

**Identifizierung einer Subpopulation von Stammzellen mit embryonalem  
und frühem neuronalen Phänotyp aus dem Knochenmark der Ratte**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Ing. (FH) Steven Sauerzweig  
geb. am 24.04.1980 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. Klaus G. Reymann

Prof. Dr. Frank Emmrich

eingereicht am: 25.08.2008

verteidigt am: 13.01.2009

*Für Jenny und Mika*



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Stammzellen.....	1
1.2	Embryonale Stammzellen .....	2
1.3	Adulte Stammzellen.....	3
1.3.1	Neurale Stammzellen .....	3
1.3.2	Stammzellen im Knochenmark .....	6
1.4	Plastizität.....	8
1.4.1	Plastizität von Knochenmarkstammzellen (KMSZ).....	8
1.4.2	Mögliche Mechanismen der Plastizität .....	10
1.5	Markierung von Zellen .....	13
1.6	Behandlung neurologischer Erkrankungen mit exogenen Stammzellen.....	16
1.6.1	Neurodegenerative Erkrankungen.....	16
1.6.2	Schlaganfall.....	17
1.7	Gegenstand der Arbeit .....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
2.1	Material .....	22
2.1.1	Geräte und Instrumente .....	22
2.1.2	Chemikalien und Substanzen .....	24
2.1.3	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	25
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	27
2.1.5	Antikörper .....	28
2.2	Methoden .....	29
2.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	29
2.2.2	Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen .....	29
2.2.3	Kryokonservierung und Revitalisierung der Knochenmarkstammzellen.....	30
2.2.4	Beschichtung von Deckgläschen für die Zellkultur .....	30
2.2.5	Induktion der mesodermalen Differenzierung .....	31
2.2.5.1	Adipogene Differenzierung .....	31
2.2.5.2	Osteogene Differenzierung .....	32
2.2.5.3	Chondrogene Differenzierung .....	33
2.2.6	Induktion von neurosphären-ähnlichen Strukturen .....	34
2.2.7	Serumdeprivation .....	34
2.2.8	Apoptoseinduktion .....	36
2.2.9	Induktion von chemischem Stress.....	36

2.2.10	BrdU-Inkorporations-Assay .....	37
2.2.11	Immunzytochemie.....	38
2.2.11.1	Immunfärbung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern.....	38
2.2.11.2	Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Methode.....	39
2.2.11.3	Anti-Bromdesoxyuridin-Färbung .....	39
2.2.12	RNS-Extraktion und qRT-PCR-Analyse.....	40
2.2.13	Elektrophysiologie .....	40
2.2.14	Auswertung .....	42
2.2.14.1	Mikroskopie.....	42
2.2.14.2	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie.....	42
2.2.14.3	Rasterelektronenmikroskopie .....	42
2.2.14.4	Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Zellen.....	43
2.2.14.5	Statistik .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
3.1	Kultivierung und funktionelle Charakterisierung von Knochenmarkstammzellen.....	44
3.2	Induktion der Sphärlenbildung.....	45
3.3	Neuroektodermale Marker in Sphärlen.....	47
3.4	Neuroektodermale Marker in basalen Knochenmarkstammzellen .....	49
3.5	Einfluss des Serumentzuges auf die Zellzahl.....	52
3.6	Identifizierung einer neuen Zellmorphologie nach Serumdeprivation .....	53
3.7	Neuroektodermale Marker in serumdeprivierten Knochenmarkstammzellen .....	58
3.8	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie.....	61
3.8.1	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie während der basalen Kultivierungsperiode.....	61
3.8.2	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie während der serumfreien Kultivierungsperiode.....	64
3.9	BrdU-Inkorporation während der Serumdeprivation .....	69
3.10	Induktion von SD-KMSZ ist nicht durch Stress bedingt .....	70
3.11	Expression embryonaler Marker in Serumdeprivation-induzierten KMSZ (SD-KMSZ)....	72
3.12	Elektrophysiologische Untersuchung von SD-KMSZ .....	74
3.13	Stabilität einer Bromdesoxyuridin-Markierung zu Transplantationszwecken.....	76
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
4.1	Kultivierung von Knochenmarkstammzellen .....	83
4.2	Induktion von Neurosphären aus Knochenmarkstammzellen.....	84
4.3	Neuroektodermaler Immunphänotyp der Knochenmarkstammzellen unter basalen Bedingungen .....	86
4.4	Auswirkungen des Serumentzuges .....	88

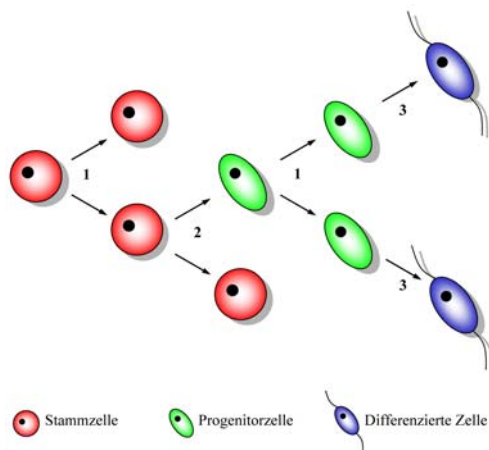
4.5	SD-KMSZ exprimieren Marker von neuronalen und embryonalen Stammzellen.....	90
4.6	Die Bedeutung verschiedener Markerproteine für den Stammzellcharakter der Zellen.....	91
4.7	Mögliche Subpopulationen pluripotenter Stammzellen im Knochenmark.....	93
4.8	Elektrophysiologische Untersuchungen mittels <i>Patch-Clamp</i> .....	97
4.9	Serumdeprivation vs. chemischer Stress.....	99
4.10	Markierung der Knochenmarkstammzellen mit BrdU.....	100
4.11	Therapie neurologischer Erkrankungen mit Knochenmarkstammzellen.....	104
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>135</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>136</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden unspezialisierte Zellen bezeichnet, die über zwei wesentliche Eigenschaften verfügen: Sie können sich durch Zellteilung selbst erneuern (engl. *self-renewal*) und sind fähig, in reifere Nachkommen zu differenzieren.

Durch asymmetrische Zellteilung kommt es zur Bildung einer Stammzelle sowie einer determinierteren Progenitorzelle, die, teilweise über mehrere Zellteilungen, in reife Zellen ausdifferenziert. Die symmetrische Teilung führt zur Bildung zweier identischer Nachkommen. Diese können entweder beide Stammzellen oder Progenitorzellen sein (Abb. 1). Auf Basis dieser Eigenschaften tragen Stammzellen zur Bildung, Erhaltung und Regeneration von Geweben bei.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Stammzellteilung.** Stammzellen teilen sich entweder symmetrisch in zwei identische Nachkommen (1), oder sie generieren mit der asymmetrischen Zellteilung erneut eine Stammzelle sowie eine in ihrer Entwicklung determiniertere Progenitorzelle (2). In beiden Teilungsmodi kommt es zur Selbsterneuerung der Stammzelle. Die Progenitorzelle differenziert in der folgenden Entwicklung in einen reifen Zelltyp (3).

Die Potenz einer Stammzelle bezeichnet dabei den Grad ihrer Differenzierungsfähigkeit. Als totipotent (lat. *totus* = ganz; lat. *potens* = fähig) gelten Stammzellen, die in der Lage sind, in alle Zelltypen eines Organismus zu differenzieren. Diese Fähigkeit besitzt die befruchtete Eizelle. Bis zum Übergang von der Morula zur Blastozyste können die Zellen sowohl embryonale (Embryoblast) als auch extraembryonale Zelltypen (Trophoblast) bilden. Pluripotente (lat. *plures* = Mehrzahl) Stammzellen sind durch die Fähigkeit gekennzeichnet, in sämtliche embryonale Zelltypen, also Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm), zu differenzieren. Zu ihnen gehören die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). ES-Zellen bilden die Innere Zellmasse und lassen sich aus dieser gewinnen. Während der Entwicklung von der Blastozyste zum Fötus kommt es zur Differenzierung dieser Inneren Zellmasse in Richtung Keimzellen und somatische Zellen (Körperzellen), die sich wiederum bei der Gastrulation in die Zelltypen eines der drei Keimblätter entwickeln. Nach Abschluss der Embryogenese werden alle Stammzellen unter der Bezeichnung postembryonale Stammzellen zusammengefasst. Zu ihnen zählen die fötalen, neonatalen und adulten Stammzellen. Aufgrund ihres

Differenzierungspotenzials – sie differenzieren lediglich noch in die Zelltypen des Keimblattes, in dem sie vorkommen – werden sie als multipotente (lat. *multi* = viele) Stammzellen bezeichnet. Als oligopotente gelten Stammzellen, die nur in wenige Zelltypen differenzieren können und unipotente Stammzellen (z.B. Muskelstammzellen) differenzieren lediglich in einen reifen Zelltyp.

## 1.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen gehören zu den pluripotenten Stammzellen und wurden Anfang der 1980er Jahre erstmals aus Zellen der Inneren Zellmasse muriner Blastozysten isoliert (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Sie können *in vitro* prinzipiell unbegrenzt kultiviert und durch entsprechende Stimulation in alle adulten Zelltypen differenziert werden. Darüber hinaus sind sie in der Lage, nach Re-Implantation in eine Blastozyste zur Bildung aller adulten Gewebe einschließlich der Keimzellen beizutragen (Bradley et al., 1984; Robertson et al., 1986). Diese Eigenschaften machen sie zu einem idealen Modellsystem zur Untersuchung zellulärer Vorgänge während der Embryonalentwicklung. Die erfolgreiche Gewinnung humaner ES-Zellen (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) ermöglicht die Entwicklung von *in vitro*-Modellen humaner neurodegenerativer Erkrankungen sowie die Untersuchung neuroprotektiver und neurotoxischer Substanzen. Anhand dieser Zellen können auch neue Gene, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren identifiziert werden, die während der Neurogenese eine Rolle spielen.

Am bedeutendsten ist aber die Möglichkeit zu bewerten, humane ES-Zellen als unbegrenzte Quelle für neurale Zellen zu verwenden und damit neue Zellersatztherapien (für z.B. Morbus Parkinson, Morbus Huntington, Schlaganfall) zu entwickeln. Darüber hinaus lassen sich aber auch Zellen aller anderen Gewebe aus humanen ES-Zellen gewinnen und somit potenziell zur Organreparatur einsetzen. Für eine Anwendung in der regenerativen Medizin stellt die Fähigkeit der ES-Zellen, in alle Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren, zugleich auch das größte Problem dar. So ist es eine Eigenschaft undifferenzierter ES-Zellen, nach einer *in vivo*-Implantation Teratome zu bilden. Um dieses auszuschließen, werden hochaufgereinigte Zellpräparate benötigt, die frei von undifferenzierten ES-Zellen sind. Des Weiteren ist die Gewinnung von humanen ES-Zellen in Deutschland ethisch höchst umstritten und gesetzlich verboten, da sie den Verlust des Embryos zur Folge hat. Nach geltendem Recht (StZG vom 28.06.2002, BGB I, S. 2277, § 4 Abs. 2 Nr. 1 Buchstabe a) war bislang lediglich die Arbeit mit importierten humanen ES-Zelllinien gestattet, die vor dem 01. Januar 2002 angelegt und kryokonserviert wurden. Diese Reglementierung wurde zwar inzwischen gelockert – der Stichtag wurde auf den 01. Mai 2007 verschoben – bleibt jedoch grundsätzlich bestehen.



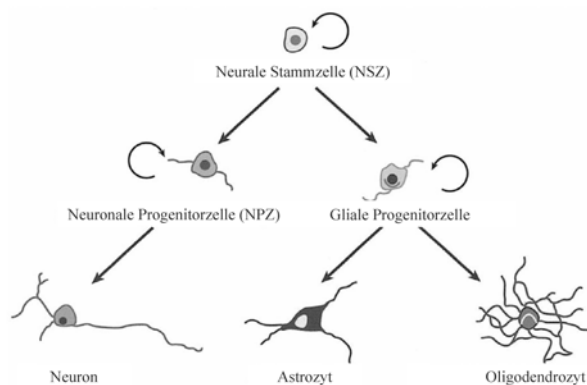
### 1.3 Adulte Stammzellen

Die zweite bedeutende Gruppe von Stammzellen sind neben den embryonalen die adulten Stammzellen. Auch als somatische (griech. *soma* = Körper) Stammzellen bezeichnet, umfassen sie alle multipotenten Stammzellen eines postnatalen Organismus'. Sie konnten bislang in einer Vielzahl von ansonsten differenzierten Geweben oder Organen nachgewiesen werden (Bianco et al., 1999; Domen and Weissman, 1999; Gandarillas and Watt, 1997; Gronthos et al., 2000; McKay, 1999; Seale and Rudnicki, 2000; Sell, 1990; Wu et al., 2001). Ihre Erneuerung und Differenzierung sorgt für die Aufrechterhaltung der Funktionen des jeweiligen Gewebes, in denen sie vorkommen.

Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten adulten Stammzellpopulationen näher eingegangen.

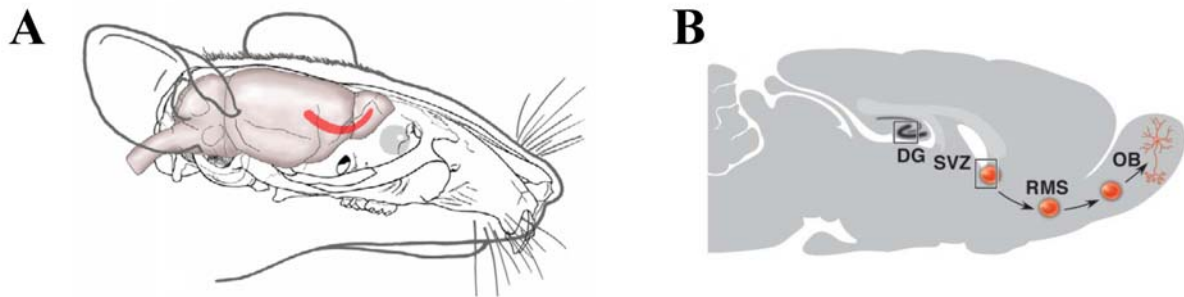
#### 1.3.1 Neurale Stammzellen

Die neuralen Stammzellen (NSZ) differenzieren in einem als Neurogenese bezeichneten Prozess in die drei Hauptzelltypen des Zentralen Nervensystems: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Abb. 2). Obwohl schon in den 1960er Jahren an Nagetieren (Altman, 1969; Altman and Das, 1967; Altman and Das, 1965) und Anfang der 1980er Jahre an Singvögeln (Goldman and Nottebohm, 1983) nachgewiesen, wurde die Existenz einer postnatalen Neurogenese erst Ende der 1990er Jahre vollständig anerkannt.



**Abb. 2: Differenzierung neuraler Stammzellen.** Neuronale Stammzellen differenzieren in der Neurogenese in die drei Hauptzelltypen, die das Zentrale Nervensystem darstellen: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Sind diese Stammzell- bzw. Progenitorzelltypen voneinander nicht zu unterscheiden, spricht man zusammenfassend von „neuralen Progenitorzellen“. (Abbildung modifiziert nach (Okano, 2002))

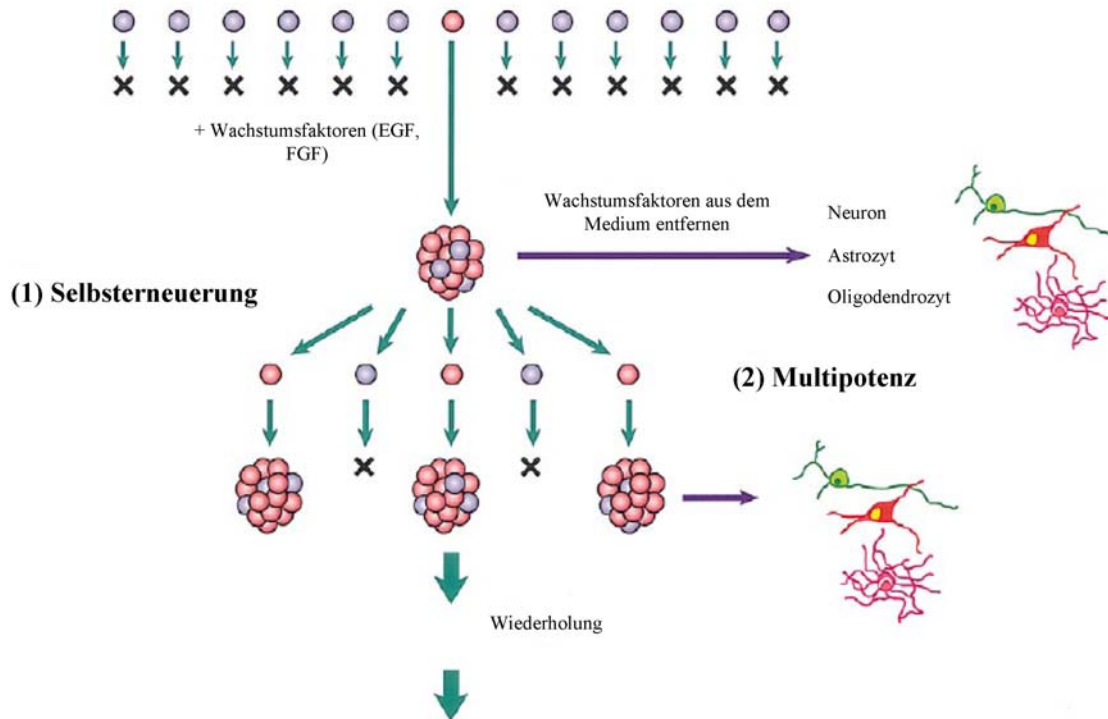
Die Fähigkeit zur postnatalen Neurogenese nimmt mit steigender Komplexität des Hirns ab. Während im Eidechsenhirn noch ganze Regionen ersetzt werden können, beschränkt sich die Neurogenese in adulten Säugetieren auf zwei Regionen des Zentralen Nervensystems (Abb. 3). Erste Hinweise zur Neurogenese in anderen Hirnarealen existieren zwar (Bauer et al., 2005; Bernier et al., 2002; Zhao et al., 2003), doch soll auf diese Arbeiten hier nicht weiter eingegangen werden.



**Abb. 3: Neurogene Zonen im adulten Säugerhirn.** (A) Schema eines Nagerkopfes, in dem die Lage des rostralen migratorischen Stroms (RMS; rot) im Hirn dargestellt ist. (B) Das sagittale Schnittbild des Hirns zeigt die beiden neurogenen Zonen des adulten ZNS: Die Subventrikulärzone (SVZ) der lateralen Ventrikel sowie der Gyrus Dentatus (DG) des Hippokampus. Die in der SVZ gebildeten neuronalen Progenitorzellen migrieren entlang des RMS in den Olfaktorischen Bulbus (OB), wo sie terminal in Interneurone differenzieren. Die neuronalen Progenitorzellen aus der Subgranulärzone des Gyrus Dentatus migrieren in die Granularschicht des Hippokampus und differenzieren dort in Körnerzellen. (Lenington et al., 2003; Taupin and Gage, 2002)

Einerseits teilen sich in der Subventrikulär-Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel NSZ zu neuronalen Progenitorzellen (Gates et al., 1995; Kuhn et al., 1997), andererseits generieren in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus Dentatus NSZ kontinuierlich einen Pool von neuronalen Progenitorzellen (Altman and Das, 1965; Kuhn et al., 1996; Van Praag et al., 1999). Nach vorherrschender Meinung stellen dabei in der Subventrikulär-Zone die an der Grenze zwischen Striatum und Ventrikel befindlichen Astrozyten die NSZ dar (Doetsch et al., 1999; Garcia et al., 2004; Laywell et al., 2000). Mehr als 30.000 der täglich in der SVZ gebildeten Progenitorzellen (Alvarez-Buylla et al., 2001) wandern über einen als „rostralen migratorischen Strom“ (RMS) bezeichneten Pfad in den Olfaktorischen Bulbus, wo sie dann in (Inter-) Neurone ausdifferenzieren. In der SGZ des Gyrus Dentatus von Ratten findet mit 9.000 neuen Zellen pro Tag (Cameron and McKay, 2001) eine geringere Genese statt. Die hier gebildeten Progenitoren migrieren in die nahe Granularschicht, wo sie zu den Körnerzellen differenzieren.

Eine elegante und etablierte Variante, neurale Stammzellen *in vitro* nachzuweisen, ist das von Reynolds und Weiss entwickelte Neurosphären-Protokoll (Cattaneo and McKay, 1990; Reynolds and Weiss, 1992; Storch et al., 2001; Vescovi et al., 1993). In diesem generieren die NSZ freischwimmende Aggregate, die durch Proliferation Neurosphären bilden. Die Anwendung dieses Protokolls ermöglicht jedoch nur eine rückblickende Identifizierung der NSZ, denn erst nach Neurosphärenbildung ist die initiale Zelle als NSZ identifiziert (Abb. 4).

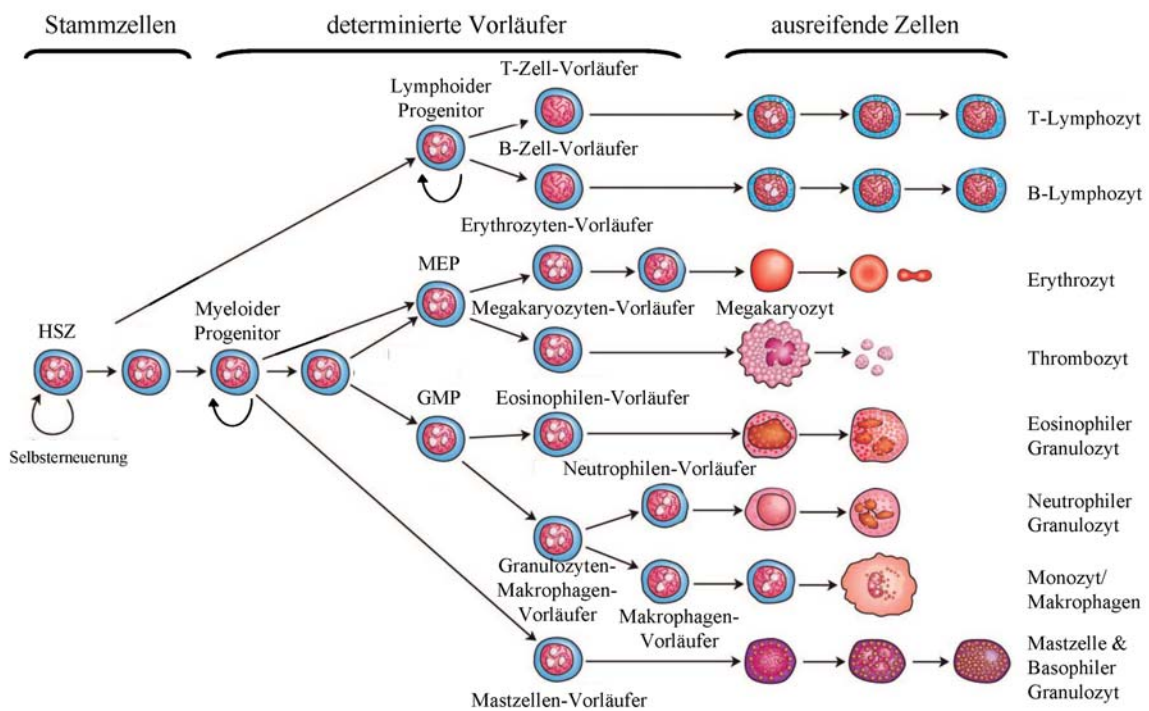


**Abb. 4: Prinzip der *in vitro*-Generierung von Neurosphären.** Eine Suspension dissoziierter Zellen aus dem Hirn wird in serumfreiem, EGF- und FGF-haltigem Medium kultiviert. Neuronale Stammzellen (NSZ) bilden unter diesen Bedingungen klonogenisch frei flotierende Aggregate, die als Neurosphären bezeichnet werden. Die Zellen einer Neurosphäre sind nach Dissoziation in der Lage, erneut Neurosphären zu generieren (1) oder aber, unter entsprechenden Kulturbedingungen, in die drei Hauptzelltypen des ZNS zu differenzieren (2). Diese Fähigkeit kennzeichnet die Multipotenz der initialen Neurosphären-induzierenden Zelle. (Abbildung modifiziert nach (Okano, 2002))

Eine „vorausblickende“ Identifizierung dieser Stammzellen ist schwierig, da sie, anders als z.B. hämatopoetische Stammzellen, keine spezifischen Oberflächen-Antigene aufweisen. Die von ihnen exprimierten selektiven Marker (Musashi1 (Good et al., 1998; Okano et al., 2002; Sakakibara et al., 1996), Nestin (Hockfield and McKay, 1985; Lendahl et al., 1990), SOX1 (Pevny et al., 1998) sind alle intrazellulär und daher für eine fluoreszenz-basierte Zellsortierung (FACS) schwer anzuwenden.

### 1.3.2 Stammzellen im Knochenmark

Die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) gelten als die am besten charakterisierten adulten Stammzellen. Sie bilden den Ausgangspunkt aller myeloiden und lymphoiden Zelltypen und erneuern auf diese Weise kontinuierlich das Blut- und Immunsystem. Die hämatopoetischen Stammzellen werden in zwei Gruppen unterteilt: Die *LT-HSC* (engl. *long-term hematopoietic stem cells*) sind lebenslang, die *ST-HSC* (engl. *short-term hematopoietic stem cells*) nur für etwa 8 Wochen in der Lage, sich zu regenerieren und zu differenzieren (Morrison and Weissman, 1994). Die *LT-HSC* differenzieren dabei geradlinig zu den *ST-HSC*, die wiederum zu den myeloiden und lymphoiden Progenitorzellen differenzieren. Abbildung 5 dient der Veranschaulichung der komplexen Differenzierung der HSZ über die Stadien der Progenitoren bis zur reifen Zelle.



**Abb. 5: Stammbaum der Hämatopoese.** Die konventionelle Sichtweise der Hämatopoese, in der sich multipotente Zellen sowohl selbst erneuern als auch Vorläuferzellen mit eingeschränktem Differenzierungspotenzial generieren. Der Vereinfachung halber verzichtet die Abbildung auf die Darstellung der Natürlichen Killerzellen und der Dendritischen Zellen. GMP – Granulozyten-Makrophagen-Progenitor; MEP – Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor. (Abbildung modifiziert nach (Metcalf, 2007))

Die ersten primitiven HSZ sind zu Beginn der Embryonalentwicklung von Säugern im Dottersack lokalisiert. Wenige Tage später lassen sich die ersten definitiven HSZ in der AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region) nachweisen (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Von dort aus migrieren sie zur fötalen Leber, die während des zweiten Trimesters der Schwangerschaft das wichtigste blutbildende Organ ist. Zum Ende der Schwangerschaft findet die Migration der HSZ in die Knochen,

ihrem endgültigen Habitat, statt. Durch Sezernierung des  $\alpha$ -Chemokins SDF-1 locken Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen der Knochen die HSZ an (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). Der Rezeptor für SDF-1, CXCR4, wird von den hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und ist der einzige Rezeptor für dieses Chemokin (Horuk 2001), weswegen ihm eine besondere biologische Bedeutung zugesprochen wird (Kucia et al., 2004a).

Im Knochenmark überleben und proliferieren die HSZ in einem komplexen Mikro-Milieu, das als Stammzellnische bezeichnet wird. Die verschiedenen Zelltypen des Knochenmarkstromas produzieren regulatorische Faktoren (z.B. SCF1) und extrazelluläre Komponenten (z.B. Fibronektin, Kollagen, Tenascin), die für den Erhalt des HSZ-Pools und die Differenzierung in die benötigten reifen Blut- und Immunzellen verantwortlich sind (Whetton and Graham, 1999).

Hämatopoetische Stammzellen haben sich in den letzten vier Jahrzehnten in der Behandlung eines weiten Feldes hämatologischer Erkrankungen bewährt. So gehören Knochenmarktransplantationen zum Zweck der Regenerierung des blutbildenden Systems nach Strahlentherapien längst zum klinischen Standard. Diese Fähigkeit ist auch die einzig verlässliche Möglichkeit, die Präsenz von HSZ nachzuweisen, da bislang keine ideale Kombination von Oberflächenmarkern gefunden wurde, um reine HSZ zu isolieren. Als allgemein anerkannt gilt jedoch die Aussage, dass HSZ in einer bestimmten Fraktion des Knochenmarks stark angereichert vorkommen. Die Zellen dieser Fraktion exprimieren keine der Entwicklungslinienmarker – sie sind *lineage negative* ( $lin^-$ ) – dafür aber verschiedene Oberflächenmarker wie CD45, CD34, c-Kit und Scal (Bonnet, 2003; Krause et al., 1994; Ogawa et al., 1991; Spangrude et al., 1988; Uchida and Weissman, 1992).

Die Existenz nicht-hämatopoetischer Stammzellen wurde, obwohl 100 Jahre zuvor schon vermutet (Cohnheim, J. 1867. Ueber Entzündung und Eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med.* 40:1), erst in den 1970er Jahren nachgewiesen (Friedenstein et al., 1976; Friedenstein et al., 1970). Friedenstein und seine Mitarbeiter kultivierten für wenige Stunden Proben von Knochenmark in unbeschichteten Zellkulturschalen und entfernten die Zellsuspension dann wieder. Auf der Kulturoberfläche setzten sich in dieser Zeit einige Zellen ab. Sie wiesen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf und proliferierten in charakteristischen Kolonien (engl. *colony-forming units-fibroblasts*, *CFU-F*). Ihrer ursprünglichen Verwendung als *Feeder-Zellschicht* zur Kultivierung von Hämatopoetischen Stammzellen (Prockop, 1997) entstammt die Bezeichnung MSZ für Markstromazellen (engl. *marrow stroma cells*, *MSC*).

Mit der Entdeckung, dass MSZ fähig waren, in die Zelltypen der mesodermalen Gewebe (Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten) zu differenzieren (Caplan, 1991; Friedenstein et al., 1976; Owen and Friedenstein, 1988; Pereira et al., 1995; Pittenger et al., 1999; Reyes et al., 2001), etablierte sich auch die Bezeichnung „Mesenchymale Stammzellen“ für diese adhärente Fraktion des Knochenmarks. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Bezeichnungen, die von Labor zu Labor variieren: *BMSC* steht dabei für *Bone Marrow Stem Cells* bzw. *Bone Marrow Stroma Cells*,

*MSC* für *Mesenchymal/Mesodermal/Marrow Stem/Stroma Cells*. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung KMSZ für Knochenmarkstammzellen (*bone marrow stem cell, BMSC*) Verwendung finden.

Zusätzlich zur Adhärenz auf Plastikoberflächen und der Differenzierbarkeit *in vitro* in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten gilt die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle als Identitätsnachweis für KMSZ. Trotz zahlreicher Bemühungen gibt es jedoch, ähnlich den HSZ, bislang noch keine definitive Markerkombination, mit der ausschließlich KMSZ erfasst werden können (Colter et al., 2000; Hermann et al., 2004; Vogel et al., 2003).

## 1.4 Plastizität

Die Ontogenese eines Individuums ist mit einer schrittweisen Spezialisierung seiner Zellen verbunden. Ausgehend von der totipotenten ES-Zelle kommt es mit der Gastrulation zur Festlegung der Zellen auf eines der drei Keimblätter. Innerhalb des jeweiligen Keimblattes entwickeln sich die Zellen, beschränkt auf eine spezifische Entwicklungslinie (engl. *lineage*), letzten Endes in einen ausgereiften, funktionellen Zelltyp. Dem Endoderm (inneres Keimblatt) entstammen beispielsweise die Zellen der Lunge, des Magen-Darm-Traktes oder der Drüsen wie Leber und Bauchspeicheldrüse. Vom Mesoderm (mittleres Keimblatt) gehen die Zellen des Blutes, des Bindegewebes, des Skelettes oder der Muskeln aus. Die Zellen des Nervensystems oder der Epidermis sind ektodermalen (äußeres Keimblatt) Ursprungs. Dieser Entwicklungsprozess von Zellen wird als Differenzierung bezeichnet.

Viele Zellen, darunter auch KMSZ, sind zu einem Prozess in der Lage, der als Plastizität bezeichnet wird (Verfaillie, 2002). Als Plastizität wird die Fähigkeit einer Zelle beschrieben, die Keimblattgrenzen überwindend zu differenzieren. Infolgedessen nimmt sie das Expressionsprofil und den funktionellen Phänotyp eines Zelltyps eines anderen Keimblattes an.

### 1.4.1 Plastizität von Knochenmarkstammzellen (KMSZ)

An KMSZ demonstrierte eine Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Studien die Differenzierbarkeit in Zellen endo- und ektodermaler Gewebe (Herzog et al., 2003): Leber (Lagasse et al., 2000; Petersen et al., 1999), Herzmuskel (Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001), Niere (Lin et al., 2003), Lunge (Gussoni et al., 1999; Ortiz et al., 2003), Epithel (Krause et al., 2001), Endothel (Jackson et al., 2001) sowie Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (Chen et al., 2004).

Sogar die neuroektodermale Differenzierung konnte nachgewiesen werden. In die lateralen Ventrikel neonataler Mäuse injizierte murine KMSZ migrierten durch Vorderhirn und Zerebellum, ohne dabei die Hirnstruktur zu beschädigen. In multiplen Hirnregionen fanden sich dann KMSZ wieder, die astrogliale oder auch neuronale Markerproteine (GFAP, NF) exprimierten (Kopen et al., 1999). Mit

systemisch applizierten KMSZ wurde demonstriert, dass sie in das Hirn migrieren und dann ebenfalls in Neurone differenzieren können. Mehrere Monate nach Applikation ließen sich so in verschiedenen Hirnregionen Zellen nachweisen, die von den KMSZ abstammen und neuronale Marker (NeuN, NSE, NF,  $\beta$ III-Tubulin) exprimierten (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Wie Zhao und Kollegen anhand von Versuchen mit humanen KMSZ zeigten, beschränkten sich die beobachteten Effekte nicht nur auf murine KMSZ. Sie induzierten in Rattenhirnen eine kortikale Ischämie und transplantierten humane KMSZ in die Region um den Infarkt. Die Ratten, die Zellen erhalten hatten, wiesen daraufhin eine funktionelle Verbesserung auf. In der anschließenden histologischen Untersuchung der Hirne wurden zwar von den KMSZ abstammende Zellen gefunden, die Marker von Astrozyten (GFAP), Oligodendrozyten (GalC) und Neuronen ( $\beta$ III-Tubulin, NF, NSE) exprimierten, doch führten die Autoren die Verhaltensverbesserungen nicht darauf zurück. Wahrscheinlicher als die Integration dieser neuen neuronalen Zellen in die Verschaltung des Hirns hielten sie die Sezernierung von Proteinen durch die KMSZ, infolgedessen es zur funktionellen Verbesserung kam (Zhao et al., 2002).

