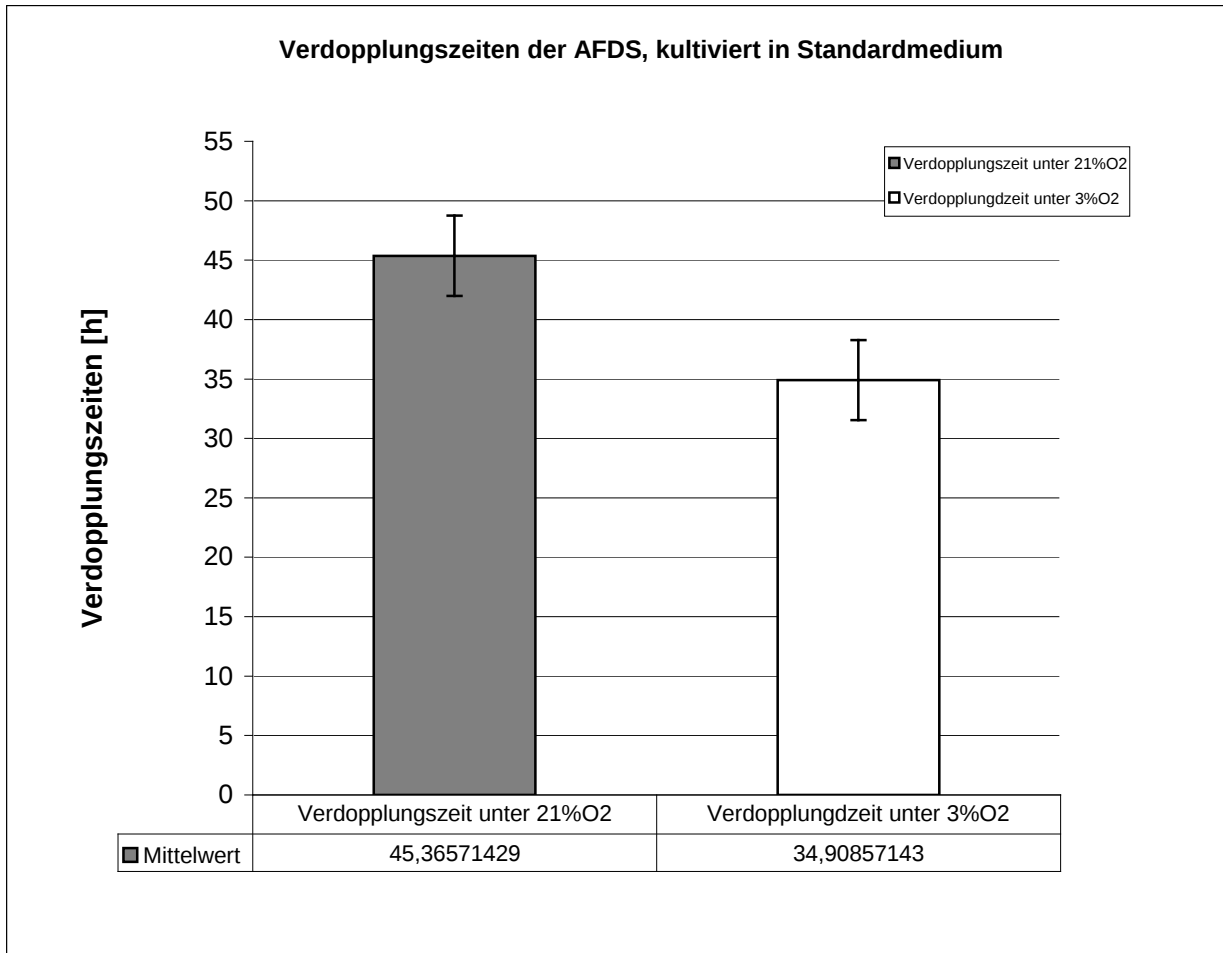


Abb.17: Gemittelte Verdopplungszeit der AFDS in Standardmedium im direkten Vergleich. Standardabweichung $\pm 3,37$ und $\pm 2,92$.

Die Zellen in Standardmedium proliferieren deutlich schneller unter hypoxischen Bedingungen.

3.1.4.2 Proliferation in den neuronalen Differenzierungsmedien unter Normalbedingungen und Hypoxie

Auch das Proliferations- und Verdopplungsverhalten in den neuronalen Differenzierungsmedien der AFDS soll aufgeführt, ausgewertet und schließlich miteinander verglichen werden.

Die Zellen in NM1 haben sich, wie in Abbildung 18 dargestellt, von anfänglich 4.400 ausplattierten Zellen auf 11.440 unter Normalbedingungen und 17.600 Zellen unter 3% Sauerstoff vermehrt. Nominal bedeutet das eine Wachstumssteigerung um 54,4%. Ihr Proliferationsverhalten verläuft ebenfalls exponentiell.

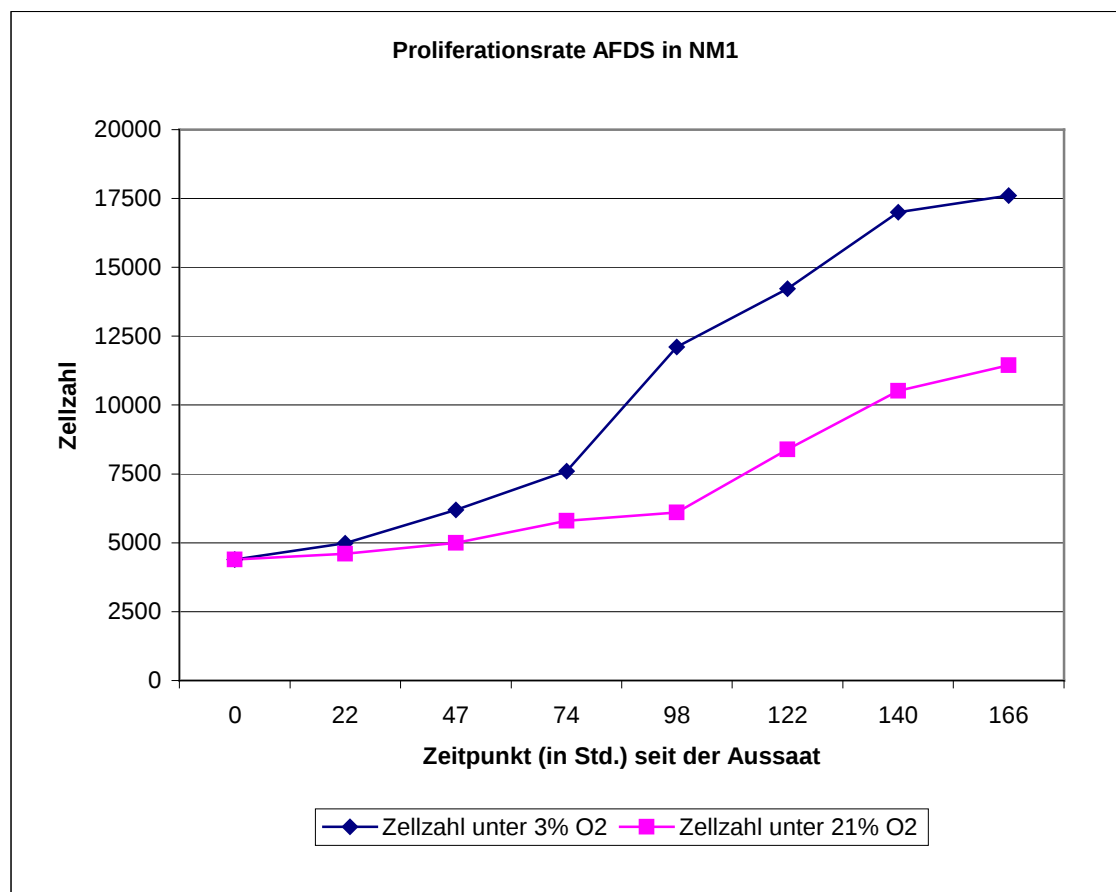


Abb.18: Proliferationsrate der AFDS in NM1 in Passage 6

Im Hinblick auf die Verdopplungszeit beim Wachstum unter Hypoxie im Vergleich zur Standardbedingung 21% Sauerstoff lässt sich notieren, dass die Zellen unter hypoxischen Bedingungen deutlich schneller proliferieren. Hier anhand von vier unterschiedlichen Passagezuständen dokumentiert, siehe Abbildung 19:

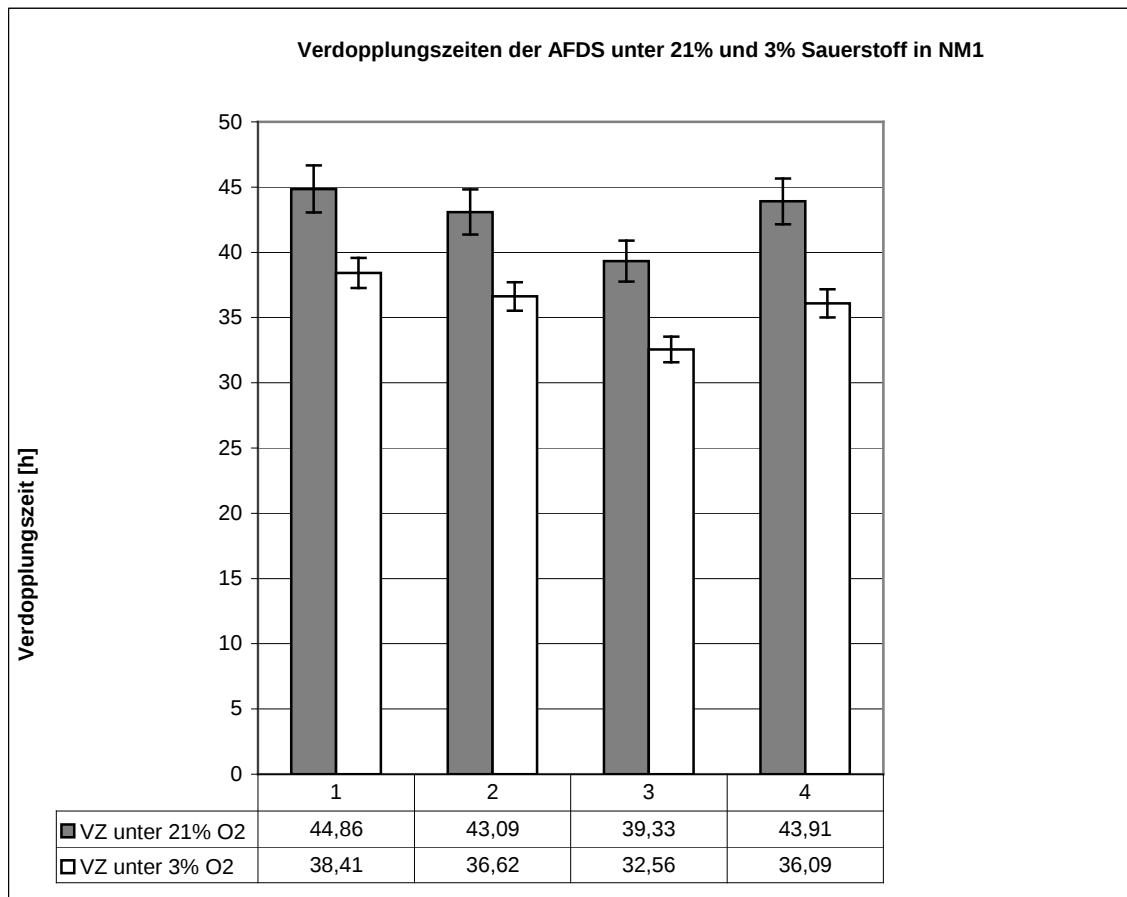


Abb.19: Die Proben 1-4 repräsentieren die Verdopplungszeit der Passagen 2, 4, 8 und 13 der AFDS in NM1

Es ergeben sich die folgenden Mittelwerte im direkten Vergleich, bei einer Standardabweichung von $\pm 2,42$ unter 3% und $\pm 2,45$ unter 21% Sauerstoff, siehe Abbildung 20.

Gemittelt beträgt die Verdopplungszeit 35,9 Stunden im Vergleich zu 42,8 Stunden. Das bedeutet eine Zunahme der Verdopplungszeit um gut 20%.

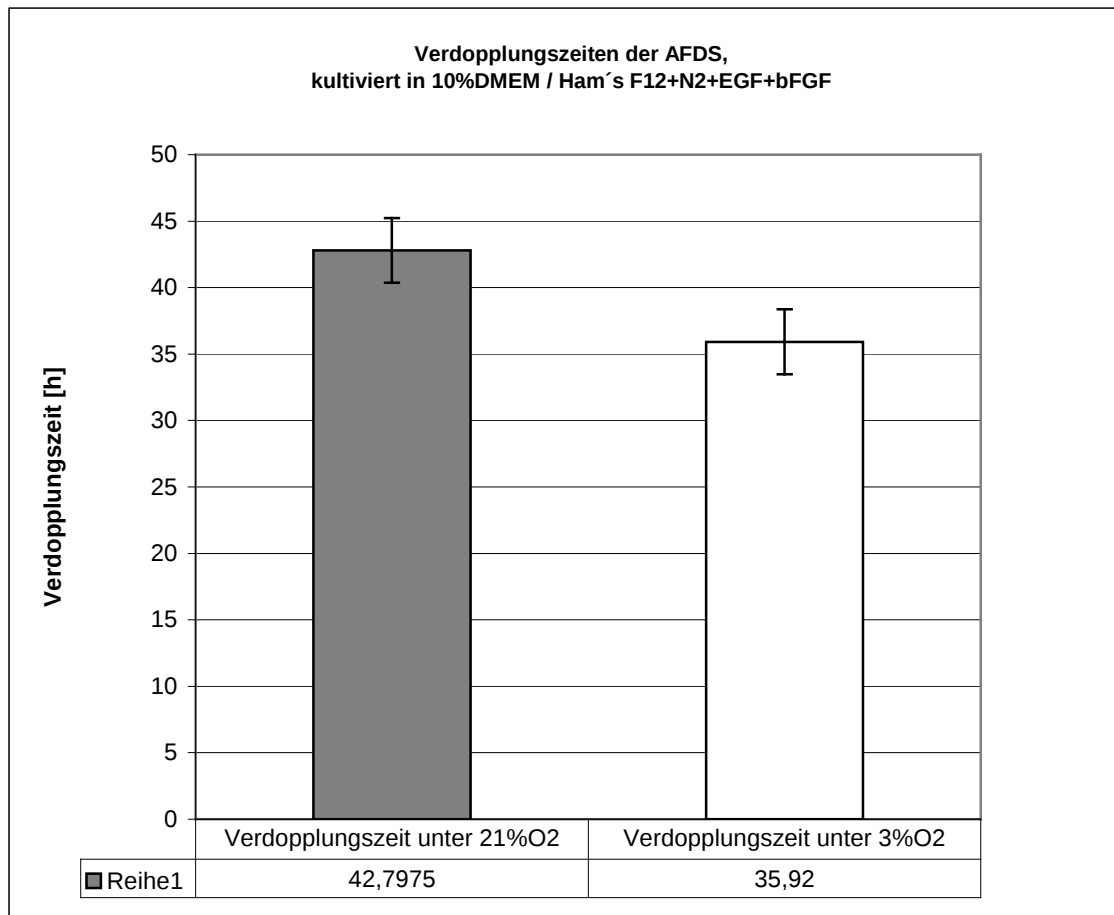


Abb.20: Gemittelte Verdopplungszeit der AFDS in NM1 im direkten Vergleich. Standardabweichung $\pm 2,45$ und $\pm 2,42$.

Anschließend werden die Zellen in NM2 untersucht. Sie haben sich, wie in Abbildung 21 dargestellt, von anfänglich 4.400 ausplattierten Zellen auf 22.400 unter Normalbedingungen und 42.020 Zellen unter 3% Sauerstoff vermehrt. Nominal bedeutet das eine Wachstumssteigerung um 87,59%. Ihr Proliferationsverhalten verläuft exponentiell.

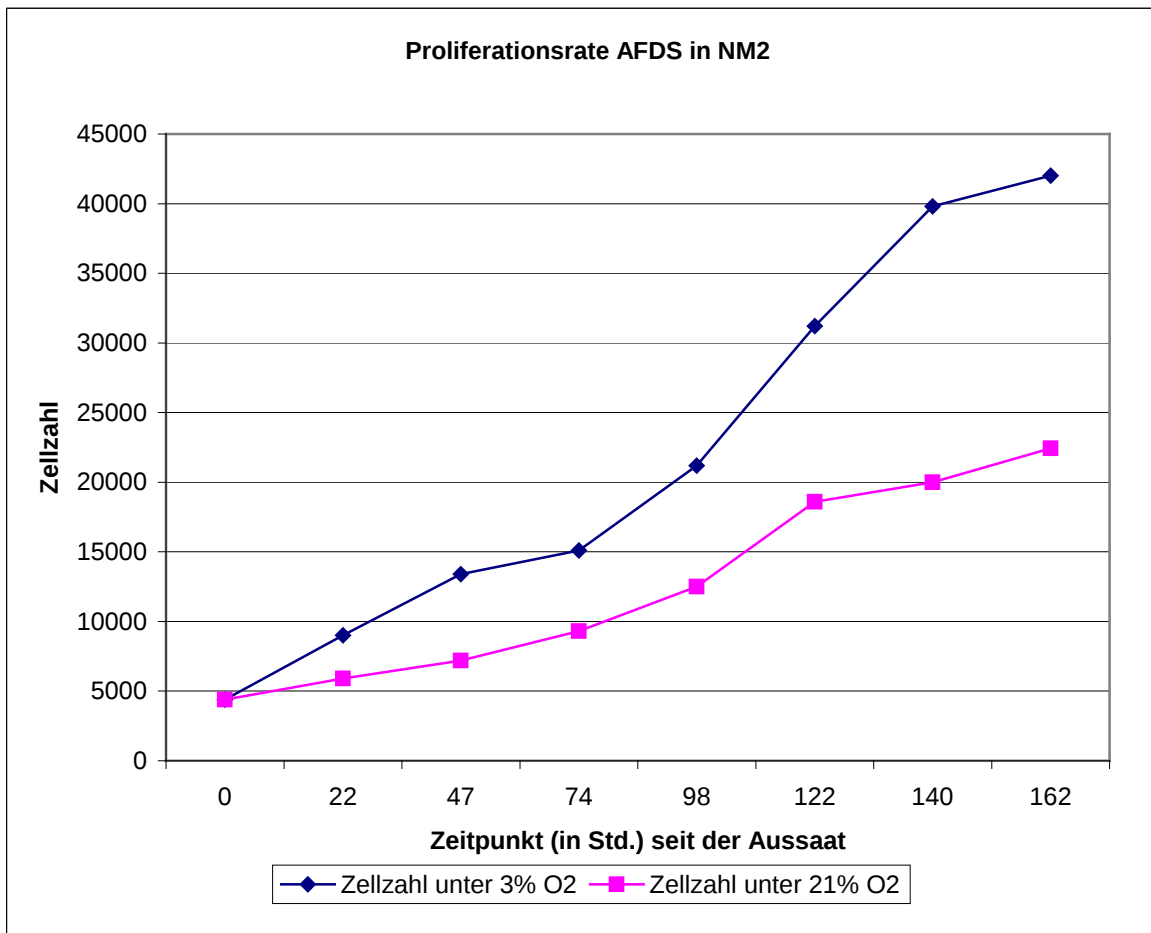


Abb.21: Proliferationsrate der AFDS in NM2 in Passage 6

Im Hinblick auf die Verdopplungszeit beim Wachstum unter Hypoxie im Vergleich zur Standardbedingung 21% Sauerstoff lässt sich notieren, dass die Zellen unter hypoxischen Bedingungen deutlich schneller proliferieren. Hier anhand von vier unterschiedlichen Passagezuständen dokumentiert, siehe Abbildung 22:

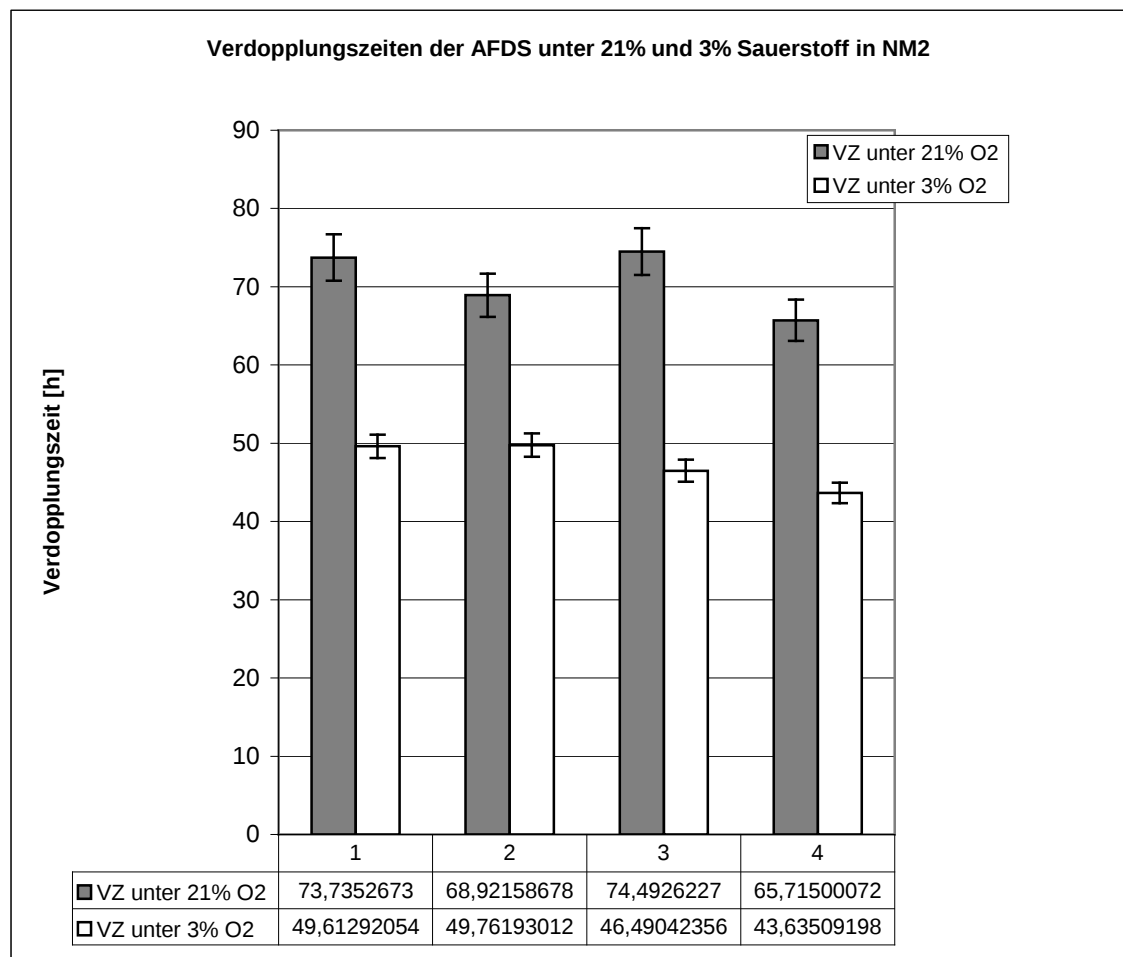


Abb.22: Die Proben 1-4 repräsentieren die Verdopplungszeit der Passagen 2, 4, 8 und 13 der AFDS in NM2.

Es ergeben sich die folgenden Mittelwerte im direkten Vergleich bei einer Standardabweichung von $\pm 2,91$ unter 3% und $\pm 4,15$ unter 21% Sauerstoff (Abb. 23).

Gemittelt beträgt die Verdopplungszeit 47,38 Stunden im Vergleich zu 70,72 Stunden. Das bedeutet eine Zunahme der Verdopplungszeit um 33,5%.