*In vitro* konnten erstmals die Gruppen um Woodbury (Woodbury et al., 2000) und Sanchez-Ramos (Sanchez-Ramos et al., 2000) mit voneinander unabhängigen Protokollen die erfolgreiche Differenzierung von KMSZ in Zellen neuronalen Phänotyps nachweisen. Seit diesen frühen Artikeln berichteten viele weitere Studien von erfolgreichen neuronalen Differenzierungen von KMSZ *in vitro* (Bossolasco et al., 2005; Deng et al., 2001; Hermann et al., 2004; Jin et al., 2003; Kondo et al., 2005; Munoz-Elias et al., 2003; Padovan et al., 2003; Tao et al., 2005; Tondreau et al., 2004; Wislet-Gendebien et al., 2003). Die verwendeten Protokolle können dabei in zwei Ansätze unterteilt werden – die einstufige und die zweistufige Konversion von KMSZ in neurale Zelltypen (Hermann et al., 2006a). Die einstufige neuroektodermale Konversion stellt eine direkte Differenzierung dar. Sie erfolgte in den Studien durch Inkubation mit

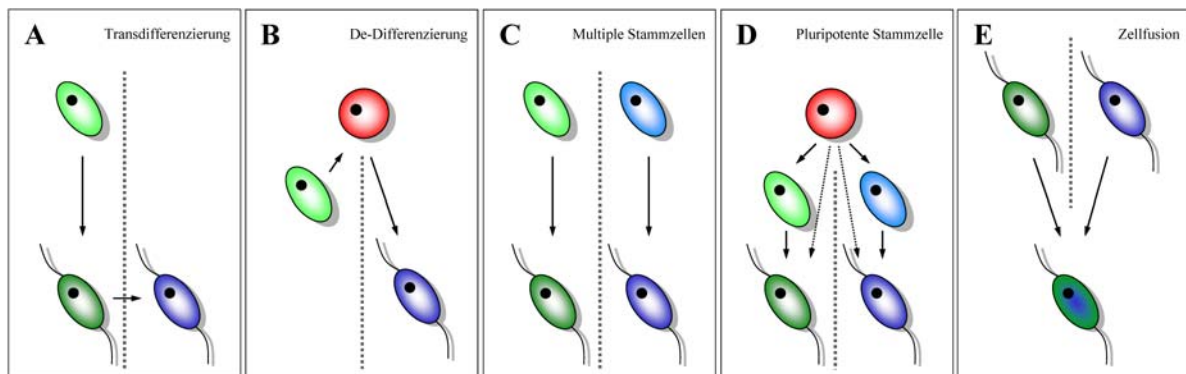
- a) Zytokinen, Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF, BDNF), konditionierten Medien oder in Ko-Kultur mit neuronalen *Feeder*-Zellen,
- b) Substanzen, die eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels zur Folge haben (z.B. IBMX, dbcAMP, Forskolin),
- c) chemisch definierten Medien, die verschiedene Komponenten einschließlich Antioxidanzien (z.B. BME, BHA, DMSO) enthielten.

Die zweistufige Konversion ist durch eine initiale Konversion der KMSZ in eine unreife, NSZ-ähnliche Zelle gekennzeichnet. Die so auf die (neuro)ektodermale Keimbahn festgelegte Zelle wird erst im zweiten Schritt in den reifen neuronalen Zelltyp ausdifferenziert.

Bedauerlicherweise weisen einige *in vitro*-Studien nach heutigem Kenntnisstand gravierende methodische Schwächen auf, die einen Teil der Ergebnisse infrage stellen. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen.

### 1.4.2 Mögliche Mechanismen der Plastizität

Das Phänomen der Plastizität von Zellen wird seit einigen Jahren kontrovers diskutiert (Anderson et al., 2001; Raff, 2003). Als möglicher Mechanismus für die beobachteten Effekte wird eines der folgenden Konzepte angesehen (Abb. 6): Transdifferenzierung, De-Differenzierung, Existenz multipler Stammzellen oder Zellfusion (Wagers and Weissman, 2004).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der Zellplastizität. (A) Transdifferenzierung. (B) De-Differenzierung. (C) Vorliegen multipler Stammzellen bzw. (D) einer pluripotenten Stammzelle. (E) Fusion determinierter Zellen. Die Keimblatt- bzw. Lineage-Grenzen werden durch die gepunktete Linie symbolisiert. (Abbildung modifiziert nach (Wagers and Weissman, 2004))**

#### Transdifferenzierung

Transdifferenzierung beschreibt den Prozess der direkten Konversion einer determinierten Zelle in eine andere (Abb. 6 A). Als Transdifferenzierung gelten beispielsweise die Ergebnisse der von Bjornson und Kollegen publizierten Studie, in der sie die Differenzierung von NSZ in Blutzellen demonstrierten (Bjornson et al., 1999).

#### De-Differenzierung

Als De-Differenzierung wird der Prozess bezeichnet, bei dem eine determinierte Zelle in einen weniger spezialisierten Status wechselt (Abb. 6 B). Als höherpotente Zelle kann sie dann in einen anderen als den ursprünglichen Zelltyp (re-) differenzieren. Auf diese Art und Weise können theoretisch sowohl Entwicklungslinie als auch Keimblattzugehörigkeit geändert werden.

Als Beispielorganismen gelten urodele Amphibien (Molche und Salamander), bei denen eine Gliedmaßen-Amputation die De-Differenzierung lokaler Myozyten zu naiven Progenitorzellen („Blastem“) zur Folge hat. Die Zellen des Blastems sind in der Lage, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und so eine neue Extremität zu generieren (Brockes and Kumar, 2002). Es muss allerdings angemerkt werden, dass die Zellen des Blastems nicht in pluripotente Stammzellen de-differenzieren, sondern sich vielmehr „an ihre frühere Identität erinnern“. Dies wurde durch Transplantation von Blastemzellen der Gliedmaßen in das Auge, in dem sie dann in Strukturen der



Gliedmaßen differenzierten, nachgewiesen (Kim and Stocum, 1986). Das reproduktive Klonen macht sich im Grunde den gleichen Effekt zu Nutze. Im Nukleus einer determinierten somatischen Zelle kommt es nach dem Transfer in eine entkernte Eizelle zu epigenetischen Änderungen in seiner DNS. Die Folge ist die erneute Differenzierbarkeit einer ursprünglich ausdifferenzierten Zelle.

Obwohl es an somatischen Säugerzellen noch nicht so drastisch gezeigt wurde, lassen einige Studien vermuten, dass hier ähnliche Prozesse für eine De-Differenzierung verantwortlich sind. Tang und Kollegen beispielsweise demonstrierten, dass Vorläufer von Oligodendrozyten Eigenschaften von NSZ annahmen, wenn sie unter geeigneten Kulturbedingungen (d.h. serumfrei und mit geringer Dichte) kultiviert wurden (Tang et al., 2001).

### Multiple Stammzellen

Ein weiterer Erklärungsansatz für Plastizität ist die Existenz verschiedener Stammzellpopulationen innerhalb der untersuchten Gewebe (Abb. 6 C). Die Kontamination einer Zellpopulation mit einer Stammzelle eines anderen Keimblattes bzw. Entwicklungslinie und deren Differenzierung könnte so fälschlicherweise als Transdifferenzierung der vermeintlich homogenen Population interpretiert werden.

Das mögliche Vorliegen einer oder mehrerer Stammzellpopulationen wurde in den entsprechenden Studien der frühen Plastizitäts-Debatte nicht sorgfältig genug in Betracht gezogen. Erst in den letzten Jahren nimmt die Akzeptanz durch den Nachweis verschiedener Stammzellpopulationen im Knochenmark zu. Neben gewebespezifischen Stammzellen (engl. *tissue committed stem cells*, TCSC) (Kucia et al., 2004b; Ratajczak et al., 2004b) gewinnen zunehmend Populationen von pluripotenten Stammzellen im adulten Knochenmark an Bedeutung (Abb. 6 D).

D'Ippolito und Kollegen (D'Ippolito et al., 2004) wiesen *in vitro* in unfraktioniertem humanen Knochenmark eine Population von nicht-hämatopoetischen Zellen (engl. *marrow-isolated adult multilineage inducible cells*, MIAMI-Zellen) nach, die sich in Zelltypen aller drei Keimblätter induzieren ließen. Darüber hinaus konnte in den MIAMI-Zellen die Expression der ES-Zell-Marker Oct4 und Rex-1 nachgewiesen werden.

Die Gruppe um Verfaillie selektierte eine Fraktion von CD45<sup>-</sup>/GlyA<sup>-</sup> Zellen aus dem Knochenmark, die sie anfänglich als mesodermale Progenitorzellen beschrieben (engl. *mesodermal progenitor cell*, MPC) (Reyes et al., 2001). Die Bezeichnung wurde in MAPC (engl. *multipotent adult progenitor cell*) abgeändert, nachdem der Beweis erbracht worden war, dass diese Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in die meisten somatischen Zelltypen differenzieren konnten (Jiang et al., 2002a; Keene et al., 2003; Schwartz et al., 2002). MAPC konnten auch aus verschiedenen anderen Geweben, wie z.B. Gehirn oder Muskeln, isoliert werden (Jiang et al., 2002b).

Eine weitere relevante Arbeit stammt von Kucia und Kollegen (Kucia et al., 2006a). In dieser identifizierten sie eine homogene Population von sehr kleinen, den embryonalen Stammzellen ähnlichen Zellen (engl. *very small embryonic like stem cells*, VSEL cells). Diese in geringer Zahl

vorkommenden Sca-1<sup>+</sup>/lin<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> Zellen exprimierten neben CXCR4 verschiedene, für pluripotente Stammzellen typische, Marker (SSEA-1, Oct4, Rex-1). Neben verschiedenen morphologischen Charakteristika embryonaler Stammzellen ließen sich die VSEL-Zellen *in vitro* in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren. Als Grund für die Präsenz pluripotenter Stammzellen im Knochenmark wird ihre Ablagerung während der frühen Embryogenese vermutet (Kucia et al., 2006b).

Zwischen den Charakteristika der genannten Stammzellen gibt es sowohl einige Übereinstimmungen als auch Differenzen. Das wirft die Frage auf, ob es sich nicht gegebenenfalls um dieselben Zellen handelt, die man lediglich unter Anwendung unterschiedlicher Protokolle identifiziert hat (Ratajczak et al., 2004a; Ratajczak et al., 2007a). Dies mit Sicherheit beantworten zu können, erfordert jedoch weitere Forschungsarbeit.

### Zellfusion

Das Ergebnis einer Zellfusion ist eine Zelle, die in der Regel über die Oberflächen-, Zytoplasma- und Kernmarker der Ausgangszellen verfügt (Abb. 6 E). Ist die Zelle anfangs noch als binukleäre Zelle identifizierbar, kann es im weiteren Verlauf auch zur Verschmelzung beider Zellkerne kommen. Die Zelle liegt dann als mononukleäre, polyploide Zelle vor. Die Zellfusion ist eine vieldiskutierte Option im Kontext der Zellplastizität, entsteht doch letztlich die totipotente Zygote aus der Fusion von Oozyte und Spermium.

Kommt es beispielsweise zwischen einer KMSZ und einem Neuron zur Zellfusion, könnte die resultierende Zelle als transdifferenziert fehlinterpretiert werden, weil sie neben KMSZ-Markern auch neuronenspezifische Marker aufweist.

Verschiedene Studien konnten die Fusion multipler Zelltypen demonstrieren. *In vitro* wurde gezeigt, dass sowohl KMSZ der Maus (Terada et al., 2002) als auch dem Maushirn entnommene Zellen mit ES-Zellen fusionieren (Ying et al., 2002). Vassilopoulos und Kollegen beschrieben *in vivo* die Fusion von transplantierten KMSZ mit Hepatozyten (Vassilopoulos et al., 2003), Weimann und Kollegen die Fusion mit Purkinje-Neuronen (Weimann et al., 2003).

Die Zellfusion ist jedoch mit ca. 2 Ereignissen je 10<sup>6</sup> aus dem Knochenmark abstammender Zellen (Terada et al., 2002) ein eher seltenes Ereignis. Darüber hinaus eignet sich dieser Mechanismus nicht als Erklärung für die vielfach *in vitro* an KMSZ-Monokulturen erzielten Differenzierungsergebnisse.

## 1.5 Markierung von Zellen

Die Untersuchung des Differenzierungspotenzials von Zellen sollte in einem weitgehend realitätsnahen Milieu erfolgen. Dies kann idealerweise durch Ko-Kultivierung oder Transplantation in das entsprechende Organ bzw. Ziel-Gewebe erreicht werden. Eine Markierung der zu untersuchenden Zellen ist dabei erforderlich, um sie anschließend wiederzufinden und von den Zellen des Empfängergewebes unterscheiden zu können.

Als Markierungsmethoden haben sich in den letzten Jahren unterschiedliche Ansätze etabliert. Sie können generell als transgen und nicht-transgen voneinander unterschieden werden. In transgenen Ansätzen werden Zellen verwendet, die ein bestimmtes Reporter-gen exprimieren. Unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors, beispielsweise des  $\beta$ -Aktin-Promotors und verstärkt durch den konstitutiv aktiven Zytomegalovirus (CMV)-Enhancer, wird das Reporter-gen in allen Zellen des Organismus' exprimiert. Ist eine Expression nur in einem bestimmten Zelltyp erwünscht, wird das Reporter-gen unter die Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors gestellt. Die in den Studien prominentesten Reporter-gene kodieren das *green fluorescent protein* (GFP) (Brazelton et al., 2000; Bühnemann et al., 2006; Wislet-Gendebien et al., 2004; Zhao et al., 2002) oder  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) (Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 2001; Jiang et al., 2002a; Lagasse et al., 2000).

GFP ist ein in der Qualle *Aequorea victoria* natürlich vorkommendes Protein. Okabe und Kollegen (Okabe et al., 1997) gelang es erstmals, eine transgene Mauslinie zu kreieren, die ubiquitär GFP produzierte und so als Quelle für grün fluoreszierende Zellen Verwendung findet. Inzwischen gibt es auch modifizierte Varianten des GFP. Sie unterscheiden sich in ihren Fluoreszenzspektren voneinander und werden dementsprechend als YFP (*yellow fluorescent protein*) oder CFP (*cyan fluorescent protein*) bezeichnet.

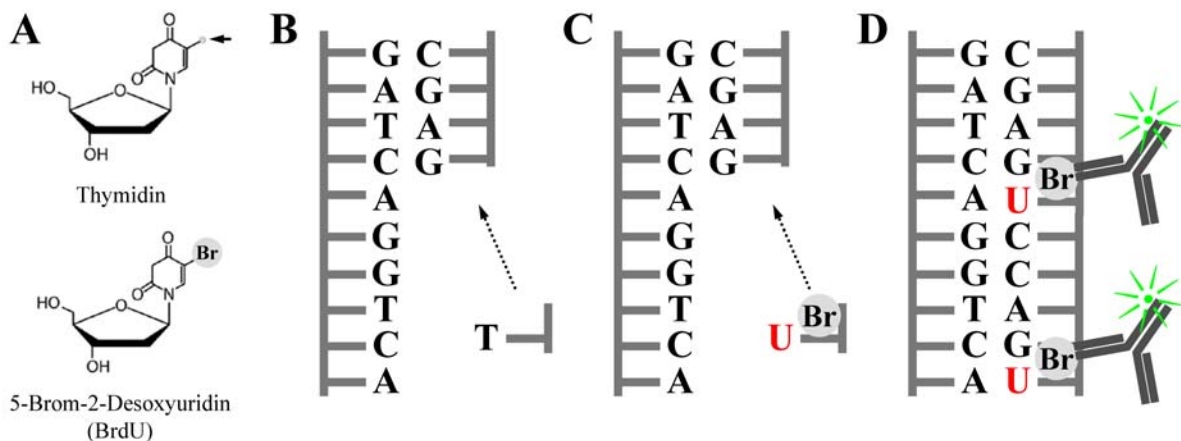
$\beta$ -Galaktosidase ist eine Glykosidase und wird durch das lacZ-Gen kodiert. Eine ubiquitäre Expression dieses Gens findet in der transgenen Mauslinie *ROSA26* statt. Während die genannten fluoreszierenden Proteine direkt anhand ihrer Fluoreszenz detektierbar sind, müssen  $\beta$ -Gal-positive Zellen mit einer histochemischen Reaktion visualisiert werden. In dieser wird das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in Galaktose und Indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl) gespalten. Die weitere Oxidierung des Indoxyls zu Indigo (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) resultiert in einer sichtbaren Blaufärbung.

Eine wesentliche Schwäche von transgenen Markierungsansätzen ist die mögliche Expressionsminderung des Transgens im Verlauf der Zelldifferenzierung (Theise et al., 2003). Mit einer sog. *sex-mismatch*-Transplantation umgeht man ein solches Problem. Anhand des Y-Chromosoms können transplantierte Zellen eines männlichen Spenders in einem weiblichen Empfänger identifiziert werden (Alison et al., 2000; Krause et al., 2001; Mezey et al., 2003). Die Detektion des Chromosoms mittels *in situ*-Hybridisierung erfordert ein sorgfältiges Schneiden der

Präparate, um die Ebene des Nukleus', in der das Chromosom lokalisiert ist, nicht zu verfehlen (Kotton et al., 2004).

Die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (Lee et al., 2004; Neumann et al., 2006; Weir et al., 2008) bietet den Vorteil einer einfachen Markierung, da die Zellen lediglich für kurze Zeit mit dem Farbstoff inkubiert werden müssen. Sie lagern sich in der Membran (z.B. DiI, PKH26) oder dem Nukleus ein (z.B. Bis-Benzimid), verdünnen sich jedoch mit jeder Zellteilung und neigen auch zur Markierung umliegender Zellen. Dies kann mit Fluoreszenzfarbstoffen vermieden werden, die intrazellulär binden (z.B. CMFDA, CFSE).

Eine weitere Möglichkeit der Zellmarkierung ist der Einsatz des Thymidin-Analogons 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) (Abb. 7 A). Während der S-Phase des Zellzyklus' wird es an Stelle von Thymidin (Abb. 7 B) in den neu synthetisierten DNS-Strang inkorporiert (Abb. 7 C). Anschließend kann es mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 7 D). Die so markierte Zelle hat einen BrdU-positiven Nukleus.



**Abb. 7: Prinzip der BrdU-Markierung.** (A) Das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) besitzt das Halogen Brom an Stelle einer Methylgruppe (Pfeil) wie Thymidin. Befinden sich an dieser Stelle andere Halogene, spricht man bspw. von Ioddesoxyuridin (IdU) oder Chlordesoxyuridin (CldU). (B) Während der DNS-Replikation wird das Nukleotid Thymidin in den neu synthetisierten Strang eingebaut. (C) Das Angebot von BrdU führt zu dessen Inkorporation in die DNS. (D) Mit spezifischen Antikörpern kann das BrdU und somit die Zelle anhand ihres markierten Nukleus' detektiert werden. (Abbildung modifiziert nach Kempermann 2002: Habilitationsschrift, <http://edoc.hu-berlin.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=20088>)

Ende der 1980er Jahre von Miller und Nowakowski (Miller and Nowakowski, 1988) als Marker für proliferierende Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) eingeführt, ersetzte BrdU aufgrund seiner Vorteile das bis dahin etablierte <sup>3</sup>H-markierte Thymidin (Breunig et al., 2007; Taupin, 2007). Mit der aufkommenden Konfokalmikroskopie wurde eine phänotypische Charakterisierung der proliferierten Zellen und deren stereologische Quantifizierung möglich. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien hat sich BrdU als geeigneter Marker für proliferierende Zellen erwiesen (Baldauf and Reymann, 2005; Kempermann et al., 1997; Kuhn et al., 1996; Leuner et al., 2006; Lichtenwalner RJ and Parent JM.,

2006; Schmidt and Reymann, 2002; Taupin, 2006; Thored et al., 2006; Van Praag et al., 1999). Die *in vivo*-Studien umfassen dabei sowohl Untersuchungen am gesunden als auch am geschädigten Gehirn. Auch die Markierung von Zellen vor einer Transplantation ist mit BrdU realisierbar (Kopen et al., 1999; Li et al., 2001c; Li et al., 2000; Lundberg et al., 1997; Reubinoff et al., 2001). Dafür wird *in vitro* dem Kulturmedium einige Stunden bis Tage vor der Transplantation, abhängig von der Proliferationsrate der zu markierenden Zellen, BrdU zugefügt. Die Markierung mit BrdU hat, wie alle Zellmarkierungsmethoden, neben den spezifischen Vorteilen auch Nachteile. So wurde beschrieben, dass es nach Transplantation so markierter Zellen zum Transfer von Thymidinanaloga in benachbarte proliferierende Zellen kommen kann, was zu falsch-positiven Resultaten führt (Burns et al., 2006; Coyne et al., 2006).

Daher ist die Anwendung und Kombination verschiedener Techniken von hoher Relevanz. Nur so lassen sich die Schwächen einzelner Markierungstechniken ausgleichen und verlässliche Daten gewinnen.

## 1.6 Behandlung neurologischer Erkrankungen mit exogenen Stammzellen

Das Differenzierungspotenzial von Stammzellen, embryonalen und auch adulten Ursprungs, schafft große Erwartungen auf einen zukünftigen Einsatz bei der Behandlung neurologischer Erkrankungen.

Wie bereits beschrieben wurde, generieren endogene Stammzellen des Zentralen Nervensystems zwar auch postnatal Neurone, doch ist dieser Prozess nach jetzigem Kenntnisstand auf wenige Regionen des Hirns (SVZ und SGZ) beschränkt. Die Applikation exogener Stammzellen bietet potenziell eine weitere Möglichkeit, neurologische Defizite zu therapieren – unabhängig, ob diese auf eine Zelldegeneration oder den gänzlichen Verlust von Zellen zurückzuführen sind.

Anhand einiger Beispiele soll im Folgenden ein kurzer Einblick in den experimentellen Einsatz von Stammzellen gegeben werden.

### 1.6.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich grundlegend durch die meist langsam fortschreitende Atrophie einzelner Neuronentypen aus. Kommt es bei Morbus Parkinson selektiv zum Absterben dopaminerger Neurone der Substantia nigra, sind es bei Morbus Huntington vorrangig die GABAergen Neurone des Striatums.

Die zellbasierte Therapie von Morbus Parkinson entwickelte sich zu einer realistischen Alternative zu pharmakologischen Ansätzen oder elektrischer Tiefenstimulation. Die Substitution der degenerierten dopaminergen Neurone ermöglicht eine ursächliche Behandlung der Erkrankung und nicht mehr nur der Symptome. In initialen Studien wurden catecholaminerge Zellen der Nebenniere in das Striatum transplantiert. Die geringen Erfolge hinsichtlich des Zellüberlebens und der Verhaltensverbesserung der Rezipienten führte zur Suche nach anderen Zellquellen (Backlund et al., 1985; Hurtig et al., 1989). Wie weitere Studien zeigten, stellten dopaminerge Neurone des fötalen ventralen Mesenzephalons die geeigneteren Zellen dar. Sie waren in der Lage zu überleben und sich im Striatum zu integrieren. Auch konnten nach ihrer Transplantation motorische Verbesserungen festgestellt werden (Bjorklund et al., 1983; Freed et al., 1992; Kordower et al., 1998; Lindvall et al., 1990; Piccini et al., 2000). In klinischen Studien wurden inzwischen mehrere hundert an Morbus Parkinson erkrankte Patienten erfolgreich mit fötalen Zellen behandelt (Barker and Widner, 2004). Die Zellen differenzierten, integrierten sich im Empfängergewebe und führten zu funktionellen Verbesserungen (Kordower et al., 1996; Kordower et al., 1995; Mendez et al., 2005). Andere Studien schränkten die Wirksamkeit bis zu einem Patientenalter von 60 Jahren ein (Freed et al., 2001) oder fanden keine Unterschiede zwischen transplantierten und Kontroll-Patienten (Olanow et al., 2003). Von Nachteil bei der Verwendung fötaler Zellen ist das Verhältnis zwischen Spenderzellen und Empfänger sowie die ethische Beurteilung. Da die Ausbeute an dopaminergen Neuronen relativ gering ist, besteht nämlich pro Patient ein Bedarf von mehreren Föten (Isacson et al., 2003).

Alternativ zu Zellen fötalen Ursprungs wurden auch ES-Zellen auf einen therapeutischen Nutzen untersucht. Ben-Hur und Kollegen generierten aus humanen ES-Zellen eine mit neuronalen Progenitorzellen angereicherte Kultur. Die Zellen überlebten mindestens 12 Wochen nach Transplantation in Ratten und differenzierten in dopaminerge Neurone. Auch eine teilweise Verbesserung des Verhaltens wurde beobachtet (Ben-Hur et al., 2004). Obwohl in dieser Studie keine Tumorbildung beobachtet wurde, belegen andere Studien, dass die Transplantation von ES-Zellen generell das Risiko einer Teratombildung beinhaltet (Brederlau et al., 2006; Roy et al., 2006).

Die Behandlung der erblichen Krankheit Morbus Huntington (auch Chorea Huntington genannt) zielt ebenfalls auf den Ersatz der degenerierten Neurone. Die klinischen Ansätze basieren auf tierexperimentellen Untersuchungen, die in Nagern und Primaten alle fötalen striatalen Zellen auf deren Wirksamkeit sowie die Sicherheit der Methode untersuchten. An allen Zelltypen konnte deren Überleben (Campbell et al., 1993; Liu et al., 1992; Lopez-Martin et al., 1999) sowie die funktionelle Verknüpfung mit dem Empfängergewebe demonstriert werden (Dunnett et al., 1998; Hantraye et al., 1992; Kendall et al., 1998; Nakao et al., 1999). Darüber hinaus führten die striatalen Transplantate zur Reduzierung der charakteristischen Krankheitssymptome. An Patienten ließ sich jedoch eine vollständige Erholung nach Erhalt der allogenen fötalen Zellen nicht beobachten. Es zeigten sich zwar motorische und psychologische Verbesserungen (Kopyov et al., 1998; Philpott et al., 1997), doch beruhen diese lediglich auf einem verzögerten Fortschreiten der Erkrankung, die für ein paar Jahre anhält (Bachoud-Levi et al., 2000; Bachoud-Levi et al., 2006). Als problematisch anzusehen ist, dass alle bisherigen klinischen Ansätze, die fötalen Zellen in das geschädigte Striatum transplantierten, scheiterten. Die Pathophysiologie von Morbus Huntington beschränkt sich jedoch nicht nur auf diese Hirnregion, so dass eine Transplantation ins Striatum alleine nicht ausreicht, alle Symptome zu beheben.

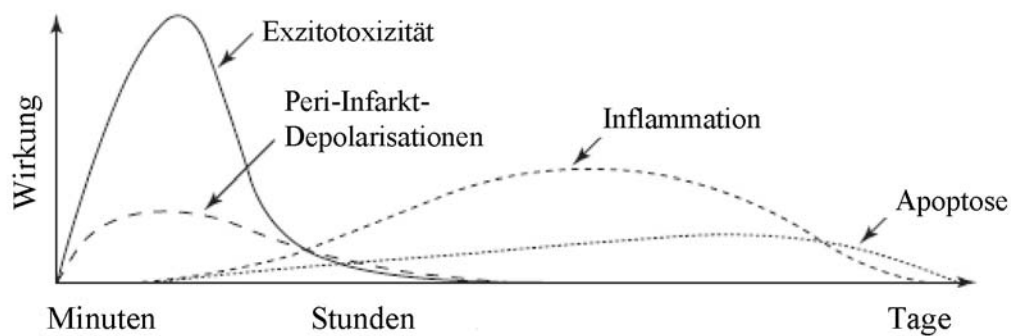
Eine weitere vielversprechende Zellquelle stellen neurale Stammzellen dar. Sie lassen sich vor einer Transplantation *in vitro* vermehren und bergen lediglich ein geringes Risiko der Tumorbildung. In Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen wurde gezeigt, dass sie nach Transplantation vorrangig in Astrozyten und nur zu einem kleinen Teil in Neurone differenzieren. Dennoch führte ihre Applikation zu funktionellen Verbesserungen in den Testtieren (Dziewczapolski et al., 2003; McBride et al., 2004; Song et al., 2007).

### 1.6.2 Schlaganfall

Anders als die vorab beschriebenen neurologischen Erkrankungen kommt es beim Schlaganfall (Apoplexie, apoplektischer Insult) zum Absterben komplexer Hirnareale. Davon sind nicht nur einzelne Neuronentypen, sondern ebenfalls die dort ansässigen Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen betroffen. Die Ursache liegt in der Mangelversorgung der entsprechenden Region mit Glukose und Sauerstoff infolge einer Reduktion des Blutflusses. Diese ist in etwa 80 % der Fälle

durch einen Gefäßverschluss bedingt. Entweder durch einen lokalen Thrombus oder einen angeschwemmten Embolus kommt es so zur fokalen zerebralen Ischämie. Die anderen etwa 20 % der Schlaganfälle resultieren aus spontanen Blutungen (intrazerebral oder subarachnoidal) und werden als hämorrhagische Insulte bezeichnet. Die Kompression des umliegenden Hirngewebes aufgrund der Einblutung und der Ausfall der Blutversorgung in den nachgeordneten Hirnregionen, haben jedoch ähnliche Auswirkungen wie ein thrombotischer Insult. Diese fokalen Varianten der Ischämie sind von der globalen zu unterscheiden, bei der es zu einer Unterversorgung des gesamten Hirns (z.B. durch Herzstillstand) kommt.

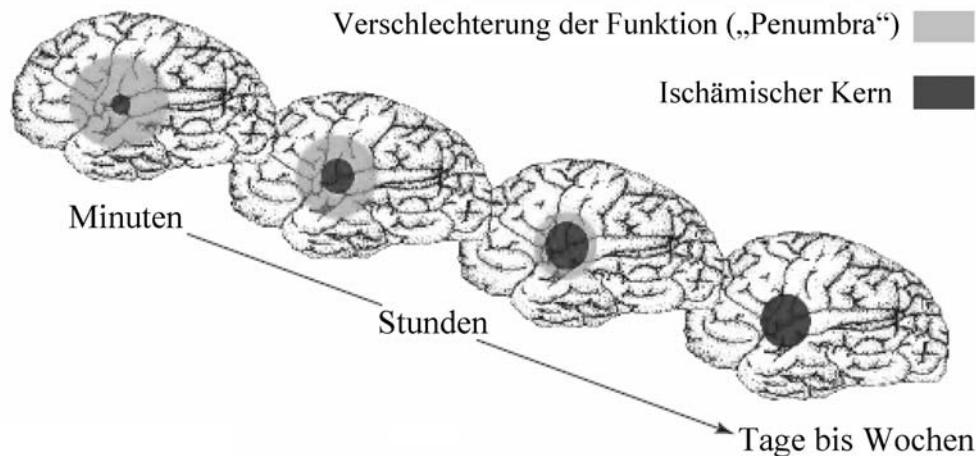
Die Minderdurchblutung löst eine Kaskade pathogener Mechanismen aus, die letztendlich zum Zelltod im betroffenen Gebiet führen. Dazu zählen Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisationen, Inflammation, Nekrose und Apoptose (Abb. 8) (Dirnagl et al., 1999).



**Abb. 8: Ischämische Kaskade der Schädigungsmechanismen der fokalen zerebralen Ischämie.** Unmittelbar nach Beginn der Perfusionsverringering kommt es zur Schädigung der Zellen durch exzitotoxische Mechanismen. Peri-Infarkt-Depolarisationen und – als verzögerte Mechanismen – Inflammation, Nekrose sowie Apoptose führen zum Untergang der Zellen im betroffenen Areal. (Dirnagl et al., 1999)

In der einer fokalen Ischämie folgenden Akutphase (die ersten 24 Stunden) lässt sich das ischämische Infarktareal anhand unterschiedlicher Blutperfuionsgrade in zwei Zonen einteilen. Der Bereich mit der geringsten verbliebenen Perfusion wird als ischämischer Kern bezeichnet. Der zerebrale Blutfluss ist hier auf unter 20 % des normalen Wertes reduziert (Hossmann, 1994). In diesem Gebiet findet eine rapide und irreversible Schädigung des bestehenden Zellgefüges statt. Zwischen diesem letal geschädigten Bereich und dem gesunden Gehirn liegt die Penumbra, eine Zone mit moderat vermindertem Blutfluss. Die dort lokalisierten Zellen bleiben strukturell intakt und können teilweise auch ihren Metabolismus aufrechterhalten (Hossmann, 1994; Obrenovitch, 1995). Die Schädigungen der Zellen in der Penumbra gelten grundsätzlich als reversibel (Hakim, 1987) – ohne Reperfusion innerhalb eines eng limitierten Zeitraumes nach Insult weitet sich das ischämische Kerngebiet jedoch auch auf die Penumbra aus und führt dort zur irreversiblen Zellschädigung (Abb. 9).





**Abb. 9: Vergrößerung des ischämischen Kerns nach fokaler Ischämie.** Im ischämischen Areal finden sich nach dem Insult eine Region mit moderat reduzierter Blutperfusion (grau; Penumbra) und eine Region mit stark reduzierter (schwarz; Ischämischer Kern) Blutperfusion. Ohne zeitnahe Gegenmaßnahmen (Reperfusion, Neuroprotektion) weitet sich die strukturelle Zellschädigung des Kerngebietes auch auf die Zellen in der Penumbra aus. (Dirnagl et al., 1999)

Die Therapie des (thrombotischen) Schlaganfalls umfasst neben der Thrombolyse die Protektion der Zellen (Neuroprotektion) in der Penumbra. Als bislang einzige klinische Anwendung hat sich die Thrombolyse etabliert. Unter der Voraussetzung einer Behandlung innerhalb weniger Stunden nach Insult kann die Behandlung die Ausweitung der Hirnschädigung in gewissem Umfang einschränken. Als Thrombolytikum wird dabei der Plasminogenaktivator t-PA (*tissue plasminogen activator*) eingesetzt. Das mit der Applikation dieser Substanz verbundene Risiko von Sekundärblutungen lässt jedoch nur die Behandlung eines geringen Teils (6 %) von ansonsten weitestgehend gesunden Patienten zu (Chiu et al., 1998).

Die Neuroprotektion umfasst Maßnahmen, die nach einer fokalen Ischämie auf die Inhibition pathogener Ereignisse in der ischämischen Kaskade zielen. Durch geeignete Pharmaka sollen so die bedrohten Neurone der Penumbra vor dem Zelltod bewahrt werden. Eine Vielzahl von Substanzen erwies sich im Tiermodell als wirksam, doch erbrachten sie in klinischen Studien keine signifikanten Verbesserungen bei den Patienten (Block and Schwarz, 1999; Wahlgren and Ahmed, 2004).

Die Ursachen für die Abweichungen der Ergebnisse zwischen klinischen und tierexperimentellen Studien sind vielfältig (Dirnagl et al., 1999). Im Tiermodell werden oftmals juvenile Tiere unter kontrollierten Laborbedingungen verwendet. Somit ist eine direkte Übertragung auf den durchschnittlich älteren, multimorbiden (z.B. Diabetes, Bluthochdruck) Schlaganfallpatienten nicht möglich. Auch scheitern einige klinische Studien, weil sich die potenziell neuroprotektiven Substanzen nicht innerhalb des zeitlichen Fensters applizieren lassen, in dem sie sich im Tiermodell als wirksam erwiesen haben. Auch die ermittelten wirksamen Dosen lassen sich aufgrund von Nebenwirkungen klinisch oft nicht umsetzen. Obwohl die grundlegenden Mechanismen einer zerebralen Ischämie zwischen den Spezies vergleichbar sind, gibt es doch gravierende Unterschiede

(Hirnstruktur, Gefäßanatomie, Metabolismus) zwischen Versuchstieren und Menschen. Zudem scheinen Ratten, als am häufigsten verwendete Versuchstiere, empfänglicher für eine neuroprotektive Behandlung zu sein als Primaten. Hinzu kommt bei ihnen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Spontanerholung nach experimentellem Schlaganfall.

Das Ausbleiben von Erfolgen bei der pharmakologischen Neuroprotektion erfordert die Entwicklung wirksamer anderer Therapieformen. Die Zellersatztherapie soll, ähnlich wie es bei den beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen bereits in *Proof-of-Principle*-Studien gezeigt wurde, den erhofften Nutzen bringen. Während die Pathologie von Morbus Huntington oder Morbus Parkinson jedoch „nur“ die Rekonstruktion relativ homogener Neuronenpopulationen erfordert, muss nach Schlaganfall ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Neuronentypen sowie Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen wiederhergestellt werden.

Eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen wurde bislang auf ihr therapeutisches Potenzial untersucht: Aus murinen ES-Zellen *in vitro* vordifferenzierte neurale Vorläuferzellen (Bühnemann et al., 2006), humane neurale Stammzellen (Kelly et al., 2004; Park, 2000), immortalisierte murine neuroepitheliale Stammzellen (Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001), NT2-Zellen (Borlongan et al., 1998; Kondziolka et al., 2000), KMSZ aus Ratten (Chen et al., 2001a; Li et al., 2001b), humane Nabelschnurblutzellen (Chen et al., 2001b; Willing et al., 2003) und aus Fettgewebe gewonnene Stromazellen (Gronthos et al., 2001; Kang et al., 2003).

## 1.7 Gegenstand der Arbeit

Das Differenzierungsverhalten von Knochenmarkstammzellen (KMSZ) stellte in den vergangenen Jahren den Fokus zahlreicher Untersuchungen dar. Insbesondere ihr Potenzial, in neuroektodermale Zelltypen zu differenzieren, knüpfte hohe Erwartungen an einen möglichen Einsatz von KMSZ in entsprechenden zellbasierten Therapieansätzen. Darüber hinaus ermöglicht ihre verhältnismäßig einfache Gewinnung aus dem Knochenmark der Patienten ihren Einsatz in autologen Transplantationen. Um einen derartigen klinischen Einsatz jedoch realisieren zu können, müssen einige grundlegende Fragen, die Stammzeleigenschaften von KMSZ betreffend, noch beantwortet werden. Wie in der Einleitung dargelegt, haben frühe Arbeiten die Hypothese nahegelegt, dass KMSZ unter definierten Bedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in neurale Zellen differenzieren können. Neuere Arbeiten belegen zwar einen therapeutischen Effekt von KMSZ nach Transplantation in Tiere mit experimentellem Schlaganfall, allerdings vermuten einige Autoren, dass dieser verhaltensverbessernde Effekt durch die Sezernierung von verschiedenen Wachstumsfaktoren durch die transplantierten Zellen bedingt wird.

Bei der Untersuchung von KMSZ aus Ratte wurden in der vorliegenden Arbeit bereits unter Standardkulturbedingungen (= Basalbedingungen) existierende Zellen entdeckt, die Markerproteine neuraler Zellen exprimierten. Diese Befunde und Daten aus der Literatur führten zur Hypothese, dass innerhalb von KMSZ möglicherweise Subpopulationen von Zellen existieren, die Eigenschaften neuraler Stammzellen besitzen. Eine solche Subpopulation von kleinen Nestin-positiven Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend charakterisiert. Des Weiteren wird demonstriert, dass ein einfacher Serumentzug zur Anreicherung dieser Subpopulation und zur Expression zusätzlicher Markerproteine führt, die typisch für embryonale und neurale Stammzellen sind. Die so erzielte und in dieser Arbeit beschriebene Population von Serumdeprivation-induzierten KMSZ (SD-KMSZ) unterstützt eine von mehreren Gruppen vertretene Ansicht, dass KMSZ pluripotente Stammzellen enthalten, die unter entsprechenden Bedingungen möglicherweise auch zu neuronalen Zellen differenzieren können.

Um eine mögliche Differenzierung in neurale Zellen aufzuklären, wurden KMSZ in Ratten nach experimentellem Schlaganfall transplantiert. Da für die Gewinnung der KMSZ keine GFP-exprimierenden KMSZ aus der Ratte zur Verfügung standen, wurden die zu transplantierenden Zellen zuvor *in vitro* mit BrdU markiert. Es zeigte sich, dass eine Detektion der transplantierten Zellen bereits nach einer Woche nicht mehr möglich war, da das BrdU-Signal nicht mehr einwandfrei nachweisbar war. Die Stabilität des BrdU-Signals wurde deshalb in einer *in vitro*-Studie untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass das BrdU in den der Markierung nachfolgenden Zellteilungen nicht nur aus dem Genom „rausverdünnt“ wird, sondern offensichtlich auch durch Reparaturprozesse aktiv aus der DNS ausgeschnitten und ins Zytoplasma transportiert wird.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

**Tab. 1:** Verwendete Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage BP 211 D	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage PT310	Sartorius, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator C200	Labotect, Göttingen
Deckgläschen	Karl Hecht „Assistent“, Sondheim
Einfriercontainer Mr. Frosty	Nunc, Wiesbaden
Einwegspritzen	B.Braun, Melsungen
Heissluftsterilisator UT6	Heraeus, Hanau
Inversmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Inversmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Kanülen (23 G)	B.Braun, Melsungen
Kritischer-Punkt-Trockner	Bal-Tec, Balzers, FL
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Labor-pH-Meter-766	Knick, Berlin
Laborautoklav 2540 EL	VWR, Wien, A
Laborschüttler Thermoshake	C. Gerhardt, Königswinter
Laserscanmikrosop LSM 5 Pascal Exciter	Carl Zeiss, Jena
Multiwell-Platten	TPP, Trasadingen, CH
Multiwell-Platten für <i>Time-Lapse</i>	BD Falcon, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht „Assistent“, Sondheim
Objektträger Super-Frost Plus	Menzel, Braunschweig
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rasterelektronenmikroskop DSM 940	Carl Zeiss, Jena
Reinstwasseranlage Ultra Clear UV plus	SG Wasser und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Schlittenmikrotom	Leica, Bernsheim
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Heraeus, Hanau
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Thermomagnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach

---

Vortex MS3 basic	Ika, Staufen
Wasserbad Julabo 19	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus, Hanau
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, CH

---

### 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

**Tab. 2:** Verwendete Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Bezugsquelle
DAB	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	MoBiTec, Göttingen
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
DPX	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eselserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formalin	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Electron Microscop Sciences, Hatfield, USA
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Roth, Karlsruhe
Halothan	Sigma-Aldrich, Steinheim
HCl	Merck, Darmstadt
Histomount	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Steinheim
PFA	Merck, Darmstadt
PI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propylenglykol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Säurefuchsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

**Tab. 3:** Zellkulturmedien und –zusätze

Bezeichnung	Bezugsquelle
Adipogener Stimulations-Zusatz	Stemcell Technologies, USA
Alpha-MEM (2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	Biochrom, Berlin
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
bFGF	Chemicon, Temecula, USA
Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Alrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGF	Roche, Mannheim
FKS*	Biochrom, Berlin
HEPES	Biochrom, Berlin
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MesenCult Basal Medium	Stemcell Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin 0,1 % (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TGF-β	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA 0.25% (v/v)/0.02% (v/v)	Biochrom, Berlin
Tween 20	Roth, Karlsruhe

\* Um negative Auswirkungen unterschiedlicher FKS-Chargen auf die Proliferation und somit auf den Ausgang der Experimente zu vermeiden, wurde lediglich eine bestimmte Charge FKS verwendet. Diese wurde durch das Austesten mehrerer Chargen bestimmt. Das FKS wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert und vor Gebrauch vollständig auf 37 °C erwärmt.

<u>Adipozyten-Induktionsmedium</u>	MesenCult Basal Medium	
	Adipogener Stimulations-Zusatz	10 % (v/v)
<u>Osteozyten-Induktionsmedium</u>	Alpha-MEM	
	FKS	15 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	0,5 % (v/v)
	L-Ascorbinsäure	60 µM
	β-Glycerophosphat	10 mM
	Dexamethason	0,1 mM
<u>Chondrozyten-Induktionsmedium</u>	Alpha-MEM	
	FKS	1 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	0,5 % (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	L-Ascorbinsäure	50 µM
	TGF-β	10 ng/ml
	Insulin	0,5 µg/ml
<u>Sphärulen-Basis-Medium</u>	Alpha-MEM	
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	EGF	20 ng/ml
	bFGF	20 ng/ml
<u>Standardmedium</u>	Alpha-MEM	
	FKS	20 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	HEPES	2 mM
<u>Serumfreies Standardmedium</u>	Alpha-MEM	
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	HEPES	2 mM
<u>Alpha-MEM/0,6 N HCl</u>	Alpha-MEM	13,8 ml
	2 N HCl	6 ml
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)



### 2.1.4 Puffer und Lösungen

<u>PBS 0,1 M</u>	NaCl	137 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
	· in <i>Aqua dest.</i> lösen · auf pH = 7,4 einstellen.	
<u>TBS 0,1 M</u>	TRIS	12 g
	NaCl	8,8 g
	<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 1.000 ml
<u>PFA 4 % (m/v)</u>	Paraformaldehyd	4 g
	PBS	100 ml
	· unter Rühren auf 65 °C erwärmen, bis die Lösung klar ist · dann durch einen Faltenfilter filtrieren	
<u>Oil Red O 0,5 % (m/v)</u>	Oil Red O	0,5 g
	Propylenglykol	100 ml
	· bis 95 °C erwärmen, dann warm filtrieren · am nächsten Tag durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) filtrieren	
<u>Säurefuchsin 1 % (m/v)</u>	Fuchsin	1 g
	<i>Aqua dest.</i>	100 ml
	Eisessig	1 Tropfen
<u>Toluidinblau</u>	Toluidinblau	1 g
	<i>Aqua dest.</i>	100 ml
	· am nächsten Tag Zugabe von 96 % Ethanol 100 ml · zum Gebrauch werden 2 ml Stammlösung in 100 ml <i>Aqua dest.</i> verdünnt	
<u>PLL-Lösung</u>	Poly-L-Lysin	5 µl
	PBS (4 °C)	50 ml

### 2.1.5 Antikörper

**Tab. 4:** Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen anti- $\beta$ III-Tubulin	1:750	Hiss Diagnostics, Freiburg
Maus anti- $\beta$ III-Tubulin	1:750	Promega, Mannheim
Ziege anti-Kaninchen-Biotin	1:500	Dianova, Hamburg
Maus anti-BrdU	1:100	Roche, Mannheim
Ratte anti-BrdU	1:100	Serotec, Düsseldorf
Kaninchen anti-Caspase-3	1:5.000	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt
Maus anti-CNPase	1:500	Chemicon, Hampshire, UK
Maus anti-Cytochrom C	1:1.000	BD, Pharmingen
Huhn anti-GFAP	1:750	Chemicon, Hampshire, UK
Kaninchen anti-GFAP	1:750	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus anti-MAP-2	1:1.000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus anti-Nestin	1:350	BD Transduction Lab., San Jose, USA
Ziege anti-Nestin	1:350	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt
Maus anti-NF200	1:200	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaninchen anti-NG2	1:500	Chemicon, Hampshire, UK
Maus anti-NeuN	1:250	Chemicon, Hampshire, UK
Maus anti-O4	1:200	Chemicon, Hampshire, UK
Kaninchen anti-Oct4	1:100	Santa Cruz, European Support Heidelberg
Ziege anti-Oct4	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Maus anti-PSA-NCAM	1:200	Chemicon, Hampshire, UK
Kaninchen anti-S100 $\beta$	1:250	Swant, Bellinzona, CH
Kaninchen anti-SOX2	1:50	Abcam, Cambridge, UK
Ziege anti-SOX2	1:50	Santa Cruz, European Support Heidelberg

Alle für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Sekundärantikörper stammen aus Esel und wurden über Dianova (Hamburg) bezogen. Sie waren mit Cy2, Cy3 oder Cy5 konjugiert und wurden 1:750 verdünnt eingesetzt.

Für die Immunfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (1:500; Jackson Immuno Research, Suffolk, UK) und ein ABC-Kit (Vector, AXXORA, Grünberg) verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Tierlabor bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Raumtemperatur von 20 °C gehalten. Die relative Luftfeuchte betrug 50 % - 60 %. Futter (Zucht- und Haltungsfutter TEKLAD 2018/2019; Harlan-Winkelmann, Borcheln) und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Das Knochenmark wurde aus juvenilen Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Deutschland) beiderlei Geschlechts gewonnen, sobald ihr Gewicht 80 – 90 g betrug.

### 2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen

Da keinerlei Erfahrung zur Präparation von Knochenmark aus der Ratte vorlag, wurde die Methode zu Beginn etabliert.

Die Gewinnung des Knochenmarks erfolgte aus den Oberschenkelknochen in mehreren unabhängigen Präparationen von jeweils 50 Tieren. Hierfür wurden die Tiere mit dem Narkosemittel Halothan euthanasiert. Anschließend wurden sie in 70%igen Ethanol getaucht, um die Keimzahl zu vermindern. Die Hinterläufe wurden aus den Gelenkpfannen des Beckens gelöst (Abb. 11 A), wobei darauf zu achten war, dass die Oberschenkelknochen intakt blieben. Nach erneutem Reinigen in 70%igem Ethanol und anschließendem Waschen in PBS erfolgte eine Zwischenlagerung der Hinterläufe bis zum Präparationsende in 4 °C-kaltem Alpha-MEM.



**Abb. 11: Präparation des Femurs zur Knochenmarkgewinnung.** (A) Die Hinterläufe der Ratten wurden am Hüftgelenk entfernt. Wichtig war, dass der Knochen bei dieser Prozedur intakt blieb. (B) Unter sterilen Bedingungen wurde der Femur weitestgehend von Gewebe befreit. (C) Die distalen und proximalen Enden der Knochen wurden entfernt, um das Knochenmark auszuspülen.

Unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank der Klasse 2) wurden die Oberschenkelknochen sorgfältig vom umliegenden Gewebe gesäubert (Abb. 11 B). Danach wurden die Enden der Knochen mit einer feinen Schere abgeschnitten (Abb. 11 C). Mittels einer Spritze und aufgesetzter Kanüle (23 G) wurde das Knochenmark mit Standardmedium ausgespült und in sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Suspension aus gepooltem Knochenmark und Standardmedium wurde grob von Knochenresten gereinigt und zentrifugiert ( $500 \times g$ , 4 min). Das Zellpellet wurde in Standardmedium resuspendiert. Mittels einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (23 G) wurden die Zellen weiter dissoziiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in T-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Inkubation aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 92 % relativer Luftfeuchte.

Nach drei Tagen wurden die nicht-adhärennten Zellen zusammen mit dem Medium abgenommen. Die adhärennt wachsenden Knochenmarkstammzellen (KMSZ) wurden in frischem Standardmedium weiterkultiviert, bis der Zellrasen eine 80%ige Konfluenz erreicht hatte.

### **2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung der Knochenmarkstammzellen**

Der Zellrasen aus KMSZ wurde nach Abspülen mit PBS für 2 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Ein anschließendes Abklopfen der Zellkulturflaschen bewirkte das Ablösen der KMSZ vom Untergrund. Die Zellen wurden in Standardmedium mit 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und zu jeweils 1 ml mit 400.000 Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert. In einem Einfriercontainer wurden die Zellen dann langsam auf -80 °C heruntergekühlt.

Die Revitalisierung der KMSZ erfolgte durch ein zügiges Auftauen der Zellsuspension bei 37 °C und anschließendes Verdünnen auf das 10fache Volumen mit Standardmedium. Nach einer Zentrifugation bei  $150 \times g$  für 4 min wurde das Zellpellet in Standardmedium resuspendiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die KMSZ mit einer Zelldichte von 5.000 KMSZ/cm<sup>2</sup> in T-Zellkulturflaschen ausgesät und passagiert, bevor sie konfluent wurden.

### **2.2.4 Beschichtung von Deckgläschen für die Zellkultur**

Um eine mikroskopische Analyse (immunzytochemisch) angefarbter KMSZ zu ermöglichen, wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die in Multiwell-Platten befindlichen Deckgläschen wurden mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) beschichtet und für 30 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach Abnahme der PLL-Lösung erfolgte ein dreimaliges Spülen von jedem Deckgläschen mit 37 °C-warmem PBS. Anschließend wurden die Wells mit Standardmedium befüllt.

## 2.2.5 Induktion der mesodermalen Differenzierung

Die Differenzierung der KMSZ in die drei mesodermalen Zelltypen – Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten – erfolgte durch Inkubation mit verschiedenen Medienkompositionen.

### 2.2.5.1 Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden  $4 \times 10^4$  KMSZ/cm<sup>2</sup> mit Adipozyten-Induktionsmedium für 14 Tage inkubiert. Die charakteristischen Lipidvakuolen wurden dann mit dem Lipidfarbstoff Oil-Red-O rot und die Zellkerne mit Hämatoxylin blau angefärbt (Tab. 5). Die mikroskopische Auswertung erfolgte direkt im Kulturgefäß.

**Tab. 5: Oil-Red-O-Färbung**

Vorgang	Dauer
Induktionsmedium entfernen	-
Lufttrocknung	30 min
10 % eiskaltes Formalin	5 min
3 × spülen mit <i>Aqua dest.</i>	-
Propylenglykol	2 min
Propylenglykol	5 min
0,5 % Oil Red O (60 °C)	8 min
85 % Propylenglykol	2 min
85 % Propylenglykol	5 min
3 × spülen mit <i>Aqua dest.</i>	-
Hämatoxylinlösung	30 s
gründlich spülen mit <i>Aqua dest.</i>	-
Zugabe von <i>Aqua dest.</i>	-

### 2.2.5.2 Osteogene Differenzierung

Zur osteogenen Differenzierung wurden  $5 \times 10^4$  KMSZ/cm<sup>2</sup> in Multiwell-Platten auf PLL-beschichteten Deckgläschen für 4 Wochen in Osteoblasten-Induktionsmedium inkubiert. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Kalkablagerungen in den Osteoblasten wurden anschließend mit einer Von-Kossa-Färbung (Tab. 6) als schwarze Strukturen identifiziert. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate mit Histomount eingedeckelt.

**Tab. 6: Von-Kossa-Färbung**

Vorgang	Dauer
Induktionsmedium entfernen	-
4 % Formalin (4 °C)	15 min
3 × spülen mit <i>Aqua dest.</i>	-
5 % AgNO <sub>3</sub>	60 min
gründlich spülen mit <i>Aqua dest.</i>	-
2 % Natriumthiosulfat	3 min
spülen mit <i>Aqua dest.</i>	3 min
1 % Eosin	3 min
spülen mit Leitungswasser	-
50 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
90 % Ethanol	3 min
100 % Ethanol	3 min
Isopropanol	3 min
Xylol 1	20 s
Xylol 2	3 s
eindeckeln mit Histomount	-

### 2.2.5.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde durch Inkubation mit chondrogenem Medium erreicht. Dabei wurden  $4 \times 10^6$  KMSZ/ml 4 Wochen in einem Zentrifugenröhrchen kultiviert. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Vom entstandenen Zellaggregat wurden am Schlittenmikrotom 20  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt, an denen dann mit einer Toluidinblau-Säurefuchsin-Färbung die typische chondrogene Matrix visualisiert wurde. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate mit Histomount eingedeckelt (Tab. 7).

**Tab. 7: Toluidinblau-Säurefuchsin-Färbung**

Vorgang	Dauer
Pellet in Xylol	10 min
100 % Ethanol	5 min
100 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
50 % Ethanol	5 min
<i>Aqua dest.</i>	5 min
1 % Säurefuchsin	30 s
<i>Aqua dest.</i>	-
<i>Aqua dest.</i>	-
Toluidinblau	1 min
<i>Aqua dest.</i>	30 s
50 % Ethanol	30 s
70 % Ethanol	30 s
90 % Ethanol	30 s
100 % Ethanol	30 s
100 % Ethanol	30 s
Isopropanol	5 min
Xylol 1	20 s
Xylol 2	3 s
eindeckeln mit Histomount	-

### 2.2.6 Induktion von neurosphären-ähnlichen Strukturen

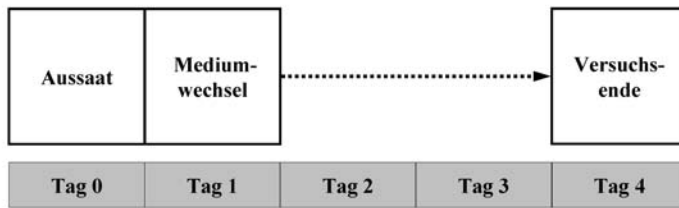
Die Induktion von neurosphären-ähnlichen Strukturen aus KMSZ erfolgte über ein modifiziertes Protokoll nach Hermann und Kollegen (Hermann et al., 2004).

KMSZ der Passagen 3-6 wurden unter Veränderung verschiedener Parameter in Bakterienschalen mit Sphärulen-Basis-Medium ausgesät. Die Parameter Zellzahl, FKS-Anteil, bewegtes oder ruhendes System wurden variiert, bis die optimale Kombination ermittelt war. Die Zellsuspension wurde für mehrere Tage unter Standardbedingungen kultiviert, bis sich neurosphären-ähnliche Strukturen bildeten. Diese wurden dann mit dem Medium abgenommen und in Multiwell-Platten überführt, in denen sich PLL-beschichtete Deckgläschen befanden. Nach einer anschließenden Inkubationsdauer von 24 Stunden, in denen die neurosphären-ähnlichen Strukturen am Untergrund anwuchsen, erfolgte die Fixierung der Kulturen mit 4 % PFA.

### 2.2.7 Serumdeprivation

Revitalisierte KMSZ wurden mit verschiedenen Zelldichten (1.600 – 6.100 KMSZ/cm<sup>2</sup>) auf PLL-beschichteten Deckgläschen in Multiwell-Platten ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde das Standardmedium durch frisches ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 72 Stunden wurden die Zellen der Gruppe A („Basal“) mit PFA fixiert (Abb. 13 A), um den immunzytochemischen Phänotyp der KMSZ unter Basalbedingungen zu ermitteln. Das Standardmedium der Gruppe B („-FKS“) wurde durch serumfreies Standardmedium ersetzt. In diesem fand die Kultivierung der Zellen für weitere 72 Stunden statt, bevor sie mit PFA fixiert wurden (Abb. 13 B). Um die Proliferation der KMSZ während der serumfreien Phase zu ermitteln, wurden dem serumfreien Standardmedium einer weiteren Gruppe C („-FKS +BrdU“) 10 µM BrdU zugesetzt (Abb. 13 C). Eine basale Langzeitkultivierung wurde durch Austausch des Mediums an Tag 4 gegen frisches Standardmedium realisiert (Abb. 13 D).



**A** Basale Kultivierung**B** Serumdeprivation**C** BrdU-Inkorporation während Serumdeprivation**D** Basale Langzeitkultivierung

**Abb. 13: Schematische Darstellung der experimentellen Ansätze.** **(A)** Basale Kultivierung: Einen Tag nach Aussaat der KMSZ wurde das Medium gegen frisches Standardmedium gewechselt. Drei Tage später erreichte die KMSZ-Kultur Konfluenz und wurde fixiert. Die Zellen dieser Gruppe wurden als basale KMSZ bezeichnet. **(B)** Serumdeprivierte KMSZ erhielt man, wenn man der konfluenten Kultur an Versuchstag 4 das Serum entzog (-FKS). Dies wurde durch einen Austausch des Standardmediums gegen serumfreies Standardmedium realisiert. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen drei Tage kultiviert und an Versuchstag 7 fixiert. **(C)** Die Zugabe von BrdU ins serumfreie Standardmedium ermöglichte die Identifizierung proliferierender Zellen während der serumfreien Kultivierungsphase. **(D)** Der Austausch des Standardmediums gegen frisches Standardmedium an Versuchstag 4 stellte die basale Langzeitkultivierung dar. Mit ihrer Hilfe konnte die Entwicklung der konfluenten KMSZ-Kultur ohne Serumentzug an Tag 4 untersucht werden.

### 2.2.8 Apoptoseinduktion

KMSZ auf PLL-beschichteten Deckgläschen wurden in Standardmedium mit einem Zusatz von 2  $\mu$ M Staurosporin für 180 min inkubiert und anschließend mit PFA fixiert.

### 2.2.9 Induktion von chemischem Stress

Wie Lu und Kollegen (Lu et al., 2004) sowie Neuhuber und Kollegen (Neuhuber et al., 2004) zeigten, waren die in früheren Studien (Woodbury et al., 2000; Woodbury et al., 2002) beobachteten rapiden Differenzierungsprozesse von KMSZ in neuronale Zellen artifiziell und beruhten auf der Toxizität der dem Kulturmedium supplementierten Chemikalien. Der resultierende „chemische Stress“ hatte durch Zellschrumpfung und Änderungen im Zytoskelett Zellen mit neuron-ähnlicher Morphologie zur Folge. Der Schwerpunkt der Studien (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004) lag dabei auf der Auswertung von Morphologie und Immunphänotyp der getesteten Zelltypen. In der vorliegenden Arbeit wurden KMSZ ausgewählten Stressoren exponiert und ihre angefärbten Nuklei anschließend mit denen serumdeprivierter KMSZ verglichen. Dieses sollte eine Aussage über mögliche stressbedingte Auswirkungen des Serumentzuges ermöglichen.

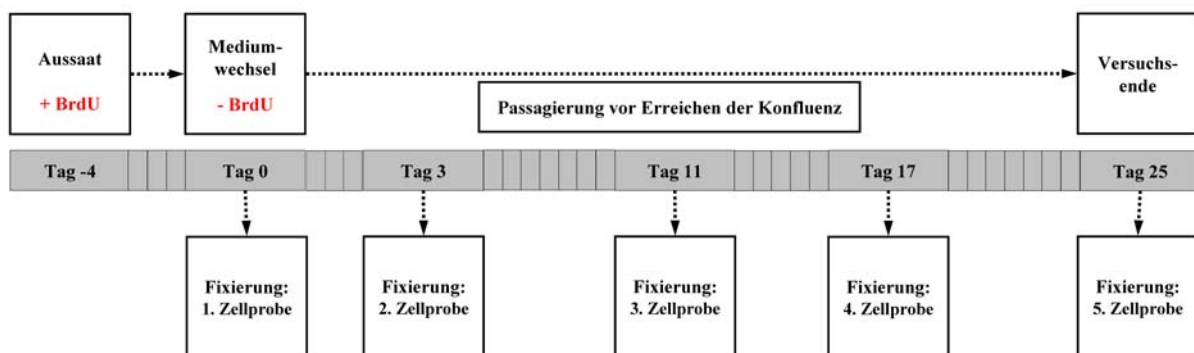
Zur Induktion chemischen Stresses wurden konfluente KMSZ-Kulturen auf PLL-beschichteten Deckgläschen in den in Tab. 8 aufgeführten Medienkompositionen inkubiert. Nach der PFA-Fixierung am Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Zellkerne mit Propidiumjodid (PI) angefärbt.

**Tab. 8: Medienkompositionen zur Induktion chemischen Stresses**

Medienzusammensetzung	Inkubationsdauer
Alpha-MEM/0,6 N HCl	30 min
Alpha-MEM/2 %DMSO	150 min
Alpha-MEM/0,05 % Tween20	150 min
Alpha-MEM/230 mM NaCl	180 min

### 2.2.10 BrdU-Inkorporations-Assay

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität einer Bromdesoxyuridin (BrdU)-Markierung von KMSZ wurden revitalisierte KMSZ der Passage 2 in Multiwell-Platten mit beschichteten Deckgläschen ausgesät (5.000 KMSZ/cm<sup>2</sup>). Dem Standardmedium wurden verschiedene Konzentrationen BrdU (0,5 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM) zugegeben. Nach 96 Stunden wurde das BrdU-haltige Medium entnommen, jedes Well einmal mit PBS gewaschen und mit BrdU-freiem Standardmedium befüllt. Zu definierten Zeitpunkten nach Entfernung des BrdU (Abb. 12) wurden Proben der Zellen mit 4 % PFA fixiert und immunzytochemisch gegen BrdU gefärbt. Im Verlauf der vierwöchigen Kultivierung wurden die Zellen passagiert, bevor sie die Konfluenz erreichten.



**Abb. 12: Schematische Darstellung des BrdU-Inkorporations-Assays.** Initial wurden KMSZ für vier Tage mit BrdU-haltigem Medium inkubiert. Innerhalb der folgenden vier Wochen wurden in definierten Abständen Proben der Zellen fixiert und immunzytochemisch gegen BrdU gefärbt.

## 2.2.11 Immunzytochemie

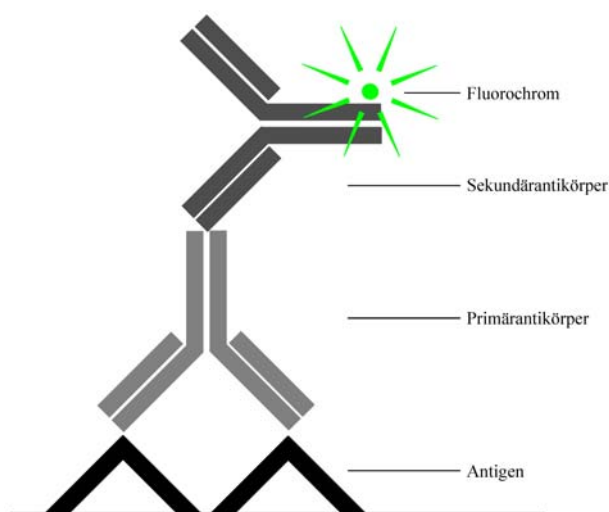
Der Vorteil immunzytochemischer Färbungen besteht in der Möglichkeit, neben dem Nachweis eines Markerproteins die Zellen auch morphologisch zu beurteilen, welche das jeweilige Protein exprimieren. Dies ist bei Differenzierungsvorgängen von entscheidender Bedeutung.

### 2.2.11.1 Immunfärbung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern

Zur immunzytochemischen Charakterisierung der KMSZ wurde die indirekte Methode (Abb. 14) angewandt. Die PFA-fixierten Kulturen wurden nach drei Waschschritten ( $3 \times 5$  min in PBS) in PBS/0,5 % Triton X-100 (v/v) permeabilisiert. Dieser Schritt erfolgte, um die Permeation der gegen intrazelluläre Antigene gerichteten Antikörper zu erleichtern. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden in 10 % Eselserum in PBS/0,5 % Triton X-100 geblockt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in PBS/0,5 % Triton X-100. Die verwendeten Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen sind in Tab. 4. (S. 28) aufgeführt.

Nach drei weiteren Waschschritten ( $3 \times 5$  min in PBS) am nächsten Tag wurden die KMSZ mit den in PBS verdünnten Sekundärantikörpern inkubiert (2 h, RT). Es wurden ausschließlich Cy2-, Cy3- und Cy5-konjugierte Sekundärantikörper aus Esel verwendet. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen ( $3 \times 5$  min in PBS). Die Zellkerne wurden durch zehnmünütige Inkubation mit den DNS-Markern DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol,dihydrochlorid; 1:10.000 in PBS) bzw. PI (1:300 in PBS) gegengefärbt. Nach erneutem Waschen ( $3 \times 5$  min in PBS) wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert und mit dem Einbettmedium DPX auf Objektträgern eingedeckelt.

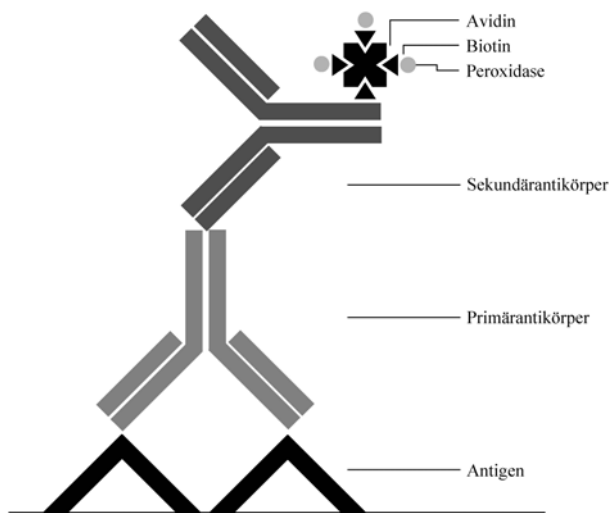
Um mögliche unspezifische Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers mit den zu untersuchenden Zellen auszuschließen, wurden in Kontrollfärbungen jeweils die Primärantikörper weggelassen.



**Abb. 14: Prinzip der indirekten Immunzytochemie.** Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen. Ein zweiter Antikörper, der Sekundärantikörper, bindet spezifisch an den Primärantikörper und lässt sich anhand des konjugierten Fluorochroms detektieren.

### 2.2.11.2 Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Methode

Die Zellen wurden mit der Avidin-Biotin-Methode (Abb. 15) gegen Caspase-3 gefärbt. Dafür wurden die PFA-fixierten Kulturen dreimal in TBS gewaschen und anschließend in TBS/1 % Triton X-100/10 % (v/v) FKS für 30 Minuten geblockt. Die Primärantikörper (Kaninchen anti-Caspase-3) wurde 1:5.000 in TBS/1 % Triton X-100/10 % FKS verdünnt und bei 4 °C für 48 Stunden inkubiert. Nach drei Waschstschritten ( $3 \times 5$  min in TBS) wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper 1 Stunde mit den Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Kulturen mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 1 Stunde. DAB wurde als Chromogen benutzt. Abschließend erfolgte eine Entwässerung der Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) und die Eindeckelung mit Histomount auf Objektträgern.



**Abb. 15: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode.** Der Sekundärantikörper ist, anstatt mit einem Fluorochrom, mit Biotin konjugiert. Der zugegebene Avidin-Biotin-Komplex ist mit dem Enzym Peroxidase konjugiert und bindet über eine freie Stelle an dem Biotin des Sekundärantikörpers. Das Antigen wird durch Zugabe eines geeigneten Chromogens (DAB) sichtbar gemacht, indem die Peroxidase das Chromogen in ein farbiges Produkt umsetzt.

### 2.2.11.3 Anti-Bromdesoxyuridin-Färbung

Die anti-BrdU-Färbung erfolgte ebenfalls mit der indirekten Methode. Für die Durchführung ist eine Vorbehandlung nötig, um die DNS zu denaturieren und so die Freilegung des darin eingebauten Antigens (BrdU) zu ermöglichen. Hierzu wurden die PFA-fixierten KMSZ in 2 N HCl bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach drei Waschstschritten ( $3 \times 5$  min in PBS) wurde wie unter 2.2.11.1 beschrieben weiter verfahren. Als Primärantikörper wurden Maus anti-BrdU bzw. Ratte anti-BrdU verwendet.

### 2.2.12 RNS-Extraktion und qRT-PCR-Analyse

Die RNS wurde von basalen und serumdeprivierten KMSZ unter Verwendung des „SV Total RNA Isolation System“ (Promega, Deutschland) isoliert. Mittels des „QuantiTect Reverse Transcription Kits“ (Qiagen, Deutschland) wurden aus jeweils 1 µg Total-RNS die cDNS synthetisiert.