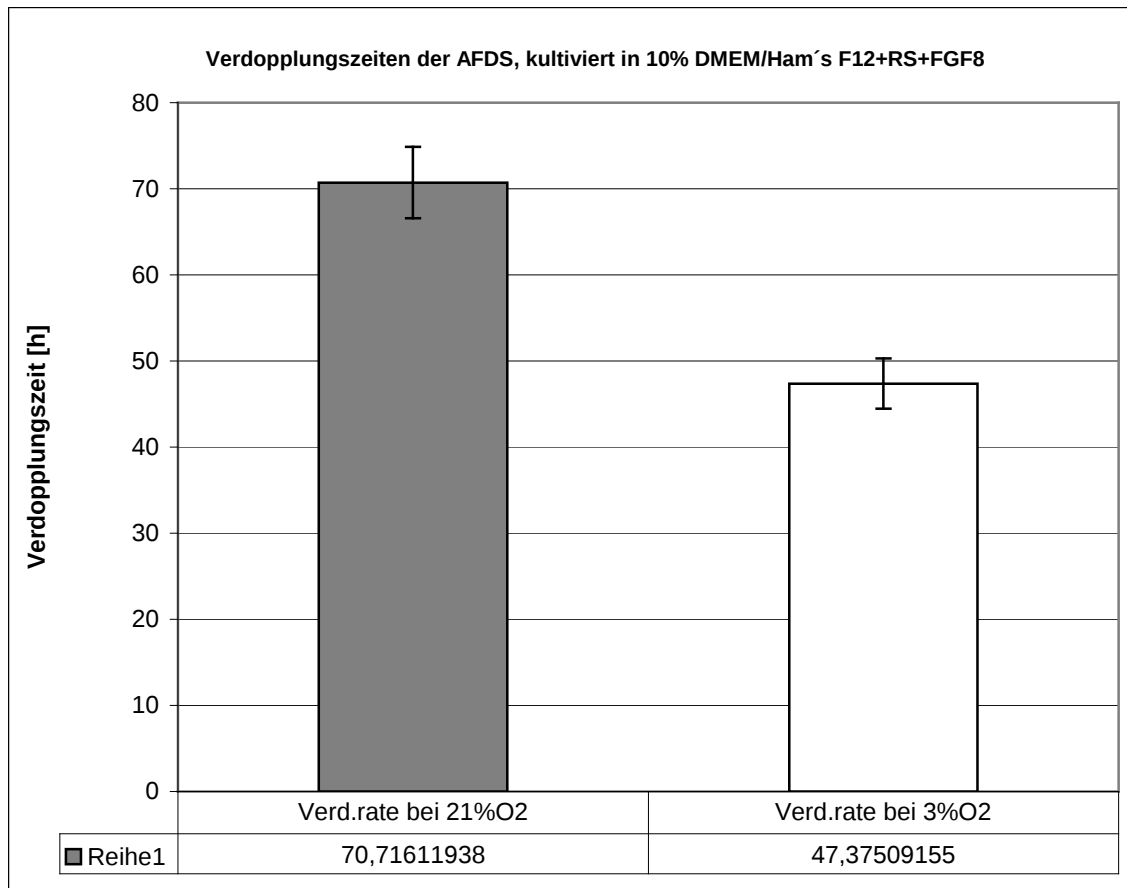


Abb.23: Gemittelte Verdopplungszeit der AFDS in NM2 im direkten Vergleich. Standardabweichung $\pm 4,15$ und $\pm 2,91$.

3.1.4.3 Vergleich der Proliferationsergebnisse innerhalb aller eingesetzten Medien

Im direkten Vergleich aller für die Zellkultur eingesetzten Medien lässt sich zunächst einmal festhalten, dass unabhängig von dem Ausgangsmedium in jeder Probe die Proliferationsrate deutlich höher ist, wenn die Zellen hypoxisch kultiviert werden. Somit ist die Verdopplungszeit unter Hypoxie deutlich geringer, d.h., die Zellen haben das Potential, sich bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt (3%) deutlich schneller zu teilen. Die Standardabweichung aller Proben ist in etwa gleich, siehe Abbildung 24:

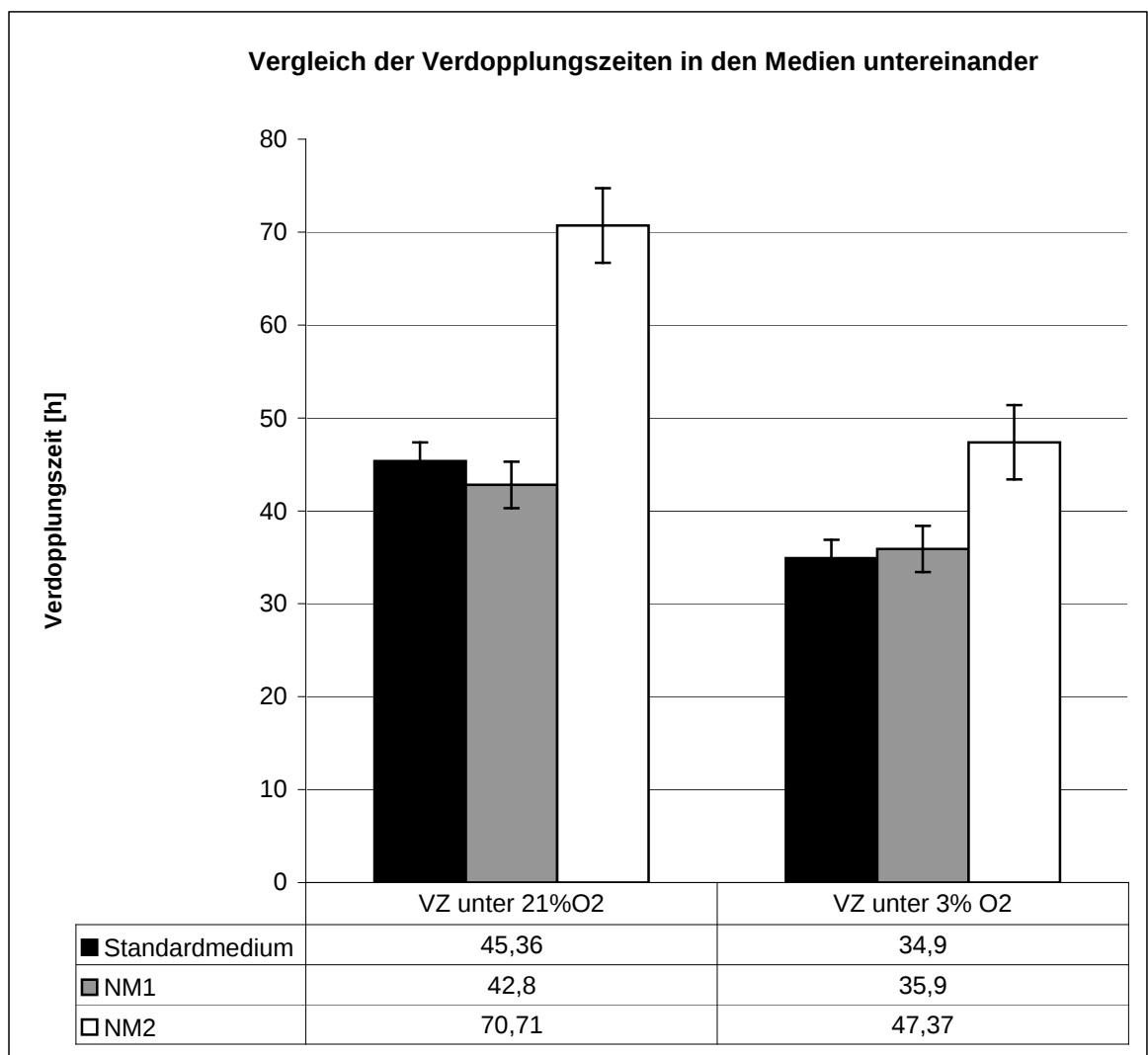


Abb.24: Gemittelte Verdopplungszeit der AFDS in allen drei Medien im direkten Vergleich.

Alle Versuche finden mit anfänglich ausplattierten 4.400 Zellen statt, dennoch unterscheidet sich am Ende die Anzahl der Zellen deutlich voneinander.

Auffällig sind die Werte in NM2. Während sich die Verdopplungszeiten für Standardmedium und NM1 durchaus ähneln, was den Unterschied zwischen Normal- und hypoxischen Bedingungen angeht, so benötigen die Zellen kultiviert in NM2 schon unter Normalbedingungen $30 \pm 4,15$ Stunden länger, um sich zu verdoppeln. Sie proliferieren also deutlich langsamer. Die Beobachtungen lassen sich unter Hypoxie ebenfalls bestätigen, auch hier benötigen die Zellen in NM2 $12 \pm 2,91$ Stunden länger um sich zu verdoppeln.

3.1.4.4 Untersuchung zum Proliferationsverhalten nach Kryokonservierung

Es kann in Bezug auf das Proliferationsverhalten nach erneuter Kryokonservierung kein Unterschied im Vergleich zu der Ursprungspopulation in den Versuchen nachgewiesen werden. Allerdings muss gewährleistet sein, dass nach dem Auftauen 60% der Zellen überlebt haben und in der neuen Kulturschale adhärent geworden sind. Ist dies der Fall, befinden sich genügend lebende Zellen in Kultur.

3.2 Charakterisierung der Zellen mittels Immunzytochemie

Die immunzytochemisch gefärbten Zellen werden mit Hilfe eines Axiophot Fluoreszenzmikroskops beurteilt, wobei Zellen in fünf aufeinanderfolgenden, zufällig ausgewählten Sichtfeldern ausgezählt werden. Durch Darstellung der Gesamtzellpopulation mit dem Kernmarker Hoechst Dye lässt sich der Prozentsatz an immuno-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermitteln. Die Anzahl an positiv ausgezählten Zellen wird mit $\pm x\%$ der aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählten Zellen ausgedrückt. Die statistische Analyse der Immunzytochemie wird mittels Student-T-Test, die des ELISA mit ANOVA (one way analysis of variance) mit Hilfe der Microcal Origin Software (Northampton, MA, USA) ausgewertet.

Die immunzytochemischen Färbungen werden in allen Medien jeweils in den Passagen 2, 4 und 8 durchgeführt. Wegen lediglich minimaler Unterschiede stammen die Fotografien aus unterschiedlichen Passagen, abhängig von der Fotoqualität.

3.2.1 Charakterisierung der Zellen in Standardkulturmedium

Wie vorher beschrieben, zeigen die Zellen im Standardmedium ein epitheliales Zellwachstum. Um dies genauer zu untersuchen, sollen in der Immunzytochemie typisch epitheliale Marker detektiert werden und zwar unter Verwendung von Anti-Cytokeratin bzw. Anti-E-Cadherin Antikörpern. Das Vorkommen von Cytokeratin stellt gleichzeitig sicher, dass es sich tatsächlich um die gewünscht selektionierten Zellen des Typs AF aus der Amnionflüssigkeit handelt.

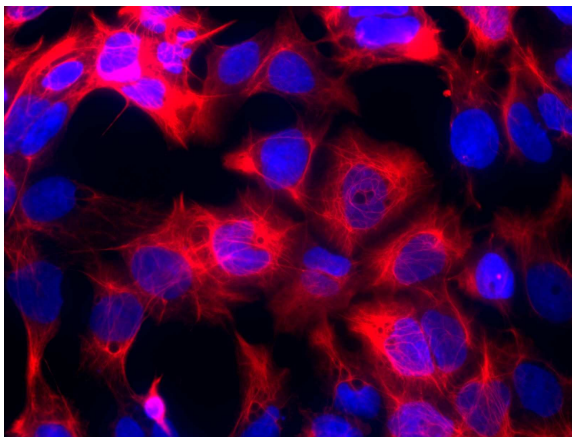


Abb.25: AFDS in Standardmedium (400x)
Anti-Cytokeratin (rot)
jeweils mit HD-Kernfärbung (blau)

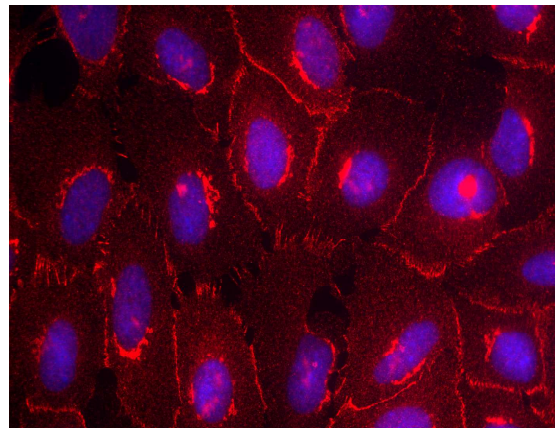


Abb.26: AFDS in Standardmedium (400X)
Anti-E-Cadherin (rot)

Wie auf den Fotografien zu erkennen ist, zeigt sich in beiden Fällen eine deutliche Markerexpression, sowohl von Cytokeratin (100%) als auch von E-Cadherin (100%). Aufgrund der phasenkontrastmikroskopischen und der immunzytochemischen Beurteilung kann sicher davon ausgegangen werden, dass es sich hier um die gewünschte, aus der Amnionflüssigkeit extrahierte, homogene Population von epithelialen Zellen (AFDS) handelt.

Die Stammzeleigenschaften werden in weitergehenden Untersuchungen immunzytochemisch unter Verwendung verschiedener Stammzellmarker untersucht. Dabei spielt der Marker SSEA-1/CD-15 eine bedeutende Rolle.

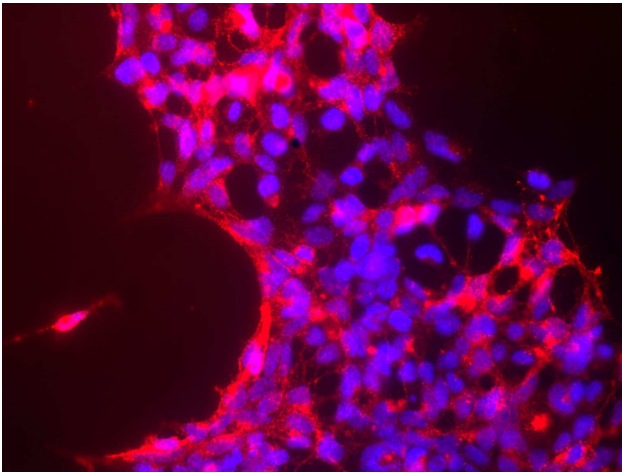


Abb.27: AFDS aus Standardmedium (40x), Anti-CD15 (rot) und HD-Kernfärbung (blau) $95\pm5,5\%$ der Zellen exprimieren CD15.

Die Zellen sind einheitlich immuno-positiv für CD 15, welcher als Marker für pluripotente Zellen verwendet wird. Die Expressionsrate kann als $95\pm5,5\%$ detektiert werden. Das gezeigte Expressionsmuster, mit der gepunkteten Färbung auf der Zelloberfläche, ist typisch für CD 15.

Weiterhin können bei der Mehrheit der Amniozyten die für pluripotente Zellen typischen Marker c-kit/CD 117 und CD 90 nachgewiesen werden. Hier liegen die Expressionsraten der Gesamtpopulation bei $94\pm5,5\%$ für den Marker CD 90 und für $88\pm4,9\%$ für c-kit.

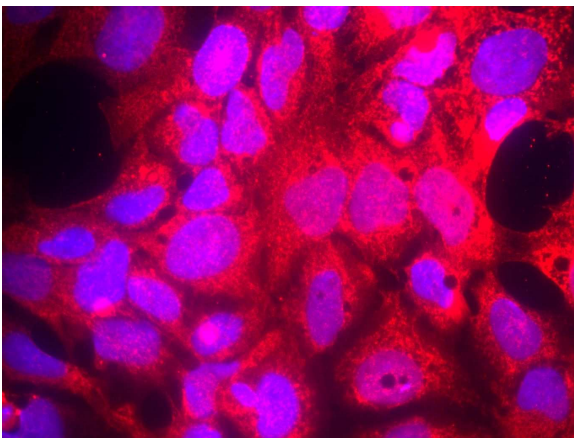


Abb.28: AFDS in Standardmedium(400x) Anti-CD 117 (rot) jeweils mit HD-Kernfärbung (blau) $88\pm4,9\%$ der Zellen exprimieren c-kit.

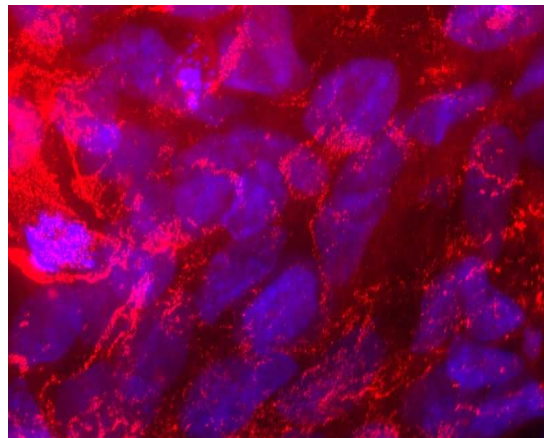


Abb.29:AFDS in Standardmedium (400x) Anti-CD 90 (rot) $94\pm5,5\%$ der Zellen exprimieren CD90.

Diese Daten beweisen die Annahme, dass die Zellen Stammzeleigenschaften besitzen. Fast in der gesamten Zellpopulation der in Standardmedium kultivierten Zellen lassen sich die oben aufgeführten Stammzellmarker immunzytochemisch detektieren. Aber es gilt nicht nur herauszufinden, inwieweit die oben genannten Stammzeleigenschaften bei den AFDS vorhanden sind. Da hier besonders auch das neuronale Differenzierungsverhalten und die damit angenommene Pluripotenz betrachtet werden sollen, werden auch die für neuronale Stammzellen, neuronale Vorläuferzellen, Glia- und Nervenzellen typischen Eigenschaften unter Verwendung verschiedener Antikörper untersucht. Es soll herausgefunden werden, ob eine Veränderung der Markerexpression abhängig vom verwendeten Medium erfolgt.

Interessant ist, dass sich bei den AFDS schon unter Standardkulturbedingungen eine Vielzahl an neuronalen Markern detektieren lassen. Weitere Untersuchungen zeigen, dass schon dort eine hohe Prozentzahl der Zellen den neuronalen Stammzellmarker Nestin (Abb.30) ($65\pm7\%$), den Marker Vimentin (Abb.31) als glialen ($70\pm3\%$) und A2B5 (Abb.32) als oligodendrozytären Vorläuferzellmarker ($42\pm2\%$) exprimieren. Ein kleiner Anteil von $11\pm3\%$ zeigt sogar die Expression des Astrozytenmarkers GFAP (Abb.33).

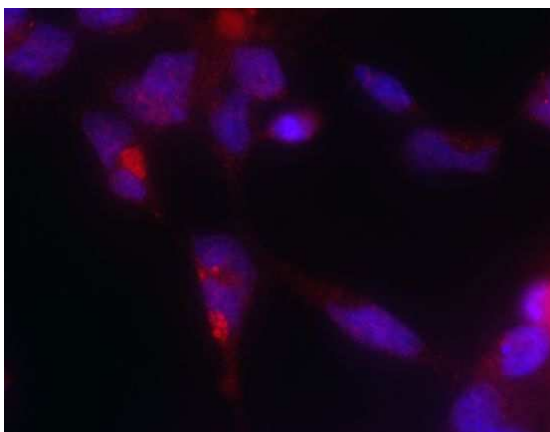


Abb.30: AFDS in Standardmedium (100x)
Anti-Nestin (rot)
jeweils mit HD-Kernfärbung (blau)
 $65\pm7\%$ der Zellen exprimieren Nestin.

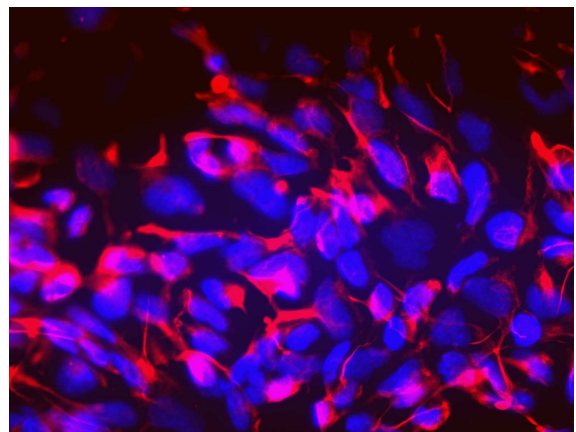


Abb.31: AFDS in Standardmedium (40x)
Anti-Vimentin (rot)
 $70\pm3\%$ der Zellen exprimieren Vimentin.

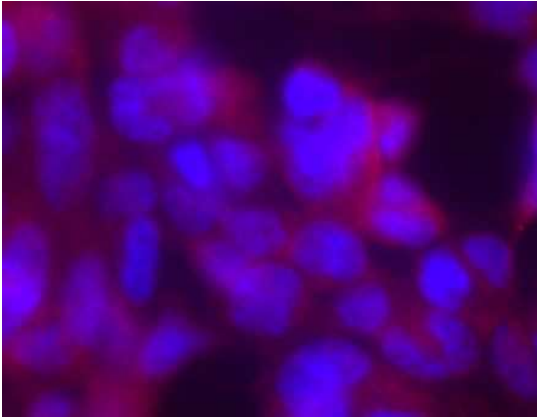


Abb.32: AFDS in Standardmedium (400x)
Anti-A2B5 (rot)
jeweils mit HD-Kernfärbung (blau)
 $42\pm 2\%$ der Zellen exprimieren A2B5.

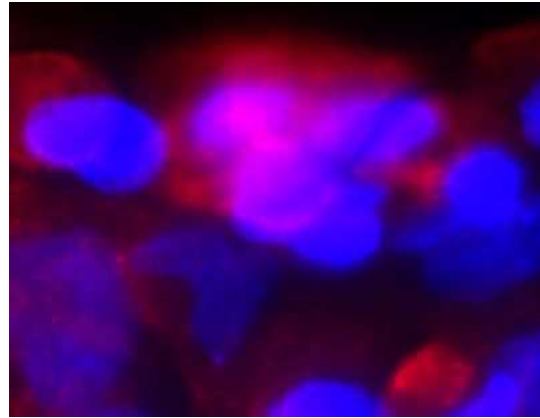


Abb.33: AFDS in Standardmedium (400x)
Anti-GFAP (rot) (Ausschnitt)
 $11\pm 3\%$ der Zellen exprimieren GFAP.

3.2.2 Charakterisierung nach Induktion der Differenzierung

Die oben durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen der AFDS in Standardmedium beweisen nicht nur deren epitheliale Herkunft und somit die gewünschte Selektion von AFDS, sondern auch deren potentielle Stammzeleigenschaften. Unter dieser Voraussetzung und der Annahme, dass eine neuronale Differenzierung erreicht werden kann, werden nun die für neuronalen Vorläuferzellen und/oder Neurone spezifischen Marker und deren Expression untersucht. Es soll ermittelt werden, inwieweit sich die Expression dieser verändern bzw. nachweisen lässt und ob so davon ausgegangen werden kann, dass hier die Induktion der neuronalen Differenzierung möglich ist und stattgefunden hat. Dieser Annahme zufolge ist auch noch interessant zu beobachten, ob eine Regredienz der Stammzellmarker festgestellt werden kann, bzw. ob sich ebenfalls ein Unterschied der Differenzierung abhängig vom verwendeten Differenzierungsmedium (A/NM1 oder B/NM2) einstellt.

Zunächst soll die Expression von Markern neuronaler Vorläuferzellen genauer betrachtet werden. Es handelt sich hierbei um Vimentin, HNK-1 und Nestin. Die Grafiken Abbildung 34, 36 und 38 zeigen die statistische Auswertung der immuno-positiven Zellen. Die Expression für Vimentin ist überraschenderweise schon unter Standardbedingungen mit $69\pm 3\%$ relativ hoch. In den neuronal induzierten Zellen beläuft sie sich auf $87\pm 4\%$ für Zellen, die in NM1 und $85\pm 4,5\%$ für Zellen, die in NM2 kultiviert werden.