Die qRT-PCR wurde mit dem “QuantiFast Sybr Green PCR Kit” (Qiagen, Deutschland) mit *Templates* von 20 ng cDNS durchgeführt. Die in der Arbeit verwendeten *Primer* aus den „QuantiTect Primer Assays“ (Qiagen, Deutschland) hatten die folgenden Katalognummern:

c-myc:	Rn_Myc_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00187201;
klf4:	Rn_Klf4_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00180285;
Oct4:	Mm_Pou5f1_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00109186;
SOX2:	Rn_RGD1565646_predicted_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00544649;
Nestin:	Rn_Nes_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00376922;
GFAP:	Rn_Gfap_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00195517;
S100β:	Rn_S100b_1_SG QuantiTect Primer Assay, QT00184744.

Alle Reaktionsschritte erfolgten entsprechend den Protokollen der verwendeten Kits. Die qRT-PCR-Reaktionen wurden an einem „ABI 9800 Thermal Cycler“ (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte pro ng cDNS.

### 2.2.13 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Zellen erfolgten im Labor von Prof. Volkmar Leßmann unter der Betreuung durch Dr. Thomas Munsch im Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke-Universität (Magdeburg).

Die Messungen wurden mit der *Whole-Cell*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Methode durchgeführt. Die *Patch-Clamp*-Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (GC 150TF-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK) mit einem Vertikal-Ziehgerät (L/M-3P-A, List medical, Darmstadt, Deutschland) gezogen. Ihr Widerstand betrug nach Befüllung mit der intrazellulären Lösung 1,5 – 2,5 MΩ. Die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösungen sind in Tab. 9 und Tab. 10 aufgeführt und orientierten sich an einer Publikation von Heubach und Kollegen (Heubach et al., 2004).

**Tab. 9: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (pH = 7,3)**

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	8
KCl	40
Kaliumaspartat	100
Tris-GTP	0,1
Mg-ATP	5
CaCl <sub>2</sub>	2
EGTA	5
KOH zur pH-Einstellung	-

**Tab. 10: Zusammensetzung der extrazellulären Lösung (pH = 7,4)**

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	150
KCl	5,4
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	2
Glukose	11
HEPES	10
NaOH zur pH-Einstellung	-

Die Deckgläschen mit den darauf befindlichen KMSZ wurden in der Messkammer eines aufrechten Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) platziert und kontinuierlich mit der 32 °C-warmen und CO<sub>2</sub>-begasten extrazellulären Lösung (Badlösung) durchspült. Unter visueller Kontrolle mittels Infrarot-Videomikroskopie wurde die *Patch*-Pipette an die einzelnen KMSZ gefahren. Um stabile Aufnahmebedingungen zu erreichen, wurden die Aufnahmen 5 min nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration gestartet.

Die Membranströme wurden mit einem EPC-9 Verstärker unter Verwendung von Pulse-Software aufgenommen (v.8.01; HEKA, Lamprecht, Deutschland). Zur Messung der Ströme wurde die Spannung in Stufen von 10 mV von -100 mV bis +100 mV und einer Dauer von 250 ms gemessen. Dies wurde bei Haltepotenzialen von -60 mV und -20 mV durchgeführt.

## 2.2.14 Auswertung

### 2.2.14.1 Mikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse und Bildgebung erfolgte an einem Axiovert 200 mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRc5; Carl Zeiss, Germany) und Zeiss-Software (AxioVs40 v4.2; Zeiss, Deutschland). Die folgenden Objektive wurden verwendet: 5× A-Plan (NA 0,12, Ph0), 10× A-Plan (NA 0,25, Ph1), 32× LD-A-Plan (NA 0,40, Ph1), 40× Plan-Neofluar (NA 1,3, Öl) (alle Zeiss, Deutschland).

Die Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop-System (LSM 5 Pascal Exciter mit zugehöriger Software LSM 5 Pascal v4.0; Zeiss, Deutschland) unter Verwendung der folgenden Objektive: 10× EC Plan-Neofluar (NA 0,3), 20× Plan-Apochromat (NA 0,8), 40× EC Plan-Neofluar (NA 1,3, Öl), 63× Plan-Apochromat (NA 1,4, Öl). Das LSM 5 Pascal Exciter verfügte über 3 Laser (Argon  $\lambda_{Em} = 450 - 530$  nm, Helium/Neon  $\lambda_{Em} = 543$  nm, Helium/Neon  $\lambda_{Em} = 633$  nm) sowie eine Diode ( $\lambda_{Em} = 405$  nm) zur Anregung der Fluorochrome. Zur Vermeidung des sog. „crosstalks“ (Überlappung der Kanäle) wurden die Präparate im *Multitracking*-Verfahren gescannt.

### 2.2.14.2 Time-Lapse-Mikroskopie

Die Analyse der Proliferation der KMSZ wurde mittels *Time-Lapse*-Phasenkontrastmikroskopie an einem Axiovert 200M durchgeführt. Das Mikroskop verfügte über eine CO<sub>2</sub>- (CTI-Controller 3700 digital; Zeiss, Germany) und temperaturgeregelte (Tempcontrol 37-2 digital; Zeiss, Deutschland) Inkubationskammer. Die Bilder wurden unter Verwendung von Zeiss-Software (AxioVs40 v4.5; Zeiss, Deutschland) in Intervallen von 2,5 – 5 min mit einem 10× Plan-Neofluar-Objektiv (NA 0,3, Ph1; Zeiss, Deutschland) und einer CCD-Kamera (AxioCam MRm; Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Die KMSZ wurden während der *Time-Lapse*-Mikroskopie in Multiwell-Platten (Falcon, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu 43 Stunden kultiviert. Die relativen Zeiten sind in den Abbildungen im Format „Stunde:Minute:Sekunde“ dargestellt.

### 2.2.14.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die KMSZ wurden nach einem Waschschrift über Nacht in 0,5 % Glutaraldehyd bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 75 %, 87,5 %, 94 %, 100 %) entwässert und in einem Kritisch-Punkt-Trockner getrocknet. Nachdem sie mit Gold bedampft wurden, erfolgte die Analyse in einem Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 940 bei 4 kV.



#### **2.2.14.4 Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Zellen**

Von mehreren unabhängigen Experimenten wurden mit einem 40× Plan-Neofluar –Objektiv (NA 1,3, Öl) randomisiert ausgewählte, nicht überlappende mikroskopische Felder aufgenommen. In diesen wurden die positiv immunmarkierten Zellen ausgezählt und, auf Basis der DAPI- bzw. PI-markierten Zellkerne, auf die Gesamtzellzahl bezogen. Je quantifizierten Marker wurden 300 – 4.000 Zellen ausgezählt.

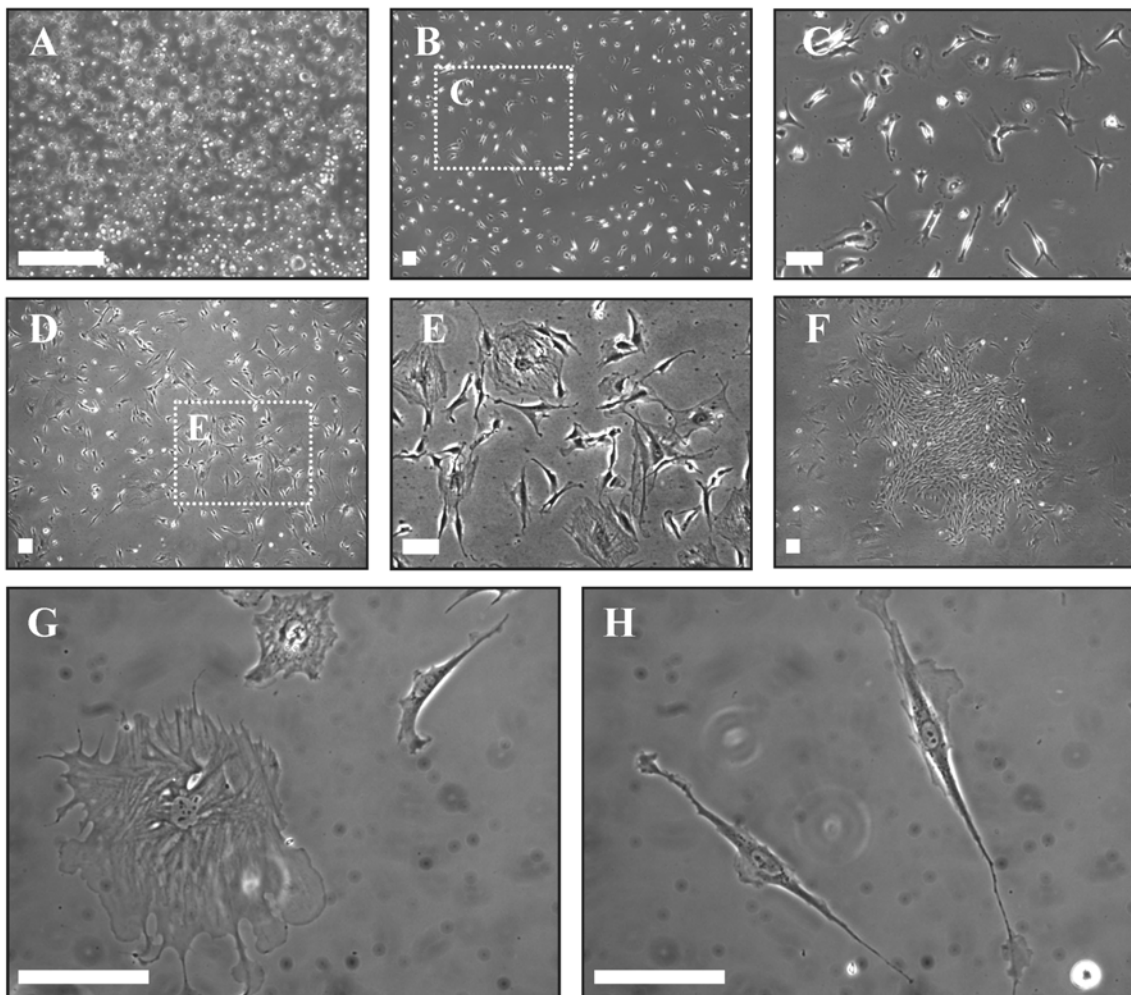
#### **2.2.14.5 Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaStat (v.3.1; Systat Software, San Jose, USA). Die Überprüfung auf Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde eine Kruskal-Wallis One Way ANOVA mit anschließendem Tukey's-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn  $P < 0,05$  war. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Kultivierung und funktionelle Charakterisierung von Knochenmarkstammzellen

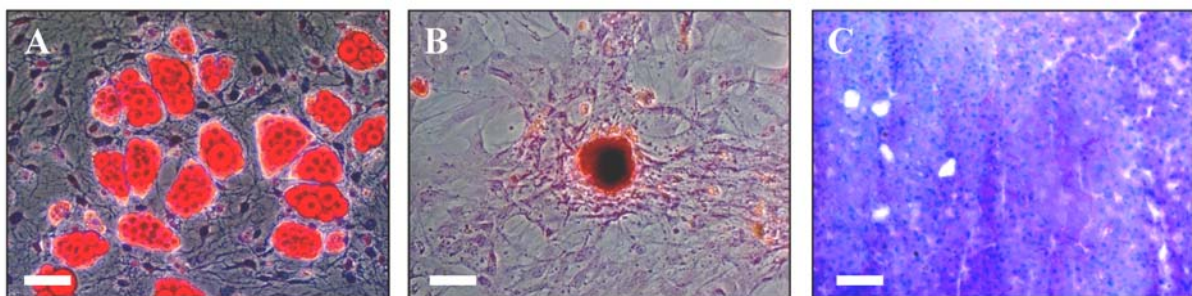
Zur Gewinnung von Knochenmarkstammzellen (KMSZ) wurde das dissoziierte Knochenmark von Ratten in unbehandelten Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert (Abb. 16 A). Aufgrund ihrer selektiven Adhärenz am Untergrund (Abb. 16 B+C) konnten die KMSZ nach drei Tagen durch Entfernen des Mediums und mehrfaches Waschen von den übrigen Zellen des Knochenmarks getrennt werden. Die KMSZ-Kulturen wiesen die zwei charakteristischen Zelltypen auf: Große, abgeflachte KMSZ sowie kleinere, spindelförmige KMSZ (Abb. 16 D+E). Während der anschließenden Inkubation proliferierten die Zellen in charakteristischen koloniebildenden Einheiten (*colony-forming-units*, CFU) (Abb. 16 F).



**Abb. 16: Isolierung von KMSZ aus dem Knochenmark.** (A) Frisch ausgesätes, dissoziiertes Knochenmark der Ratte. (B) KMSZ-Kultur nach dem Entfernen der übrigen zellulären Knochenmarkbestandteile durch Waschen an Tag 4. Die KMSZ sind in geringer Dichte auf der Zellkulturoberfläche angewachsen. (C) Vergrößerung aus B. (D) KMSZ-Kultur wenige Tage nach dem Waschen. (E) Vergrößerung aus D. (F) Die KMSZ vermehren sich in koloniebildenden Einheiten. (G) KMSZ treten als große flächige Zellen oder als (H) fibroblastenähnliche, spindelförmige Zellen auf. (Maßstab 100 µm)

Nach 7-10 Tagen wurden die Zellen abgelöst und kryokonserviert. So wurde gewährleistet, dass für alle folgenden Experimente Zellen eines weitestgehend gleichen Stadiums zur Verfügung standen. Vor der Kryokonservierung durchgeführte Zellzählungen zeigten, dass lediglich 0,5 % ( $n = 5$ ) der ursprünglich ausgesäten Knochenmarkszellen KMSZ waren. Zog man die Proliferation während der mehrtägigen Kultivierung zuvor mit in Betracht, entsprach das den in der Literatur beschriebenen Angaben über den KMSZ-Anteil am Knochenmark (Pittenger et al., 1999).

Ein weiteres Kriterium von KMSZ ist ihre Differenzierbarkeit in die Zelltypen des Mesoderms. Unter Verwendung etablierter Protokolle ließen sich die isolierten KMSZ in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren. Die 14tägige Inkubation in Adipozyten-Induktionsmedium führte zur Bildung von Vakuolen, die sich mit dem Lipidfarbstoff Oil Red O anfärben ließen (Abb. 17 A). Wurden die KMSZ in Osteoblasten-Induktionsmedium kultiviert, ließen sich nach 4 Wochen Kalkablagerungen nachweisen (Abb. 17 B). Die Differenzierung zu Chondrozyten konnte nach einer vierwöchigen Inkubation in entsprechendem Induktionsmedium ebenfalls erfolgreich nachgewiesen werden. Das Zellpellet, das sich aufgrund der Kultivierung in einem Zentrifugenröhrchen gebildet hatte, wies die für Chondrozyten charakteristische Matrix auf (Abb. 17 C).

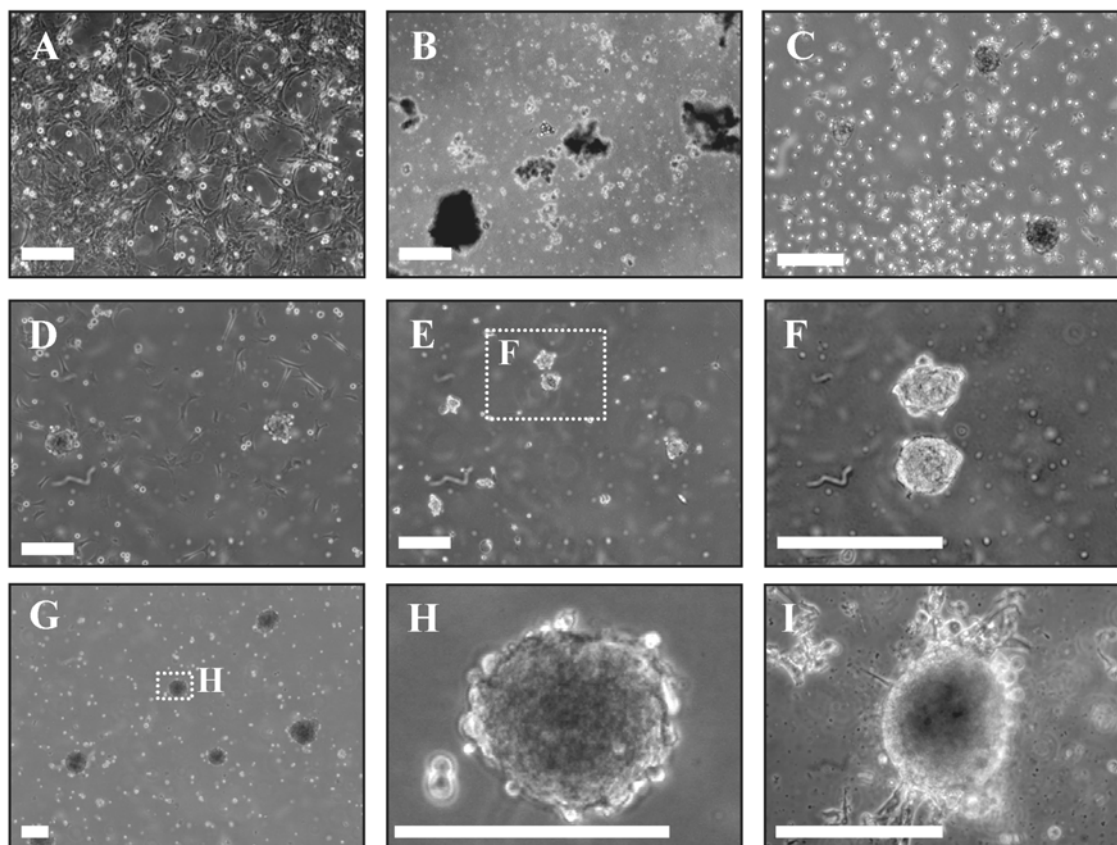


**Abb. 17: Funktionelle Charakterisierung der KMSZ.** Die Inkubation in entsprechenden Induktionsmedien resultierte in der Differenzierung der KMSZ in (A) Adipozyten, (B) Osteoblasten und (C) Chondrozyten. (Maßstab 100  $\mu\text{m}$ )

### 3.2 Induktion der Sphärulbildung

Die Isolierung und Vermehrung neuraler Stammzellen (NSZ) erfolgt über die Kultivierung in EGF- und FGF-haltigem Medium (Cattaneo and McKay, 1990; Reynolds and Weiss, 1992; Storch et al., 2001; Vescovi et al., 1993). Die NSZ vermehren sich dabei in frei schwimmenden Zellaggregaten, den sog. Neurosphären. Hermann und Kollegen (Hermann et al., 2004) gelang es erstmals, die etablierten Protokolle erfolgreich auf humane KMSZ anzuwenden. Die Zellen wurden auf diese Weise in NSZ konvertiert und vermehrten sich in charakteristischen, neurosphären-ähnlichen Strukturen. Eine anschließende Inkubation mit ausgewählten Wachstumsfaktoren führte zur Ausdifferenzierung in Zellen mit neuronalem bzw. glialem Phänotyp.

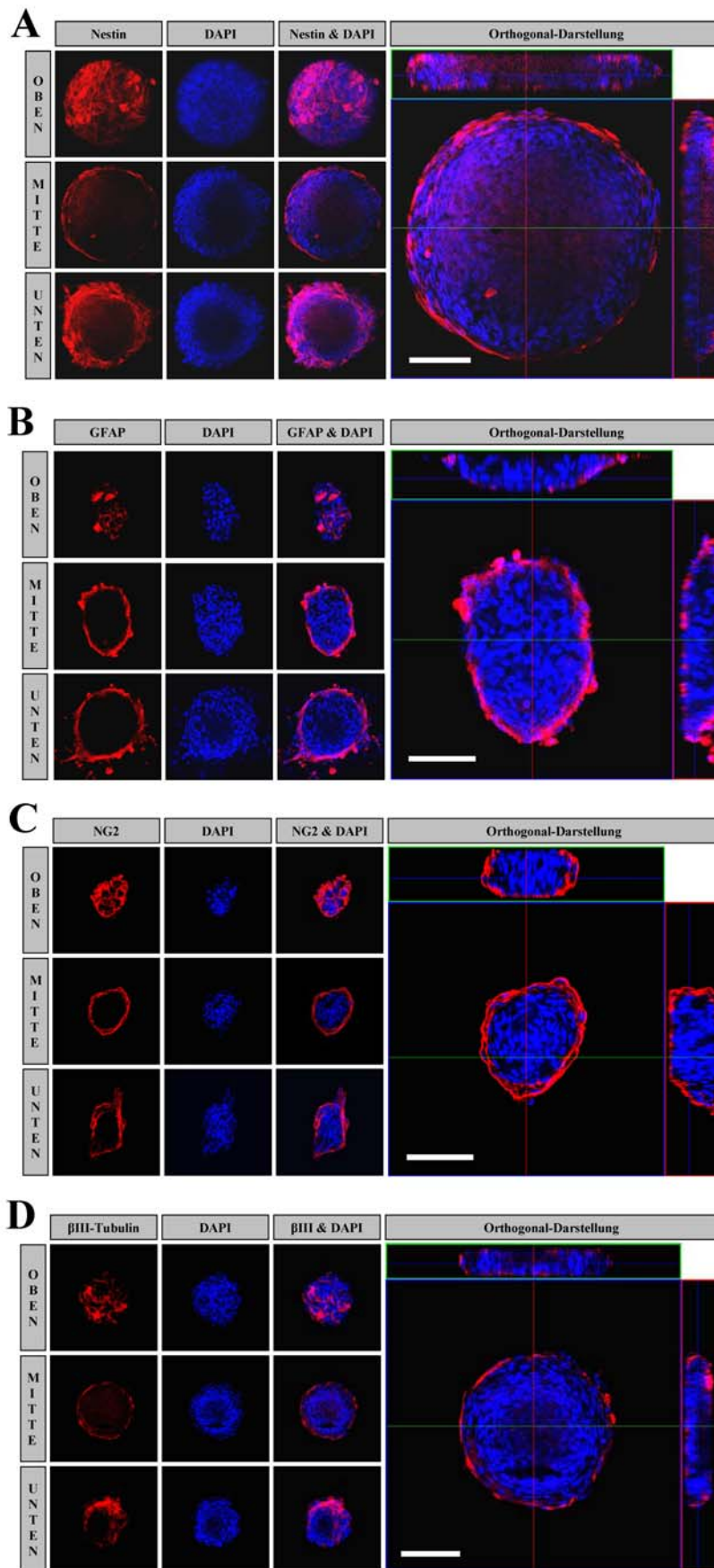
Für die Generierung von neurosphären-ähnlichen Strukturen aus Ratten-KMSZ wurden in der vorliegenden Arbeit zu Beginn  $5 \times 10^6$  KMSZ in Bakterienchalen ausgesät. Als Medium wurde Alpha-MEM mit jeweils 20 ng/ml EGF und bFGF verwendet. Nach 24stündiger Inkubation hatten sich trotz gering adhäsiver Oberfläche fast alle Zellen am Untergrund abgesetzt und bildeten einen Zellrasen (Abb. 18 A). Ein sanftes Schwenken der Kulturgefäße verhinderte ein Absetzen von Zellen, die sich so aber vorrangig zu Zellclustern zusammenlagerten (Abb. 18 B). Durch Zugabe von 10 % FKS konnte die Clusterbildung reduziert werden und es wurde erreicht, dass sich trotz großer Mengen abgesetzter Zellen einige Sphärulen bildeten, die auch nach einer Passagierung weiterhin im Medium schwammen (Abb. 18 C). Die Anzahl sich absetzender Zellen konnte durch Verringerung der eingesetzten KMSZ auf  $5 \times 10^5$  Zellen deutlich reduziert werden (Abb. 18 D). Unter diesen Bedingungen ließen sich die Sphärulen bis zu 22 DIV kultivieren (Abb. 18 E+F). Die Kultivierung von  $1 \times 10^6$  KMSZ in Sphärulen-Basis-Medium mit 10 % FKS und sanftem Schwenken des Kulturgefäßes zeigte schließlich den besten Effekt (Abb. 18 G+H). Nach dem Transfer auf PLL-beschichtete Deckgläschen adhärten die Sphärulen innerhalb von 24 Stunden. Durch auswachsende Zellen im Kontaktbereich mit dem Untergrund bildeten die Sphärulen dabei eine Art Sockel (Abb. 18 I).



**Abb. 18: Generierung von Sphärulen.** (A) KMSZ, die sich in serumfreien Sphärulenmedium abgesetzt haben. (B) Durch sachttes Schwenken wurde das Absetzen der Zellen verringert, ein Verklumpen jedoch gefördert. (C) Sphärulen in serumhaltigem Sphärulenmedium nach Passagierung in eine neue Kulturschale. (D) Die Verringerung der Zellzahl erhöhte die Ausbeute an Sphärulen. (E) Sphärulen an Tag 22 nach Induktion. (F) Vergrößerung aus E. (G) Die Kombination aus einer geringeren Zellzahl, einem Anteil von FKS und sanftem Schwenken erbrachte die besten Ergebnisse bei der Generierung von Sphärulen aus KMSZ. (H) Vergrößerung aus G. (I) 24 Stunden nach Transfer der Sphärulen auf beschichtete Deckgläschen. (Maßstab 200  $\mu\text{m}$ )

### 3.3 Neuroektodermale Marker in Sphärulen

Die Sphärulen wiesen immunreaktive Zellen der drei neuroektodermalen Hauptzelltypen auf. Durch Anfertigung optischer Schnitte mit dem konfokalen Laserscanmikroskop durch die Sphärulen (sog. *Z-Stacks*) stellte sich heraus, dass vorrangig die Zellen in den Randbereichen positiv für die getesteten Marker waren. Sie exprimierten den neuroepithelialen Stammzellmarker Nestin (Abb. 19 A), den Astrozytenmarker GFAP (Abb. 19 B), den Oligodendrozytenmarker NG2 (Abb. 19 C) sowie den frühen Neuronenmarker  $\beta$ III-Tubulin (Abb. 19 D).

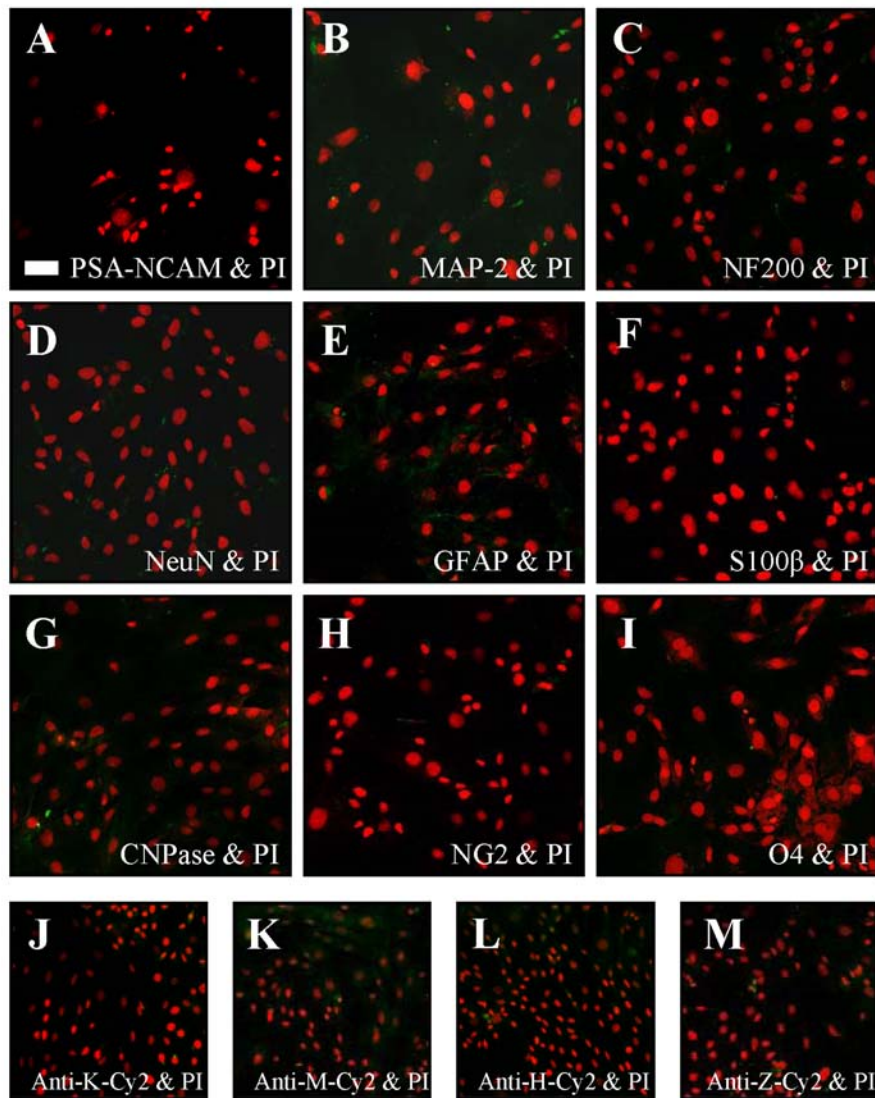


**Abb. 19: Immunocytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine.** In den Sphärulen ließen sich (A) Nestin-, (B) GFAP-, (C) NG2- sowie (D) βIII-Tubulin-positive Zellen (rot) nachweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

### 3.4 Neuroektodermale Marker in basalen Knochenmarkstammzellen

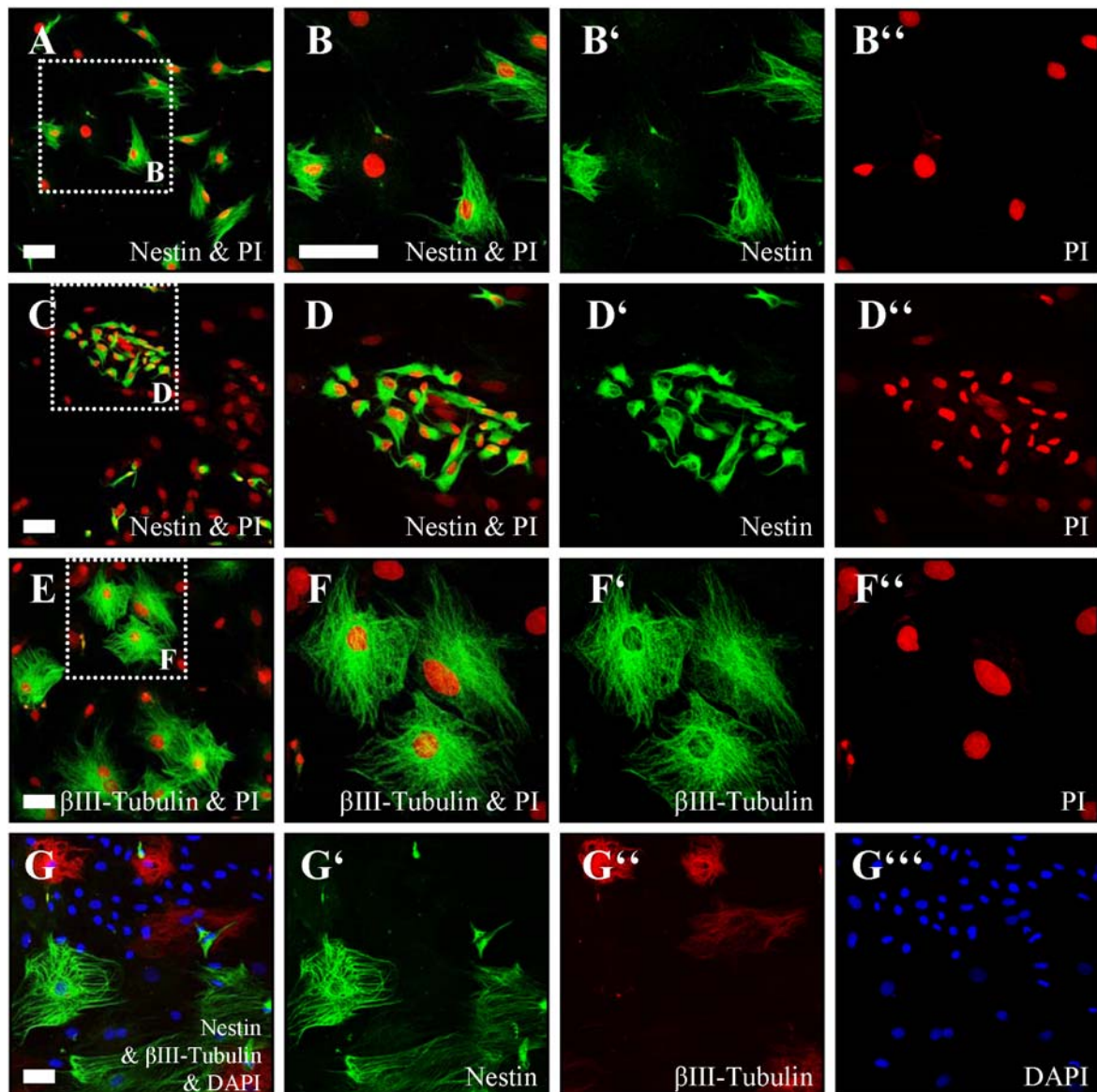
Vor Beginn der Versuche musste eine geeignete Zelldichte ermittelt werden. Diese betrug 4.500 KMSZ/cm<sup>2</sup> und wurde, sofern nicht anders beschrieben, in allen Versuchen verwendet.

Die an Tag 0 ausgesäten KMSZ sanken innerhalb der ersten 24 Stunden des Versuchsprotokolls ab und adhärten am Untergrund. Zelltrümmer und Zellen, die in dieser Zeit nicht anwuchsen, wurden an Tag 1 mit einem Mediumwechsel entfernt. In den folgenden 3 Tagen proliferierten die KMSZ zu einem konfluenten Zellrasen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die KMSZ mittels immunzytochemischer Färbungen auf die Expression von Markerproteinen der drei neuroektodermalen Zelltypen (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) untersucht. Die KMSZ exprimierten keine der getesteten astroglialen (GFAP: Abb. 20 E; S100 $\beta$ : Abb. 20 F) oder oligodendroglialen (CNPase: Abb. 20 G; NG2: Abb. 20 H; O4: Abb. 20 I) Proteine. Mit Ausnahme von Nestin, einem neuroepithelialen Stammzellmarker, und  $\beta$ III-Tubulin, einem neuronenspezifischen Marker, konnte keine weitere Expression neuronaler Proteine (PSA-NCAM: Abb. 20 A; MAP-2: Abb. 20 B; NF-200: Abb. 20 C; NeuN: Abb. 20 D) detektiert werden. Auffällig war die Existenz von zwei verschiedenen Expressionsmustern des Nestins. So konnten Nestin-positive Zellen nachgewiesen werden, die über eine flächige, für neurale Stammzellen untypische Morphologie verfügten (Abb. 21 A+B). Diese Zellen bekamen aufgrund ihrer Lokalisation *innerhalb* des Zellrasens die Bezeichnung „I-KMSZ“. Außerdem waren Nestin-positive Zellen *auf* dem Zellrasen (Abb. 21 C+D), und daher als „A-KMSZ“ bezeichnet, erkennbar. Diese verfügten über kleinere Zellkerne ( $10,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ,  $n=161$ , Abb. 26) als die Zellen des Zellrasens ( $20,7 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ,  $n=101$ , Abb. 26). Die  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen (Abb. 21 E+F) waren aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb des Zellrasens und ihren flächigen Somata mit den Nestin-positiven Zellen der I-KMSZ vergleichbar. Eine Ko-Lokalisation beider Marker konnte durch Doppelfärbungen ausgeschlossen werden (Abb. 21 G).



**Abb. 20: Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine in basalen KMSZ.** Eine Expression verschiedener Markerproteine auf Proteinebene ließ sich immunzytochemisch nicht nachweisen. Die Zellen waren negativ für (A) PSA-NCAM, (B) MAP-2, (C) NF-200, (D) NeuN, (E) GFAP, (F) S100 $\beta$ , (G) CNPase, (H) NG2 und (I) O4 (jeweils mit Cy2 gefärbt). (J-M) Kontrollfärbungen mit den verwendeten Sekundärantikörpern (anti-Kaninchen-, anti-Maus-, anti-Huhn-, anti-Ziege-Cy2). Die Zellkerne wurden mit PI (rot) gegengefärbt. (Maßstab 50  $\mu$ m)

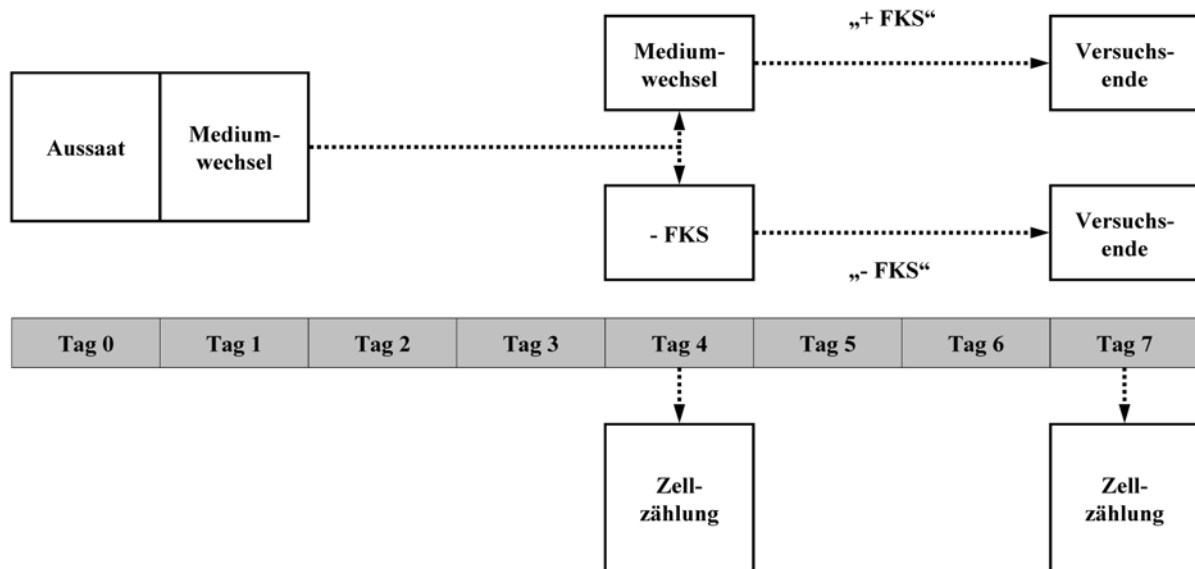




**Abb. 21: Expression von Nestin und  $\beta$ III-Tubulin in basalen KMSZ.** Einige KMSZ exprimieren bereits unter Standardkulturbedingungen (= basal) Nestin (A-D) bzw.  $\beta$ III-Tubulin (E, Vergrößerung in F). Die Nestin-positiven Zellen erscheinen in zwei Morphologien: als große, flache Zellen direkt auf der Oberfläche des Zellkulturgefäßes und so als Bestandteil des Zellrasens (A, Vergrößerung in B) sowie als kleine Zellen, die sich auf dem Zellrasen befanden und von uns als A-KMSZ bezeichnet wurden (C, Vergrößerung in D). Die  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen treten nur als große, flächige Zellen innerhalb des Zellrasens auf. (G) Eine Ko-Expression beider Marker in einzelnen KMSZ konnte nicht detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit PI (A-F) bzw. DAPI (G) gegengefärbt. (Maßstab 50  $\mu$ m)

### 3.5 Einfluss des Serumentzuges auf die Zellzahl

Der Einfluss eines Serumentzuges auf die Entwicklung der Zellzahl wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsprotokolls bestimmt (Abb. 22)



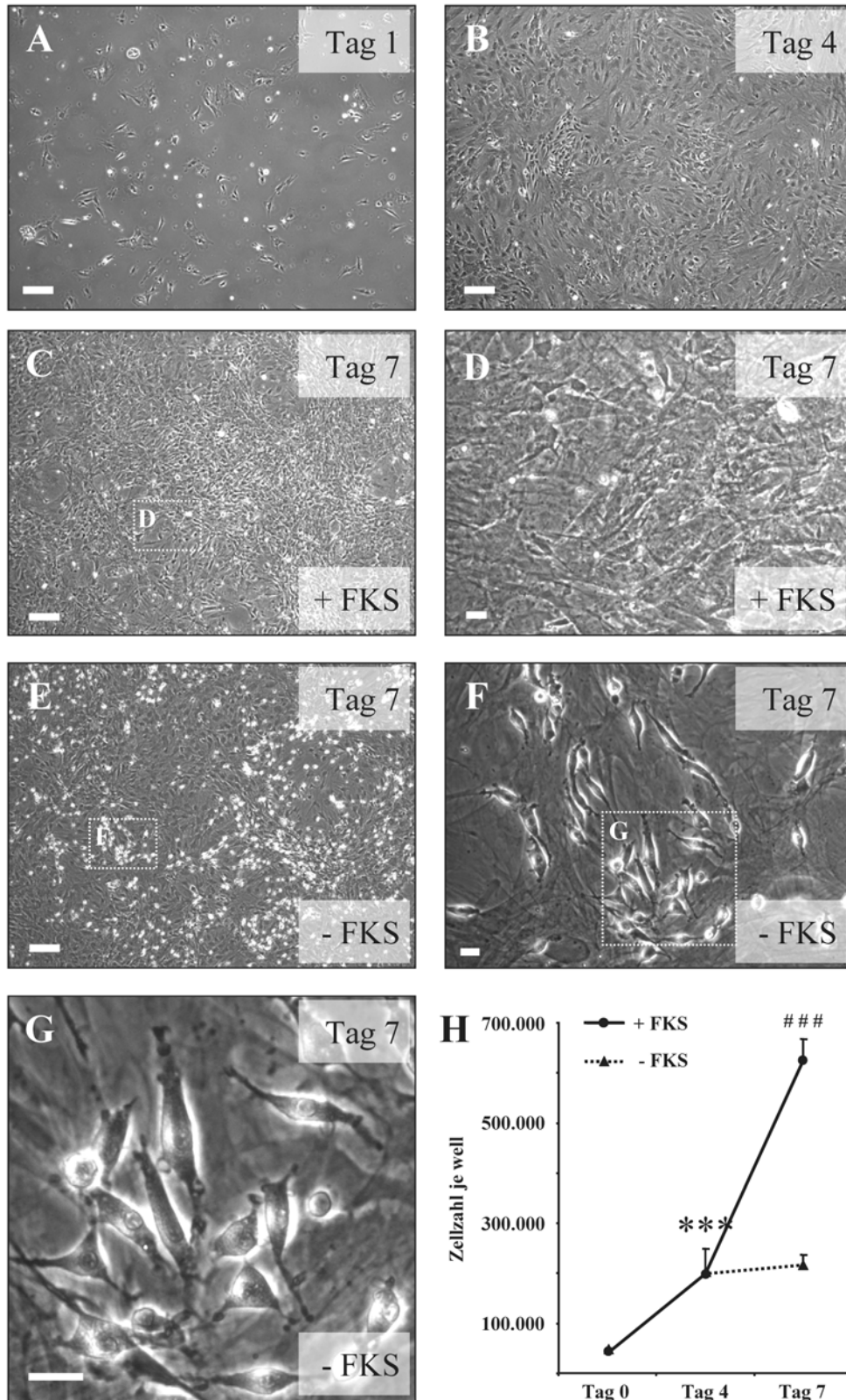
**Abb. 22: Experimentelles Design zur Bestimmung der Zellzahlen.** Am Versuchstag 4 erfolgte die Zellzählung. Bis dahin wurden die KMSZ in Standardmedium kultiviert. Eine Gruppe der Zellen wurde in frischem Standardmedium, d.h. mit Serum („+ FKS“), weiterkultiviert. Einer zweiten Gruppe wurde das Serum entzogen, indem an Tag 4 das Standardmedium gegen serumfreies Standardmedium ausgewechselt wurde („- FKS“). Am Versuchstag 7 wurden die Zellzahlen beider Gruppen bestimmt.

Innerhalb der ersten 4 Tage proliferierten die KMSZ um 498,4 % von 40.000 auf  $199.375 \pm 49.001$  Zellen/well ( $n=6$ ; Abb. 23 A+B+E). Nach dem Austausch des Standardmediums gegen frisches Standardmedium an Tag 4 erhöhte sich die Zellzahl bis Tag 7 auf  $625.000 \pm 42.308$  KMSZ/well ( $n=6$ ; Abb. 23 E: „+ FKS“). Dieser Wert entsprach 1.562,5 % der an Tag 0 ausgesäten Zellen. Die KMSZ lagen nun nicht mehr als einschichtiger Zellrasen vor, sondern wuchsen in mehreren Ebenen übereinander (Abb. 23 C+C’).

Ein Austausch des Standardmediums an Tag 4 gegen serumfreies Standardmedium und die folgende dreitägige Inkubation in diesem Medium hatte eine geringe Erhöhung der Zellzahl zur Folge (Abb. 23 E: „-FKS“). Sie betrug zum Versuchsende  $216.667 \pm 20.656$  KMSZ/well ( $n=6$ ).

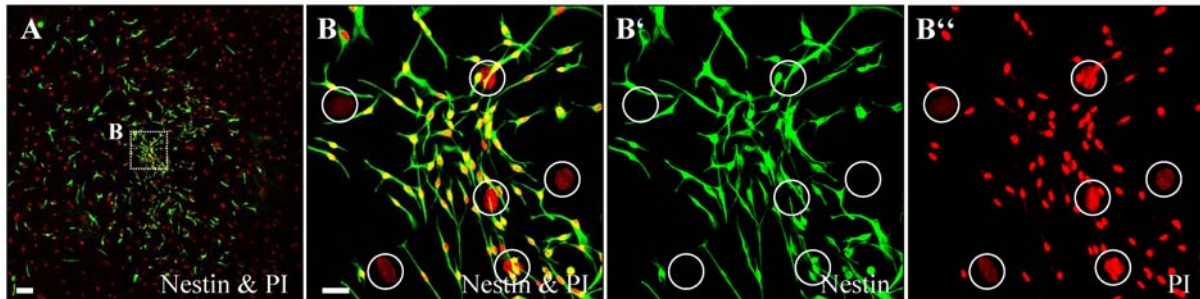
### **3.6 Identifizierung einer neuen Zellmorphologie nach Serumdeprivation**

Im Gegensatz zur serumhaltigen Kultivierung, die in einem zum Teil mehrschichtigen Zellrasen von sehr hoher Zelldichte resultierte (Abb. 23 C+D), wies das mikroskopische Bild einer serumdeprivierten Kultur an Tag 7 einen vorrangig einschichtigen Zellrasen von geringerer Zelldichte auf (Abb. 23 E-G). Interessanterweise ließen sich aber auf diesem Zellrasen eine Vielzahl von vereinzelt vorliegenden Zellen detektieren (Abb. 23 E-G).

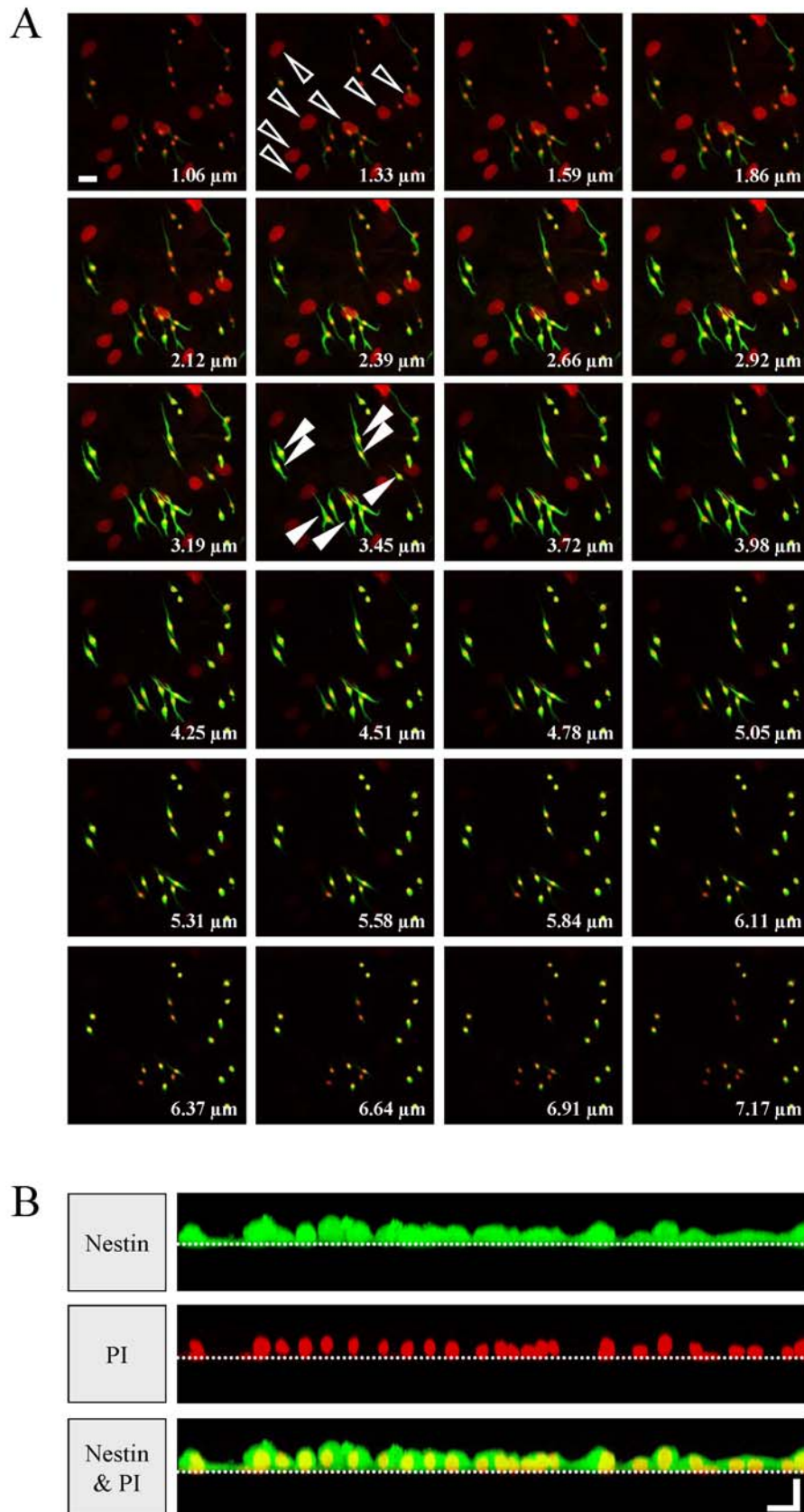


**Abb. 23: Proliferation unter Basal- und serumfreien Kulturbedingungen.** (A) KMSZ am Versuchstag 1. (B) Konfluenter Zellrasen am Versuchstag 4. (C) Die Weiterkultivierung in Standardmedium resultierte an Tag 7 in einem Zellrasen von sehr hoher Zelldichte. (D) Vergrößerung aus C. (E) Der komplette Serumentzug führte zur Bildung von kleinen runden bzw. bipolaren KMSZ auf dem Zellrasen. (F) Vergrößerung aus E. (G) Vergrößerung aus F. (H) Die Entwicklung der Zellzahlen im Verlauf der 7tägigen Experimente. n=6, \*\*\* p < 0,001 („Tag 4“ vs. „Tag 0“) ### p < 0,001 („Tag 7 +FKS“ vs. „Tag 4“). (Maßstab: A, B, C, E 200 µm; D, F, G 20 µm)

Diese aufliegenden Zellen verfügten über eine runde bzw. bipolare Morphologie und waren, wie immunzytochemische Färbungen zeigten, alle Nestin-positiv (Abb. 24). Ein *Z-Stack* durch das Präparat bestätigte, dass es sich bei den Nestin-positiven Zellen um die auf dem Zellrasen lokalisierten Zellen handelte (Abb. 25).



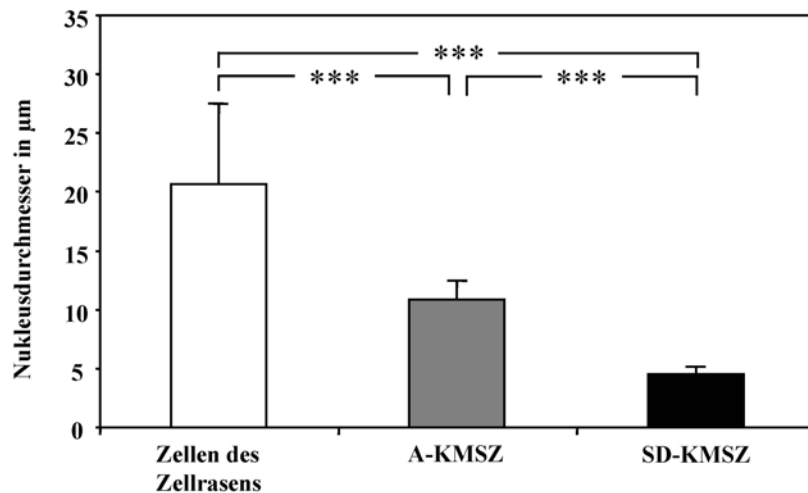
**Abb. 24: Nestin-Expression nach Serumdeprivation.** (A) Auf dem Zellrasen konnten in großer Anzahl bipolare und runde Nestin-positive Zellen (grün) detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit PI (rot) gegengefärbt. (B-B'') Vergrößerung aus A. Die Zellen des Zellrasens wiesen keine Immunreaktivität gegen Nestin auf. Ihre Zellkerne sind weiß eingekreist. B' bzw. B'' zeigen in Einzeldarstellungen die Nestin- bzw. Kernfärbung. (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ )



**Abb. 25: Z-Stack durch eine Kultur serumdeprivierter KMSZ.** (A) Die Darstellung einzelner optischer Ebenen in Intervallen von  $0,27\ \mu\text{m}$  verdeutlicht die Lage der Nestin-positiven Zellen (grün, weiße Pfeilspitzen) auf dem Zellrasen. Die Zellkerne (rot) des Zellrasens werden durch schwarze Pfeilspitzen angezeigt. (B) Optischer Schnitt durch die XZ-Achse. Die Ebene des Zellrasens ist durch die gepunktete Linie symbolisiert. (Maßstab: A  $20\ \mu\text{m}$ ; B  $10\ \mu\text{m}$ )

Eine weitere Eigenschaft der Nestin-positiven Zellen waren ihre kleineren Zellkerne. Mit einem Durchmesser von  $4,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$  ( $n=184$  gezählte Zellen in 3 unabhängigen Experimenten) waren sie signifikant kleiner als die Zellkerne der, unter Standardbedingungen identifizierten, Nestin-positiven A-KMSZ (Abb. 26) und die Zellkerne des Zellrasens.

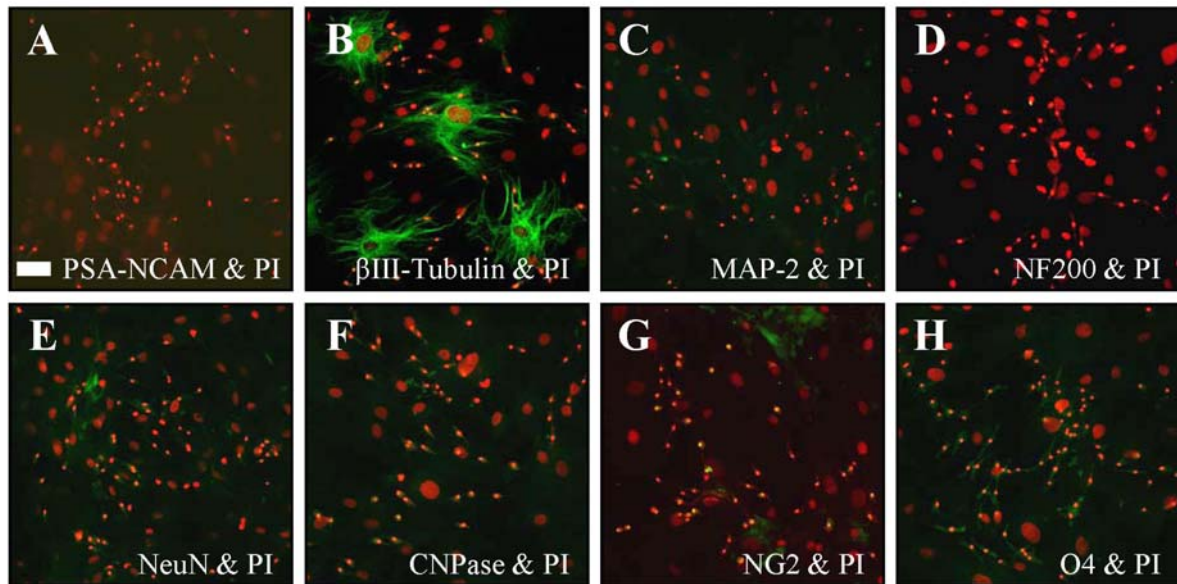
Aufgrund ihres Auftretens nach der serumfreien Kultivierungsphase erhielten diese kleinnukleären, Nestin-positiven KMSZ die Bezeichnung „Serumdeprivation-induzierte KMSZ (SD-KMSZ)“.



**Abb. 26: Unterschiede in der Zellkerngrößen.** Die Durchmesser der Zellen des Zellrasens ( $20,7 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ;  $n=101$ ), der A-KMSZ ( $10,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ;  $n=161$ ) und der SD-KMSZ ( $4,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ;  $n=184$ ) unterschieden sich signifikant voneinander. \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.7 Neuroektodermale Marker in serumdeprivierten Knochenmarkstammzellen

Mit Ausnahme von  $\beta$ III-Tubulin exprimierten die KMSZ-Kulturen auch nach der serumfreien Kultivierung keine neuronalen (PSA-NCAM: Abb. 27 A; MAP-2: Abb. 27 C; NF-200: Abb. 27 D; NeuN: Abb. 27 E) oder oligodendroglialen (CNPase: Abb. 27 F; NG2: Abb. 27 G; O4: Abb. 27 H) Proteine.

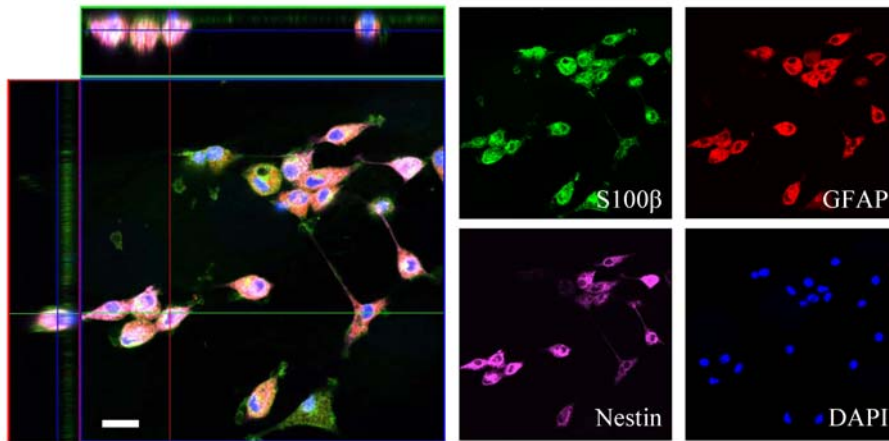


**Abb. 27: Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine in serumdeprivierten KMSZ-Kulturen.** (A-H) Das bereits unter Basalbedingungen ermittelte Expressionsmuster der KMSZ des Zellrasens (große Zellkerne) änderte sich durch die Serumdeprivation nicht. Auch die neu generierten SD-KMSZ (kleine Zellkerne) waren immunnegativ für die untersuchten Marker reifer neuroektodermaler Zellen. (Maßstab 50  $\mu$ m)

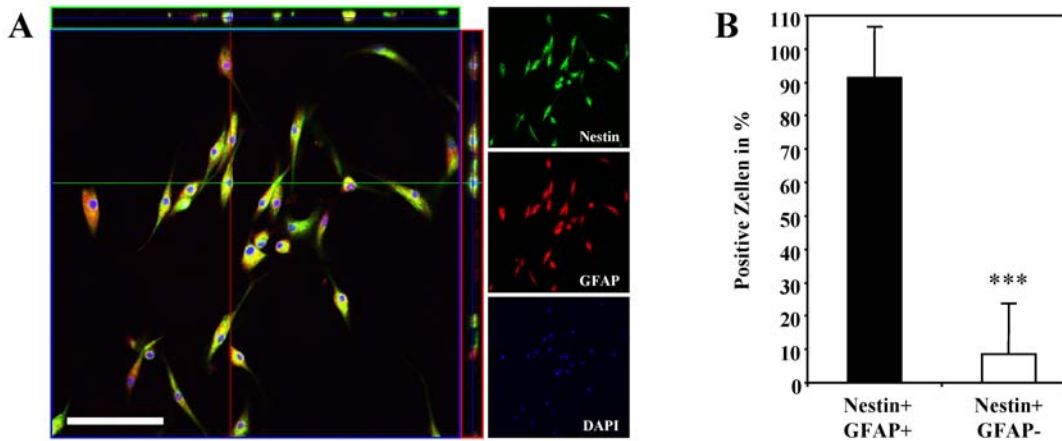
Überraschenderweise ließen sich in den SD-KMSZ jedoch sowohl GFAP als auch S100 $\beta$  immunzytochemisch nachweisen (Abb. 28). Quantifizierungen ergaben, dass 91,5 $\pm$ 15,2 % aller Nestin-positiven SD-KMSZ auch GFAP exprimierten (n=1.104 gezählte Zellen in 3 unabhängigen Experimenten; Abb. 29). Der Anteil an GFAP-ko-exprimierenden Nestin-positiven Zellen stieg von 5,4 $\pm$ 7,4 % unter basalen Bedingungen auf 91,5 $\pm$ 15,2 % unter serumfreien Kulturbedingungen (n=1.475 gezählte Zellen in 6 unabhängigen Experimenten; Abb. 31).

Eine Ko-Expression von S100 $\beta$  konnte in 99,4 $\pm$ 0,4 % aller GFAP-positiven SD-KMSZ nachgewiesen werden (n=864 gezählte Zellen in 3 unabhängigen Experimenten; Abb. 30). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die überwiegende Mehrheit der SD-KMSZ Nestin, GFAP und S100 $\beta$  ko-exprimieren.

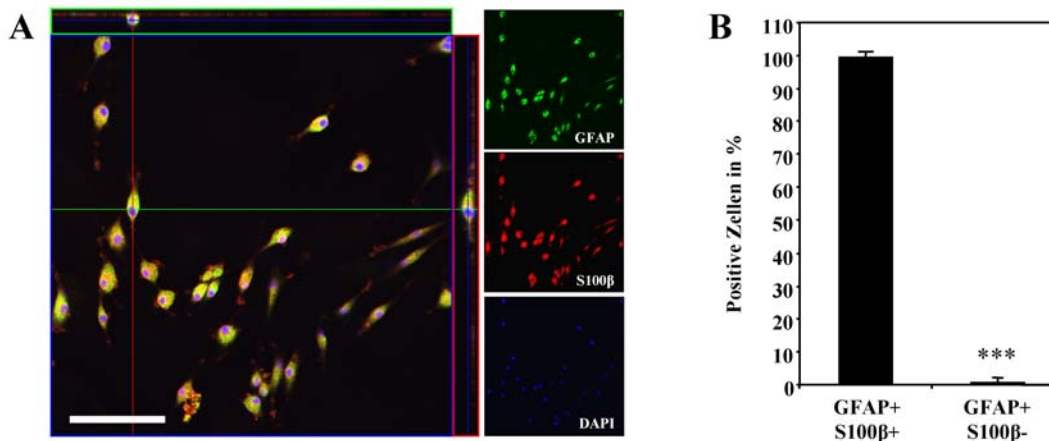




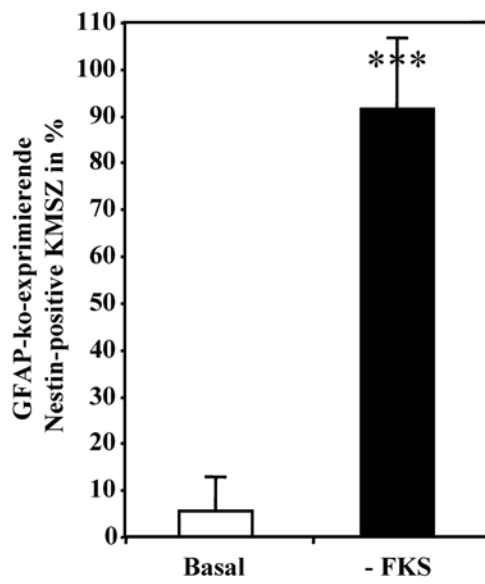
**Abb. 28: SD-KMSZ ko-exprimieren frühe neurogliale Markerproteine.** Die überwiegende Mehrheit der SD-KMSZ ist durch die Expression von Nestin, GFAP und S100β gekennzeichnet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (Maßstab 10 µm)



**Abb. 29: Ko-Expression von Nestin und GFAP in SD-KMSZ.** (A) Orthogonal-Darstellung von Nestin-GFAP-doppelmarkierten SD-KMSZ. (B) Die überwiegende Mehrheit der Nestin-positiven SD-KMSZ (91,5±15,2 %; n=1.104) ko-exprimieren GFAP. \*\*\* p < 0,001. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)



**Abb. 30: Ko-Expression von GFAP und S100β in SD-KMSZ.** (A) Orthogonal-Darstellung von GFAP-S100β-doppelmarkierten SD-KMSZ. (B) Nahezu alle GFAP-positiven SD-KMSZ (99,4±0,4 %; n=864) ko-exprimieren S100β. \*\*\* p < 0,001. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)



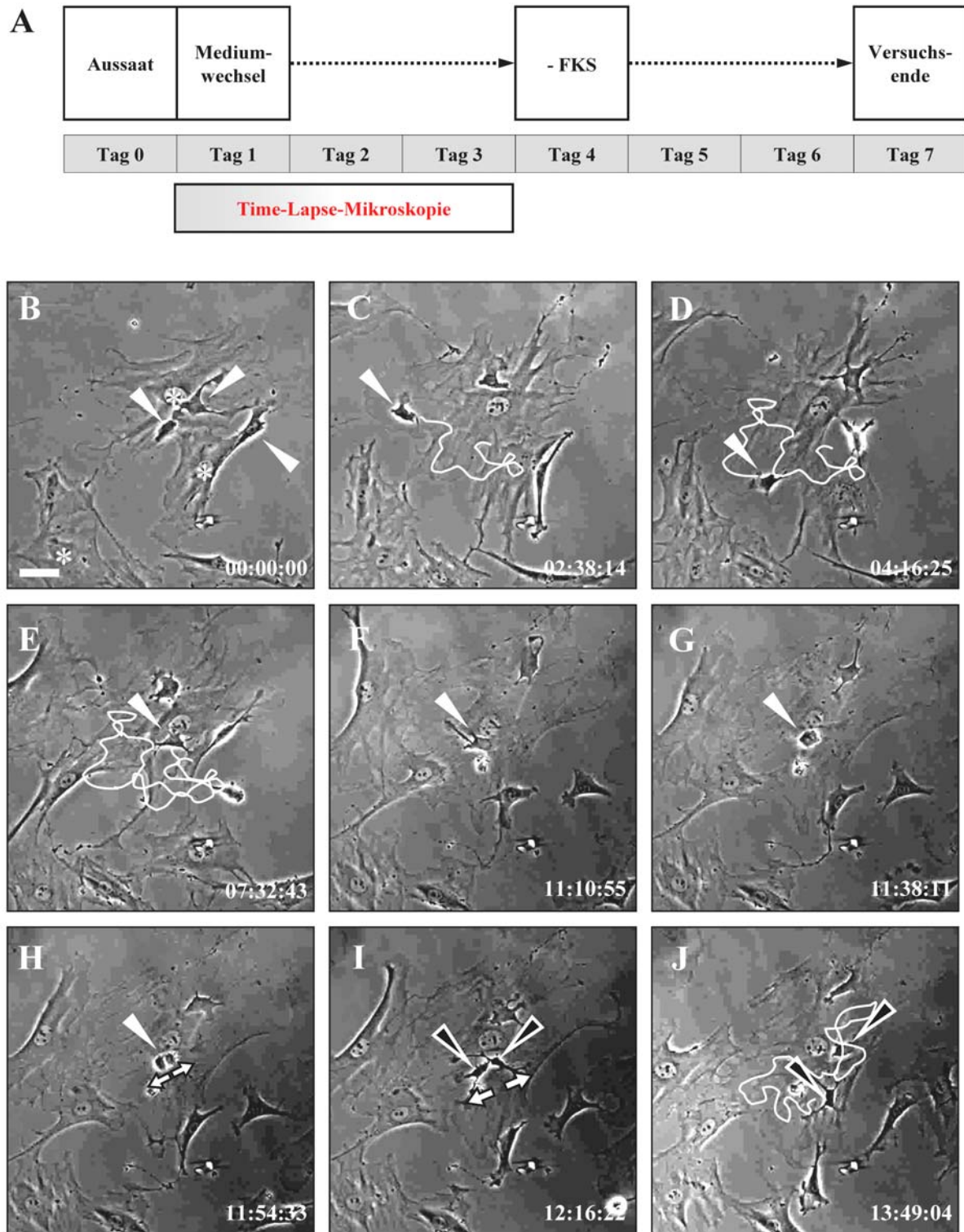
**Abb. 31: Erhöhung des Anteils Nestin-GFAP-ko-exprimierender Zellen durch Serumentzug.** Während unter Basalbedingungen 5,4±7,4 % aller Nestin-positiven KMSZ GFAP ko-exprimierten, exprimierten nach Serumentzug 91,5±15,2 % der Nestin-positiven KMSZ auch GFAP. n=1.475; \*\*\* p < 0,001.