Als Bildbeispiel wird jeweils ein Foto der Zellen des Mediums angeführt, welches die größte Expressionsrate des zu detektierenden Antigens aufweist.

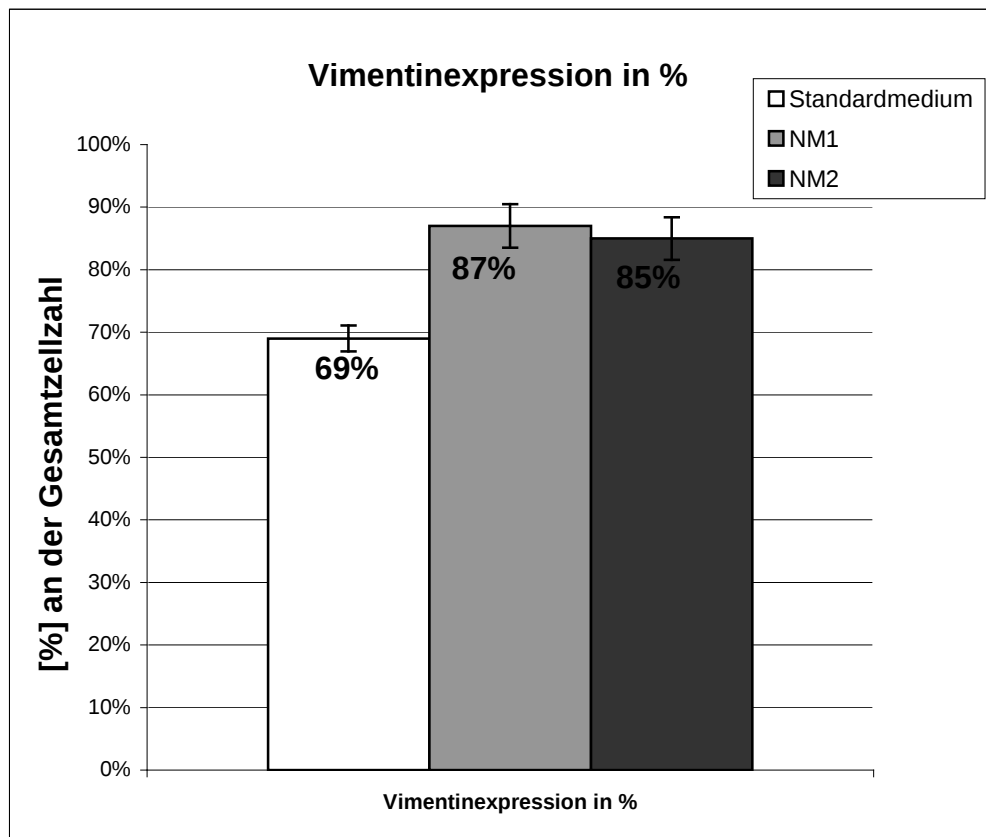


Abb.34: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine Vimentin Expression von 69%, in NM1 von 87% und für NM2 von 85%.

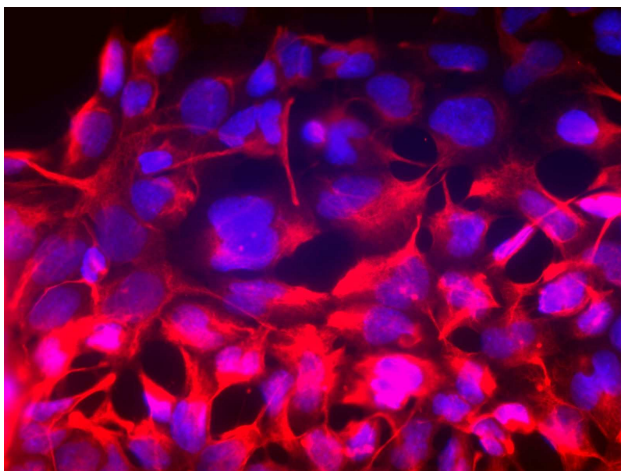


Abb.35: AFDS in NM1 (100x) Anti-Vimentin (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $87 \pm 5,5\%$ der Zellen exprimieren Vimentin.

Im Standardmedium sind lediglich $1,5 \pm 0,5\%$ der Zellen positiv für HNK-1. Ein signifikanter Anstieg ist dagegen bei den Zellen in den neuronalen Differenzierungsmedien zu beobachten. Die Expression von HNK-1 beläuft sich im Medium NM1 auf $73 \pm 8\%$ und im Medium NM2 auf $68 \pm 5,5\%$.

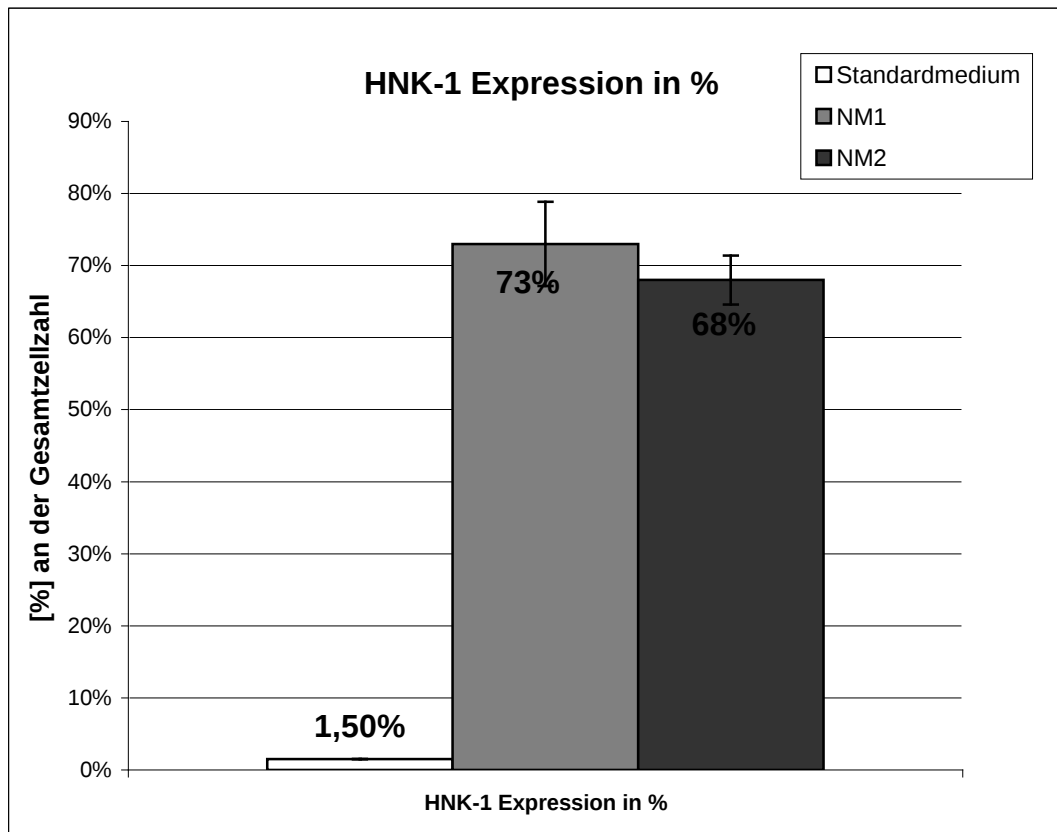


Abb.36: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine HNK-1 Expression von 1,5%, in NM1 von 73% und in NM2 von 68%.

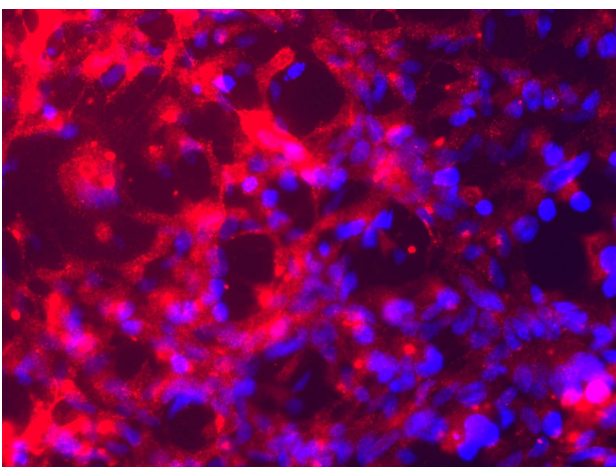


Abb.37: AFDS in NM1 (40x) Anti-HNK-1 (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $73 \pm 6\%$ der Zellen exprimieren HNK-1.

Für den neuronalen Stammzellmarker Nestin zeigt sich in den neuronalen Differenzierungsmedien eine signifikant höhere Expression als unter Standardkulturbedingungen. Hier liegt die Expression in NM1 bei $95\pm 2\%$ und $90\pm 4\%$ in NM2. Im Vergleich dazu liegt die Anzahl der Nestin immuno-positiven Zellen bei nur $62\pm 6,5\%$ im Standardmedium.

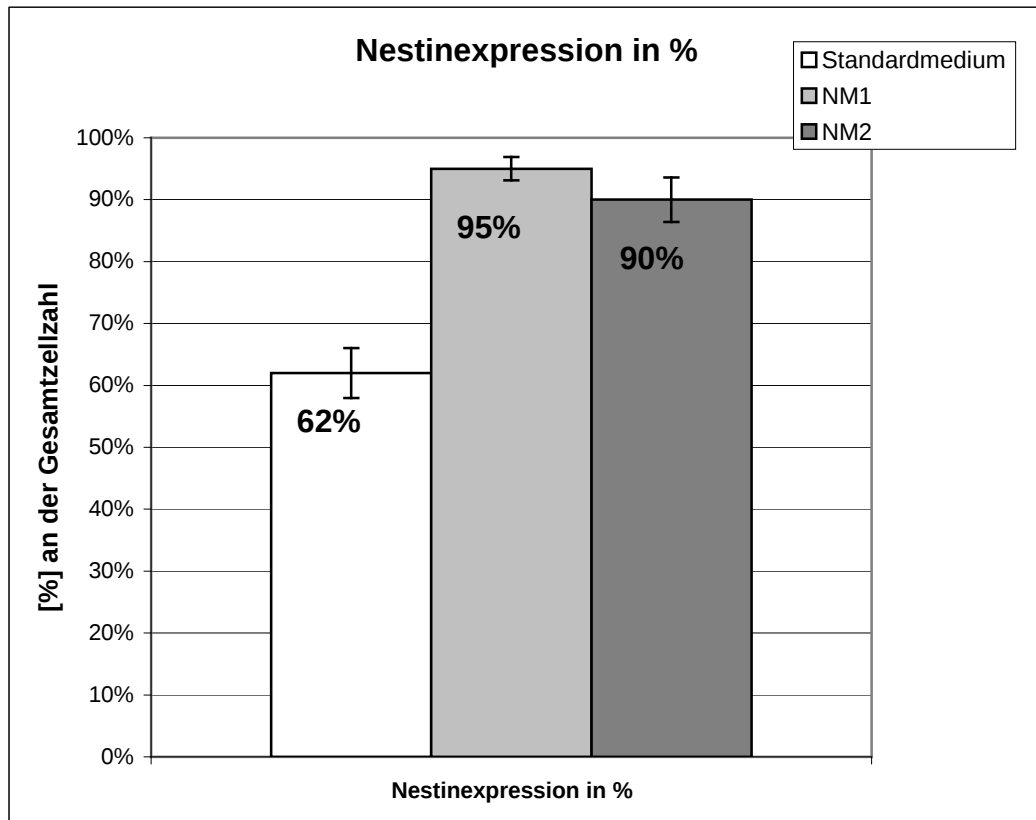


Abb.38: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine Nestinexpression von 62%, in NM1 von 95% und in NM2 von 90%.

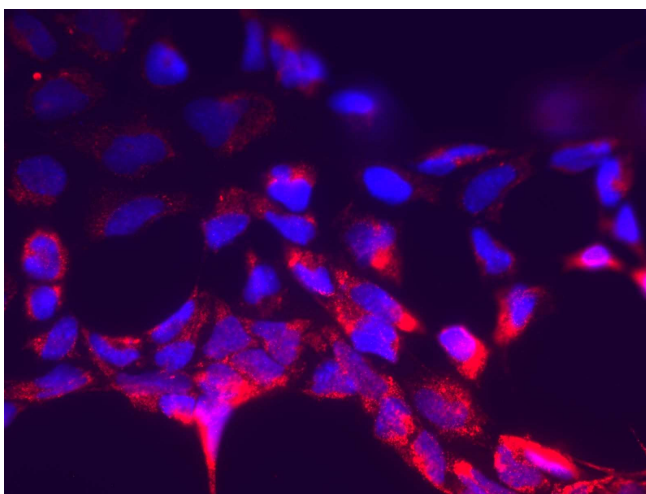


Abb.39: AFDS in NM1 (100x) Anti-Nestin (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $95\pm 3,5\%$ der Zellen exprimieren Nestin.

In Bezug auf die Marker für neuronale Vorläuferzellen lässt sich feststellen, dass die Expression aller drei Marker am ausgeprägtesten in NM1 ist; ebenso deutlich, mit ein paar Prozentpunkten weniger, in NM2. Interessanterweise zeigen auch die Zellen ohne Induktion im Standardmedium eine Immunopositivität für Vimentin und Nestin mit jeweils über 60%. Die HNK-1 Expression im Standardmedium dagegen beläuft sich nur auf 1,5%. Insgesamt zeigt sich eine erfolgreiche Induktion, da die neuronalen Vorläuferzellmarker zu einem deutlich höheren Prozentsatz in den neuronal induzierten Zellen als in den nicht-stimulierten Zellen exprimiert werden.

Als Vertreter von Markern der frühen Neurogenese werden zusätzlich die Expressionsraten von A2B5 und α -Internexin ausgewertet. Die Grafiken Abbildung 40 und 42 zeigen die statistische Auswertung der immuno-positiven Zellen. Die Expression für A2B5 und α -Internexin sind überraschenderweise schon unter Standardbedingungen mit $71 \pm 3,5\%$ bzw. $65,9 \pm 7\%$ relativ hoch. In den neuronal induzierten Zellen belaufen sich auf $89 \pm 4,2\%$ bzw. $88 \pm 6,3\%$ in NM1 und $90 \pm 2\%$ bzw. $89,3 \pm 5,5\%$ in NM2.

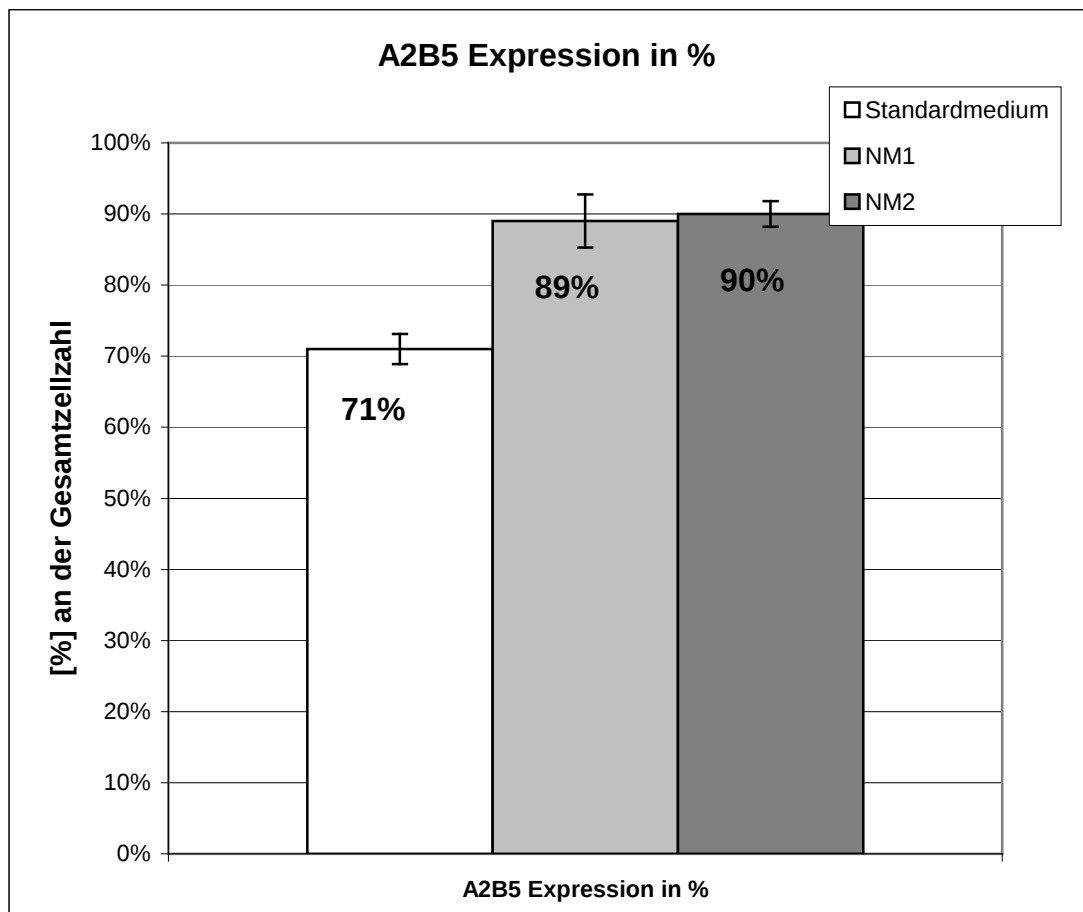


Abb.40: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine A2B5 Expression von 71%, in NM1 von 89% und in NM2 von 90%.

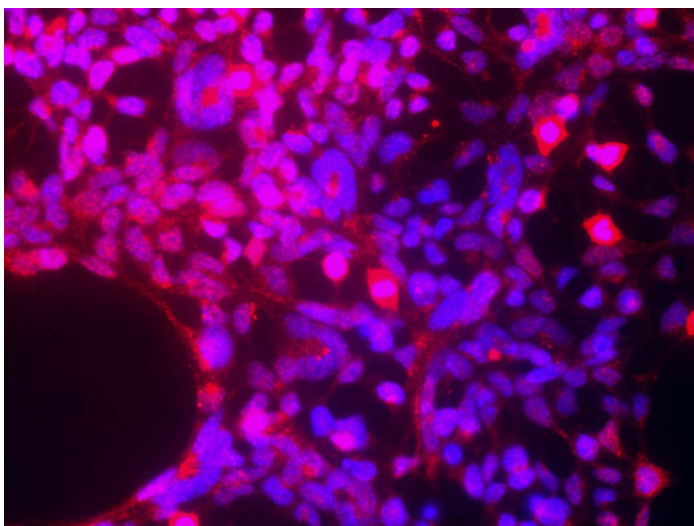


Abb.41: AFDS in NM2 (40x) Anti-A2B5 (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $90 \pm 8,5\%$ der Zellen exprimieren A2B5.

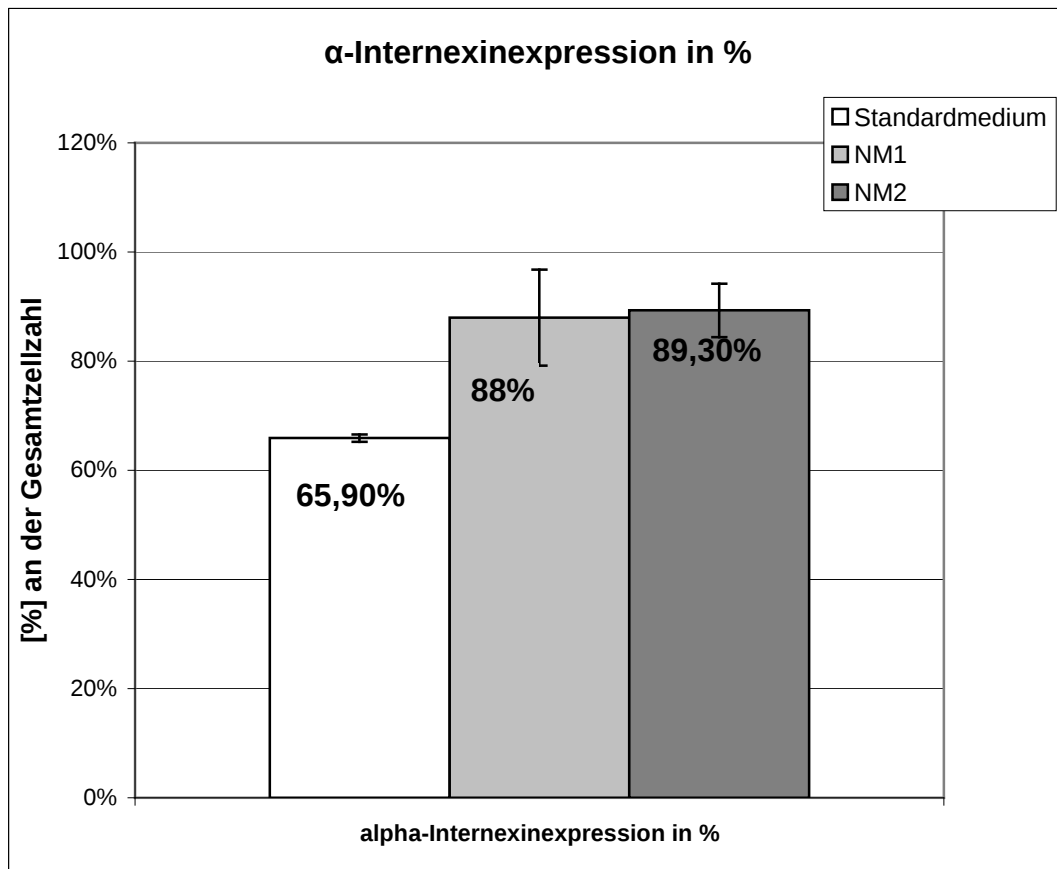


Abb.42: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine α -Internexinexpression von 65,9%, in NM1 von 88% und in NM2 von 89,3%.

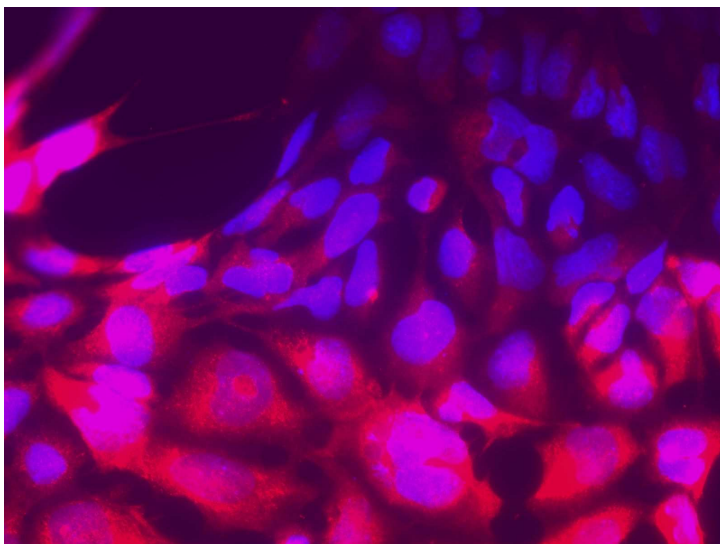


Abb.43: AFDS in NM2 (100x) Anti- α -Internexin (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $89,3 \pm 4\%$ der Zellen exprimieren α -Internexin.

In Bezug auf die Marker früher neuronaler Entwicklung lässt sich also festhalten, dass die Expression beider Marker deutlich ausgeprägter in den Medien neuronaler Induktion ist, und zwar in etwa im gleichen Verhältnis.