### 3.8 *Time-Lapse*-Mikroskopie

#### 3.8.1 *Time-Lapse*-Mikroskopie während der basalen Kultivierungsperiode

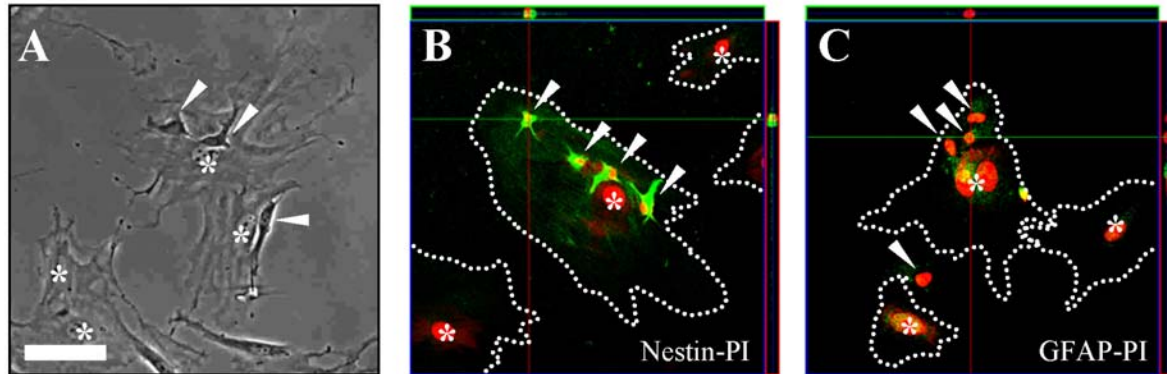
Da die SD-KMSZ auf dem Zellrasen lokalisiert waren, wurde vermutet, dass sie möglicherweise mit den basal existierenden und ebenfalls auf dem Zellrasen lokalisierten A-KMSZ in Zusammenhang stehen. Um dies zu verifizieren, wurden *Time-Lapse*-Aufnahmen, zunächst unter Basalbedingung und dann während der Serumdeprivation, durchgeführt.

Die Analyse von KMSZ-Kulturen unter basalen Kulturbedingungen (Abb. 32 A) zeigte vereinzelt kleine Zellen (Abb. 32, weiße Pfeilspitzen), die sich auf größeren, flachen Zellen befanden. Sie waren hochmotil, bewegten sich auf den flachen Zellen, vermieden aber den Kontakt mit der freien Oberfläche der Zellkulturschale (Abb. 32). Des Weiteren proliferierten die kleinen Zellen auf den flachen Zellen zu jeweils zwei motilen Tochterzellen mit vergleichbarer Morphologie wie die Mutterzelle.



**Abb. 32: Detektion hochmotiler KMSZ unter Basalbedingungen.** (A) Die Aufnahmen wurden während der basalen Kultivierungsphase erstellt. (B) Auf den charakteristischen flächigen Zellen (Zellkerne durch Sterne symbolisiert) ließen sich kleinere, kontrastreiche Zellen (weiße Pfeilspitzen) detektieren. Sie verfügten über eine hohe Motilität und migrierten auf den anderen KMSZ, vermieden jedoch den Kontakt mit zellfreien Oberflächen. Ebenfalls auf den flächigen KMSZ fand die Zellteilung der kleineren Zellen statt (G-I). Der zurückgelegte Weg der in (C) markierten Zelle wurde mit einer weißen Linie nachgezogen. (Maßstab 50 µm)

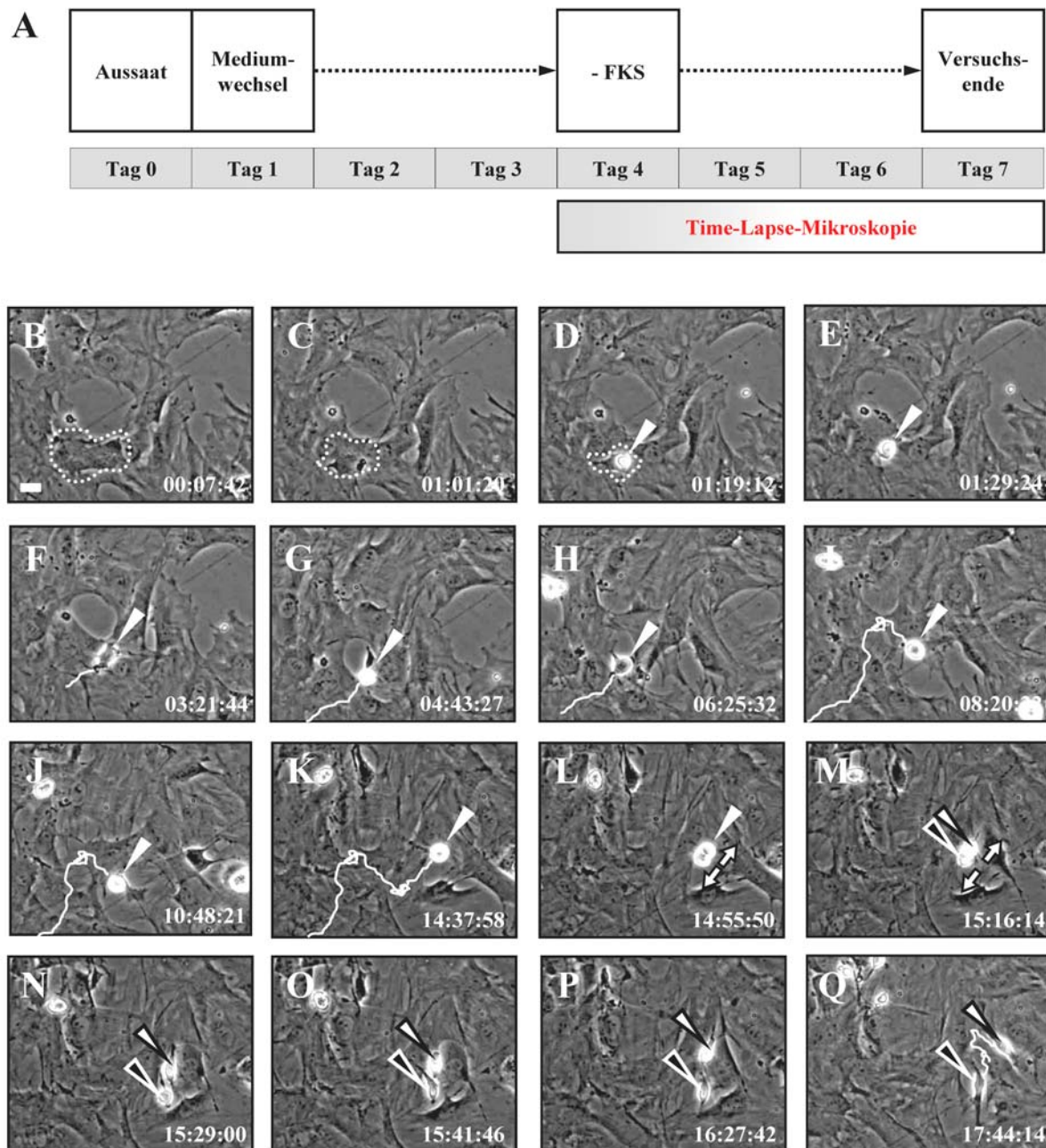
Immunzytochemische Färbungen stellten sicher, dass es sich bei den kleinen Zellen um die A-KMSZ handelte. Sie exprimierten Nestin, nicht aber die anderen getesteten Markerproteine (Abb. 33, Nestin und exemplarisch GFAP).



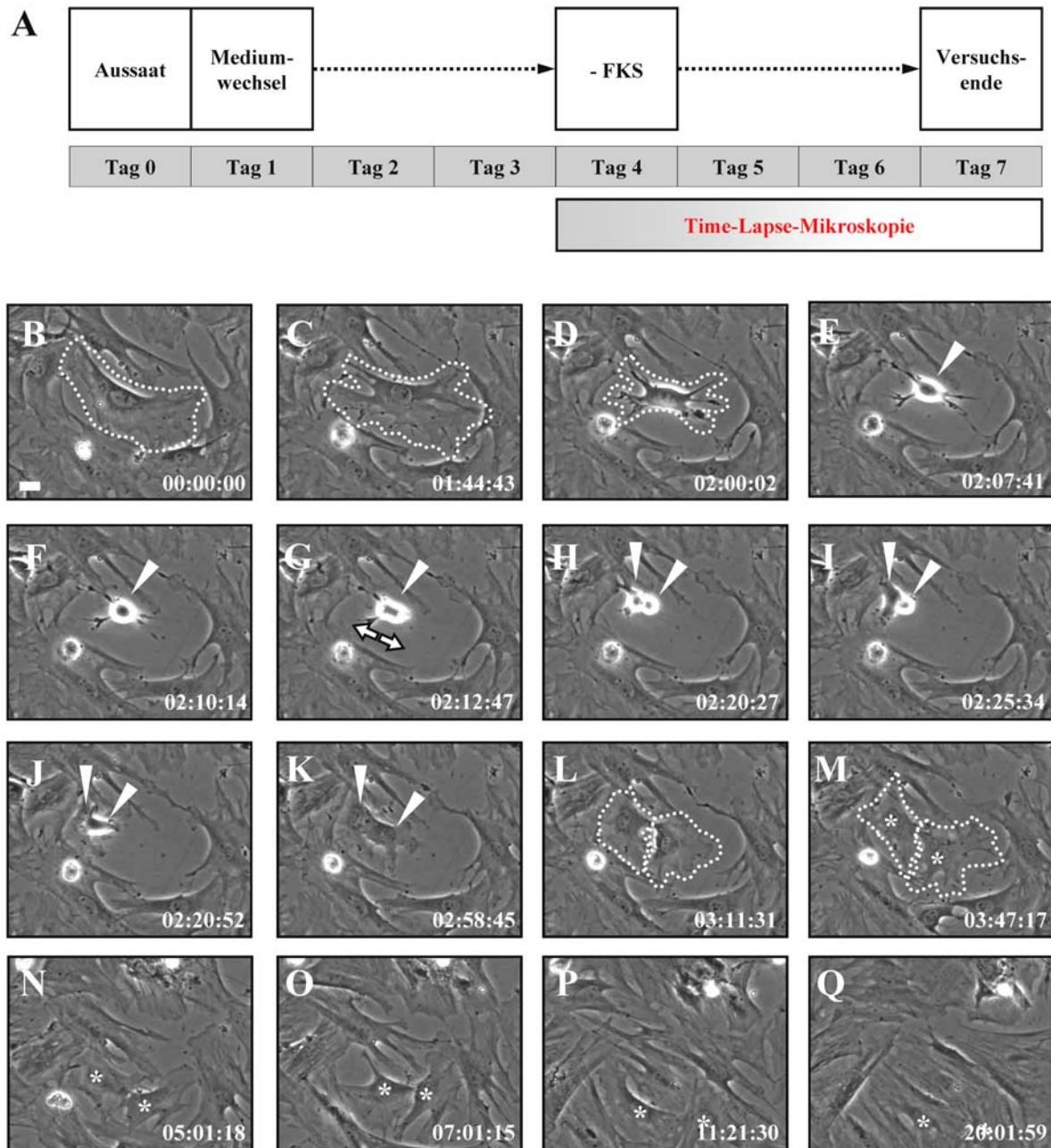
**Abb. 33: Identifizierung der hochmotilen KMSZ als A-KMSZ.** Immunzytochemische Färbungen zeigten, dass die hochmotilen KMSZ (A, weiße Pfeilspitzen) auf den flächigen KMSZ (Zellkerne durch Sterne dargestellt) lediglich Nestin (grün) exprimierten (B). Die Expression anderer Marker, hier exemplarisch eine GFAP-Färbung (C, grün), wurde nicht nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit PI (rot) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

### 3.8.2 *Time-Lapse*-Mikroskopie während der serumfreien Kultivierungsperiode

Unter serumfreien Kulturbedingungen (Abb. 34 A) rundeten sich die Somata der A-KMSZ ab (Abb. 34 B–E). Die im Ergebnis kugeligen Zellen migrierten in den folgenden Stunden weiterhin über den inzwischen konfluenten Zellrasen (Abb. 34 F–K) und vermieden den Kontakt mit der Kulturoberfläche (Abb. 34 G–K). Mehrere Stunden nach Abrundung teilten sich die Zellen in zwei Tochterzellen (Abb. 34 I+M). Interessanterweise wiesen die Tochterzellen eine neue Morphologie auf: Sie hatten einen bipolaren, spindelförmigen Zellkörper (Abb. 34 N). Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass sie in dieser Form über den Zellrasen migrierten, während sie ansonsten auch eine kugelförmige Form annehmen konnten. In keinem der Experimente ließ sich jedoch ein Abflachen der Tochterzellen oder gar ein Einfügen in den bestehenden Zellrasen beobachten. Dieses ließ sich ausschließlich bei Zellen des Zellrasens nachweisen, die sich für ihre Teilung ebenfalls abkugelten, danach aber wieder in den Rasen integrierten (Abb. 35).



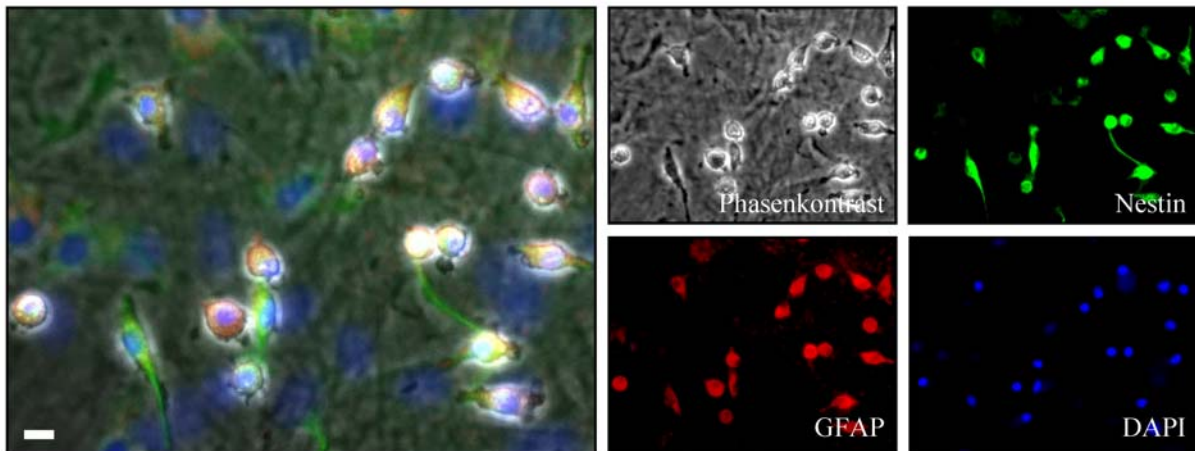
**Abb. 34: Proliferation von A-KMSZ während der serumfreien Kultivierungsperiode.** (A) Die Aufnahmen wurden während der serumfreien Kultivierungsperiode erstellt. (B) Die A-KMSZ (eingekreist mit gepunkteter Linie) beginnt sich zu einer kugeligen Zelle (weiße Pfeilspitze in E) zusammenzuziehen. Bevor sie sich einige Stunden später teilt (L), migriert sie über den nahezu konfluenten Zellrasen. Die Nachkommen (weiß- bzw. schwarzumrandete Pfeilspitze in M) weisen – anders als die Mutterzelle – eine spindelförmige, bipolare Morphologie auf. (Maßstab 10 µm)



**Abb. 35: Proliferation von KMSZ des Zellrasens während der serumfreien Kultivierungsperiode.** Vereinzelt kommt es während der serumfreien Kultivierungsperiode (A) auch zur Proliferation von KMSZ des Zellrasens (B, mit weißer gepunkteter Linie eingekreist). Die flächigen Zellen kondensieren ebenfalls bis in eine kugelige Form (F) und teilen sich dann (G). Die anfangs kugeligen Nachkommen (H) flachen unmittelbar danach ab, breiten sich auf dem Untergrund aus (Zellkerne durch Sterne markiert) und integrieren sich so in den Zellrasen (I-Q). (Maßstab 10 µm)

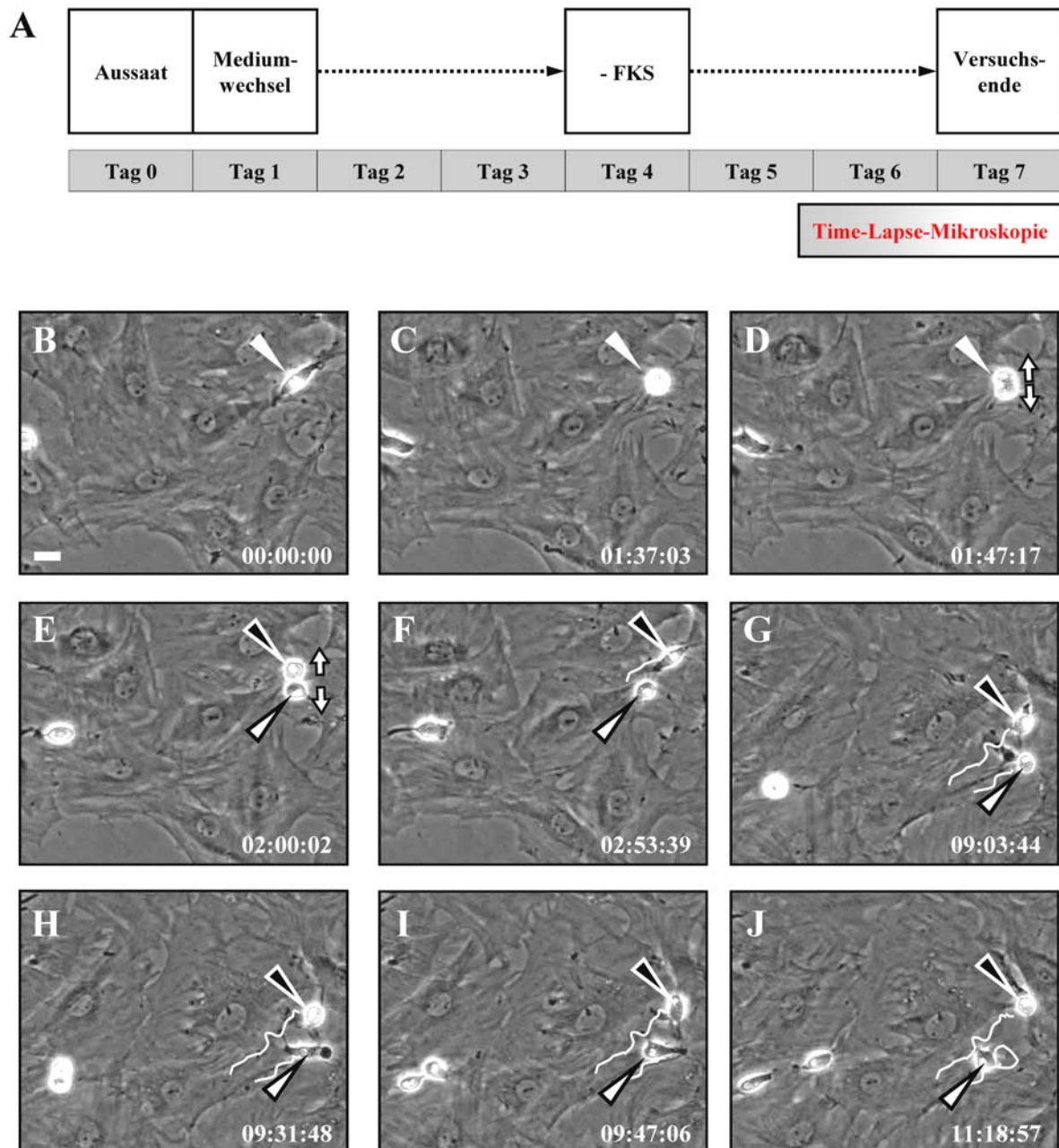


Immunfärbungen konnten bestätigen, dass es sich bei den durch Teilung entstandenen runden/bipolaren Zellen um SD-KMSZ handelte (Abb. 36).



**Abb. 36: Identifizierung der aufliegenden Zellen als SD-KMSZ.** Immunzytochemische Färbungen bestätigten, dass die runden bzw. bipolaren Zellen Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> SD-KMSZ waren. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt. (Maßstab 10 µm)

Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, waren die SD-KMSZ fähig, weiterhin in Tochterzellen mit bipolarer Morphologie (Abb. 37) zu proliferieren.



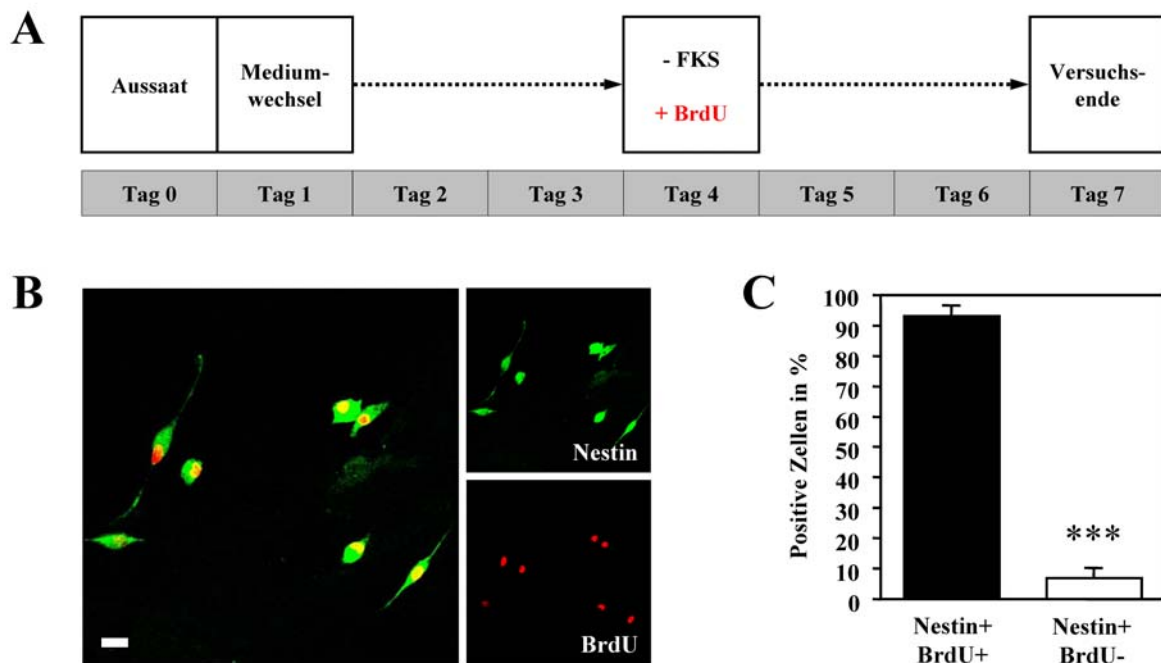
**Abb. 37: SD-KMSZ proliferierten unter Serumentzug in weitere SD-KMSZ.** (A) Die Aufnahmen wurden während der anhaltenden Serumdeprivation erstellt. Eine bipolare SD-KMSZ (B, weiße Pfeilspitze) kondensiert zum Zweck der Teilung ebenfalls zu einer runden Zelle (C), teilt sich (D) und generiert zwei neue SD-KMSZ (E, weiß- bzw. schwarzumrandete Pfeilspitzen). Diese migrieren ebenfalls über den Zellrasen (F-J). (Maßstab 10 µm)

Die beschriebenen Effekte wurden nur nach einem Serumentzug beobachtet. Wurden die KMSZ ab Tag 4 weiter in serumhaltigem Standardmedium inkubiert (vgl. Abb. 13 „+FKS“), kam es lediglich zur beschriebenen Proliferation ohne Veränderung des (Immun-) Phänotyps der A-KMSZ.

### 3.9 BrdU-Inkorporation während der Serumdeprivation

Die Markierung proliferierender Zellen durch Zugabe von BrdU zum serumfreien Medium (Abb. 38 A) sollte eine Aussage darüber erlauben, wie hoch die Zahl an SD-KMSZ war, die sich während der Serumdeprivation bildeten.

Die Quantifizierung der Nestin-BrdU-doppelmarkierten Zellen (Abb. 38 B) ergab, dass  $93,2 \pm 3,4$  % der Nestin-positiven SD-KMSZ ( $n = 1.287$  gezählte Zellen in 3 unabhängigen Experimenten; Abb. 38 C) BrdU inkorporiert hatten. Ergänzend zu den Ergebnissen der *Time-Lapse*-Analysen ließ sich so die Aussage treffen, dass der überwiegende Anteil der SD-KMSZ aus Zellteilungen der A-KMSZ während der Serumdeprivation hervorgegangen ist.



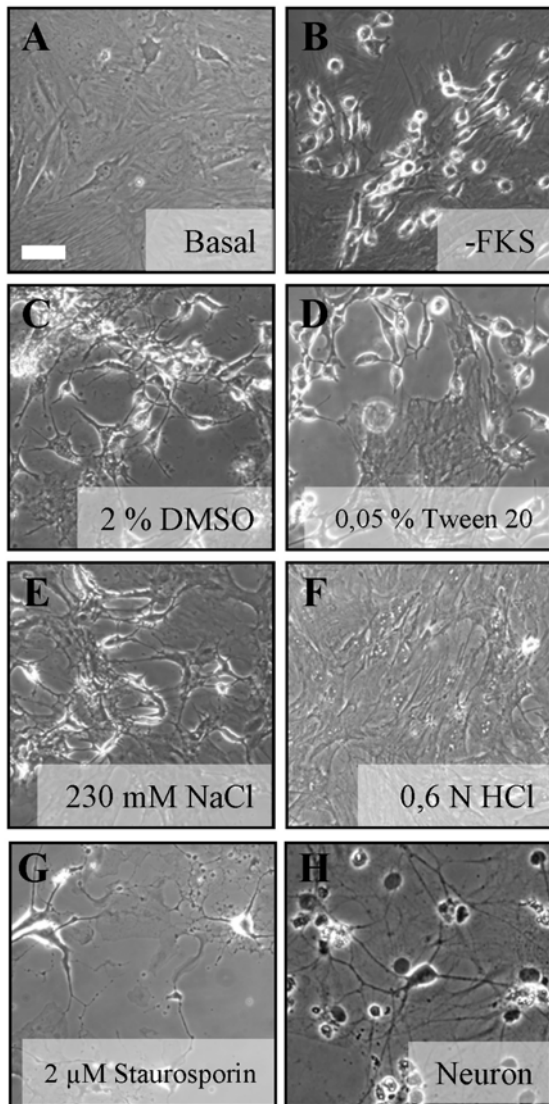
**Abb. 38: Quantifizierung der SD-KMSZ-Generierung.** (A) Während der serumfreien Kultivierungsperiode wurde dem Medium BrdU beifügt. (B) Die BrdU-positiven Zellkerne (rot) der SD-KMSZ (grün) zeigten, dass die Zellen aus Zellteilungen hervorgegangen sind. (C) Der überwiegende Anteil der SD-KMSZ ( $93,2 \pm 3,4$  %) ist durch Proliferation während des dreitägigen Serumentzuges entstanden.  $n=1.287$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (Maßstab 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.10 Induktion von SD-KMSZ ist nicht durch Stress bedingt

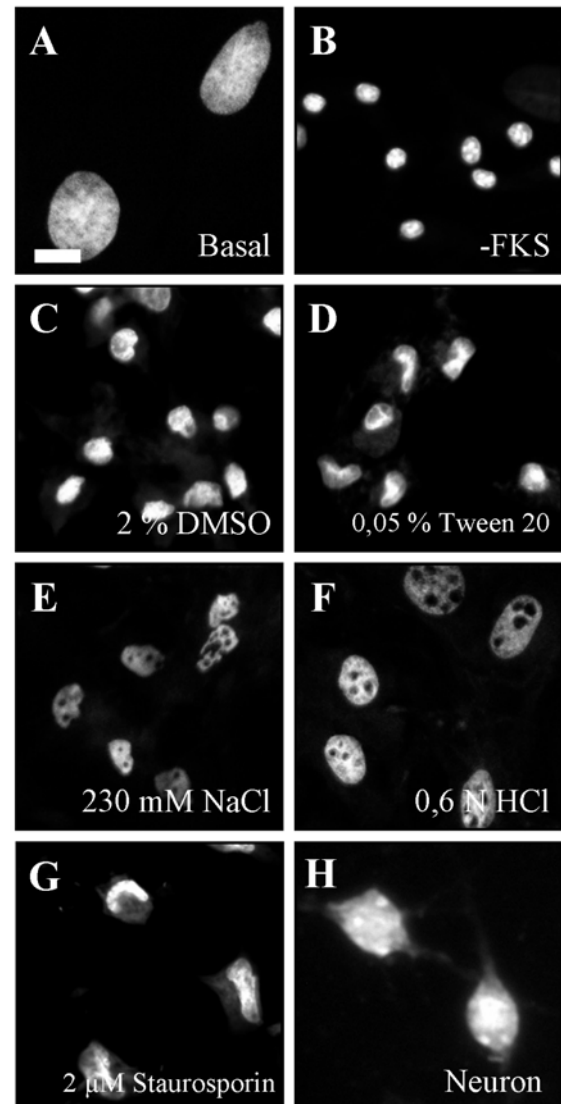
Kulturen serumdeprivierter KMSZ sollten mit KMSZ verglichen werden, die chemischen Stressoren ausgesetzt waren, um die Frage zu beantworten: Induziert der vollständige Serumentzug einen chemischen Stress, der zur Bildung der SD-KMSZ führt? Zum Vergleich der Nuklei serumdeprivierter Zellen mit denen chemisch gestresster Zellen wurden KMSZ-Kulturen mit verschiedenen Stressoren inkubiert, deren zellschädigende Eigenschaften bekannt sind. Als Positiv-Kontrolle für apoptotischen Zelltod wurden Kulturen mit Staurosporin behandelt.

Abbildung 39 A zeigt einen konfluenten Zellrasen unter basalen Bedingungen. Die Zellkerne sind groß und gleichmäßig gefärbt (Abb. 40 A). In Abbildung 39 B ist eine KMSZ-Kultur nach dreitägigem Serumentzug dargestellt. Auf dem Zellrasen sind SD-KMSZ zu erkennen. Ihre Zellkerne weisen keinerlei Anzeichen von Apoptose auf, sondern verfügen über eine regelmäßige Form mit deutlich erkennbarem Eu- und Heterochromatin (Abb. 40 B).

Die Inkubation in DMSO- bzw. Tween-20-haltigen Medien hatte die in der Literatur beschriebenen Effekte zur Folge (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Die Kondensation des Zytoplasmas und das Zurückziehen der Somata führte zur Ausbildung pseudo-neuronaler Morphologien (Abb. 39 C+D). *Time-Lapse*-Aufnahmen bestätigten (ohne Abb.), dass als Neuriten interpretierbare Zellfortsätze auf nicht-zurückgezogene Abschnitte der Somata zurückzuführen waren. Die beobachteten Effekte waren nach Inkubation mit Tween-20-haltigem Medium deutlich stärker ausgeprägt, so dass es hier bereits zur Ablösung einzelner Zellen vom Untergrund kam. Die Betrachtung der Zellkerne zeigte, dass die so behandelten Zellen apoptotisch waren (Abb. 40 C+D). Ihre Zellkerne wiesen die gleichen charakteristischen Merkmale wie die der staurosporin-behandelten KMSZ (Abb. 40 G) auf. Des Weiteren führte auch die Inkubation mit Staurosporin zu einer pseudo-neuronalen Differenzierung der KMSZ (Abb. 39 G). Die Inkubation in einem Medium mit hyperosmolarer Salzkonzentration führte zu einer geringeren Ausbildung kondensierter Zellen (Abb. 39 E), hatte aber die Ausbildung löchriger Nuklei zur Folge (Abb. 40 E). Der gleiche Effekt war bei KMSZ zu beobachten, die einem geringen pH-Wert exponiert waren (Abb. 40 F), obwohl die Zellen einen weitestgehend intakten Eindruck vermittelten (Abb. 39 F). Zum Vergleich ist in Abbildung 39 H eine vitale Neuronenkultur sowie in Abbildung 40 H die Kernfärbung einer solchen Kultur dargestellt.



**Abb. 39: Phasenkontrastaufnahmen zur Beurteilung der Zellmorphologie.** (A) KMSZ unter basalen Kulturbedingungen. (B) KMSZ-Kultur nach Serumentzug. Deutlich zu erkennen sind die SD-KMSZ, die sich auf dem konfluenten Zellrasen befinden. (C+D) KMSZ-Kultur nach Inkubation in 2 % DMSO bzw. 0,05 % Tween 20. Der ursprünglich konfluente Zellrasen ist durch Kondensation der Zellen aufgerissen. Die kondensierten Zellen ähnelten den SD-KMSZ, lagen jedoch nicht auf anderen Zellen, sondern auf der Oberfläche des Kulturgefäßes vor. (E+F) Die Inkubation mit 230 mM NaCl bzw. 0,6 N HCl führte zu relativ geringen morphologischen Veränderungen an den KMSZ. (G) Die Induktion von Apoptose durch Inkubation mit 2  $\mu$ M Staurosporin resultierte in einem Aufreißen des konfluenten Zellrasens und stark kondensierten KMSZ. Generell erinnerten die chemisch behandelten (C-E) bzw. apoptotischen (G) KMSZ aufgrund ihrer Form und der scheinbaren Ausläufer in Folge der Kondensation an kultivierte Neurone (H). (Maßstab 50  $\mu$ m)



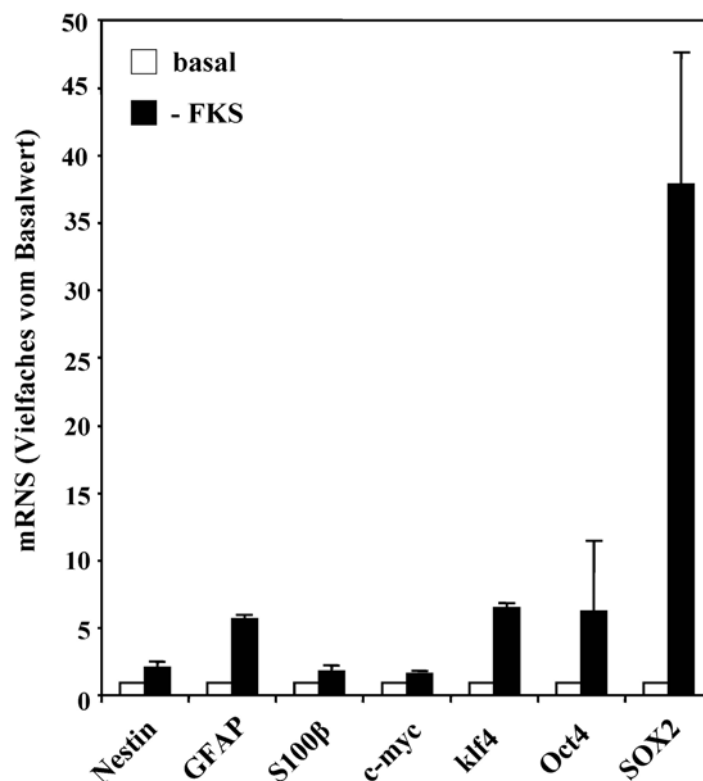
**Abb. 40: Fluoreszenzaufnahmen der Zellkerne.** Unbehandelte Zellen (A: KMSZ; H: Neurone) verfügten über intakte vitale Zellkerne. Sie wiesen eine gleichmäßige Form und weitestgehend homogene Färbung auf. (B) Die Zellkerne der SD-KMSZ verfügten ebenfalls über eine gleichmäßige Form. Gut zu erkennen waren an ihnen Eu- und Heterochromatin (hellere Bereiche im Zellkern). Im Gegensatz dazu verfügten die Zellkerne der KMSZ nach Inkubation mit verschiedenen chemischen Stressoren (C-F) über verschiedene Merkmale apoptotische Zellkerne (G). Neben unregelmäßigen und gefalteten Formen (C-D) konnten auch Löcher in den Kernen dargestellt werden (E+F). Die Zellkerne wurden mit PI gegengefärbt und schwarzweiß abgebildet. (Maßstab 10  $\mu$ m)

### 3.11 Expression embryonaler Marker in Serumdeprivation-induzierten KMSZ (SD-KMSZ)

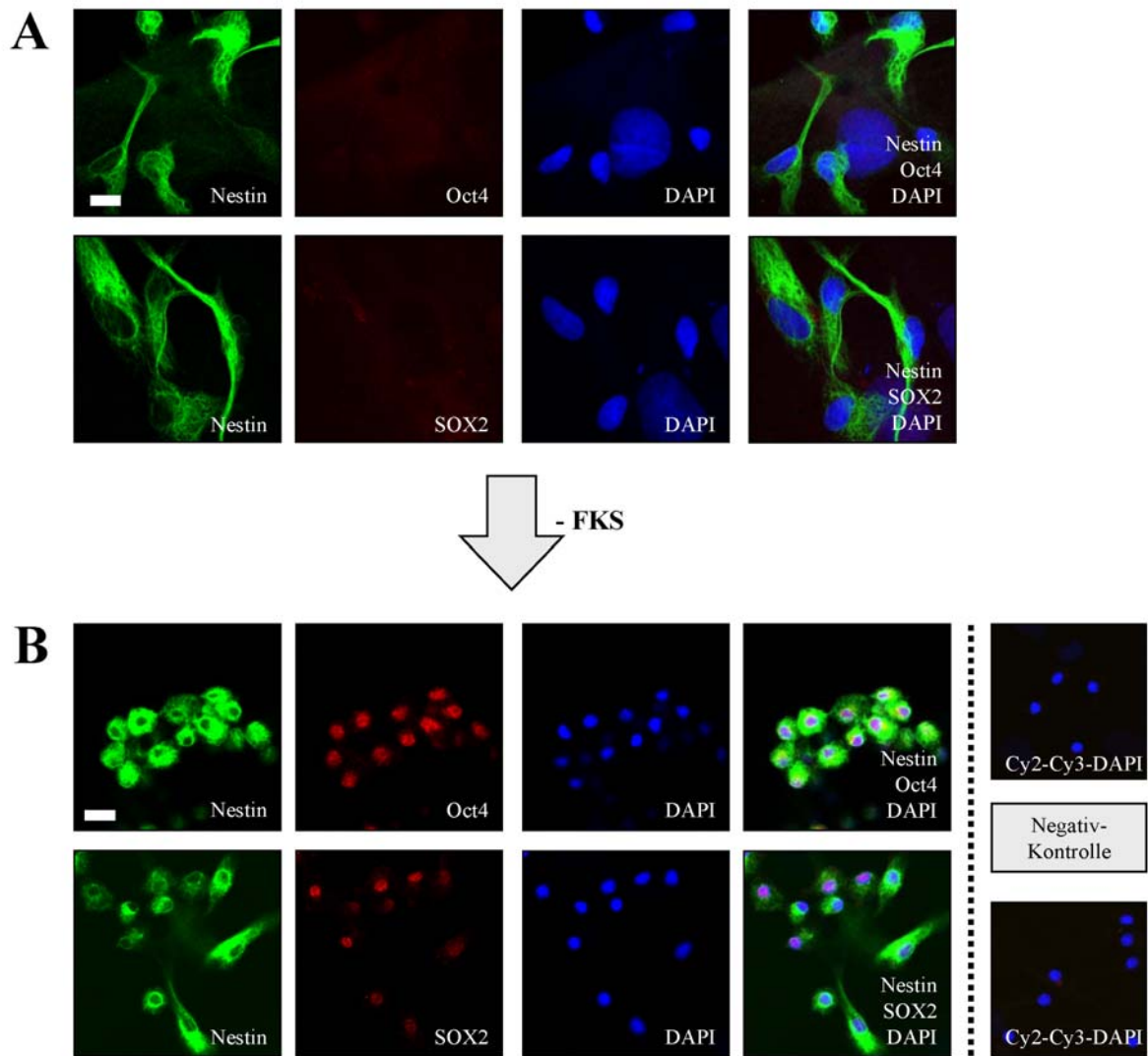
Die Serumdeprivation induzierte einen Anstieg der Expression von Genen, die typisch für neurale Stammzellen sind (Abb. 41). Bezogen auf die Expression unter Basalbedingungen verdoppelten sich die Mengen der Nestin-mRNS ( $2,044 \pm 0,496$ ;  $n=3$  unabhängige Experimente) und S100 $\beta$ -mRNS ( $1,814 \pm 0,466$ ;  $n=3$  unabhängige Experimente). Die Expression von GFAP-mRNS versechsfachte sich ( $5,719 \pm 0,252$ ;  $n=3$  unabhängige Experimente).

Des Weiteren wurde für diese Arbeit die Expression von c-myc, klf4, Oct4 und SOX2 untersucht. Wie kürzlich gezeigt wurde, führt die Überexpression dieser Gene zur Transformierung von Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (engl. *induced pluripotent stem cells, iPS cells*) (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007). Die Expression aller 4 Gene war in den KMSZ nach dem Serumentzug erhöht (c-myc:  $1,597 \pm 0,055$ ; klf4:  $6,459 \pm 0,380$ ; Oct4:  $6,253 \pm 5,189$ ; SOX2:  $37,824 \pm 9,790$ ;  $n=3$  unabhängige Experimente) (Abb. 41).

Immunzytochemisch ließen sich Oct4 und SOX2 in KMSZ unter Basalbedingungen nicht nachweisen (Abb. 42 A). In den serumdeprivierten KMSZ-Kulturen konnten beide Transkriptionsfaktoren in den SD-KMSZ detektiert werden (Abb. 42 B).



**Abb. 41: Anstieg der mRNS neuraler Vorläufermarker und Pluripotenzgene.** Der dreitägige Serumentzug induzierte in den KMSZ-Kulturen eine Verfielfachung der mRNS-Expression (schwarze Säulen), verglichen mit basal kultivierten KMSZ (weiße Säulen). Sowohl die mRNS für die frühen neuralen Markerproteine Nestin und GFAP als auch für die Pluripotenzgene c-myc, klf4, Oct4 und SOX2 sind (zum Teil) nach Serumentzug stark erhöht. Auch die mRNS-Menge für S100 $\beta$  hat sich nahezu verdoppelt.

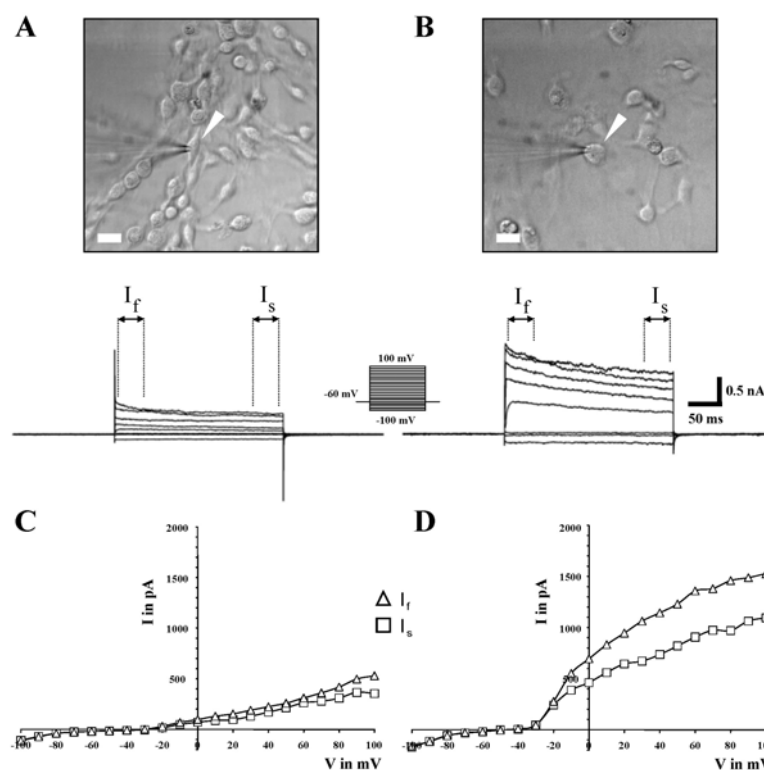


**Abb. 42: Expression von Oct4 und SOX2 in SD-KMSZ nach Serumentzug. (A)** In den Zellkernen der A-KMSZ ließ sich immunzytochemisch kein Oct4 (rot) bzw. SOX2 (rot) nachweisen. **(B)** Die durch die serumfreie Kultivierung generierten SD-KMSZ exprimierten im Zellkern immunzytochemisch nachweisbares Oct4 und SOX2. Als Negativ-Kontrollen wurden KMSZ-Kulturen nur mit den jeweiligen Sekundärantikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 10 µm)

### 3.12 Elektrophysiologische Untersuchung von SD-KMSZ

Ist die Expression neuraler und embryonaler Stammzellmarker mit besonderen elektrophysiologischen Eigenschaften gekoppelt? Um dieser Frage nachzugehen, wurden *patch-clamp*-Untersuchungen durchgeführt.

Zunächst war der Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von A-KMSZ und SD-KMSZ geplant. Die flache Morphologie der A-KMSZ verhinderte jedoch das Annähern mit der *Patchpipette* und die Erzeugung eines stabilen *Gigaseals*. Eine Aufnahme der elektrophysiologischen Eigenschaften war somit nicht möglich. In einer Veröffentlichung von Heubach und Kollegen wird das gleiche Problem beschrieben. Der Versuch, die Ströme auf Deckgläschen kultivierter humaner KMSZ aufzunehmen, schlug fehl, da sich Heubach und Kollegen mit der *Patchpipette* den Zellen ebenfalls nicht ausreichend nähern konnten. Erst die Behandlung mit Trypsin/EDTA löste das Problem. Die Zellen lösten sich ab und ermöglichten als runde Zellen den Kontakt mit der *Patchpipette* und somit auch die Messungen (Heubach et al., 2004). Auf eine solche Behandlung wurde hier verzichtet, da eine Identifizierung der A-KMSZ innerhalb der, ebenfalls abgelösten, übrigen Zellen nicht mehr möglich gewesen wäre.

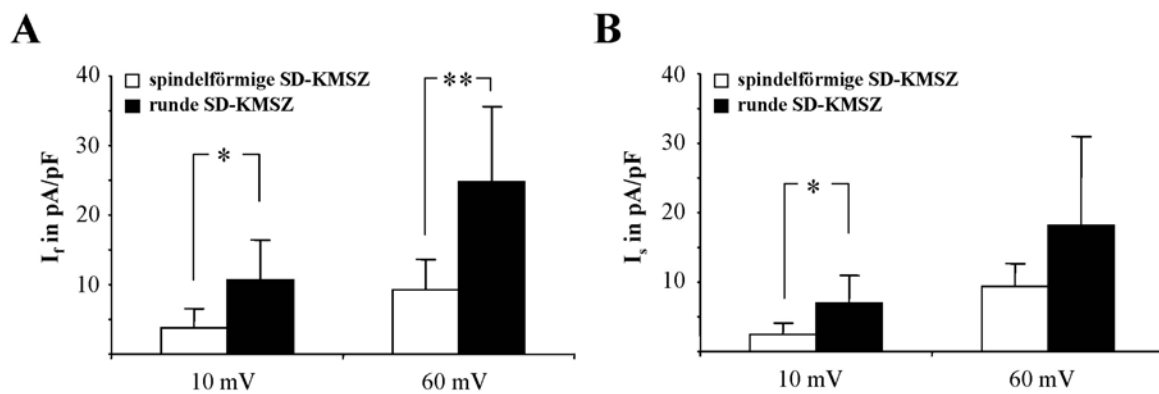


**Abb. 43: Voltage-Clamp-Aufnahmen von SD-KMSZ** (A) Typische Aufnahmen von spindelförmigen SD-KMSZ bzw. (B) runden SD-KMSZ. Das Haltepotenzial war  $E = -60$  mV und die Spannung wurde schrittweise um 10 mV mit einer Dauer von 250 ms von -100 mV auf +100 mV erhöht. Jede dritte Stromspur ist abgebildet. Der maximale Stromwert zwischen 2,5 ms und 50 ms wurde als  $I_{\text{fast}}$  ( $I_f$ ) definiert, der maximale zwischen 200 ms und 247,5 ms als  $I_{\text{slow}}$  ( $I_s$ ). (C) Exemplarische Abbildung der Strom-Spannungskurven einer spindelförmigen SD-KMSZ bzw. einer (D) runden SD-KMSZ. (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ )



Alle untersuchten SD-KMSZ wiesen deutliche Auswärtsströme und keine Einwärtsströme auf. Die Membranströme setzten sich üblicherweise aus einem schnell aktivierenden und langsam inaktivierenden, als  $I_{fast}$  ( $I_f$ ) bezeichneten Strom, gefolgt von einer aufrechterhaltenen Komponente einer langsamen Aktivierungskinetik,  $I_{slow}$  ( $I_s$ ), zusammen (Abb. 43 A+B).

Die Darstellung der Strom-Spannungs-Beziehung von  $I_f$  und  $I_s$  ließ Unterschiede in den Stromdichten sowie in der spannungsabhängigen Aktivierung von spindelförmigen und runden SD-KMSZ erkennen. Abbildung 43 zeigt repräsentative Beispiele für die Strom-Spannungskurven der spindelförmigen (Abb. 43 C) bzw. runden SD-KMSZ (Abb. 43 D). Die Auswärtsströme der spindelförmigen SD-KMSZ wurden bei ca. -20 mV aktiviert, während die der runden SD-KMSZ bereits bei -40 mV aktivierten. Darüber hinaus waren die durchschnittlichen Stromdichten von  $I_f$  und  $I_s$  bei Testpotenzialen von +10 mV und +60 mV in den runden SD-KMSZ signifikant höher als in den spindelförmigen SD-KMSZ (Abb. 44 A+B)



**Abb. 44:** (A)  $I_{fast}$  und (B)  $I_{slow}$  wurde bei Testpotenzialen von +10 mV und +60 mV analysiert und auf die Zellkapazität normalisiert \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; spindelförmige SD-KMSZ:  $n=5$ ; runde SD-KMSZ:  $n=6$ .

Testpotenziale von -100 mV bis +100 mV wurden bei Haltepotenzialen von -60 mV beziehungsweise -20 mV angewandt. Positivere Haltepotenziale resultierten in einer stärkeren und reversiblen Reduktion der schnellen Stromkomponente  $I_f$ . Die ist typisch für Kaliumströme vom A-Typ.

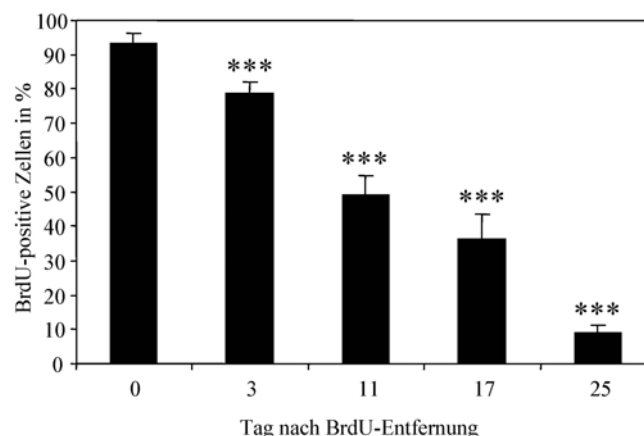
$I_f$  der runden SD-KMSZ zeigte eine deutlich stärkere Abhängigkeit vom Haltepotenzial, verglichen mit den spindelförmigen SD-KMSZ. Dies deutet auf eine stärkere Verbreitung des A-Typ-Kaliumstromes in den runden SD-KMSZ hin.

### 3.13 Stabilität einer Bromdesoxyuridin-Markierung zu Transplantationszwecken

In parallelen Transplantationsexperimenten wurden ischämie-geschädigte Ratten mit BrdU-markierten KMSZ behandelt. Die Transplantation der Zellen erfolgte ins geschädigte Hirnparenchym. Über BrdU-spezifische Antikörper sollten die transplantierten Zellen nach einem definierten Zeitraum wiedergefunden werden und auf die Expression von neuronalen Markerproteinen hin untersucht werden. Allerdings konnten bereits 7 Tage nach Transplantation keine BrdU-positiven Zellen mehr gefunden werden. Als Ursache wurde deshalb eine geringe Stabilität des inkorporierten BrdUs vermutet.

Bromdesoxyuridin inkorporiert während der S-Phase der Mitose in die DNS. Die Langzeitstabilität des inkorporierten BrdUs ist für die Wiederfindung der so markierten Zellen (z.B. nach Transplantation) von enormer Bedeutung. Zur Untersuchung der Langzeitstabilität in den hier verwendeten Ratten-KMSZ wurden diese Zellen markiert und über vier Wochen *in vitro* beobachtet. Dafür wurden KMSZ zunächst für vier Tage in Kulturmedien mit unterschiedlichen BrdU-Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte eine vierwöchige Kultivierung mit Standardmedium. Es erwies sich die höchste BrdU-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als am besten geeignet, um nach diesem Zeitraum noch BrdU-markierter Nuklei detektieren zu können. Aus diesem Grund wurden die Versuche für die im Folgenden erläuterten Ergebnisse mit dieser BrdU-Konzentration durchgeführt.

Zu definierten Zeitpunkten nach Entfernung des BrdU wurden Zellproben fixiert und immunzytochemisch gegen BrdU gefärbt. In Abbildung 45 ist die Abnahme des Anteils BrdU-markierter KMSZ von 93,4 %, unmittelbar nach Entfernung des BrdU (Tag 0), auf 8,9 % zu Versuchsende (Tag 25) dargestellt.

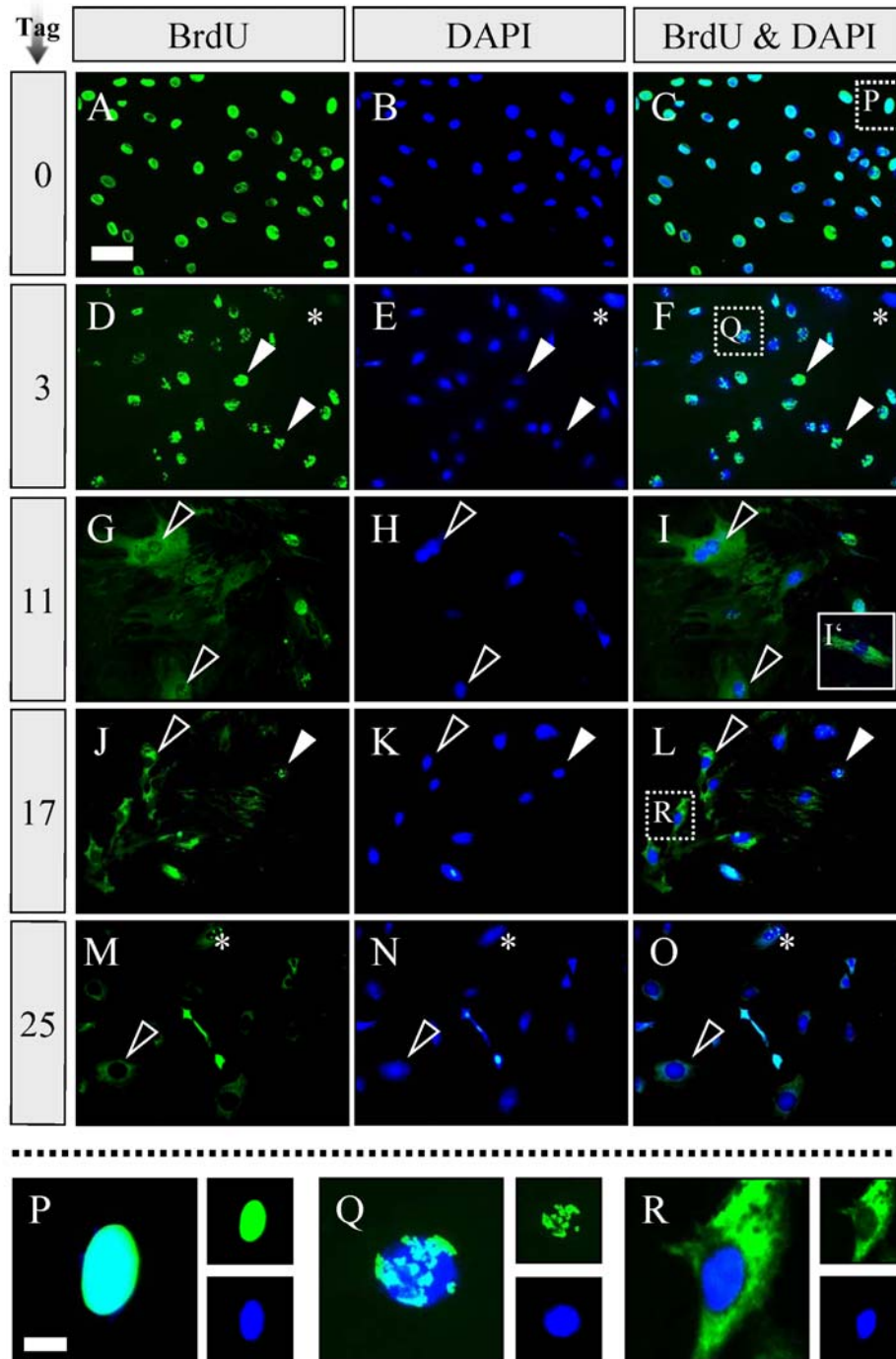


**Abb. 45: Quantifizierung des Anteils BrdU-positiver KMSZ über einen Zeitraum von 4 Wochen.** Die BrdU-positiven Zellen wurden gezählt und auf die Gesamtzellzahl bezogen. Unmittelbar nach Entfernung des BrdU aus dem Kulturmedium waren 93,4±2,9 % aller Zellen (n= 4.013) BrdU-positiv. Wie erwartet verringerte sich ihr Anteil während der weiteren Kultivierung. Nach drei Tagen betrug er 78,8±3,1 % (n=2.403), nach 11 Tagen 49,1±5,4 % (n=1.291) und nach 17 Tagen 36,3±7,0 % (n=913). Zu Versuchsende, fast vier Wochen nach BrdU-Markierung, konnten lediglich noch 8,9±2,4 % aller Zellen (n=1.516) als BrdU-markiert identifiziert werden. \*\*\* p < 0,001.

Da die Proliferation der KMSZ in BrdU-freiem Medium die Verteilung des BrdU auf die Tochterzellen zur Folge hat, war eine Verringerung der markierten Zellen zu erwarten.

Eine Betrachtung der markierten Zellen zeigte jedoch, dass sich auch das BrdU-Signal selbst verändert hatte. Die anfangs komplett markierten Nuklei (Abb. 46 A-C und P) wiesen bereits drei Tage nach Entfernung des Thymidin-Analogons eine nur noch segmentierte oder sogar punktierte Färbung auf (Abb. 46 D-F und Q). Die Zellen, die über einen Markierungsgrad von mindestens 75 % verfügten, wurden als segmentierte Zellen bezeichnet, die mit mindestens 50 % als punktierte Zellen. Entsprechend die BrdU-Färbung weniger als 50 % des Nukleus, wurden die Zellen als nicht mehr markiert eingestuft, da sie nach einer Transplantation nicht mehr mit Sicherheit als markierte Zelle identifizierbar gewesen wären. Am Tag 11 konnten Zellen mit einem markanten BrdU-Signal detektiert werden (Abb. 46 G-I). Die Nuklei dieser KMSZ wiesen im Grunde keine BrdU-Färbung auf. Stattdessen konnte im Zytoplasma BrdU nachgewiesen werden (Abb. 46 R). 25 Tage nach Entfernung des BrdU zeigten nahezu alle KMSZ ein BrdU-positives Zytoplasma, obwohl die Intensität des Signals im Vergleich zu Tag 11 schwächer war (Abb. 46 M-O). In nur noch wenigen Zellen ließ sich BrdU im Nukleus nachweisen (Abb. 46 M-O, Stern).

Um zu überprüfen, ob das zytoplasmatische BrdU-Signal in einem unspezifischen Binden des verwendeten Anti-BrdU-Primärantikörpers begründet war, wurden parallel markierte KMSZ mit einem anderen Anti-BrdU-Primärantikörper gefärbt. Dieser Ratte-anti-BrdU-Antikörper führte zu den gleichen Ergebnissen wie der eingangs eingesetzte Maus-anti-BrdU-Antikörper (Abb. 46 I')



**Abb. 46: Veränderung des BrdU-Signals in markierten KMSZ.** (A-C) Direkt nach viertägiger BrdU-Inkubation wiesen nahezu alle KMSZ einen homogen markierten Zellkern auf. Abbildung (P) zeigt eine vergrößerte Abbildung eines komplett markierten Zellkerns. (D-F) Bereits drei Tage später veränderte sich die Markierung von einem kompletten (*gefüllten*) zu einem *segmentierten* oder sogar *punktierten* Signal (weiße Pfeilspitzen). Abbildung (Q) zeigt einen vergrößerten Zellkern mit einem segmentierten BrdU-Signal. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich erste Zellen, die keine BrdU-Markierung aufwiesen (Stern). (G-I) Nach sieben Tagen BrdU-freier Kultivierung zeigten sich immer mehr Zellen mit unmarkierten Zellkernen, aber einer deutlichen BrdU-Färbung der Somata (schwarze Pfeilspitzen). Das eingefügte Bild (I') zeigt die Immunfärbung mit einem anderen anti-BrdU-Antikörper (Ratte anti-BrdU), um die Spezifität der Antikörper zu bestätigen und falsch-positive Färbungen der Somata auszuschließen. (J-L) Weitere sechs Tage später hatte der Anteil der Zellen mit markierten Somata (schwarze Pfeilspitzen) noch weiter zugenommen. Abbildung (R) zeigt eine repräsentative Zelle. Nur noch wenige KMSZ ließen sich mit eindeutig markiertem Zellkern (weiße Pfeilspitzen) nachweisen. (M-O) Zu Versuchsende, nach 25 Tagen, wies die Mehrheit der Zellen einen Zellkern ohne BrdU-Signal (schwarze Pfeilspitzen) auf. Eine nukleäre Immunfärbung ließ sich nur noch in Form einzelner Punkte nachweisen (Stern). (Maßstab: A-O 50 µm; P-R 20 µm)

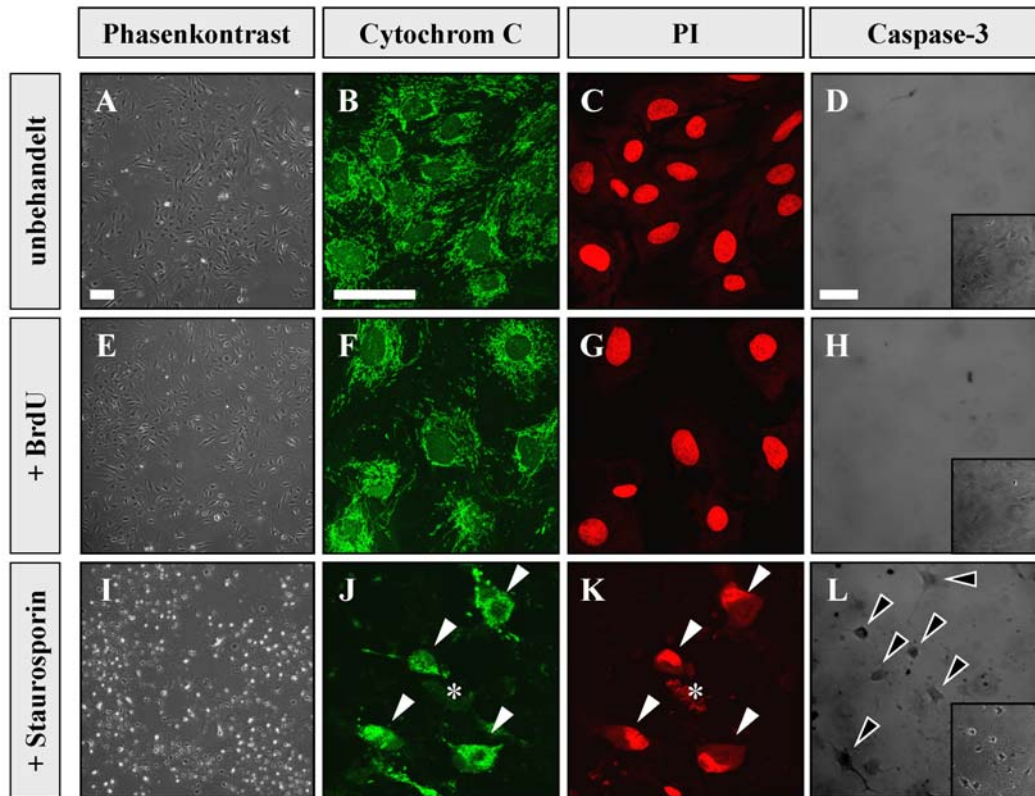
Des Weiteren musste die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Markierung mit 10  $\mu\text{M}$  BrdU einen Zelltod induziert und dieses der Grund für die Verringerung des Anteils BrdU-markierter KMSZ und die beschriebene Translokation des BrdU vom Nukleus ins Zytoplasma war.

Zu diesem Zweck wurden drei Gruppen von KMSZ auf die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und auf die Aktivierung von Caspase-3 untersucht. Unter Standardbedingungen kultivierte KMSZ stellten die Gruppe 1 dar. Gruppe 2 waren KMSZ, die entsprechend der vorherigen Experimente für vier Tage mit 10  $\mu\text{M}$  BrdU inkubiert wurden. Die KMSZ der Gruppe 3 wurden für 3 Stunden mit 2  $\mu\text{M}$  Staurosporin inkubiert und stellten die Positiv-Kontrolle für apoptotische Zellen dar.

Die BrdU-behandelten KMSZ-Kulturen (Abb. 47 E) wiesen keinerlei morphologische Veränderungen, verglichen mit den unbehandelten Kulturen (Abb. 47 A), auf. Sie verfügten über charakteristische vitale Nuklei, wie die Kernfärbung mit PI zeigte (Abb. 47 G). Cytochrom C ließ sich als feine Punkte im Zytoplasma der Zellen anfärben (Abb. 47 F), was auf eine Lokalisation in intakten Mitochondrien schließen ließ. Des Weiteren konnte keine signifikante Expression von aktivierter Caspase-3 festgestellt werden (Abb. 47 H). Die BrdU-behandelten KMSZ glichen in allen untersuchten Kriterien den unbehandelten Kontroll-KMSZ (Abb. 47 A-D) und wiesen keine Anzeichen für apoptotischen Zelltod auf (Kulkarni and McCulloch, 1994; Simm et al., 1997; Zhu et al., 2006).

Im Gegensatz dazu ließ sich in den Staurosporin-behandelten KMSZ Apoptose nachweisen. Die mikroskopische Betrachtung zeigte fragmentierte und stark kondensierte Zellkörper (Abb. 47 I) sowie Nuklei (Abb. 47 K). Darüber hinaus konnte Cytochrom C im Zytoplasma verteilt detektiert werden (Abb. 47 J), was auf eine Freisetzung aus den Mitochondrien hinweist. Aktivierte Caspase-3 konnte ebenso in vielen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 47 L).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass BrdU in der verwendeten Konzentration keinen Zelltod in KMSZ auslöst. Allerdings wird das BrdU durch Zellteilungen nach der Markierungsphase aus dem Genom „herausverdünnt“. Zusätzlich scheint es zu Reparaturprozessen zu kommen, die das BrdU aktiv aus der DNS ausschneiden und es in das Zytoplasma der Zelle transferieren. Beide Prozesse führen dazu, dass BrdU-markierte KMSZ nur innerhalb weniger Tage nach Transplantation im Gehirn der Rezipiententiere wiederzufinden sind.



**Abb. 47: Die Inkubation mit BrdU führte nicht zur Apoptose.** Verschiedene Parameter unmarkierter KMSZ (**A-D**), mit 10  $\mu$ M BrdU für 96 h inkubierte KMSZ (**E-H**) und KMSZ, die für 3 h mit 2  $\mu$ M Staurosporin inkubierten (**I-L**), wurden verglichen. Die unmarkierten (**A**) und BrdU-markierten (**E**) Zellen wiesen eine vergleichbare Zellmorphologie auf und verfügten über gleichmäßige, runde PI-gefärbte Zellkerne (**C+G**). Des Weiteren erscheint die Cytochrom C-Expression im Zytosol in abgegrenzten, strich- und punktförmigen Mustern (**B+F**). Dieses deutet auf eine Lokalisation innerhalb intakter Mitochondrien hin. Eine Expression aktivierter Caspase-3 ist nicht nachweisbar (**D+H**). Die eingefügten Bilder in **D**, **H** und **L** zeigen das Phasenkontrastbild des abgebildeten Bereiches. Die staurosporinbehandelten KMSZ zeigten eine starke Kondensierung der Somata (**I**) und enthielten kondensierte, stark gefaltete Zellkerne (**K**, weiße Pfeilspitzen). Cytochrom C ließ sich in den Somata dispers verteilt nachweisen (**J**, weiße Pfeilspitzen), was auf eine Freisetzung aus den Mitochondrien hinwies. Einige tote Zellen konnten lediglich noch anhand der PI-Färbung ihrer DNS detektiert werden (Sterne in **J+K**). Darüber hinaus exprimierten eine Vielzahl von staurosporinbehandelten KMSZ Caspase-3 (**L**, schwarze Pfeilspitzen). (Maßstab A, E, I 200  $\mu$ m; B, C, D, F, G, H, J, K, L 50  $\mu$ m)

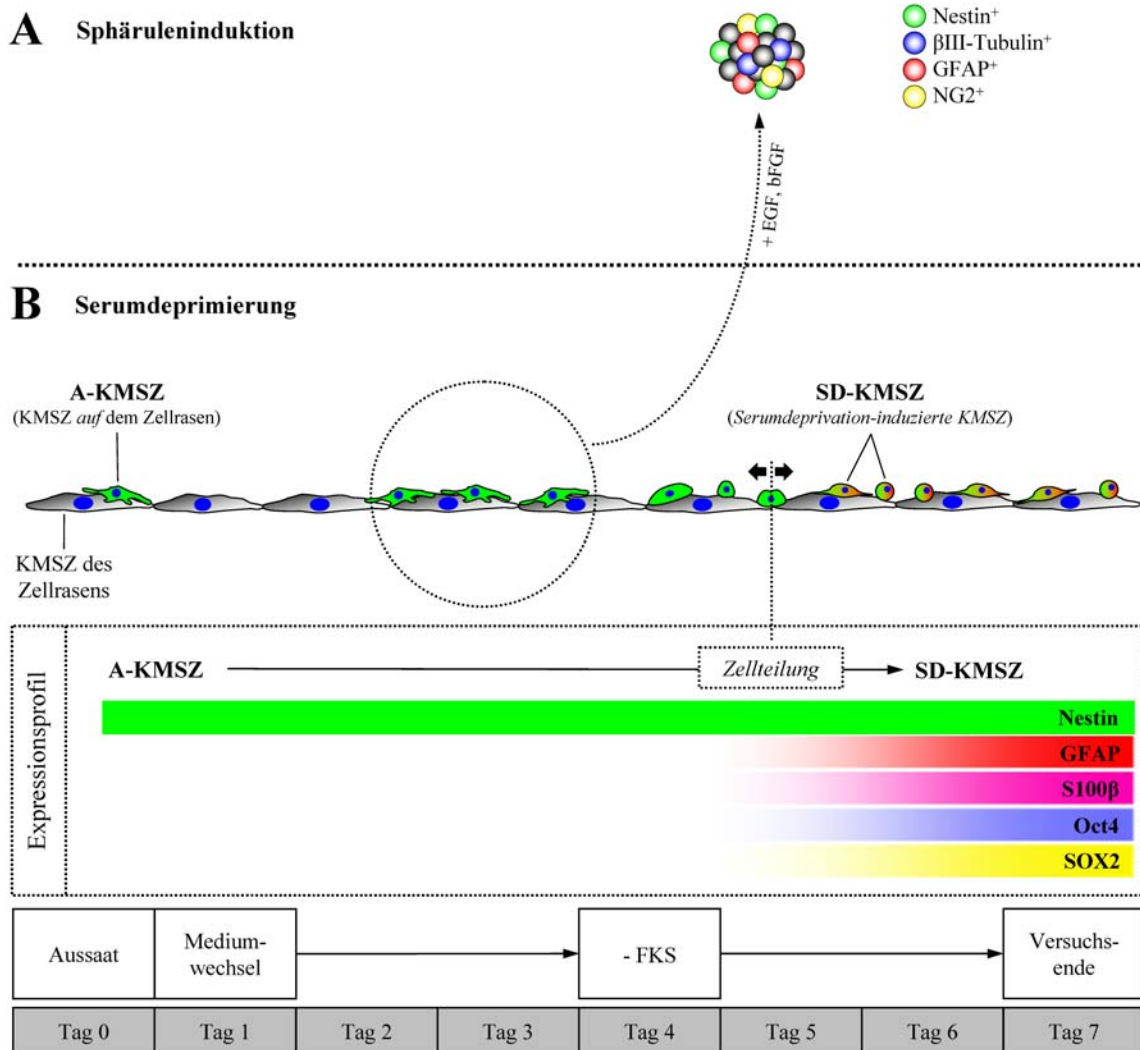
#### 4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Beantwortung der Frage, welchen Einfluss ein kompletter Entzug des Serums *in vitro* auf kultivierte Knochenmarkstammzellen (KMSZ) aus der Ratte ausübt. Es wurde vermutet, dass durch die Serumdeprivation eine potenziell existierende Subpopulation von neuroektodermalen Stammzellen identifiziert und angereichert werden kann. Eine Transplantation dieser Subpopulation von Stammzellen in Ratten nach induzierter fokaler Ischämie sollte in einer höheren Ausbeute an neural ausdifferenzierten Zelltypen resultieren, als es bei der Transplantation basal kultivierter KMSZ der Fall ist. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass murine KMSZ nach Transplantation – sei es direkt in das Gehirn neonataler oder durch intravenöse Applikation in adulte Mäuse – das Gehirn penetrieren, dort migrieren und darüber hinaus einen neuralen Phänotyp annehmen (Brazelton et al., 2000; Kopen et al., 1999; Mezey et al., 2000). Auch wurde *in vitro* demonstriert, dass unter geeigneten Kulturbedingungen humane, murine und Ratten-KMSZ in Zellen neuralen Phänotyps differenzieren können (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000).