Um auch die Expression der Markerproteine für ausdifferenzierte Neurone und Gliazellen zu untersuchen, wird im nächsten Abschnitt die Expression von Neurofilament, β -3-Tubulin und GFAP analysiert. Ein positiver Nachweis dieser Marker gibt einen deutlichen Hinweis auf die neuronalen Qualitäten der Amnionzellen. Eine Neurofilamentexpression ist im Standardkulturmedium kaum nachweisbar. Der Prozentsatz der Neurofilament-exprimierenden Zellen liegt bei 0,5%. Es sind also nur ganz vereinzelt positive Zellen zu detektieren. Nach der Induktion in den Differenzierungsmedien zeigen die Zellen eine Expression von Neurofilament mit einem Prozentsatz von $46 \pm 6,2\%$ in NM1 und von $63 \pm 5,5\%$ in NM2 (Abb.44):

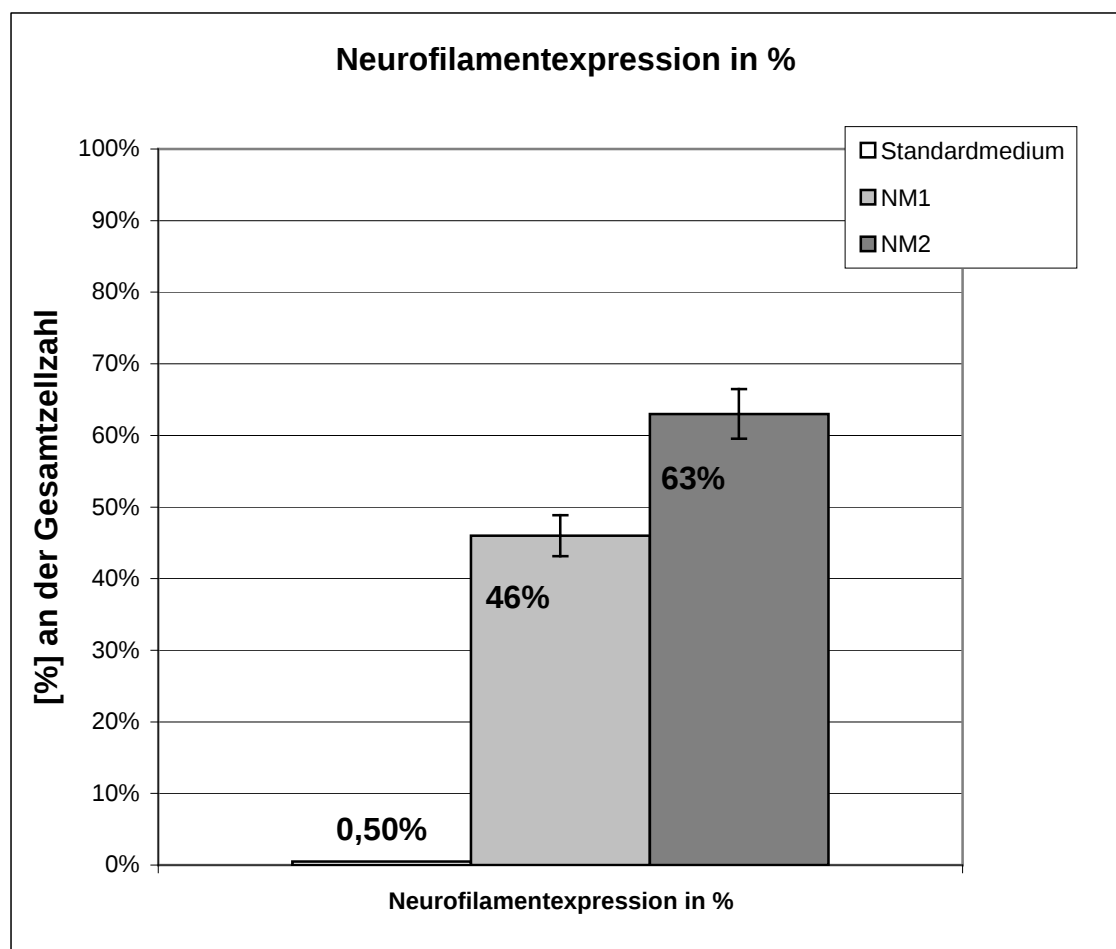


Abb.44: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine Neurofilamentexpression von 0,5%, in NM1 von 46% und in NM2 von 63%.

Vereinzelt können sogar typische neurale Morphologien detektiert werden. Die Zellen weisen nach Induktion ein charakteristisches neurales Perikaryon mit mehreren Fortsätzen auf (Abb. 45).

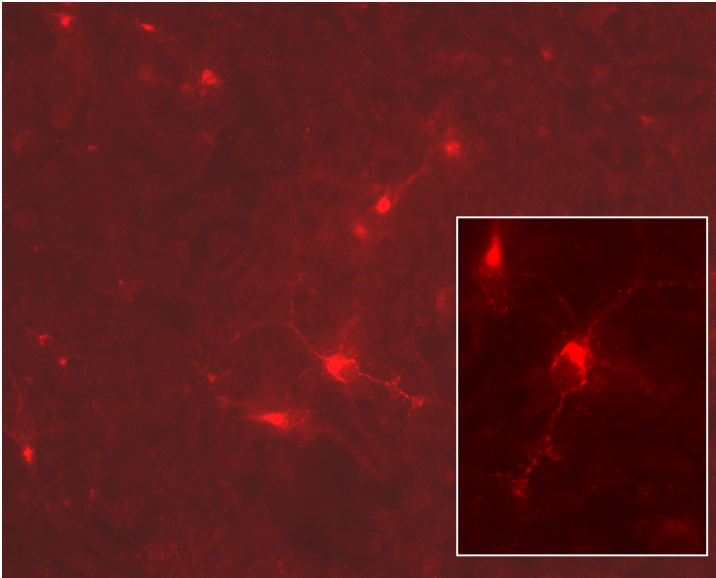


Abb.45: AFDS in NM2 (400x). $63\pm5,5\%$ der Zellen exprimieren Neurofilament. Es können typische neuronale Morphologien erkannt werden.

Die Expression für β -3-Tubulin und GFAP in den in Standardmedium kultivierten Zellen ist schon wie die für Neurofilament sehr gering. Es sind nur einzelne Zellen positiv, 1% bzw. $5\pm1\%$. Im Vergleich dazu nimmt die Expression der Marker nach neuronaler Induktion um ein Vielfaches zu. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle ist ein signifikanter prozentualer Anstieg der neuronalen Markerexpression zu verzeichnen: auf $16\pm2,2\%$ (NM1) und $34,8\pm4,1\%$ (NM2) für β -3-Tubulin und sogar bis auf $43\pm7\%$ (NM1) und $67\pm6,3\%$ (NM2) für GFAP.

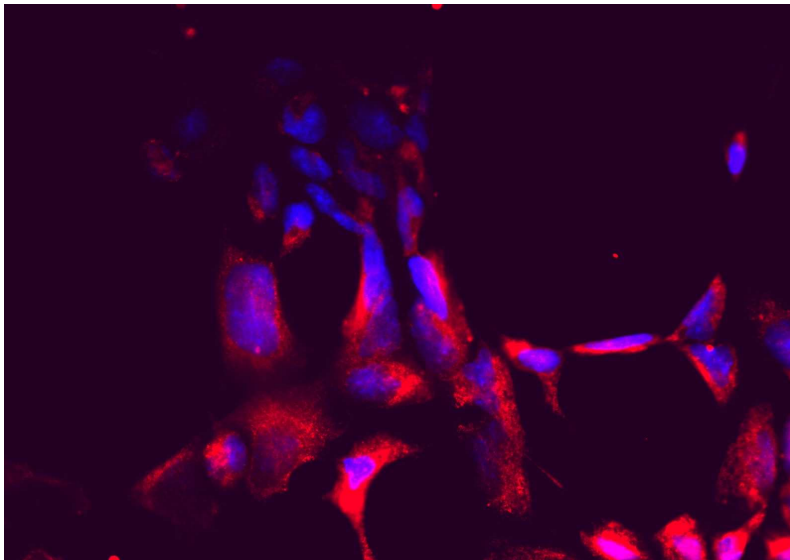


Abb.46: AFDS in NM2 (100x) beta-3-Tubulin und HD-Kernfärbung. $34,8 \pm 4,1\%$ der Zellen exprimieren β -3-Tubulin.

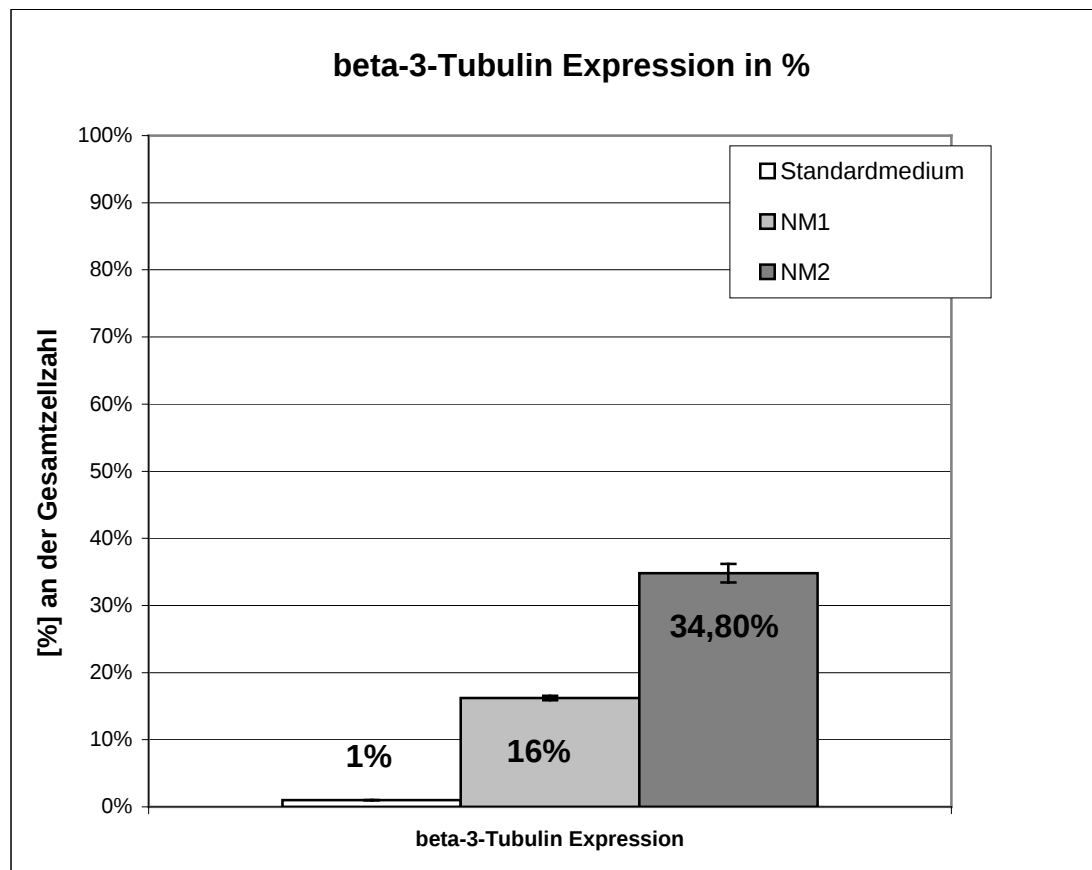


Abb.47: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine β -3-Tubulin Expression von 1%, in NM1 von 16% und in NM2 von 34,8%.

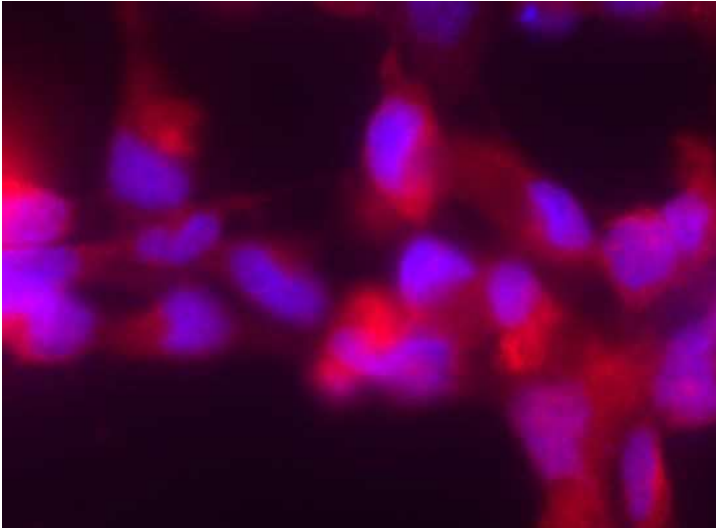


Abb.48: AFDS in NM2 (400x), GFAP (rot) und HD-Kernfärbung (blau). $67 \pm 6,3\%$ der Zellen exprimieren GFAP.

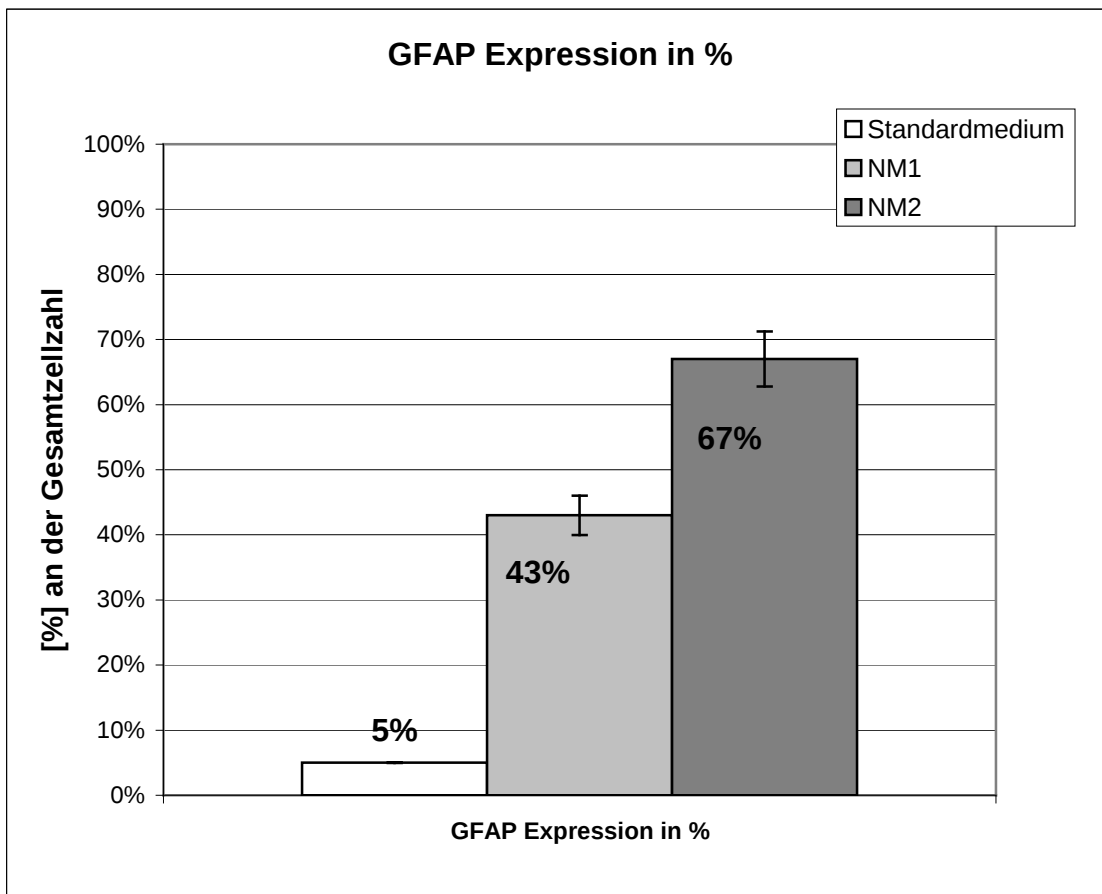


Abb.49: Gemessen an der Gesamtzahl der Zellen zeigt sich für die Zellen in Standardmedium eine GFAP Expression von 5%, in NM1 von 43% und in NM2 von 67%.

Ob sich nach neuronaler Induktion eine Regredienz an Stammzellmarkern eingestellt hat, wird stellvertretend am Beispiel für CD15 untersucht. Vorher zeigt sich eine Expression an CD15 von $95 \pm 5,5\%$ im Standardmedium. Nach

neuronaler Induktion beläuft sich die Expression für CD15 in NM1 auf $63\pm 4,6\%$ bzw. $60\pm 2\%$ in NM2. Die Expression des Stammzellmarkers ist somit deutlich zurückgegangen. Das bestätigt die Annahme, dass die Zellen mit der Differenzierung begonnen haben.

3.3 Ergebnisse der RT-PCR

3.3.1 Nachweis der Transkripte der Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Sox-2

Mittels RT-PCR sollen unterschiedliche Passagen der AFDS auf das Vorkommen der Transkripte für Sox-2, Nanog und Oct-4 als Stammzellmarker untersucht werden. Es werden jeweils zwei Proben aus Passage 4 und Passage 13 in Standardmedium aufgetragen. Als Kontrolle wird der unter 2.8.5 beschriebene 100 bp DNA-Marker verwendet.

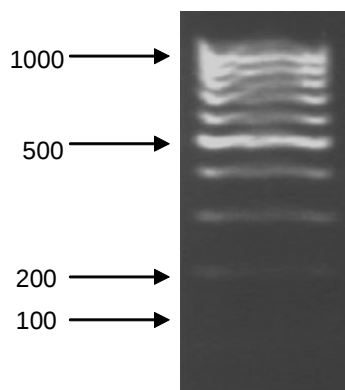


Abb.50: Darstellung des 100 bp- Markers

Die Ergebnisse sind in Abb. 51 dargestellt. Wie ersichtlich, ist in allen Ansätzen die erste Bande für Sox-2, Nanog und Oct-4 kaum oder nur schwach ausgeprägt. Es muss sich dabei um einen Fehler beim Auftragen auf das Agarose-Gel gehandelt haben, da die Nachbarbande ebenfalls Passage 4 darstellt und sehr deutlich ausgeprägt ist.

Es zeigt sich, abgesehen von der jeweiligen ersten Banden, eine starke Ausprägung der einzelnen Spuren. Die Expressionen der Marker unterscheiden sich nicht, auch nicht abhängig von der Passage. Sie sind überall sehr deutlich.

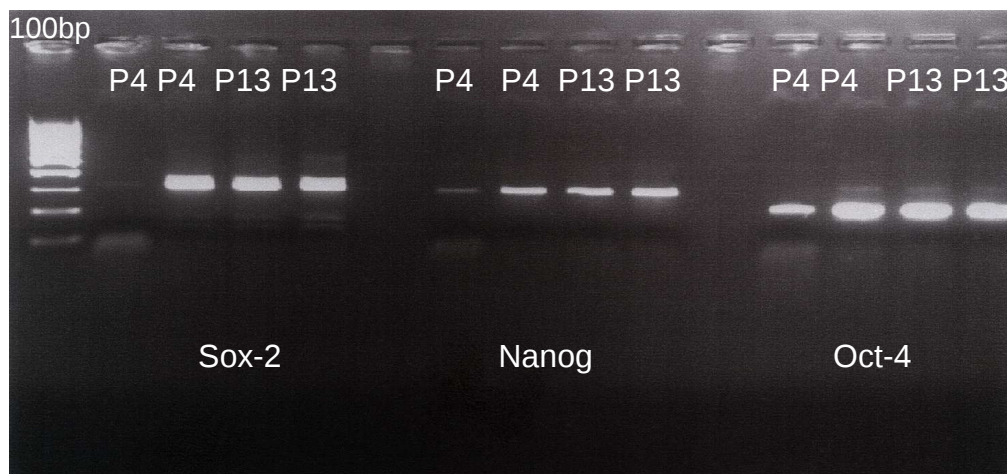


Abb.51: Darstellung der Banden für die Transkripte Sox-2, Nanog und Oct-4 aus den in Passage 4 und 13 in Standardmedium kultivierten AFDS.

3.3.2 Nachweis der Transkripte der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, GDNF und NT-3

Wie bereits erwähnt, zeigen die präselektionierten AFDS immunzytochemisch schon unter Standardbedingungen eine Ausprägung an neuronalen Markern, allerdings ohne wesentliche neuronale Morphologie aufzuweisen. Daher sollen schon an den Zellen in Standardmedium die Untersuchungen zur Expression neurotropher Faktoren durchgeführt werden, auch im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen der AFDS in Bezug auf Regeneration und Erneuerung von Nervenzellen, beispielsweise im ZNS.

Wie oben schon beschrieben, werden auch hier Zellen, die in dem Standardmedium kultiviert und verschiedenen Passagen gewonnen worden sind, eingesetzt. Es handelt sich um Zellen aus den Passagen 2, 8 und 13.

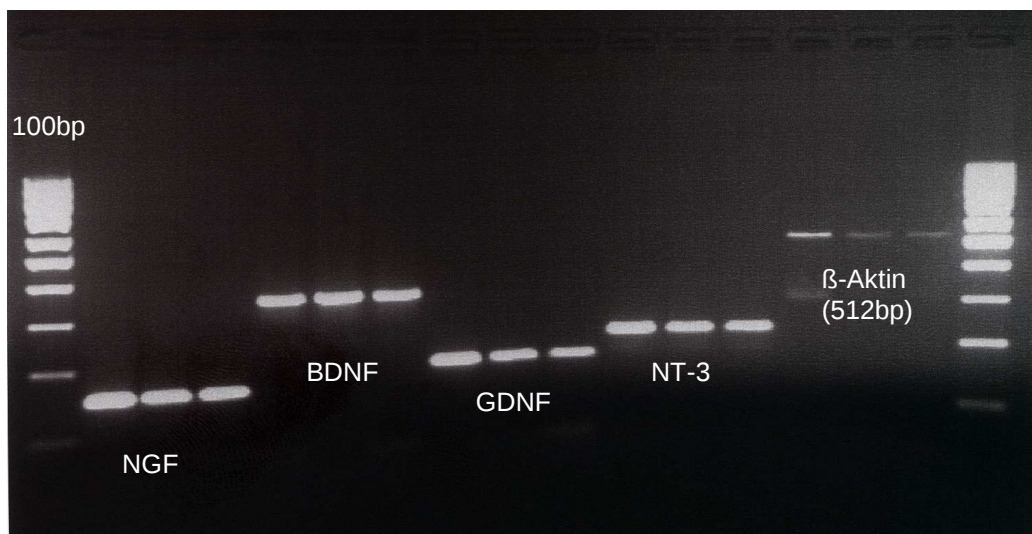


Abb.52: Darstellung der Banden für die Transkripte der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, GDNF und NT-3. Passagen 2, 8 und 13 AFDS in Standardmedium. Als Housekeeping- Gen wird β -Aktin verwendet.

Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten zeigen, dass schon in unselektionierten, noch nicht neuronal induzierten Zellen Transkripte für die vier neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, GDNF und NT-3 in drei unterschiedlichen Passagen nachweisbar sind.

3.4. Auswertung des ELISA-Assay

3.4.1 Untersuchung und Quantifizierung von NGF

Mit Hilfe der Immunzytochemie und der RT-PCR lassen sich qualitative Aussagen über das Vorkommen von neuronalen Markern und neurotrophen Faktoren machen. Um aber ebenfalls quantitativ analysieren zu können, nicht nur in welchem Ausmaße die Zellen die neurotrophen Faktoren produzieren, sondern auch ob sich mit zunehmender Differenzierung und abhängig von der Zahl der Passagen die Sekretion ändert, werden in diesem Abschnitt die in den Medien enthaltenen Konzentrationen von NGF bzw. BDNF analysiert und miteinander verglichen. Der ELISA-Assay macht dies möglich.

Die RT-PCR hat bereits gezeigt, dass sich schon unter Standardkulturbedingungen die neurotrophen Faktoren in den AFDS in verschiedenen Konzentrationen nachweisen lassen (Abb.53):

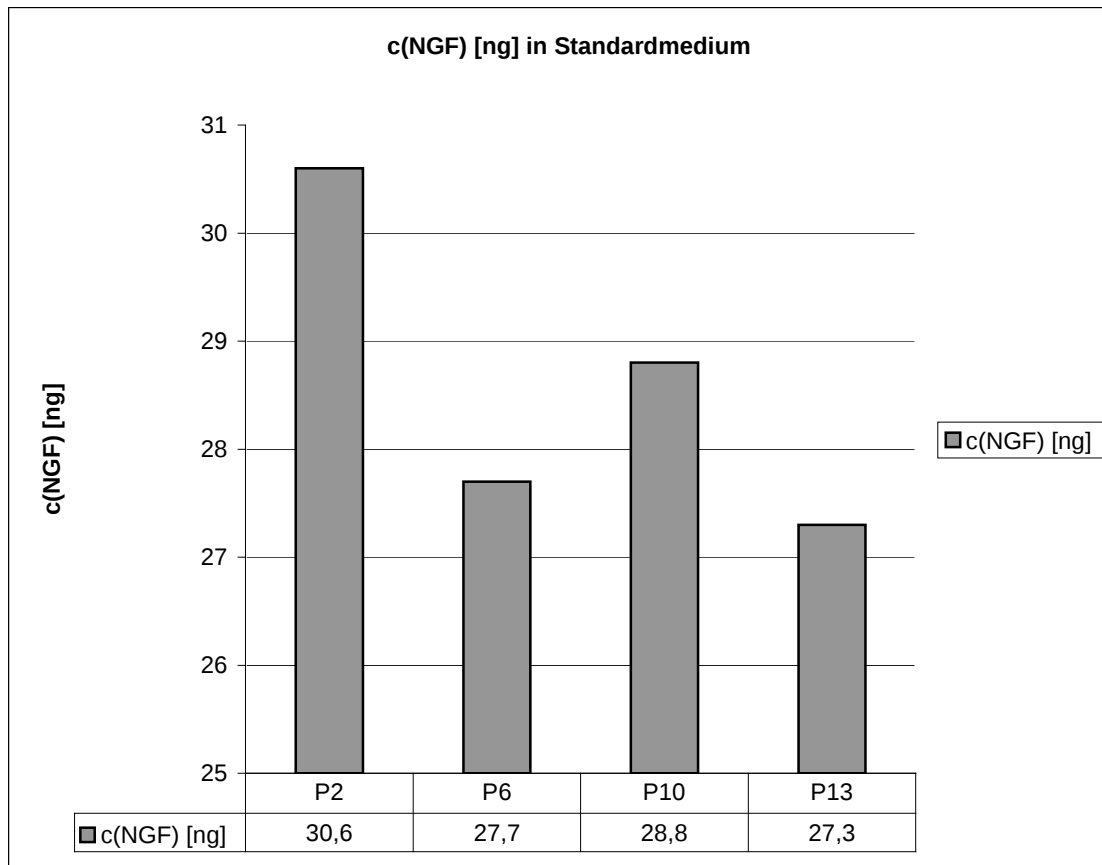


Abb.53: Konzentration von NGF im Amniozytenüberstand des Standardmediums in den Passagen 2, 6, 10 und 13 [jeweils n=2; für P13 n=3].

Schon in einer frühen Passage zeigt sich mit 30,6 ng/ml an NGF eine deutliche Produktion des neurotrophen Faktors. Wenn die Kulturüberstände nach ihrer Herkunft aus den verschiedenen Passagen analysiert werden, ist mit zunehmender Passagenzahl eine Schwankung der Konzentrationen zu beobachten. Da die Sekretion aber zwischen Passage 6 und 10 wieder zunimmt, lassen sich die Schwankungen wohl am ehesten mit unterschiedlichen Voraussetzungen bei der Versuchsdurchführung erklären. Es kann nie von der exakt gleichen Menge Zellen beim Passagieren, der exakt gleichen Menge an Medium oder der identischen Versuchsdurchführung zum Beispiel beim Pipettieren während des ELISAs ausgegangen werden. Dennoch ist insgesamt eine Regredienz der NGF- Sekretion zu beobachten.

Bei Betrachtung des Überstandes der in NM1 kultivierten Zellen, siehe Abbildung 54, fällt sofort auf, dass schon in niedriger Passage (P2) mit 104,5 ng/ml eine deutlich stärkere Sekretion von NGF als im Vergleich zum Standardmedium vorliegt, welche mit zunehmender Passagenzahl und somit Kulturdauer, deutliche Progredienz zeigt. Von Passage 2 bis Passage 13 nimmt die Sekretion um etwa 20%, auf 124,5 ng/ml zu.

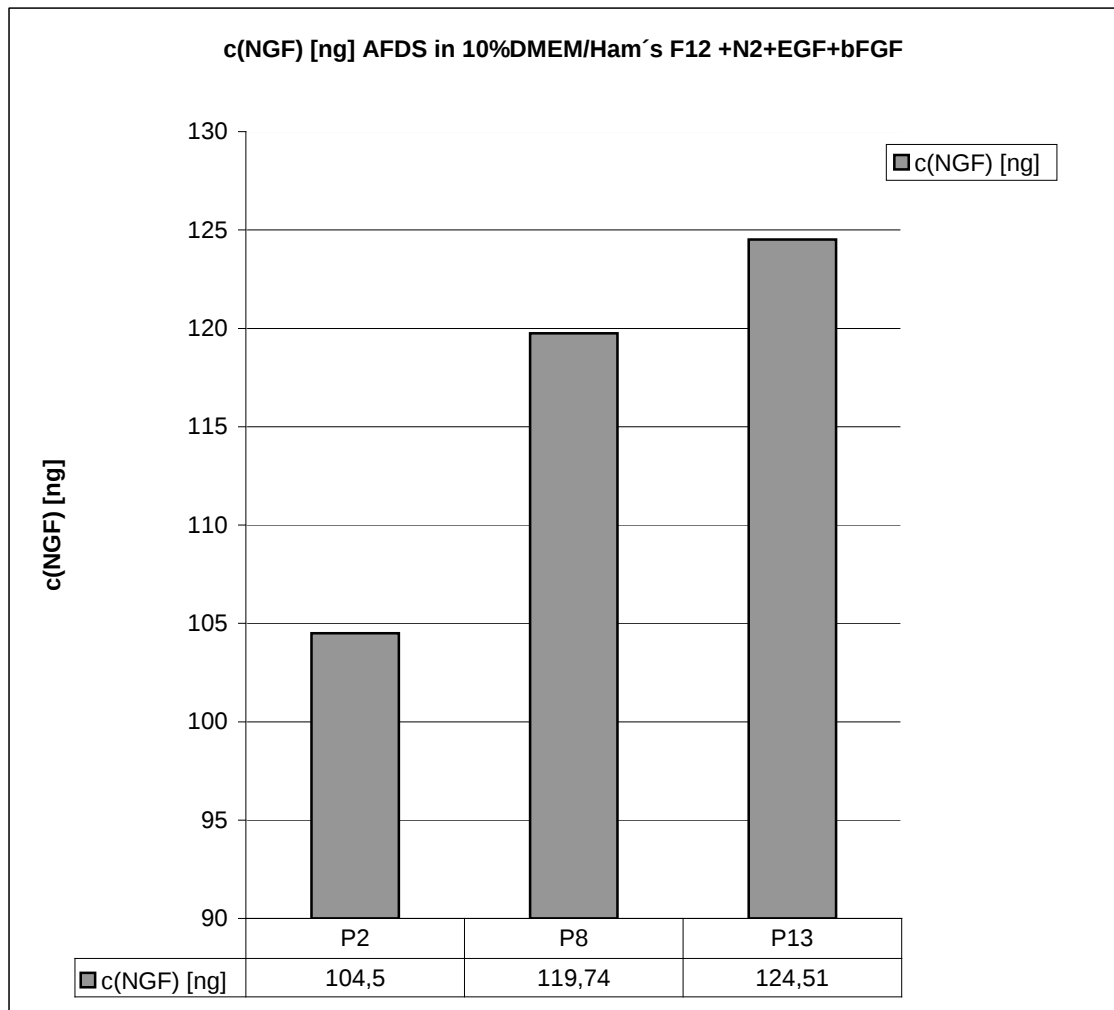


Abb.54: Konzentration von NGF im Amniozytenüberstand von NM1 in den Passagen 2, 8 und 13 [jeweils n= 3).

Die Beobachtungen für NM1 gelten in gleicher Weise auch für den Überstand der in NM2 kultivierten Zellen (Abb.55). Allerdings ist die Sekretion von NGF im Vergleich zu NM1 mit 63,1 ng/ml in Passage 2 geringer, aber immer noch deutlich stärker als in der Standardkultur. Auch hier zeigt sich eine Progredienz der NGF Sekretion von 63,1 ng/ml auf 112,6 ng/ml in Passage 13. Das entspricht einer Steigerung um 78%.

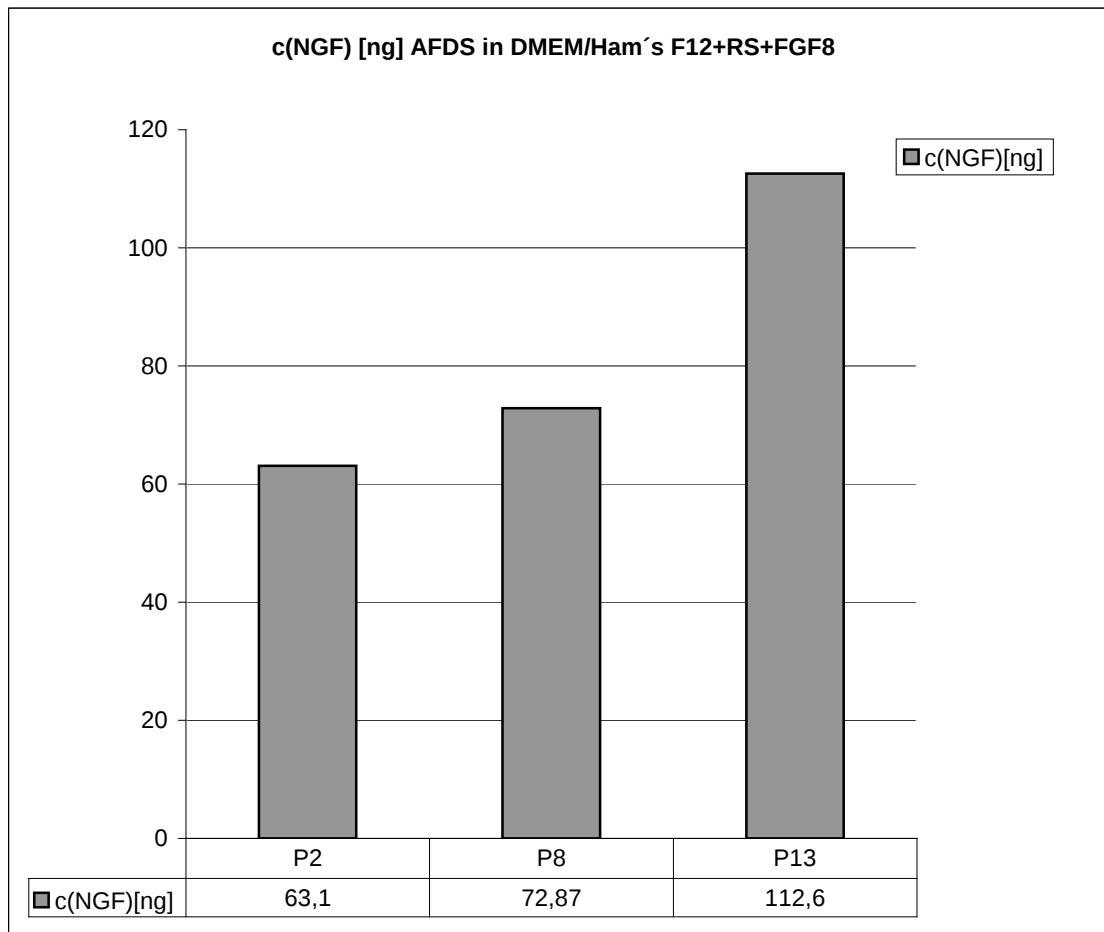


Abb.55: Konzentration von NGF im Amniozytenüberstand von NM2 in den Passagen 2, 8 und 13 [jeweils n=3].

Der direkte Vergleich aller Proben untereinander ist aus Abbildung 56 ersichtlich. Während unter Standardkulturbedingungen die NGF-Konzentration als $27,6 \pm 6$ ng/ml ermittelt werden kann, zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Konzentration in den Differenzierungsmedien NM1 mit $116,9 \pm 10,4$ ng/ml und NM2 mit $82,9 \pm 29,8$ ng/ml.

Die Sekretion von NGF ist also um ein vielfaches höher, betrachtet man die Zellen nach neuronaler Induktion. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu dem Standardmedium. Weiterhin kann beobachtet werden, dass sich NM1 auf die NGF-Produktion und Sekretion am stärksten auswirkt, da auch im Vergleich zu NM2 die Konzentration mit $116,9 \pm 10,4$ ng/ml signifikant höher ist als $82,9 \pm 29,8$ ng/ml in NM2.

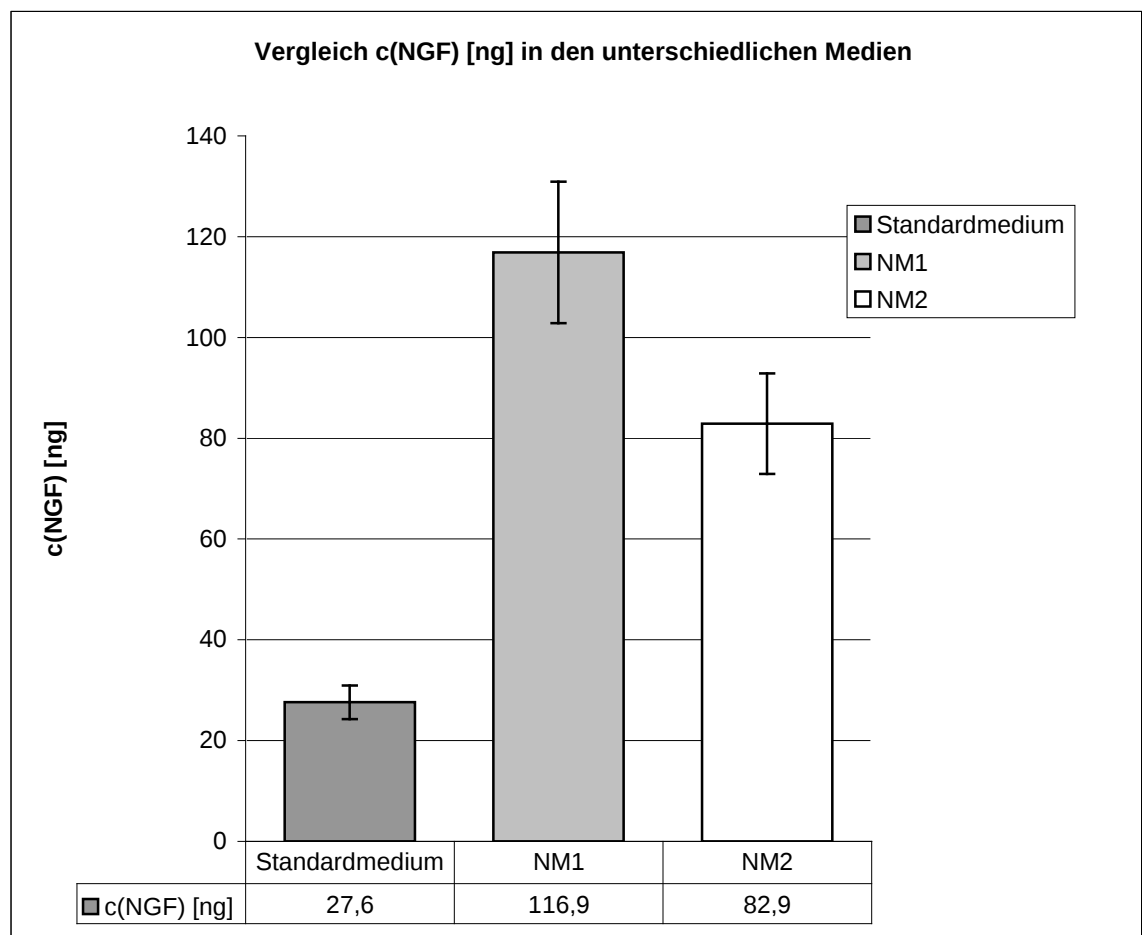


Abb.56: Vergleich der Konzentration von NGF im Amniozytenüberstand aller drei eingesetzten Medien.

3.4.2 Untersuchung und Quantifizierung von BDNF

Die AFDS in Standardmedium zeigen neben NGF auch eine deutliche BDNF Sekretion, siehe Abbildung 57:

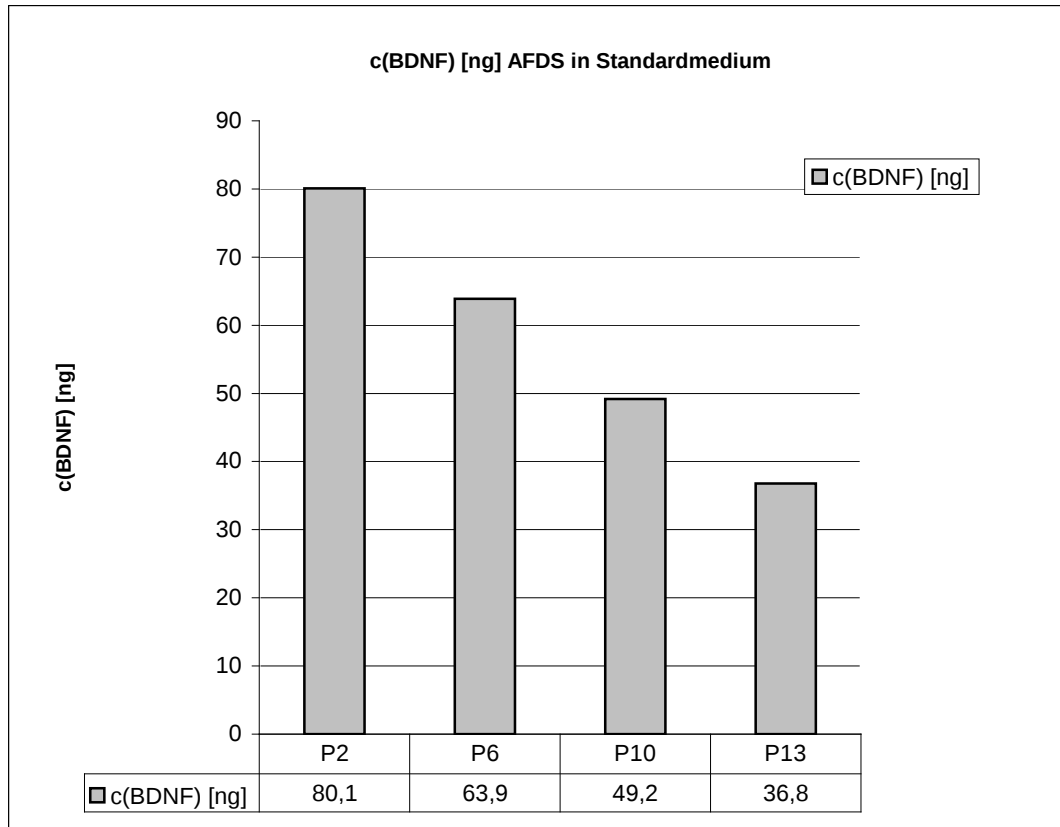


Abb.57: Konzentration von BDNF im Amniozytenüberstand unter Standardkulturbedingungen in den Passagen 2, 6, 10 und 13 [jeweils n=2, für P13 n=3].

Die BDNF-Konzentration im Standardmedium ist mit 80,1 ng/ml deutlich höher als die von NGF. Weiterhin zeigen sich keine Schwankungen, sondern die Zellen scheinen ganz klar mit zunehmender Passage die BDNF Sekretion zu senken bzw. herunterzuregulieren. Von Passage 2 bis zu Passage 13 hat sich die BDNF-Konzentration von 80,1 ng/ml auf 36,8 ng/ml um mehr als die Hälfte reduziert.

Bei Betrachtung des Überstandes der in NM1 kultivierten Zellen, siehe Abbildung 58, fällt wie bei NGF auch schon auf, dass auch in niedriger Passage (P2) mit 89,12 ng/ml eine deutlich stärkere Sekretion/höhere Konzentration von BDNF im Vergleich zum Standardmedium vorliegt, welche mit zunehmender Passagenzahl und somit Kulturdauer deutliche Progredienz zeigt. Von Passage 2 bis zu Passage 13 hat die BDNF-Konzentration von 89,2 ng/ml auf 123,45 ng/ml zugenommen. Das entspricht einer Steigerung um 39%.

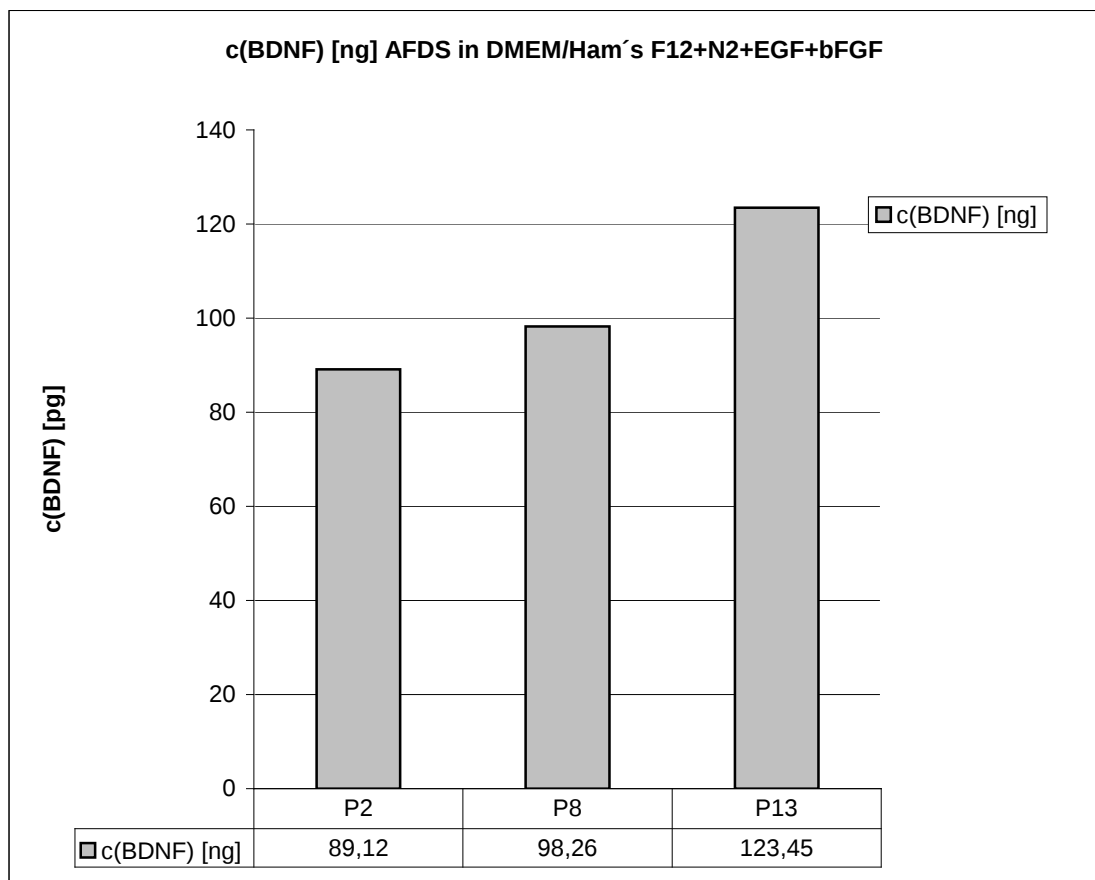


Abb.58: Konzentration von BDNF im Amniozytenüberstand von NM1 in den Passagen 2, 8 und 13 [jeweils n=3].

Die Beobachtungen für NM1 gelten in gleicher Weise auch für den Überstand der in NM2 kultivierten Zellen (Abb.59). Allerdings ist die Sekretion von BDNF im Vergleich zu NM1 mit 116,4 ng/ml in Passage 2 deutlich mehr als in der Standardkultur und ebenfalls mehr als in NM1.

Anhand des Balkendiagramms ist ersichtlich, dass sich auch bei den in NM2 kultivierten Zellen eine deutliche Progredienz der BDNF Konzentration von 116,4 ng/ml auf 134,8 ng/ml zeigt. Das entspricht einer Steigerung um 16%.

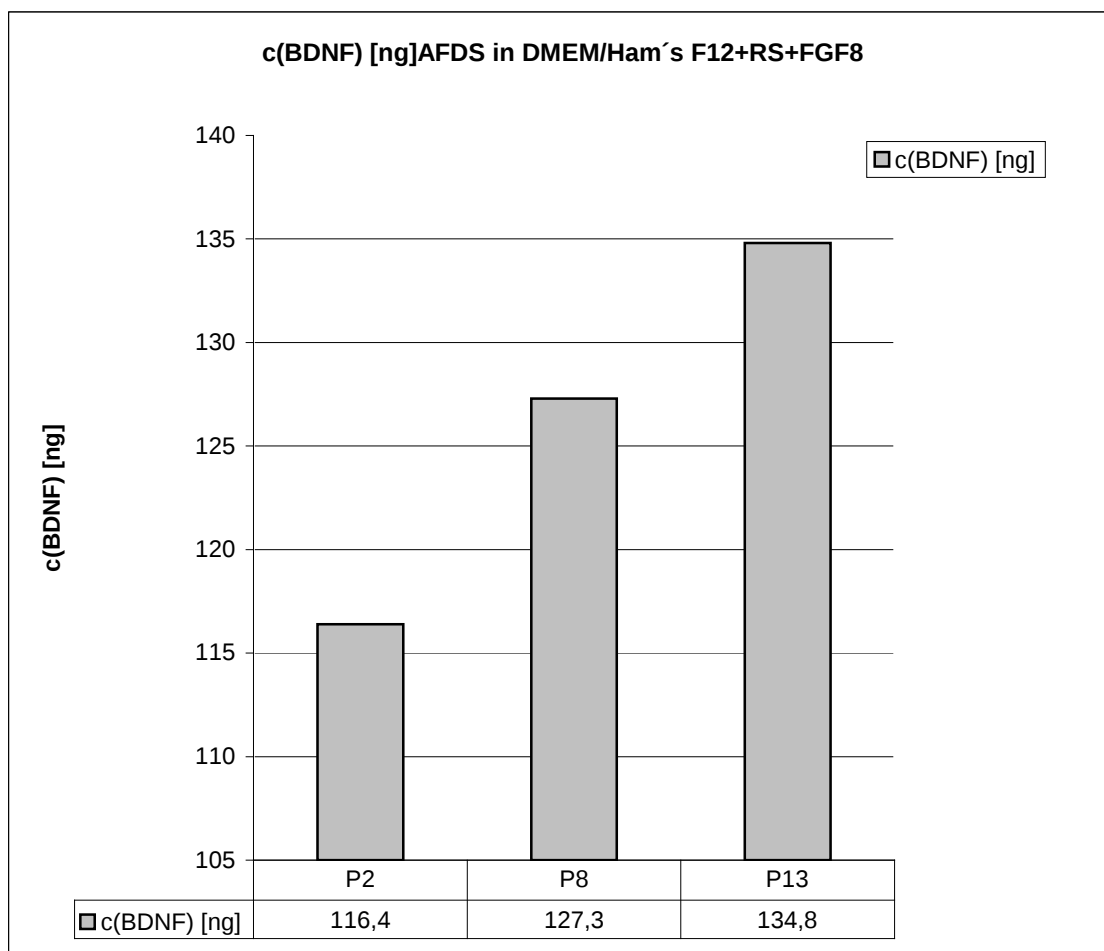


Abb.59: Konzentration von BDNF im Amniozytenüberstand von NM2 in den Passagen 2, 8 und 13 [jeweils n=3].

Der direkte Vergleich aller Proben miteinander ist in Abbildung 60 dargestellt. Während unter Standardkulturbedingungen die BDNF-Konzentration als $57,5 \pm 22,5$ ng/ml ermittelt werden kann, zeigt sich ein signifikanter Anstieg in den Differenzierungsmedien NM1 mit $98,9 \pm 20,6$ ng/ml und NM2 mit $126,2 \pm 11$ ng/ml.

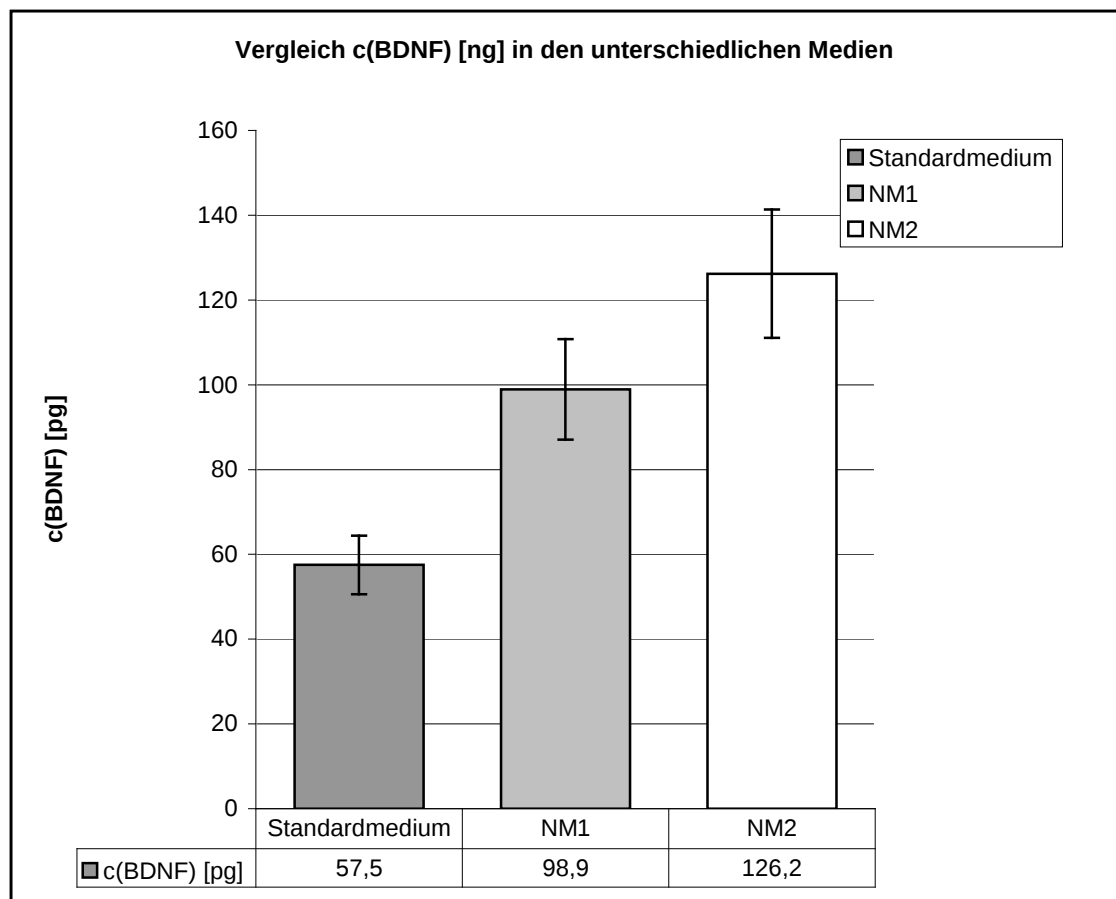


Abb.60: Vergleich der Konzentration von BDNF im Amniozytenüberstand aller drei eingesetzten Medien.

Der Vergleich der Konzentrationen in allen drei Medien zeigt einen Unterschied in der Sekretion der neurotrophen Faktoren NGF und BDNF. Während für NM1 die Konzentration an NGF mit $116,9 \pm 10,4$ ng/ml am höchsten ist, dominiert in NM2 die BDNF Konzentration mit $126,2 \pm 11$ ng/ml. In beiden Fällen sind die Werte der neuronalen Medien aber deutlich größer als die im Standardmedium.

Zusammenfassend zeigt die mittels ELISA durchgeführte Analyse die Steigerung der Konzentrationen an neurotrophen Faktoren bei Zellen, die neuronal induziert worden sind. Es machen sich signifikante Unterschiede

bemerkbar. In beiden neuronalen Medien beweist sich so eine stattgefundene und geglückte neuronale Differenzierung, da sonst die Konzentration an NGF und BDNF nicht so deutlich von der Konzentration im Standardmedium abweichen würde. NM1 wirkt sich dabei positiver auf Zellen aus die NGF, NM2 auf Zellen, die in höherem Ausmaße BDNF sezernieren.

3.5 Stereotaktische Implantation der Amniozyten

3.5.1 Beurteilung der Integration der mit GFP markierten Zellen im Striatum

Die bisherigen Experimente an den AFDS zeigen deren Charakteristik, Eigenschaften und Verhalten *in vitro*. Ziel all dieser Untersuchungen soll es langfristig aber sein, Amniozyten als Stammzellen neurogener Potenz beispielsweise zur Heilung neurodegenerativer Erkrankungen heranzuziehen und zu etablieren. Daher ist es notwendig die Zellen auch *in vivo* auf ihre neuronale Differenzierungskapazität bzw. Migration und Adaptation an ihre Umgebung in einem Empfängergewebe zu testen. Die Applikation der Zellen findet deshalb in das ZNS adulter Ratten statt. Nach adenoviraler Transduktion *in vitro* mit einem Vektor, der die Sequenz für GFP trägt, werden die immortalisierten Amniozyten stereotaktisch in das Striatum adulter Ratten injiziert, siehe 2.7 Material und Methoden.

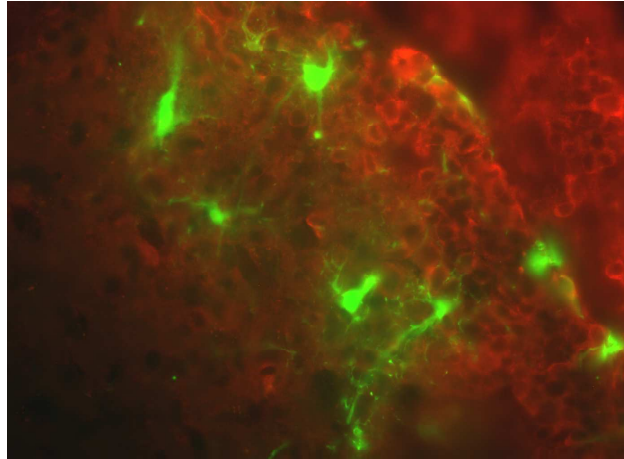
3.5.2 Untersuchungen der Zellen nach Transplantation

14 bzw. 30 Tage nach der Injektion können autofluoreszierende Zellen (GFP Fluoreszenz) in Kryostatschnitten des Striatum in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle detektiert werden. GFP-exprimierende Zellen sind in die Peripherie der Injektionsstelle und des Stichkanals gewandert und können dort als einzelne Zellen neuronaler Morphologie detektiert werden. Einige Zellen scheinen sich auch in das Ventrikelependym integriert zu haben. Dabei macht es keinen nachweislichen Unterschied, ob die Standzeiten der Tiere 14 oder 30 Tage betragen. Anhand der GFP Expression der Zellen kann eine vergleichbare Migration der markierten Amniozyten dargestellt werden.

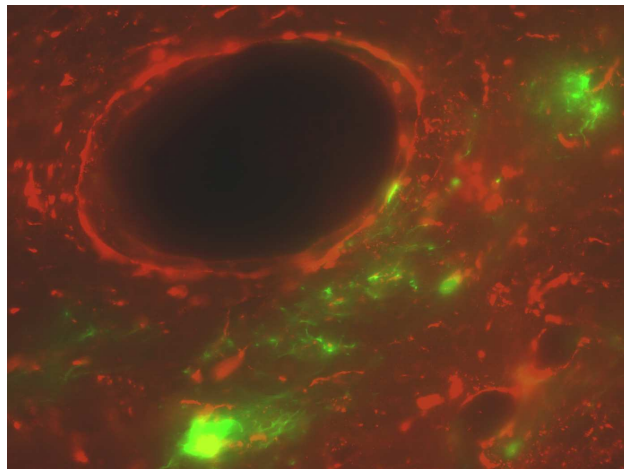
Zur genaueren Betrachtung werden die morphologischen Untersuchungen zusammen mit einer immunzytochemischen Analyse für die Antikörper Nestin,

GFAP und Neurofilament durchgeführt. Nestin wird charakteristischerweise in der axonalen Wachstumsphase von Nervenzellen exprimiert, Neurofilament und GFAP weisen Zellen der Neuro- und der Gliogenese nach und sind somit Marker für Neuronen und Gliazellen, siehe 2.4.3 Material und Methoden. Die Ko-Expression und der Nachweis dieser Marker in den Kryostatschnitten des Injektionsareals haben die morphologische Integration der GFP-markierten AFDS im Striatum bestätigt. Im Bereich der eingebrachten Zellen und in deren Migrationsareal kann keine Beschädigung der ortsständigen Nachbarzellen detektiert werden. Im Zeitraum der Untersuchungen zeigten sich weder immunologische Reaktionen der Tiere auf die injizierten Zellen noch offensichtlicher Nachweis einer Tumorformation in den histologischen Schnitten.

(a)



(b)



(c)

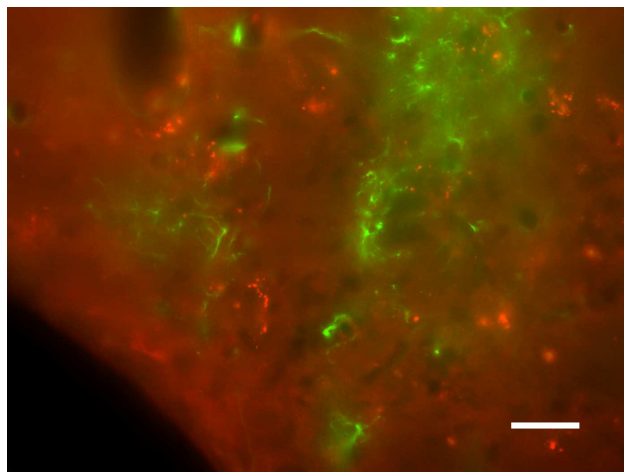


Abb.61: Detektion GFP-markierter AFDS im Striatum adulter Ratten 30 Tage nach Transplantation. Integration in die lokale Umgebung mit Ko-Darstellung des neuronalen Vorläuferzellmarkers Nestin (a), dem glialen Marker GFAP (b) und dem neuronalen Marker Neurofilament (c).

Besonders bemerkenswert ist die Formation der GFP-markierten Zellen in ihrer Nachbarumgebung. (Maßstab = 10mm in a-c)

4. DISKUSSION

4.1 Zielsetzung der Dissertation

Wie angeführt, wird ständig nach alternativen Zelltypen mit Stammzeleigenschaften gesucht. Besitzt eine Zelle diese Eigenschaften, muss es auch möglich sein, sie durch verschiedene Faktoren so zu beeinflussen, dass sie sich in eine gewünschte Richtung ausdifferenziert. In dieser Arbeit werden Amniozyten verwendet. Nach Untersuchungen auf Stammzeleigenschaften dieser Zellen wird eine Induktion in die neuronale Richtung angestrebt. Das Ziel dieser Dissertation ist es, die neuronale Differenzierungskapazität immortalisierter humaner Amniozyten zu untersuchen.

Zunächst werden unterschiedliche Kulturbedingungen in unterschiedlichen Medien geschaffen. Ein Standardkulturmedium und zwei neuronale Differenzierungsmedien sollen unter Normalbedingungen (21% Sauerstoff) und Hypoxie (3% Sauerstoff) verglichen werden, ebenso wie die Proliferationsrate der Zellen und deren Morphologie und Wachstumsverhalten. An den unterschiedlich kultivierten Zellen wird dann eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt, um zu ermitteln, welche Zellen unter welchen Kulturbedingungen welche Stammzell- bzw. Differenzierungsmarker exprimieren. Als qualitative Marker werden sowohl Stammzell- als auch Marker neuronaler Zellen verwendet. Zu den eingesetzten Stammzellmarkern gehören CD90, CD15 und CD117. Zur Untersuchung der neuronalen Differenzierungskapazität werden Antikörper gegen Nestin, α -Internexin, A2B5 und HNK1, β 3-Tubulin, GFAP und Neurofilament in die Studie aufgenommen. Zur Identifizierung der verschiedenen Zellpopulationen aus der Amnionflüssigkeit werden zusätzlich Antikörper gegen Vimentin, E-Cadherin und Cytokeratin verwendet. Anhand des Expressionsmusters und des prozentualen Anteils der immuno-positiven Zellen lassen sich dann auch quantitative Aussagen zum Vorkommen der Marker machen.

Mittels RT-PCR werden diverse Genabschnitte der Amniozyten näher betrachtet und qualitativ auf das Vorkommen der Genabschnitte für die Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Sox-2 und die neuronalen Marker BDNF, NGF, NT-3 und GDNF untersucht. Anschließend erfolgt der Nachweis der von den Zellen synthetisierten neurotrophen Faktoren NGF und BDNF mittels ELISA, um eine quantitative Aussage über deren Vorkommen machen zu können. Abschließend erfolgt eine Transduktion der Zellen mit Hilfe eines adenoviralen Vektors zur Einschleusung der Reportergensequenz EGFP und die stereotaktische Implantation der so markierten Zellen in das Striatum von adulten Ratten. Die Zellen verbleiben dort 14 bzw. 30 Tage. Nach Tötung der Tiere werden ihre Gehirne unter Kryoprotektion eingefroren und anschließend mit Hilfe eines Kryostaten Gefrierschnitte angefertigt. Via Immunfluoreszenz lässt sich dann die Integration und Adaptation der Zellen an ihre Umgebung im Empfängergewebe auswerten.

4.2 Kritik der Methode

Das Ziel dieser Arbeit, die Amniozyten umfassend auf ihre Eigenschaften zu untersuchen, soll erreicht werden, indem möglichst unterschiedliche, etablierte und gut anwendbare Verfahren zum Einsatz kommen, die darüber hinaus auch leicht reproduzierbar sind. Des Weiteren sollen die Zellkulturbedingungen so ausgewählt werden, dass möglichst viele Informationen über die Eigenschaften der AFDS gewonnen und dabei qualitative als auch quantitative Ergebnisse aufgezeigt werden können.

Diese Arbeit stützt sich sowohl auf lichtmikroskopische Verfahren zur Dokumentation des Zellwachstums und der morphologischen Charakteristika der Zellen in Kultur als auch auf immunzytochemische Untersuchungen, die sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über eine Markerexpression zulassen. Darüber hinaus erfolgen qualitative molekularbiologische Untersuchungen mittels RT-PCR und quantitative ELISA-Untersuchungen zum Nachweis neurotropher Faktoren. Die Transplantationsversuche *in vivo* sollen schließlich die Differenzierungskapazität in einem Empfängergewebe durch das

Vor-Ort-Milieu zeigen und einen Hinweis auf einen möglichen therapeutischen Einsatz der Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen geben.

Die Auswahl dieser Verfahren ist von entscheidender Bedeutung, denn so kann das Ziel der Arbeit im Vorhinein klar definiert werden. Im vorliegenden Falle sollte untersucht werden, ob immortalisierte Amniozyten neuronale Eigenschaften aufweisen können. Die Auswahl der genannten Verfahren basiert darauf, dass die Zellen auf unterschiedliche Charakteristika untersucht werden. So kann beispielsweise das Verhalten in Kultur in den unterschiedlichen Medien und das Wachstumsverhalten auf unterschiedliche Morphologien schließen lassen. Wie in der Literatur bereits beschrieben, zeigen die Amniozyten in Kultur abhängig vom Medium unterschiedliche lichtmikroskopische Morphologien, beispielsweise gliazell- oder fibroblastenähnlich (Woodbury et al., 2006). Mit Hilfe der Immunzytochemie wird dann auf das Vorkommen verschiedenster, ausgewählter Marker untersucht. Mit diesem Verfahren konnte beispielsweise auch bei Woodbury schon eine Expression an β -3-Tubulin in kultivierten Amniozyten gezeigt werden. Dabei steht die Untersuchung zur Expression von Stammzellmarkern, aber auch das Vorkommen von neuronalen Markern im Vordergrund. Die Auswahl dieser Marker erfolgte aufgrund schon bekannter Ergebnisse aus vergleichbaren Arbeiten und ist hinreichend während der Versuchsbeschreibungen begründet worden. Die unterschiedliche Markerexpression in Abhängigkeit der Zellkulturmedien von Medium und Passage lässt eindeutige Rückschlüsse auf die Zellcharakteristik zu, nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nach Auszählen der immuno-positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl.

Die Anwendung der RT-PCR und die Untersuchung auf Transkripte für Stammzellmarker wie auch auf neurotrophe Faktoren erlauben lediglich eine qualitative Aussage. Auch hier konnten Woodbury et al. bereits 2006 eine Expression an Oct-4 als Pluripotenznachweis und eine Expression von GAP-43 als neuronalen Marker zeigen. Diese Nachweise gelangen in diesem Fall ebenfalls mit Oct-4 als Stammzell- und beispielsweise GDNF als Neuronenmarker. (Woodbury et al., 2006) Der ELISA zum Nachweis von

neurotrophen Faktoren dient dazu, die molekularbiologischen Ergebnisse zu bestätigen und darüber hinaus sogar eine quantitative Aussage über die Syntheserate der entsprechenden Faktoren zu machen. Die Ergebnisse unter den verschiedenen Kultur- und Differenzierungsbedingungen können anschließend untereinander verglichen werden. Durch die Nutzung unterschiedlichster Verfahren konnte hier somit eine möglichst weite Betrachtung der Zellcharakteristika stattfinden und die neuronale Differenzierung erreicht werden.

Sicherlich sind die tierexperimentellen Untersuchungen zur Integrationsfähigkeit der Zellen nach stereotaktischer Implantation in das Striatum von Ratten *in vivo* in dem hier dargestellten Umfang keinesfalls hinreichend. Um Aussagen über das tatsächliche Verhalten *in vivo* machen zu können, ist die Zahl der Versuchstiere mit $n=6$ dafür nicht ausreichend. Dennoch bieten diese Untersuchungen erste Anhaltspunkte für die Integrationsfähigkeit der Zellen *in vivo*. Um allerdings fundierte Aussagen über die Möglichkeit diese AFDS zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen am Menschen einzusetzen treffen zu können, müssen noch weitere Untersuchungen dieser Art folgen. Dennoch ist mit dieser Arbeit der Weg für eine mögliche therapeutische Applikation der Zellen grundsätzlich aufgezeigt.

4.3 Diskussion der Befunde

Auf der Suche nach Zellpopulationen, die als Quelle für Zell-Ersatz-Therapien dienen können, standen bisher embryonale oder adulte Stammzellen im Zentrum des Interesses. Eine ebenso interessante wie gut zugängliche Alternative könnten fetale Stammzellen aus der Amnionflüssigkeit darstellen. Aufgrund ihres fetalen Ursprungs könnten sie einen weit höheren Plastizitätsgrad als andere Zelltypen, beispielsweise mesenchymale oder adulte Stammzellen, aufweisen. Ein weiterer Vorteil der AFDS ist sicherlich auch, dass die Zellen ohne ethische Grundsätze zu verletzen, gewonnen und kultiviert werden können.

Im Laufe der Zeit sind schon einige Daten zu dem Potential und Verwendung der Amnionzellen als Stammzellen veröffentlicht worden (Prusa and Hengstschlager, 2002; Prusa et al., 2003). All diese Veröffentlichungen haben sich mit den unterschiedlichen Zelltypen, die im Amnion und in der Amnionflüssigkeit vorkommen, und deren Eigenschaften auseinandergesetzt. In dieser Arbeit werden Zellen des Typs AFDS charakterisiert, die durch die Transduktion mittels eines adenoviralen Vektors (Schiedner et al., 2000) immortalisiert worden sind. Dies ist die erste vorliegende Arbeit zur Charakterisierung von Zellen dieses Typs. Die homogene Population an immortalisierten AFDS wurde hier sowohl auf ihre Stammzeleigenschaften als auch auf ihre neuronale Differenzierungskapazität untersucht.

Die Betrachtung des Verhalten der Zellen in Kultur zeigte zu Beginn der Versuche eindeutig, dass es sich um die gewünscht selektionierten Zellen des Typs AFDS (siehe Einleitung) handeln musste, da die Zellen in Standardmedium kultiviert, lichtmikroskopisch epitheliales Zellwachstum aufwiesen. Sie formierten sich in Zellgruppen, bildeten deutliche Zellkontakte aus und zeigten polygonale Morphologien. Dies wurde auch durch die Detektion der immunzytochemischen Marker E-Cadherin, zum Nachweis von Zell-zu-Zell-Kontakten von epithelialen Zellen, und Cytokeratin, als spezifisches Intermediärfialament von epithelialen Zellen, bestätigt. Durch die Transduktion mittels des adenoviralen Vektors (Schiedner et al., 2000) konnte eine unlimitierte Passagenanzahl erreicht werden, die auch bei fortschreitender Kulturdauer ebenso schnell proliferierende Zellen epithelialen Wachstums hervorzubringen in der Lage war. Eine erneute Kryokonservierung hat in Kultur, lichtmikroskopisch und immunzytochemisch, keine Veränderung gezeigt, was bedeutet, dass die Zellen nach Expansion in flüssigem Stickstoff problemlos gelagert und aufbewahrt werden können. In Anbetracht des möglichen therapeutischen Nutzens der Amniozyten ist es von großer Bedeutung, dass die Möglichkeit gegeben ist, die Zellen über Jahre hinweg in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahren zu können. Der Nachweis von E-Cadherin sowie Cytokeratin als epitheliale Marker und die unlimitierte Möglichkeit des Passagierens und der Kryokonservierung ist 2001 durch Kaviani beschrieben und in unseren Versuchen bestätigt worden (Kaviani et al., 2001).

Auch die Zellen, die in neuronalen Induktionsmedien kultiviert worden sind, zeigten hinsichtlich ihrer Passagenzahl keine Limitationen. Lichtmikroskopisch konnte das Auswachsen glialer Fortsätze eindeutig dokumentiert und das unterschiedliche Wachstumsverhalten im Vergleich zur Standardkultur festgehalten werden. Morphologisch wurden somit neuronale Charakteristika nachgewiesen, was spätere immunzytochemische Untersuchungen unter Verwendung neuronaler Marker bestätigen konnten. Erneutes Kryokonservieren hatte auch hier keinen Einfluss auf den Fortbestand und Differenzierbarkeit in Kultur. Die Zellen ließen sich ohne Probleme lagern.

Sowohl für die Standard- als auch für die neuronalen Kulturen zeigte sich einheitlich eine höhere Proliferationsrate unter hypoxischen Bedingungen. Im direkten Vergleich proliferierten die Zellen in allen Fällen deutlich besser unter 3% im Vergleich zu 21% Sauerstoff. Die Zellen in Standardkultur zeigten eine Wachstumszunahme um 105% unter Hypoxie im Vergleich zu Normalbedingungen, auch die Verdopplungszeit verkürzte sich. Die in NM1 kultivierten Zellen waren in der Lage unter Hypoxie ihr Wachstum um 54,4% zu steigern und somit die Verdopplungszeit ebenfalls zu verkürzen. In NM2 zeigte sich eine Wachstumssteigerung um 87,59% bei einer ebenfalls verkürzten Verdopplungszeit unter Hypoxie im Vergleich zu Normalbedingungen. 2003 führte Kaviani auch Versuche an Amniozyten unter hypoxischen Kulturbedingungen durch und gelangte zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Proliferationseigenschaften. Auch in diesen Versuchen, die allerdings in Standard- und nicht in Induktionsmedien stattfanden, zeigte sich eine signifikant höhere Proliferationstendenz unter Sauerstoffmangel (Kaviani et al., 2003).

Die Verdopplungszeit der Zellen in Kultur wies keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Standardmedium und dem Differenzierungsmedium NM1 auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sich das Wachstumsverhalten der Zellen nach Differenzierung in NM2 dem der übrigen Kulturen annäherte. Es konnte ermittelt werden, dass sich die Hypoxie ebenfalls positiv auf die Zellen in NM2 auswirkte, sie vermehrten sich unter Hypoxie rund 30% schneller als unter 21% Sauerstoff. Zusammenfassend zeigte sich, dass sich für das Zellwachstum das Standardmedium unter Hypoxie bei undifferenzierten Zellen am positivsten

auswirkt und für die Zellen in diesem Versuchsansatz die besten Kultivierungsbedingungen vorherrschten, so dass sie sich in kürzester Zeit verdoppeln konnten. Den Versuchsansätzen gemein war, dass alle Zellen, undifferenziert und in beginnender Differenzierung, besser auf einen erniedrigten Sauerstoffgehalt in der Atmosphäre ansprachen. Diese Ergebnisse bestätigten die Erwartungen: Amnionzellen und auch die unterschiedlichen Typen von Nervenzellen müssen an einen erniedrigten Sauerstoffgehalt adaptiert sein.

Wie Held und Sonnichsen in Versuchen an Amnionzellen unter Standard- und hypoxischen Bedingungen bereits beschrieben haben, herrscht in der Amnionflüssigkeit Sauerstoffmangel (Held and Sonnichsen, 1984). Da die Zellen an einen erniedrigten Sauerstoffgehalt adaptiert sind, zeigen sie unter Hypoxie deutlich mehr Tendenz zu proliferieren. Von anderen Stammzelltypen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Differenzierung zu Nervenzellen unter hypoxischen Bedingungen besser abläuft als unter 21% O₂. So war beispielsweise in *in vitro* Versuchen an neuronalen Stammzellen der Maus, in der diese Zellen unter 20%, 4% und 2% Sauerstoff kultiviert worden waren, die grösste Proliferations- und Differenzierungsrate unter 2% nachweisbar (Horie et al., 2008). Dieses Ergebnis deckt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Die Untersuchungen haben also bestätigt, dass Zellen, die aus einer an niedrigen Sauerstoffgehalt adaptierten natürlichen Umgebung stammen, Mechanismen entwickelt haben, sich bestens an ihre Umwelt anzupassen (Sikkema-Raddatz et al., 2006), und auch auf ischämische Bedingungen reagieren können (Wang et al., 2008). Die Tatsache, dass die undifferenzierten Zellen in ihrer Gesamtheit schneller als die Zellen nach Induktion proliferierten, ist ein erwartetes Ergebnis, denn Nervenzellen sind eine Zellart, die sich im Vergleich zu anderen Zellarten langsam teilen und entwickeln. So findet beispielsweise bei Nerven nach Verletzungen in der Peripherie das Wachstum mit einer Geschwindigkeit von circa 1mm/Tag statt (Physiologie des Menschen; Schmidt/Lang/Thews, Springer Verlag, 29. Auflage). Die Ergebnisse der Proliferationsversuche können deshalb als ein weiterer Schritt einer gelungenen Induktion gedeutet werden. Dies wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass die Zellen, die mit dem Nährmedium 2 induziert worden sind, das Potential haben

sich in ausgereifte Neurone zu entwickeln, wie sich in späteren Versuchen herausgestellt hat, während sich die Zellen aus NM1 eher im Stadium neuronaler Vorläuferzellen befinden und somit schneller teilen können.

Immunzytochemische Untersuchungen wurden zur Detektion von Stammzellmarkern und Markern zum Nachweis neuronaler Charakteristika herangezogen. Da in dieser Arbeit eine mögliche Zelldifferenzierung angestrebt wird, sollten zunächst Stammzellmarker detektiert werden, denn das Vorliegen von Stammzeleigenschaften wäre die Voraussetzung für eine mögliche Differenzierungskapazität dieser Zellpopulation. Die hier verwendeten Stammzellmarker CD15, CD117 und CD90 (Morrison et al., 1997; Muramatsu and Muramatsu, 2004; Yanagisawa and Yu, 2007) konnten alle zu einem hohen Prozentsatz detektiert werden. Bei der vorliegenden Population an AFDS zeigte sich somit eine deutliche Stammzellcharakteristik und mögliche Differenzierungskapazität. Besonders CD15 konnte einheitlich in der AFDS Population nachgewiesen werden. CD15 als Oberflächenmarker wird auf primordialen Keimzellen und embryonalen Stammzellen von Mäusen und humanen primordialen Keimzellen exprimiert (Muramatsu and Muramatsu, 2004; Fenderson et al., 2006), wurde aber auch bei humanen embryonalen Stammzellen nachgewiesen (Klassen et al., 2001). Auch der Nachweis von CD117, einem Oberflächenmarker, der Auskunft über die Selbsterneuerungsfähigkeiten von Stammzellen gibt, und das Vorkommen von CD90 in über 80% der Zellen, als spezifische Oberflächenmarker für eine Vielzahl von Stammzellen (Kemshead et al., 1982; Morrison et al., 1997), unterstrichen die Stammzeleigenschaften. In diesem Zusammenhang ist noch interessant zu erwähnen, dass erst kürzlich über eine CD117 positive Population mesenchymaler Zellen in der Amnionflüssigkeit berichtet worden ist, die in der Lage sind, sich in alle drei embryonalen Keimblätter auszudifferenzieren (De Coppi et al., 2007).

Die Annahme, die Zellen besäßen Stammzeleigenschaften, wurde zusätzlich in der RT-PCR bestätigt. In den Untersuchungen auf die Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Sox-2 (Prusa et al., 2003; Komitova and Eriksson, 2004) konnten

die entsprechenden Banden sichtbar gemacht und so die Stammzellcharakteristik der AFDS eindeutig bewiesen werden.

In den undifferenzierten Zellen ließen sich ebenfalls einige neuronale Marker wie Nestin, Vimentin und A2B5 nachweisen. Dies heißt, dass die Zellen schon in undifferenziertem Zustand neuronale Eigenschaften aufwiesen und die Möglichkeit zur neuronalen Induktion unter Verwendung der entsprechenden Induktionsmedien gegeben war. Unter diesen Voraussetzungen wurden die Zellen in den beiden unterschiedlichen Medien neuronal induziert und nach erfolgter neuronaler Induktion erneut auf die Expression neuronaler/ neuraler Marker getestet und festgestellt, dass die Expression nach Induktion deutlich anstieg.

Nach statistischer und graphischer Darstellung lassen sich die immunzytochemischen Untersuchungen also wie folgt auswerten: Generell ist festzuhalten, dass die AFDS auch ohne Induktion ganz deutlich neuronale Charakteristika zeigten. Die Zellen exprimierten in Standardkultur schon in beachtlichem Ausmaß Marker für neuronale Vorläuferzellen. Die neuronalen Marker, die typisch für reife Nervenzellen sind, ließen sich ohne Induktion allerdings nicht detektieren. Die Zellen zeigten zwar neuronale Eigenschaften in Bezug auf die Expression des neuronalen Stammzellmarkers Nestin, des Markers Vimentin als glialen und A2B5 als oligodendrozytären Vorläuferzellmarker, haben sich aber noch nicht in ausgereifte Nervenzellen differenzieren können, da sich keiner der anderen Marker für reife Neurone und Gliazellen nachweisen ließ. Anders verhielten sich die Zellen in den Induktionsmedien. Dort konnte zunächst eine signifikant höhere Expressionsrate der Marker für neuronale Vorläuferzellen als im Standardmedium detektiert werden. Darüber hinaus konnten unter diesen Bedingungen sowohl Marker für ausgereifte neuronale Zellen (β -3-Tubulin, Neurofilament) als auch für Astrozyten (GFAP), die unter Standardbedingungen nicht nachweisbar waren, aufgezeigt werden. Während für Neurofilament, β -3-Tubulin und GFAP kaum eine Expression im Standardmedium sichtbar gemacht werden konnte, stieg die Expression dieser nach Induktion sehr deutlich. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle war ein signifikanter

prozentualer Anstieg der neuronalen Markerexpression für Neurofilament, β -3-Tubulin für GFAP zu verzeichnen. Das Vorkommen dieser Marker bedeutete gleichzeitig, dass die Induktion tatsächlich erfolgreich gewesen ist. Es ist an dieser Stelle der Nachweis erfolgreicher Induktion gelungen, was aussagt, dass die AFDS das Potential besitzen, in Neurone ausreifen zu können.

Die neuronalen Medien zeigten auch Unterschiede im direkten Vergleich, abhängig von dem verwendeten Medium. Die Auswertung bewies eine deutliche Präferenz für die Entwicklung der Zellen in neuronale Vorläufer (HNK-1, Vimentin, Nestin) (Messam et al., 2000; Sultana et al., 2000) unter Zugabe des Mediums NM1. Die Marker für reife Zellen (Nachweis GFAP, Neurofilament, β -3-Tubulin) konnten eher nach Kultivierung im Induktionsmedium NM2 detektiert werden. Die immunzytochemischen Untersuchungen an den Zellen, die neuronale Morphologien aufwiesen, konnten also somit auch bestätigen, dass HNK-1 als Marker neuronaler Vorläufer betrachtet werden kann (Yanagisawa and Yu, 2007). In Bezug auf den Markernachweis der frühen neuronalen Entwicklung (A2B5, α -Internexin) (Wang et al., 2006) blieb das Zahlenverhältnis immuno-positiver Zellen für beide Medien in etwa gleich. Weiterhin zeigte sich, dass sich nach neuronaler Induktion eine Regredienz an Stammzellmarkern eingestellt hatte, was stellvertretend am Beispiel für CD15, der als Marker für embryonale Stammzellen gilt (Klassen et al., 2001), untersucht wurde. Vor der Induktion der Differenzierung belief sich die CD15-Expression auf $95 \pm 5,5\%$ im Standardmedium, nach neuronaler Induktion konnte lediglich eine Expression für CD15 in NM1 von $63 \pm 4,6\%$ bzw. $60 \pm 2\%$ in NM2 nachgewiesen werden. Die Expression des Stammzellmarkers ist somit deutlich zurückgegangen. Das bestätigte die Annahme, dass in den Zellen tatsächlich Differenzierungsvorgänge abgelaufen sind.

Als Ergebnis all dieser Versuche zeigte sich, dass eine Differenzierung der immortalisierten Zellen aus der Amnionflüssigkeit möglich ist, was sogar selektiv durch die entsprechende Wahl des Mediums gesteuert werden konnte. Abhängig vom gewünschten Ergebnis kann man die Zellen entweder mit EGF, bFGF und N2 oder FGF-8 und Retinsäure versetzen. Die Wahl des

Differenzierungsmediums sollte dann nach dem gewünschten Ergebnis erfolgen. Um einen möglichst breiten therapeutischen Nutzen zu erreichen und den Zellen auch beispielsweise noch nach einer intrazerebralen Injektion die Möglichkeit zur Adaption an die Nachbarzellen und zur Differenzierung zu geben, sollte der Zusatz von bFGF und EGF angestrebt werden. Ist eine Population an ausgereiften Nervenzellen erwünscht, sollte das neuronale Induktionsmedium mit Retinsäure- und FGF8-Zusatz gewählt werden, um die Differenzierung im Vorhinein zu erreichen (Maden, 2007). So ist schon bei Maden et al. beschrieben, dass RS bei der Induktion neuraler Differenzierung, Auswachsen von Motoneuronen und neuralem Vernetzungsmuster einer der wichtigsten Faktoren ist. Sogar die Rolle nach erfolgter Entwicklung ist immens. Erhöhte RS-Spiegel konnten bei der Nervenregeneration als Trigger für das Auswachsen von Axonen nachgewiesen werden, während eine niedrige RS-Konzentration mit neurodegenerativen Prozessen assoziiert zu sein scheint, beispielsweise bei der Motoneuronenkrankheit, der Entwicklung von Alzheimer und sogar der des Morbus Parkinson (Maden, 2007; Morrison and Hof, 1997). Ähnliche Ergebnisse sind schon für die AFDS nach Induktion neuronaler Differenzierung beschrieben worden, bei diesen Untersuchungen wurde die Differenzierung mittels Retinsäure und FGF4 als neuronale Differenzierungsfaktoren eingeleitet (Miki et al., 2005).

Die oben angeführten neuronalen Charakteristika, die durch die immunzytochemischen Markerexpressionen belegt wurden, haben sich zusätzlich noch durch das Vorkommen der Gentranskripte der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, GDNF und NT-3 in der RT-PCR an den unselektionierten AFDS nachweisen lassen. Es zeigten sich in allen Versuchansätzen eindeutige Expressionen der Transkripte für die entsprechenden neurotrophen Faktoren. Der Nachweis dieser neurotrophen Faktoren bedeutet, dass die Zellen genetisch so ausgestattet sind, dass sie neurogenes Potential besitzen bzw. auch in der Lage sind, entsprechende neurotrophe Faktoren zu synthetisieren (Acheson et al., 1991; Lin et al., 1993), somit die Voraussetzungen zur Differenzierung mitbringen und davon auszugehen ist, dass sie diese auch selber induzieren können. Bei dem tatsächlichen Nachweis und einer Quantifizierung der neurotrophen Faktoren

NGF und BDNF mittels ELISA, stellvertretend für alle in der PCR nachgewiesenen neurotrophen Faktoren, konnte gezeigt werden, dass die Sekretion dieser vom Differenzierungsgrad und der Passagenanzahl anhängig war. Die Konzentration an NGF konnte im Standardmedium mit $27,6 \pm 6$ ng/ml, in NM1 mit $116,9 \pm 10,4$ ng/ml und in NM2 mit $82,9 \pm 29,8$ ng/ml detektiert werden, damit war die Konzentration des neurotrophen Faktors in den Induktionsmedien deutlich größer. Innerhalb der einzelnen Medien zeigte sich auch, dass mit zunehmender Passagenzahl im Standardmedium die Konzentration der neurotrophen Faktoren kontinuierlich abnahm, während nach erfolgter Induktion in NM1 und NM2 mit zunehmender Induktionsdauer und Passagenzahl die Sekretion zunahm. Im Verlauf von Passage 2 zu Passage 13 hat die Sekretion von NGF in NM1 um 20%, in NM2 um 78% zugenommen. Die gleichen Beobachtungen konnten auch für BDNF gemacht werden: Im Verlauf von Passage 2 zu Passage 13 zeigte sich auch hier eine Zunahme der Sekretion um 39% in NM1 und um 16% in NM2. Die ELISA-Analyse bewies eindeutig die Steigerung der Sekretion neurotropher Faktoren bei Zellen, die neuronal induziert worden sind und sich in fortschreitender Differenzierung befunden haben. NM1 wirkte sich dabei positiver auf Zellen aus die NGF, NM2 auf Zellen, die in höherem Ausmaße BDNF sezernierten. Generell war die größte Steigerung der Produktion der neurotrophen Faktoren für NM2 zu beobachten. Ausgehend davon, dass NGF in PNS und BDNF vorrangig im ZNS nachweisbar ist (Yamamoto and Gurney, 1990) und die Faktoren dort die jeweiligen Nervenzellen stimulieren (Henderson, 1996), überrascht das Ergebnis nicht. Wie die angewandten immunzytochemischen Untersuchungen zeigten, war die Expressionsrate der Marker für reife Nervenzellen des ZNS in NM2 nicht nur am größten, sondern auch signifikant höher als in den anderen Medien. Daher ist auch die Produktion an BDNF dort deutlich größer. NGF als Vertreter eines peripheren neurotrophen Faktors konnte in NM1 vermehrt nachgewiesen werden, was sich auch mit der immunzytochemischen Expression der Marker für neuronale Vorläufer peripherer Nervenzellen bestätigen ließ. Je nach Induktionsrichtung konnten sich somit entweder NGF oder BDNF vermehrt detektieren lassen.

Warum und inwieweit sich die verschiedenen Differenzierungsmedien letztendlich unterschiedlich auf die Zelldifferenzierung auswirkten, konnte hier nicht geklärt werden. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die zur Induktion eingesetzten Faktoren (EGF, bFGF und N2 bzw. RS und FGF8) auf die Zellen einwirken und sie dazu veranlassen eine Reihe unterschiedlichster Zytokine und trophischer Faktoren zu produzieren und somit deren Differenzierungsrichtung zu beeinflussen. Dieses wäre von entscheidender Bedeutung bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und wurde in ähnlicher Weise unter Verwendung von mesenchymalen Stammzellen, die aus Knochenmark gewonnen worden sind, schon einmal nachgewiesen (Arnhold et al., 2006).

Ziel dieser Untersuchungen war es, modellhaft an einer Zelllinie immortalisierter Amnionzellen zu zeigen, dass Zellen dieses Typs und dieser Herkunft langfristig dazu geeignet sind, bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen als Ausgangspopulation für Zellersatztherapien Anwendung zu finden. Vor diesem Hintergrund fanden auch die Injektionen und Transplantationen der Zellen in Hirne adulter Ratten statt. Nach GFP-Markierung wurden die autofluoreszierenden Zellen stereotaktisch in das Rattenstriatum verbracht und deren Adaption an das umliegende Gewebe untersucht. In Kryostatschnitten, verbunden mit immunhistochemischen Untersuchungen hinsichtlich einer Ko-Expression von Nestin, GFAP und Neurofilament, konnte eindeutig eine erfolgreiche Integration der Zellen in das umliegende Gewebe nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten neuronale Morphologien und das Auswachsen gliaartiger Fortsätze ohne dabei das Nachbargewebe zu schädigen oder immunologische Reaktionen im umliegenden Gewebe hervorzurufen. Es konnten weder Zeichen einer Entzündung, noch einer Abstoßungsreaktion sichtbar gemacht werden. Es ist also möglich, die Zellen in das Gehirn zu injizieren und eine Adaptation hervorzurufen, wie es mit mesenchymalen Stammzellen, aus Knochenmark gewonnen, kürzlich schon beschrieben worden ist (Arnhold et al., 2006).

4.4 Schlussfolgernde Betrachtungen

Ziel und Ergebnis der hier vorgestellten Untersuchung war die Anwendung verschiedener Differenzierungsmedien und Betrachtung der Differenzierungskapazität humaner immortalisierter Amniozyten *in vitro* und *in vivo* unter experimentellen Bedingungen, um potentielle neue Behandlungsstrategien für neurodegenerative Erkrankungen aufzuzeigen. Es wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass Amniozyten immortalisiert werden können und dann, durch verschiedenste Einflüsse, das Potential besitzen als Stammzellquelle mit zusätzlichen neurogenen Eigenschaften zu dienen. Als Zellen fetalen Ursprungs, die unter einfachen Bedingungen gewonnen werden können und mit einem breiten Differenzierungspotential ausgestattet sind, haben sie die besten Voraussetzungen, als therapeutische Zellen Verwendung zu finden. Unsere ersten Untersuchungen die Zellen *in vivo* einzusetzen, waren erfolgreich. Es müssten nun eine Vielzahl von Studien zu dem Einsatz *in vivo* erfolgen, um eine definitive Aussage machen zu können, ob sich Zellen aus der Amnionflüssigkeit mit den hier gezeigten Eigenschaften langfristig zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen eignen. Die Daten dieser Arbeit zeigen das Potential der Amnionzellen dazu auf.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Zellen aus der Amnionflüssigkeit, die über eine Transduktion mittels eines adenoviralen Vektors immortalisiert wurden. Unter Verwendung dieser Zelllinie sollten modellhaft die generellen Stammzeleigenschaften von Zellen aus der Amnionflüssigkeit untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine neuronale Differenzierung angestrebt und das Zellverhalten *in vivo* und *in vitro* beurteilt werden. Weiterhin wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf ihre Morphologie untersucht und ihr Verhalten in Kultur, ihre Proliferationsrate und ihr unterschiedliches Verhalten unter Hypoxie jeweils in unterschiedlichen Differenzierungsmedien analysiert. Zur neuronalen Induktion wurden zwei verschiedene Kulturmedien, eines mit EGF und bFGF, eines mit Retinsäure und FGF-8 als Induktionsfaktoren, eingesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen unter Hypoxie, unabhängig vom Medium, in allen Fällen schneller proliferierten und sich ein erniedrigter Sauerstoffgehalt positiv auf das Zellwachstum und auch die neuronale Differenzierung auswirkte. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe unterschiedlichster Verfahren wie der Immunzytochemie, RT-PCR, ELISA und letztlich noch Implantationsversuchen in Rattenhirne auf ihre Stammzellcharakteristik und neuronale Differenzierungskapazität untersucht. Dabei gaben das Zellkulturverhalten, die immunzytochemische Expression von Stammzell- und neuronalen Markern, der Nachweis vorhandener Gentranskripte für Stammzellmarker und neurotrophe Faktoren und die quantitative ELISA-Analyse der Sekretion dieser, Hinweise auf das Potential, das Amnionzellen besitzen, möglicherweise in der Zukunft therapeutisch genutzt zu werden. Bei den Zellen hat sich eindeutig Stammzellcharakteristik, durch Expression der entsprechenden Marker (CD15, CD117, CD90) in der Immunzytochemie und Nachweis der Gentranskripte in der RT-PCR (Nanog, Sox-2, Oct-4), und eine erfolgreiche neuronale Induktion feststellen lassen. Die Zellen in den neuronalen Medien zeigten mit zunehmender Passage und Kulturdauer eine progrediente gliale Morphologie, steigende Expression an neuronalen (z.B. HNK-1, α -Internexin) und neuronalen Markern

(z.B. Neurofilament, GFAP) und eine Regression der Stammzellcharakteristika, morphologisch und immunzytochemisch. So ging die Expression des Stammzellmarkers CD15 von anfänglichen 95% im Standardmedium auf 60% in den Induktionsmedien zurück. Des Weiteren konnten diese Ergebnisse durch nachgewiesene Gentranskripte neurotropher Faktoren (NGF, GDNF, BDNF, NT-3) gestützt und mittels quantitativer ELISA-Analyse schließlich bewiesen werden. Die Sekretion der neurotrophen Faktoren NGF und BDNF war in den induzierten Zellen deutlich höher als in der Kontrollgruppe im Standardmedium. Die stereotaktische Implantation der Zellen, die vorher mittels eines adenoviralen GFP-Vektors transduziert worden waren, erfolgte in das Striatum adulter Ratten und anschließend wurde die Migration, Adaptation und Verhalten der Zellen in Bezug auf ihr Nachbargewebe untersucht. Kryostatschnitte der entsprechenden Hirnareale bzw. Injektionsbereiche zeigten, jeweils mit immunzytochemischer Ko-Expression von Nestin, Neurofilament und GFAP, eine erfolgreiche Migration und Integration der Zellen in das umliegende Gewebe sowie eine ortstypische Differenzierung.

In dieser Arbeit wurde die Vermutung bewiesen, dass immortalisierte Amniozyten Stammzellcharakteristika besitzen und in der Lage sind, sich neuronal zu differenzieren und Nervenzellen bzw. deren Vorläufer hervorzubringen. Sie sind sogar fähig, sich *in vivo* in Empfängergewebe zu integrieren und zu differenzieren, so dass davon auszugehen ist, dass Amniozyten künftig als potentiell Zellmaterial, beispielsweise für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, zur Verfügung stehen könnten.

6.LITERATURVERZEICHNIS

1. About,I., Laurent-Maquin,D., Lendahl,U., and Mitsiadis,T.A. (2000). Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am. J. Pathol.* 157, 287-295.
2. Acheson,A., Barker,P.A., Alderson,R.F., Miller,F.D., and Murphy,R.A. (1991). Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 7, 265-275.
3. Altmann,C.R., Bell,E., Sczyrba,A., Pun,J., Bekiranov,S., Gaasterland,T., and Brivanlou,A.H. (2001). Microarray-based analysis of early development in *Xenopus laevis*
1. *Dev. Biol.* 236, 64-75.
4. Alvarez-Buylla,A. and Lois,C. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13, 263-272.
5. Arenas,E., Trupp,M., Akerud,P., and Ibanez,C.F. (1995). GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15, 1465-1473.
6. Arndt-Jovin,D.J. and Jovin,T.M. (1977). Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content
1. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 585-589.
7. Arnhold,S., Klein,H., Klinz,F.J., Absenger,Y., Schmidt,A., Schinkothe,T., Brixius,K., Kozlowski,J., Desai,B., Bloch,W., and Addicks,K. (2006). Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 551-565.

8. Arnhold,S., Post,C., Gluer,S., Hoopmann,M., Wenisch,S., Volpers,C., and Addicks,K. (2008). Neuronal characteristics of amniotic fluid derived cells after adenoviral transformation
1. *Cell Biol. Int.* 32, 1559-1566.
9. Baba,H., Nakahira,K., Morita,N., Tanaka,F., Akita,H., and Ikenaka,K. (1997). GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev. Neurosci.* 19, 49-57.
10. Baharvand,H., Mehrjardi,N.Z., Hatami,M., Kiani,S., Rao,M., and Haghighi,M.M. (2007). Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 371-378.
11. Buchman,V.L. and Davies,A.M. (1993). Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development* 118, 989-1001.
12. Buj-Bello,A., Buchman,V.L., Horton,A., Rosenthal,A., and Davies,A.M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 15, 821-828.
13. Cai,J., Wu,Y., Mirua,T., Pierce,J.L., Lucero,M.T., Albertine,K.H., Spangrude,G.J., and Rao,M.S. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev. Biol.* 251, 221-240.
14. Chiu,F.C. and Goldman,J.E. (1985). Regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in CNS development and in pathological states. *J. Neuroimmunol.* 8, 283-292.
15. Chu,M.S., Chang,C.F., Yang,C.C., Bau,Y.C., Ho,L.L., and Hung,S.C. (2006). Signalling pathway in the induction of neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells
1. *Cell Signal.* 18, 519-530.

16. Cohen,R.I., Marmur,R., Norton,W.T., Mehler,M.F., and Kessler,J.A. (1996). Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *J. Neurosci.* *16*, 6433-6442.
17. Dahlstrand,J., Lardelli,M., and Lendahl,U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *84*, 109-129.
18. De Coppi,P., Bartsch,G., Jr., Siddiqui,M.M., Xu,T., Santos,C.C., Perin,L., Mostoslavsky,G., Serre,A.C., Snyder,E.Y., Yoo,J.J., Furth,M.E., Soker,S., and Atala,A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* *25*, 100-106.
19. Dinser,R., Kreppel,F., Zaucke,F., Blank,C., Paulsson,M., Kochanek,S., and Maurer,P. (2001). Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem. Cell Biol.* *116*, 69-77.
20. Dinsmore,J., Ratliff,J., Deacon,T., Pakzaban,P., Jacoby,D., Galpern,W., and Isacson,O. (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation
10. *Cell Transplant.* *5*, 131-143.
21. Doe,C.Q. (1996). Asymmetric cell division and neurogenesis
4. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 562-566.
22. Doetsch,F., Garcia-Verdugo,J.M., and Alvarez-Buylla,A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain
2. *J. Neurosci.* *17*, 5046-5061.
23. Drago,J., Murphy,M., Carroll,S.M., Harvey,R.P., and Bartlett,P.F. (1991). Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 2199-2203.

24. Durbec,P., Marcos-Gutierrez,C.V., Kilkenny,C., Grigoriou,M., Wartiovaara,K., Suvanto,P., Smith,D., Ponder,B., Costantini,F., Saarma,M., and . (1996). GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381, 789-793.
25. Ellis,P., Fagan,B.M., Magness,S.T., Hutton,S., Taranova,O., Hayashi,S., McMahon,A., Rao,M., and Pevny,L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* 26, 148-165.
26. Eng,L.F., Ghirnikar,R.S., and Lee,Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.
27. Fenderson,B.A., De Miguel,M.P., Pyle,A.D., and Donovan,P.J. (2006). Staining embryonic stem cells using monoclonal antibodies to stage-specific embryonic antigens. *Methods Mol. Biol.* 325, 207-224.
28. Gage,F.H., Coates,P.W., Palmer,T.D., Kuhn,H.G., Fisher,L.J., Suhonen,J.O., Peterson,D.A., Suhr,S.T., and Ray,J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain
3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11879-11883.
29. Gospodarowicz,D. (1991). Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 1-8.
30. Graham,V., Khudyakov,J., Ellis,P., and Pevny,L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity
11. *Neuron* 39, 749-765.
31. Hall,P.A. (1989). What are stem cells and how are they controlled?
1. *J. Pathol.* 158, 275-277.
32. Hall,P.A. and Watt,F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity
2. *Development* 106, 619-633.

33. Hatten,M.E., Lynch,M., Rydel,R.E., Sanchez,J., Joseph-Silverstein,J., Moscatelli,D., and Rifkin,D.B. (1988). In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev. Biol.* 125, 280-289.
34. Held,K.R. and Sonnichsen,S. (1984). The effect of oxygen tension on colony formation and cell proliferation of amniotic fluid cells in vitro. *Prenat. Diagn.* 4, 171-179.
35. Henderson,C.E., Phillips,H.S., Pollock,R.A., Davies,A.M., Lemeulle,C., Armanini,M., Simmons,L., Moffet,B., Vandlen,R.A., Simpson LC [corrected to Simmons, and . (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064.
36. Henderson,C.E. (1996). Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 64-70.
37. Horie,N., So,K., Moriya,T., Kitagawa,N., Tsutsumi,K., Nagata,I., and Shinohara,K. (2008). Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro
10. *Cell Mol. Neurobiol.* 28, 833-845.
38. Hou,J.G., Lin,L.F., and Mytilineou,C. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 66, 74-82.
39. Irvin,D.K., Dhaka,A., Hicks,C., Weinmaster,G., and Kornblum,H.I. (2003). Extrinsic and intrinsic factors governing cell fate in cortical progenitor cultures
1. *Dev. Neurosci.* 25, 162-172.
40. Jeffries,A.R., Mungall,A.J., Dawson,E., Halls,K., Langford,C.F., Murray,R.M., Dunham,I., and Powell,J.F. (2003). beta-1,3-Glucuronyltransferase-1 gene implicated as a candidate for a

schizophrenia-like psychosis through molecular analysis of a balanced translocation. *Mol. Psychiatry* 8, 654-663.

41. Kachinsky,A.M., Dominov,J.A., and Miller,J.B. (1994). Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev. Biol.* 165, 216-228.
42. Katsura,Y. and Kawamoto,H. (2001). Stepwise lineage restriction of progenitors in lympho-myelopoiesis
4. *Int. Rev. Immunol.* 20, 1-20.
43. Kaviani,A., Perry,T.E., Dzakovic,A., Jennings,R.W., Ziegler,M.M., and Fauza,D.O. (2001). The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering
6. *J. Pediatr. Surg.* 36, 1662-1665.
44. Kaviani,A., Guleserian,K., Perry,T.E., Jennings,R.W., Ziegler,M.M., and Fauza,D.O. (2003). Fetal tissue engineering from amniotic fluid
4. *J. Am. Coll. Surg.* 196, 592-597.
45. Kemshead,J.T., Ritter,M.A., Cotmore,S.F., and Greaves,M.F. (1982). Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res.* 236, 451-461.
46. Kilpatrick,T.J., Talman,P.S., and Bartlett,P.F. (1993). The differentiation and survival of murine neurons in vitro is promoted by soluble factors produced by an astrocytic cell line. *J. Neurosci. Res.* 35, 147-161.
47. Klassen,H., Schwartz,M.R., Bailey,A.H., and Young,M.J. (2001). Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci. Lett.* 312, 180-182.
48. Kleene,R. and Schachner,M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 195-208.
49. Komitova,M. and Eriksson,P.S. (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain
1. *Neurosci. Lett.* 369, 24-27.

50. Kornblum,H.I., Hussain,R., Wiesen,J., Miettinen,P., Zurcher,S.D., Chow,K., Derynck,R., and Werb,Z. (1998). Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J. Neurosci. Res.* 53, 697-717.
51. Kruglyakova,E.P., Khovryakov,A.V., Shikhanov,N.P., Maccann,G.M., Vael',I., Kruglyakov,P.P., and Sosunov,A.A. (2005). Nestin-expressing cells in the human hippocampus. *Neurosci. Behav. Physiol* 35, 891-897.
52. Leibrock,J., Lottspeich,F., Hohn,A., Hofer,M., Hengerer,B., Masiakowski,P., Thoenen,H., and Barde,Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149-152.
53. Lendahl,U., Zimmerman,L.B., and McKay,R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
54. Li,S.S., Liu,Y.H., Tseng,C.N., Chung,T.L., Lee,T.Y., and Singh,S. (2006). Characterization and gene expression profiling of five new human embryonic stem cell lines derived in Taiwan. *Stem Cells Dev.* 15, 532-555.
55. Lin,L.F., Doherty,D.H., Lile,J.D., Bektesh,S., and Collins,F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.
56. Louis,S.A. and Reynolds,B.A. (2005). Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue. *Methods Mol. Biol.* 290, 265-280.
57. Luo,R., Gao,J., Wehrle-Haller,B., and Henion,P.D. (2003). Molecular identification of distinct neurogenic and melanogenic neural crest sublineages. *Development* 130, 321-330.
58. Maden,M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 755-765.

59. Maric,D., Maric,I., Chang,Y.H., and Barker,J.L. (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
21. J. Neurosci. 23, 240-251.
60. Mayer-Proschel,M., Kalyani,A.J., Mujtaba,T., and Rao,M.S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells
1. Neuron 19, 773-785.
61. Messam,C.A., Hou,J., and Major,E.O. (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. Exp. Neurol. 161, 585-596.
62. Miki,T., Lehmann,T., Cai,H., Stolz,D.B., and Strom,S.C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 23, 1549-1559.
63. Miyata,T., Kawaguchi,A., Okano,H., and Ogawa,M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons
2. Neuron 31, 727-741.
64. Morrison,J.H. and Hof,P.R. (1997). Life and death of neurons in the aging brain. Science 278, 412-419.
65. Morrison,S.J. and Weissman,I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype
1. Immunity. 1, 661-673.
66. Morrison,S.J., Wandycz,A.M., Hemmati,H.D., Wright,D.E., and Weissman,I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors
2. Development 124, 1929-1939.

67. Morrison,S.J., Wright,D.E., Cheshier,S.H., and Weissman,I.L. (1997). Hematopoietic stem cells: challenges to expectations
3. Curr. Opin. Immunol. 9, 216-221.
68. Morrison,S.J., Wright,D.E., and Weissman,I.L. (1997). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization
4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 1908-1913.
69. Morrison,S.J., Shah,N.M., and Anderson,D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology
5. Cell 88, 287-298.
70. Motohashi,T., Aoki,H., Chiba,K., Yoshimura,N., and Kunisada,T. (2007). Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells. Stem Cells 25, 402-410.
71. Muramatsu,T. and Muramatsu,H. (2004). Carbohydrate antigens expressed on stem cells and early embryonic cells. Glycoconj. J. 21, 41-45.
72. Niwa,H., Miyazaki,J., and Smith,A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. 24, 372-376.
73. Nunes,M.C., Roy,N.S., Keyoung,H.M., Goodman,R.R., McKhann,G., Jiang,L., Kang,J., Nedergaard,M., and Goldman,S.A. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain
1. Nat. Med. 9, 439-447.
74. O'Leary,D.D. and Nakagawa,Y. (2002). Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex
1. Curr. Opin. Neurobiol. 12, 14-25.

75. Okabe,S., Forsberg-Nilsson,K., Spiro,A.C., Segal,M., and McKay,R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro
1. Mech. Dev. 59, 89-102.
76. Okano,H., Okada,S., Nakamura,M., and Toyama,Y. (2005). Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord
8. Kidney Int. 68, 1927-1931.
77. Oppenheim,R.W., Houenou,L.J., Johnson,J.E., Lin,L.F., Li,L., Lo,A.C., Newsome,A.L., Prevet,D.M., and Wang,S. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. Nature 373, 344-346.
78. Portier,M.M., Escurat,M., Landon,F., Djabali,K., and Bousquet,O. (1993). Peripherin and neurofilaments: expression and role during neural development. C. R. Acad. Sci. III 316, 1124-1140.
79. Potten,C.S. and Loeffler,M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt
1. Development 110, 1001-1020.
80. Priest,R.E., Marimuthu,K.M., and Priest,J.H. (1978). Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. Lab Invest 39, 106-109.
81. Prusa,A.R. and Hengstschlager,M. (2002). Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. Med. Sci. Monit. 8, RA253-RA257.
82. Prusa,A.R., Marton,E., Rosner,M., Bernaschek,G., and Hengstschlager,M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Hum. Reprod. 18, 1489-1493.
83. Qi,H. and Pei,D. (2007). The magic of four: induction of pluripotent stem cells from somatic cells by Oct4, Sox2, Myc and Klf4
1. Cell Res. 17, 578-580.

84. Qian,X., Davis,A.A., Goderie,S.K., and Temple,S. (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18, 81-93.
85. Qian,Z., Fernald,A.A., Godley,L.A., Larson,R.A., and Le Beau,M.M. (2002). Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14925-14930.
86. Rao,M.S. (1999). Multipotent and restricted precursors in the central nervous system 3. *Anat. Rec.* 257, 137-148.
87. Renoncourt,Y., Carroll,P., Filippi,P., Arce,V., and Alonso,S. (1998). Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons 2. *Mech. Dev.* 79, 185-197.
88. Reynolds,B.A., Tetzlaff,W., and Weiss,S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565-4574.
89. Reynolds,B.A. and Weiss,S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system 2. *Science* 255, 1707-1710.
90. Robinson,R.C., Radziejewski,C., Stuart,D.I., and Jones,E.Y. (1995). Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry* 34, 4139-4146.
91. Rosenthal,A., Goeddel,D.V., Nguyen,T., Martin,E., Burton,L.E., Shih,A., Laramée,G.R., Wurm,F., Mason,A., Nikolics,K., and . (1991). Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 129, 1289-1294.

92. Sahin,K.S., Mahmood,A., Li,Y., Yavuz,E., and Chopp,M. (1999).
Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain. *Brain Res.*
840, 153-157.
93. Schiedner,G., Hertel,S., and Kochanek,S. (2000). Efficient transformation
of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new
cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* *11*, 2105-
2116.
94. Sejersen,T. and Lendahl,U. (1993). Transient expression of the
intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell*
Sci. *106 (Pt 4)*, 1291-1300.
95. Shimazaki,T. (2003). Biology and clinical application of neural stem cells
1. *Horm. Res.* *60 Suppl 3*, 1-9.
96. Sikkema-Raddatz,B., Suijkerbuijk,R., van,d., V, Stoepker,M., Buys,C.H.,
and te Meerman,G.J. (2006). An absolute procedure to test the growth
potential of medium and the influence of decreased oxygen tension in
primary amniotic fluid cell cultures. *Prenat. Diagn.* *26*, 855-860.
97. Sultana,S., Sernett,S.W., Bellin,R.M., Robson,R.M., and Skalli,O. (2000).
Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a
subset of astrocytes during development. *Glia* *30*, 143-153.
98. Sun,H.B., Xia,S.J., and Tang,X.D. (2005). [Expression of different genes
in transitional zone and peripheral zone of human normal prostate]
11. Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. *85*, 610-613.
99. Szigeti,V. and Miller,R.H. (1993). A cell surface antigen expressed by
astrocytes and their precursors. *Glia* *8*, 20-32.
100. Takizawa,T., Nakashima,K., Namihira,M., Ochiai,W., Uemura,A.,
Yanagisawa,M., Fujita,N., Nakao,M., and Taga,T. (2001). DNA
methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte
differentiation in the fetal brain
1. *Dev. Cell* *1*, 749-758.

101. Temple,S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture
1. *Nature* 340, 471-473.
102. Temple,S. (2001). The development of neural stem cells
2. *Nature* 414, 112-117.
103. Temple,S. (2001). Stem cell plasticity--building the brain of our dreams
3. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 513-520.
104. Tolkovsky,A. (1997). Neurotrophic factors in action--new dogs and new tricks. *Trends Neurosci.* 20, 1-3.
105. Trentin,A., Glavieux-Pardanaud,C., Le Douarin,N.M., and Dupin,E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells
15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4495-4500.
106. Tyden,O., Bergstrom,S., and Nilsson,B.A. (1981). Origin of amniotic fluid cells in mid-trimester pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88, 278-286.
107. Tyden,O., Bergstrom,S., and Nilsson,B.A. (1981). Surface ultrastructure of amniotic fluid cells and fetal tissues of the Rhesus monkey. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 60, 277-286.
108. Tyden,O., Bergstrom,S., Lindmark,G., and Nilsson,B.A. (1981). A comparison of the amniotic fluid cytology, lecithin/sphingomyelin ratio and creatinine in predicting fetal maturity at term. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 60, 63-69.
109. Wang,P., Wang,S.M., Hsieh,C.J., and Chien,C.L. (2006). Neural expression of alpha-internexin promoter in vitro and in vivo. *J. Cell Biochem.* 97, 275-287.
110. Wang,X.L., Zhao,Y.S., Yang,Y.J., Xie,M., and Yu,X.H. (2008). Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats
5. *Brain Res.* 1222, 87-94.

111. Wilson,S.I. and Edlund,T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism
1. *Nat. Neurosci. 4 Suppl*, 1161-1168.
112. Woodbury,D., Kramer,B.C., Reynolds,K., Marcus,A.J., Coyne,T.M., and Black,I.B. (2006). Long-term cryopreserved amniocytes retain proliferative capacity and differentiate to ectodermal and mesodermal derivatives in vitro
1. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1463-1472.
113. Yamamoto,H. and Gurney,M.E. (1990). Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 10, 3469-3478.
114. Yan,Q., Matheson,C., and Lopez,O.T. (1995). In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373, 341-344.
115. Yanagisawa,M. and Yu,R.K. (2007). The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology* 17, 57R-74R.
116. Zhang,X., Stojkovic,P., Przyborski,S., Cooke,M., Armstrong,L., Lako,M., and Stojkovic,M. (2006). Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 24, 2669-2676.
117. Zimmerman,L., Parr,B., Lendahl,U., Cunningham,M., McKay,R., Gavin,B., Mann,J., Vassileva,G., and McMahon,A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12, 11-24.

7.VORABVERÖFFENTLICHUNGEN

Hiermit erkläre ich, dass Teile dieser Dissertationsschrift bereits in folgender Publikation veröffentlicht sind:

Arnhold,S., **Post,C.**, Gluer,S., Hoopmann,M., Wenisch,S., Volpers,C. and Addicks,K. (2008). Neuronal characteristics of amniotic fluid derived cells after adenoviral transformation; 1. Cell Biol. Int. 32, 1559-1566.

LEBENS LAUF

Name: Carola Post

Anschrift: Düsseldorfstr. 27
45481 Mülheim an der Ruhr

Geburtsdatum: 20.7.1982

Geburtsort: Mülheim

Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung: Schulbesuch von 1988-2001:
Abitur 2001 am St. Hildegardis Gymnasium, Duisburg

Studium: 2001-2003 Studium der Chemie an der Westfälischen
Wilhelms- Universität zu Münster
2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Universität
zu Köln

Hochschul-
abschluss: Approbation als Ärztin am 10. Juni 2009

Wissen-
schaftlicher
Werdegang: seit April 2006 Arbeiten an vorliegender Dissertationsschrift
mit dem Titel „Humane Amniozyten zeigen neuronale Eigen-
schaften nach adenoviraler Transformation *in vitro* und *in vivo*“.

Mülheim, den 15.5.2009