Basierend auf diesen Erkenntnissen festigte sich die Idee, dass KMSZ, neben ihrer mesodermalen Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten, auch in neuroektodermale Zelltypen differenzieren können. Es ist für das zellbiologische Gesamtverständnis der Zelldifferenzierung von großer Bedeutung, auf welchem Mechanismus diese Plastizität beruht. Dieses Verständnis wird darüber hinaus großen Einfluss auf zukünftige Transplantationsstudien haben. Während die überwiegende Mehrheit der *in vitro*-Studien der letzten Jahre eine Transdifferenzierung als ursächlichen Prozess zu Grunde legte, fand das Konzept von stammzellartigen Subpopulationen innerhalb der kultivierten KMSZ in nur wenigen Studien Beachtung. Es ist ein allgemeines Phänomen, dass sich Proliferation und Differenzierung von Zellen in einem bestimmten Maß ausschließen. Zur Proliferation benötigen Zellen Serum. Viele Differenzierungsstudien, aber auch Studien, in denen Stammzellpopulationen identifiziert werden konnten, verwendeten Kulturmedien mit stark reduzierten Serumanteilen. Gleichzeitig fand jedoch oft eine Supplementierung der Medien mit Wachstumsfaktoren statt (D'Ippolito et al., 2004; Kucia et al., 2006a; Reyes et al., 2001; Roche et al., 2007; Tao et al., 2005; Wislet-Gendebien et al., 2003).

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten KMSZ aus Ratte wurden primär isoliert. Anhand immunzytochemischer Färbungen konnte bereits innerhalb der unter Standardbedingungen (= Basalbedingungen, d.h. 20 % FKS im Kulturmedium) kultivierten KMSZ eine Subpopulation von Nestin-positiven Zellen mit kleinen Somata identifiziert werden. Neben ihrer Nestin-Expression waren sie durch ihre Lokalisation *auf* dem Zellrasen aus KMSZ gekennzeichnet, weswegen sie die Bezeichnung „A-KMSZ“ erhielten. Darüber hinaus wiesen die A-KMSZ keine immunzytochemisch detektierbare Expression weiterer getesteter neuroektodermaler Markerproteine auf. Wurden die KMSZ-Kulturen in komplett serumfreiem Kulturmedium und ohne Zugabe jedweder Wachstumsfaktoren inkubiert, so kam es überraschenderweise zu einer selektiven Proliferation der

A-KMSZ. Ihre Nachkommen wiesen mit runden bzw. bipolar spindelförmigen Somata eine neue, von den Mutterzellen abweichende, Morphologie auf. Mit der Zellteilung änderte sich auch das Expressionsmuster der A-KMSZ. Die aus ihnen hervorgegangenen Tochterzellen exprimierten neben Nestin auch GFAP, S100 $\beta$ , Oct4 und SOX2 (Abb. 48) und damit Markerproteine, die typisch für neurale und embryonale Stammzellen sind. Da sich die Genese dieser Zellen auf die Serumdeprivation zurückführen ließ, wurden sie als „Serumdeprivation-induzierte KMSZ (SD-KMSZ)“ bezeichnet.



**Abb. 48: Induktion von Neurosphären bzw. SD-KMSZ aus Knochenmarkstammzellen der Ratte.** Die Kultivierung unter Standardbedingungen (d.h. 20 % FKS-Anteil) führt zur Vermehrung der KMSZ und der auf ihnen lokalisierten Nestin-positiven A-KMSZ. **(A)** Unter *low-attachment*-Bedingungen und Zugabe von EGF und bFGF lassen sich aus dieser Mischpopulation Neurosphären induzieren. In den Neurosphären sind Zellen nachweisbar, die neuroektodermale Markerproteine exprimieren. **(B)** Ein Serumentzug führt zur selektiven Proliferation der A-KMSZ unter Veränderung ihrer Morphologie und ihres Immunphänotyps. Die durch Serumentzug induzierten Tochterzellen der A-KMSZ, die SD-KMSZ, weisen eine runde bzw. bipolare Morphologie auf und ko-exprimieren Nestin, GFAP, S100 $\beta$ , Oct4 und SOX2.



#### 4.1 Kultivierung von Knochenmarkstammzellen

Zum angestrebten Zweck einer Transplantation in Ratten mit fokaler Ischämie wurden für diese Arbeit Knochenmarkstammzellen aus Ratten verwendet. Mögliche Abstoßungsprozesse, wie sie bei xenogenen Transplantationen von murinen ES-Zellen in ischämische Ratten beobachtet wurden und zum Abbau des Transplantats führten (Bühnemann et al., 2006), sollten so minimiert werden. Die KMSZ wurden in mehreren unabhängigen Präparationen (n=5) aus dem Knochenmark juveniler Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts gewonnen. Um individuenspezifische Unterschiede in der Zellqualität oder -quantität auszugleichen, wurden je Präparation 50 Ratten verwendet. Anhand ihrer selektiven Adhäsion an unbeschichteten Kunststoffoberflächen von Zellkulturflaschen konnten die KMSZ aus dem dissoziierten Knochenmark isoliert werden. Die so angelegten Kulturen enthielten KMSZ mit den in der Literatur beschriebenen typischen Morphologien: Große, flächige Zellen und fibroblastenähnliche, spindelförmige Zellen (Mets and Verdonk, 1981).

Die Untersuchungen wurden aus mehreren Gründen mit jungen Zellen (d.h. niedrige Passagenzahl) durchgeführt. Eine lange Kultivierung von Zellen, verbunden mit vielfacher Passagierung, erhöht das Risiko chromosomaler Aberrationen. Im Extremfall führt dies zu Zellen, die nur noch wenig mit den ursprünglich isolierten Zellen gemeinsam haben (Dominici et al., 2006). DiGirolamo und Kollegen zeigten, dass humane KMSZ-Kulturen mit steigender Passage ihre Multipotenz verlieren und so nicht mehr fähig sind, in Adipozyten zu differenzieren (DiGirolamo et al., 1999).

Darüber hinaus richtete sich der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung einer möglichen Subpopulation. Eine ausgedehnte Kultivierung der primär isolierten KMSZ über viele Passagen hätte jedoch zu ihrem Verschwinden führen können. Die auf eine Proliferation der KMSZ ausgelegten Kultivierungsparameter sind unter Umständen nicht geeignet, um Subpopulationen mit pluripotenten Eigenschaften überleben zu lassen. Die steigende Homogenität von KMSZ-Kulturen mit höheren Passagen (eigene Beobachtungen sowie (Bruder et al., 1997; Mets and Verdonk, 1981)) ist ein starkes Indiz dafür, dass nur ein Teil der ursprünglich isolierten Zellen überlebt. Außerdem ist eine langanhaltende Kultivierung von Stammzellen über viele Passagen wenig reproduzierbar und mit klinischen Anforderungen nur schwer vereinbar.

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Verwendung der Zellen der gesamten adhärennten Knochenmark-Fraktion. Wie eine Studie von D'Ippolito und Kollegen (D'Ippolito et al., 2004) demonstrierte, resultiert die Fraktionierung des Knochenmarks in einem signifikanten Absinken der Ausbeute an primitiven Progenitorzellen. Ein wesentlicher Aspekt für das Überleben und Differenzieren von Stamm- und Progenitorzellen ist deren Nische im umliegenden Gewebe. Diese Nische ist für hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark beschrieben worden (Whetton and Graham, 1999), gilt aber letztlich wohl für alle Stammzellen. Die *Time-Lapse*-Aufnahmen zeigen, dass sowohl A-KMSZ als auch die daraus entstandenen SD-KMSZ auf dem allgemeinen Zellrasen der übrigen KMSZ wuchsen. Beim Migrieren verließen sie sehr selten den Zellrasen und mieden den

Kontakt mit der unbewachsenen (PLL-beschichteten) Oberfläche des Kulturgefäßes. Dies deutet darauf hin, dass A-KMSZ und auch SD-KMSZ die restlichen Zellen als eine Art *Feeder*-Zellschicht benötigen. So war es uns nicht möglich, die SD-KMSZ abzulösen und auf zellfreie Untergründe zu transferieren. Dennoch wäre eine Fraktionierung, beispielsweise durch eine FACS-Sortierung, sinnvoll. Nach Aussortierung einzelner Zellen bestimmten Phänotyps ließe sich so deren Einfluss auf die basal existierenden A-KMSZ und die Bildung der SD-KMSZ untersuchen.

## 4.2 Induktion von Neurosphären aus Knochenmarkstammzellen

Als gemeinhin akzeptierter Test für den Nachweis von neuralen Stammzellen (NSZ) gilt das Neurosphärenprotokoll. Anfang der 1990er Jahre kultivierten Reynolds und Weiss murine striatale Zellen in serumfreiem Medium unter Zugabe von EGF. Die wenigen überlebenden Zellen (1,5 %) wurden als neurale Stammzellen bezeichnet. Sie formierten sich zu proliferierenden Zellclustern („Sphärulen“) und waren immunreaktiv für den neuroepithelialen Stammzellmarker Nestin (Reynolds and Weiss, 1992). Diese Effekte fanden sich lediglich in EGF-haltigem Medium und konnten nicht mit anderen Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, NGF) induziert werden. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die Kombination bzw. die sukzessive Gabe unterschiedlicher Wachstumsfaktoren einen starken Einfluss auf die Proliferation und terminale Differenzierung von neuroepithelialen Stammzellen hat (Cattaneo and McKay, 1990). Die Inkubation der EGF-generierten Sphärulen mit bFGF induzierte die Proliferation von zwei Progenitorzelltypen. Der bipotente Zelltyp differenzierte in Neurone und Astrozyten, während der zweite, ein unipotente Zelltyp, lediglich in Neurone differenzierte (Vescovi et al., 1993).

Um die Möglichkeit der Existenz von potenziellen NSZ zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit aus basal kultivierten Knochenmarkstammzellen neurosphären-ähnliche Strukturen erzeugt. Die Induktion erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll, mit dem es schon möglich war, aus basalen humanen KMSZ neurosphären-ähnliche Strukturen zu erzeugen (Hermann et al., 2004). Die Variationen beliefen sich dabei hauptsächlich auf die Zugabe von Serum (FKS) zum Induktionsmedium. Wurde dem Induktionsmedium kein Serum zugefügt, setzten sich nahezu alle Zellen, trotz der verwendeten Bakterienchalen mit gering adhäsiver Oberfläche (engl. *low attachment*), ab. Erst ein Anteil von 10 % FKS führte zur Bildung einiger Sphärulen. Zwar setzte sich auch unter diesen Bedingungen ein Großteil der Zellen ab, aber generell deutet die erfolgreiche Generierung von neurosphären-ähnlichen Strukturen darauf hin, dass innerhalb der basalen KMSZ-Kulturen Zellen vorhanden sein müssen, die mit neuralen Stammzellen vergleichbar sind. Die Ursache, weshalb erst die Zugabe von FKS die beschriebenen Effekte bewirkte, könnte in den unterschiedlichen Spezies liegen, aus denen die verwendeten KMSZ gewonnen wurden. Während Hermann und Kollegen humane Zellen untersuchten (Hermann et al., 2004), fanden in der

vorliegenden Arbeit Ratten-KMSZ Verwendung. Vescovi und Kollegen, die ebenfalls mit Zellen aus Nagern (Mäuse) arbeiteten, beschrieben, dass die Zugabe von 3 % FKS notwendig für eine volle Differenzierung war (Vescovi et al., 1993) – vermutlich, weil FKS zusätzliche Faktoren enthält, die eine Differenzierung begünstigen (Raff et al., 1984).

Die hier erzeugten Sphärulen enthielten neben Nestin-positiven Zellen auch Zellen, die Marker aller drei neuronalen Richtungen exprimierten ( $\beta$ III-Tubulin, GFAP, NG2). Es fiel auf, dass die positiven Zellen vorrangig in den Randbereichen der Neurosphären lokalisiert waren. Das kann daran liegen, dass die medial gelegenen Zellen nur unzureichend mit Wachstumsfaktoren aus dem Medium versorgt wurden und so nicht differenzieren konnten. Auch das Fehlen von Zellen im Zentrum der Sphärulen, insbesondere in denen größeren Durchmessers, deutet auf eine Mangelversorgung der innen gelegenen Zellen hin. Diese konnte, wie die Färbung der Zellkerne mit DAPI vermuten lässt, ein Absterben dieser Zellen zur Folge gehabt haben. Es könnte aber auch eine intrinsische Aktivität von Sphärulen reflektieren, sich in eine bestimmte Richtung zu entwickeln, wobei die Zellen von innen nach außen wandern und dabei eine Differenzierung durchlaufen. Das Zellgebilde der Sphärulen wäre somit eine Art Nische für diese Differenzierung. Dies hätte Analogien zur ontogenetischen Weiterentwicklung einer Morula.

Im Gegensatz zu Hermann und Kollegen (Hermann et al., 2004) konnten in dieser Arbeit GFAP-positive Zellen in den Neurosphären nachgewiesen werden. Dieser Unterschied könnte erneut in den verschiedenen eingesetzten Spezies begründet oder auf die Verwendung von FKS im Induktionsmedium zurückzuführen sein.

Eine mögliche terminale Differenzierung der Knochenmarkstammzellen nach Induktion der Neurosphären wurde hier nicht weiter verfolgt. Vielmehr interessierten die Ursachen für die Sphärulbildung, wobei die Expression von Nestin eine wesentliche Rolle spielt. Wislet-Gendebien und Kollegen beschrieben in einer Studie an Ratten-KMSZ, dass diese nur Neurosphären generierten, nachdem eine Nestin-Expression induziert wurde. Nestin-negative KMSZ verblieben unverändert als Einzelzellen in Suspension (Wislet-Gendebien et al., 2003). Da wir mit basalen (undifferenzierten) KMSZ arbeiteten, untersuchten wir diese folgerichtig auf das Vorhandensein von Nestin-positiven Zellen.

### 4.3 Neuroektodermaler Immunphänotyp der Knochenmarkstammzellen unter basalen Bedingungen

Die Expression verschiedenster neuraler Marker durch KMSZ wurde bereits von anderen Gruppen gezeigt, allerdings häufig nur mit Methoden wie Western-Blot, FACS oder RT-PCR (Blondheim et al., 2006; Bossolasco et al., 2005; Tondreau et al., 2004). Für die vorliegende Arbeit wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt, um gezielt positive Zellen auch morphologisch beurteilen zu können. Außer auf die Expression von Nestin wurden die basalen KMSZ auch auf die Expression diverser anderer neuronaler (PSA-NCAM,  $\beta$ III-Tubulin, MAP-2, NeuN, NF200), glialer (GFAP, S100 $\beta$ ) und oligodendrogialer (O4, NG2, CNPase) Markerproteine untersucht. Eine Verunreinigung der basalen KMSZ-Kulturen durch hämatopoetische Stammzellen konnte durch anti-CD45-Immunfärbungen ausgeschlossen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass KMSZ-Kulturen bereits unter Standardkulturbedingungen Zellen enthalten, die Nestin und  $\beta$ III-Tubulin exprimieren. Nestin, ein Klasse-IV-Intermediärfilament, ist, obwohl auch außerhalb von Nervengewebe nachgewiesen (About et al., 2000; Li et al., 2003; Mokry and Nemecek, 1998; Toma et al., 2001; Wiese et al., 2006; Zulewski et al., 2001), gemeinhin als Marker für neurale Stammzellen und sich entwickelndes Nervengewebe (Dahlstrand et al., 1995; Frederiksen and McKay, 1988; Frisen et al., 1995; Gallo and Armstrong, 1995; Lendahl et al., 1990; Tohyama et al., 1992) anerkannt. Auch bei Ratten-KMSZ scheint eine Nestin-Expression die Voraussetzung dafür zu sein, in astrozytäre oder neuronale Zellen differenzieren zu können (Wislet-Gendebien et al., 2003; Wislet-Gendebien et al., 2004; Wislet-Gendebien et al., 2005a; Wislet-Gendebien et al., 2005b). In den Studien von Wislet-Gendebien und Kollegen konnte jedoch, anders als in der vorliegenden Arbeit, eine Nestin-Expression in KMSZ nur durch Serumentzug an Zellen in hohen Passagen induziert werden (Wislet-Gendebien et al., 2003). Ob die Entfernung des Serums dabei wirklich ausschlaggebend war, bleibt unklar. So wurde das Serum gegen verschiedene neurogene Zusätze (F12, N2, B27) ausgetauscht, eine reine serumfrei kultivierte Gruppe fehlte. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit, unseres Wissens nach zum ersten Mal, aufgrund der Verwendung immunzytochemischer Färbungen nachgewiesen werden, dass Nestin unter Standardkulturbedingungen in zwei morphologisch komplett unterschiedlichen KMSZ-Typen exprimiert wird: a) in großflächigen Zellen, die stark an die induzierten Nestin-positiven KMSZ von Wislet-Gendebien und Kollegen erinnern (Wislet-Gendebien et al., 2003) und b) in kleinen Zellen, die typischerweise oben auf dem allgemeinen Zellrasen der restlichen KMSZ wachsen. Aufgrund ihrer Lokalisation *auf* dem Zellrasen erhielten diese kleinen KMSZ die Bezeichnung „A-KMSZ“. Interessanterweise ähnelten die A-KMSZ in Form und Größe humanen neuralen Progenitorzellen, wie sie in einer Publikation von Piper und Kollegen gezeigt wurden (Piper et al., 2000). Die  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen besaßen eine ähnliche Morphologie wie die großflächigen Nestin-positiven KMSZ. Allerdings konnten keine doppelmarkierten Nestin- $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen detektiert werden.

Das Zytoskelettprotein  $\beta$ III-Tubulin ist ein Marker junger, unreifer Neurone. Außerdem wird es in einigen mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und ist während der fötalen und postnatalen Hirnentwicklung nachweisbar (Doetsch et al., 1997; Lee et al., 1990; Menezes and Luskin, 1994). Es war leicht zu erkennen, dass die Morphologie der  $\beta$ III-Tubulin positiven MSC nicht mit der Morphologie  $\beta$ III-Tubulin-exprimierender junger Neurone übereinstimmte (Braun et al., 2006; Braun et al., 2002). Welche Rolle letztlich die großflächigen Nestin-positiven und die großflächigen  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen innerhalb einer KMSZ-Kultur spielen, muss offen bleiben.

Da Nestin in neuralen Stammzellen bzw. Progenitorzellen des Hippokampus und der Subventrikulärzone gemeinsam mit GFAP exprimiert wird (Couillard-Despres et al., 2005; Doetsch et al., 1999; Filippov et al., 2003; Fukuda et al., 2003), wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf eine mögliche Ko-Expression beider Proteine gelegt. GFAP gilt anerkanntermaßen als Marker reifer Astrozyten. Dennoch findet sich in einer großen Zahl von neugebildeten Zellen der Subgranulärzone des Hippokampus ebenfalls eine GFAP-Expression (Eckenhoff and Rakic, 1988). In einer Studie von Dötsch und Kollegen wurde gezeigt, dass neugebildete Neurone von GFAP-exprimierenden Zellen abstammen (Doetsch et al., 1997). Unter Verwendung transgener Mäuse konnten Garcia und Kollegen demonstrieren, dass GFAP-exprimierende Zellen die prinzipielle Quelle der Neurogenese im Vorderhirn sind (Garcia et al., 2004). Die Nestin-GFAP-exprimierenden Zellen stimmen in einigen Charakteristika mit embryonalen radialen Gliazellen überein (Cameron et al., 1993; Levitt and Rakic, 1980), welche als neuronale Progenitoren während der embryonalen Entwicklung fungieren (Hartfuss et al., 2001). Letztlich müssen wohl aber die Nestin-GFAP-exprimierenden Zellen eher als Progenitor- denn als Stammzellen gesehen werden, denn in einer Studie von Bull und Bartlett konnte nicht gezeigt werden, dass diese Zellen zur Selbsterneuerung fähig sind (Bull and Bartlett, 2005).

Allerdings zeigte sich in den Untersuchungen, dass weder die Nestin-exprimierenden A-KMSZ noch die anderen KMSZ unter Basalbedingungen GFAP oder einen der anderen untersuchten neuronalen Marker exprimierten. Andere Publikationen (Blondheim et al., 2006; Tondreau et al., 2004) beschrieben zwar entsprechende Expressionen, zum Teil auch auf dem Proteinlevel (Lamoury et al., 2006), diese konnte hier aber nicht bestätigt werden.

#### 4.4 Auswirkungen des Serumentzuges

Es ist ein allgemein anerkanntes Phänomen, dass sich Proliferation und Differenzierung von Zellen in einem bestimmten Maß ausschließen. Während zur Proliferation der Zellen Serum zugefügt wird, lässt sich durch Absenken der Serumkonzentration die Differenzierungspotenz von KMSZ erhöhen (Reyes et al., 2001; Roche et al., 2007). In vielen Differenzierungsstudien wurde die Serumkonzentration reduziert, gleichzeitig wurden aber unterschiedliche Wachstumsfaktoren zugesetzt (Bossolasco et al., 2005; Hermann et al., 2006b; Lei et al., 2007; Mannello and Tonti, 2007; Ulloa-Montoya et al., 2005; Wislet-Gendebien et al., 2003). So gibt es in diesem Kontext interessanterweise bis zum heutigen Tag lediglich eine Publikation, die die Auswirkungen eines reinen Serumentzuges auf KMSZ untersucht hat (Pochampally et al., 2004). Dabei wurden humane KMSZ in einer niedrigen Passage komplett ohne Serum, Wachstumsfaktoren oder andere Zusätze über einen Zeitraum von 2 bis 4 Wochen kultiviert. Obwohl viele der Zellen apoptotisch und nekrotisch wurden, überlebte ein Teil der Zellen die Prozedur und war sogar in der Lage, unter anschließenden serumhaltigen Konditionen weiter zu proliferieren. Die überlebenden Zellen wurden als serumdeprivierte Zellen (SD-Zellen) bezeichnet. Sie wiesen längere Telomere sowie eine verstärkte Expression von Genen (z.B. Oct4) auf, die vorrangig in frühen Progenitorzellen exprimiert werden.

Wie erwartet, führte der Serumentzug in der vorliegenden Studie auch zu einem starken Rückgang der allgemeinen Zellproliferation. Etliche Zellen starben, zu erkennen an den Zelltrümmern im Medium. Durch den verhältnismäßig kurzen Serumentzug (3 Tage) kam es jedoch nicht zu einem solch massiven Zelltod, wie von Pochampally und Kollegen beschrieben. Möglicherweise lag es auch daran, dass im Vergleich zu Pochampally und Kollegen mit konfluenten Kulturen gearbeitet wurde. Der schädigende Einfluss des Serumentzuges könnte so durch den dichteren Zellverband teilweise kompensiert worden sein, was ein geringeres Zellsterben zur Folge hatte.

Die Verwendung der *Time-Lapse*-Mikroskopie ermöglichte es, die durch den Serumentzug induzierten Vorgänge auf Einzelzellebene zu analysieren. Anhand ihrer charakteristischen Morphologie und ihrer Lokalisation auf dem Zellrasen ließen sich die basal existierenden A-KMSZ klar identifizieren. Unter Basalbedingungen proliferierten sie in Zellen mit gleicher Morphologie. Wie die *Time-Lapse*-Aufnahmen im Weiteren zeigen, hielten sich sowohl die A-KMSZ als auch ihre Tochterzellen vorrangig auf anderen Zellen bzw. auf dem Zellrasen auf. Sie migrierten zwar auch auf zellfreie Areale, verblieben dort jedoch nur kurz. Damit unterschieden sie sich grundlegend von den restlichen KMSZ der Kulturen, welche sie offensichtlich als *Feederzellen* benötigen. Während der serumfreien Kultivierung (Serumdeprivation) jedoch proliferierten die A-KMSZ nahezu selektiv und generierten Tochterzellen mit einer komplett anderen Morphologie. Die Tochterzellen der A-KMSZ hatten eine runde bis bipolar spindelförmige Morphologie und exprimierten ausnahmslos Nestin. Mit dieser Morphologie ähnelten sie den GFAP-positiven neuronalen Progenitorzellen, die Garcia und Kollegen in der Subgranulärzone muriner Hirne nachgewiesen haben (Garcia et al., 2004). Pochampally und

Kollegen (Pochampally et al., 2004) beschrieben ihre serumdeprivierten Zellen als groß und gealtert erscheinend. Kleine runde bzw. bipolare Zellen wurden nicht erwähnt. Das lässt die Frage offen, ob es in der Studie nicht zu einer derartigen Generierung kam oder man ihrem Erscheinen keine Bedeutung zusprach.

Neben der Veränderung ihrer Morphologie veränderte sich mit der Zellteilung während der serumfreien Kulturperiode auch der Immunphänotyp der Zellen. Die Tochterzellen exprimierten neben Nestin auch GFAP, S100 $\beta$ , Oct4 und SOX2. Das S100-Protein ist ein Kalzium bindendes und im Nervensystem von Wirbeltieren weit verbreitetes Protein (Calissano et al., 1969; Herschman et al., 1971; Kessler et al., 1968; Moore, 1965). Die  $\beta$ -Form des S100-Proteins ist vorrangig im Zytoplasma von Astrozyten des Säugerhirns lokalisiert (Haan et al., 1982; Zimmer and Van Eldik, 1987). Wurde das Medium an Tag 4 anstatt gegen serumfreies Medium gegen serumhaltiges Standardmedium ausgetauscht, kam es lediglich zu einer generellen Proliferationssteigerung aller Zellen, ohne dass die A-KMSZ in die Zellen besagter Morphologie proliferierten oder neben Nestin noch andere neurale Marker exprimierten. Da sich die Entstehung der runden bzw. bipolaren Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>/S100 $\beta$ <sup>+</sup>/Oct4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup> Zellen somit zweifelsfrei auf den Serumentzug zurückführen ließ, wurden sie als „Serumdeprivation-induzierte Knochenmarkstammzellen (SD-KMSZ)“ bezeichnet.

Durch Zugabe von BrdU zum serumfreien Kulturmedium und anschließende immunzytochemische Färbung konnte gezeigt werden, dass die SD-KMSZ ausnahmslos durch Proliferation während der Serumdeprivation entstanden sind.

#### 4.5 SD-KMSZ exprimieren Marker von neuronalen und embryonalen Stammzellen

Die SD-KMSZ exprimieren gleichzeitig Nestin, GFAP und S100 $\beta$ , ein Expressionsmuster mit auffälligen Ähnlichkeiten zu dem von neuronalen Stammzellen. Darüber hinaus konnte aber mit Oct4 und SOX2 die Expression von Markerproteinen in den SD-KMSZ nachgewiesen werden, die typisch für embryonale Stammzellen sind. Ein weiteres Indiz für die neuronalen Progenitorzell-Eigenschaften ist die runde bzw. bipolare Morphologie der SD-KMSZ. So beschreibt eine Studie (Bibel et al., 2004) die Generierung einer homogenen Population von neuronalen Vorläuferzellen aus murinen ES-Zellen. Diese Vorläufer weisen eine bipolare, spindelförmige Morphologie auf und sind nahezu alle positiv für Nestin sowie die radialen Glia-Marker RC2, BLBP und Pax-6 (Hartfuss et al., 2001; Malatesta et al., 2003). Pax-6 ist ein Transkriptionsfaktor und wird während der embryonalen Entwicklung in Vorläuferzellen gebildet. Er spielt sowohl bei der Regulierung der Proliferation als auch der Festlegung auf die neuronale Entwicklung eine entscheidende Rolle (Englund et al., 2005; Götz et al., 1998). Pax-6-positive Zellen ko-exprimieren GFAP und Nestin (Maekawa et al., 2005; Nacher et al., 2005). Die SD-KMSZ der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls auf die Expression von Pax-6-Protein untersucht, allerdings konnte es nicht detektiert werden. Interessanterweise erhielten Bibel und Kollegen die genannten Zellen erst, nachdem sie die ES-Zellen als Sphärulen in Retinsäure-haltigem Medium kultiviert hatten.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Lamoury et al., 2006) konnten bereits in basalen KMSZ-Kulturen Oct4 und darüber hinaus auch SOX2 nachgewiesen werden. Da die Menge jedoch sehr gering war, gelang dies, anders als bei Lamoury und Kollegen, nicht auf Proteinebene, sondern lediglich auf mRNA-Ebene. Die Abbildungen in der besagten Studie von Lamoury und Kollegen lassen jedoch offen, ob es sich um falsch-positive Immunreaktionen handelt. Während Oct4 als Transkriptionsfaktor kernlokalisiert ist, zeigen die Abbildungen Oct4-positive Zellkörper. Ein Nachweis von SOX2 erfolgte bei Lamoury und Kollegen nicht. Der dreitägige Serumentzug in der vorliegenden Arbeit hatte eine Erhöhung der mRNA-Expression von Oct4 bzw. SOX2 um das sechs- bzw. das 38fache zur Folge, wie die durchgeführte qRT-PCR zeigte. Eine vergleichende Bestimmung der mRNA von ES-Zellen war nicht möglich, da bedauerlicherweise keine ES-Zellen zur Verfügung standen. Anhand einer solchen Messung hätte die Stärke der Oct4- bzw. SOX2-Induktion beurteilt werden können. Dennoch führte der Serumentzug zu einer ausreichend starken Induktion von Oct4 und SOX2, so dass beide Proteine nun auch immunzytochemisch nachweisbar waren. So konnten die Oct4- bzw. SOX2-Expression immunzytochemisch den SD-KMSZ zugeordnet werden (Abb. 42, Seite 73). Eine erhöhte Oct4-Expression nach Serumentzug wurde auch von Pochampally und Kollegen beschrieben, doch haben sie diese lediglich mittels RT-PCR ermittelt und konnten sie daher keinem bestimmten Zelltyp zuordnen (Pochampally et al., 2004). Roche und Kollegen (Roche et al., 2007) argumentieren in ihrer Studie, dass das Mikro-Milieu bzw. eine „Nische“ von erheblicher Bedeutung für den Differenzierungsprozess von KMSZ ist. Sie stellen die Hypothese auf, dass eine



geringe Serumkonzentration in Kombination mit geeigneten Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF) eine Re-Expression embryonaler Faktoren auslöst und so die KMSZ in einen undifferenzierten Status versetzt. Sie demonstrierten, dass die humanen KMSZ nach Inkubation in Medium mit einem Serumanteil von 10 % nur sehr geringe Level von Oct4 (mittels RT-PCR bestimmt) exprimierten. Ein zweites untersuchtes Gen, Rex-1, wurde gar nicht exprimiert. Die Inkubation mit einem abgesenkten Serumanteil (2 %) führte allerdings zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von Oct4 und Rex-1.

#### **4.6 Die Bedeutung verschiedener Markerproteine für den Stammzellcharakter der Zellen**

Während der Entwicklung eines Organismus' wird das Schicksal der Zellen von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Diese wirken als molekulare Weichen, indem sie die Expression bestimmter Gene aktivieren oder unterdrücken. Der Transkriptionsfaktor Oct4 (*octamer binding transcription factor 4*), auch bekannt als POU5F1, wird in embryonalen Stammzellen und Keimzellen exprimiert und gilt als einer der wichtigsten Marker für die Pluripotenz von Stammzellen (Nichols et al., 1998; Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990). Oct4 ist für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und so für die Fähigkeit zur Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verantwortlich (Niwa et al., 2000). Während der Differenzierung der ES-Zellen wird Oct4 herunterreguliert (Pesce et al., 1998), ist aber mindestens bis zum Blastozystenstadium nachweisbar (Abdel-Rahman et al., 1995). Es übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Spezifizierung der pluripotenten Stammzellen der Inneren Zellmasse. Murine Oct4-defiziente Zygoten waren nicht fähig, das reife Blastozystenstadium zu erreichen (Boiani and Schöler, 2005; Hay et al., 2004). In verschiedenen Genen wurden Bindungsstellen für Oct4 lokalisiert, darunter FGF4 (*fibroblast growth factor 4*) und PDGF (*platelet-derived growth factor*). Vier der bekannten Oct4-Ziel-Gene wurden als erforderlich für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz identifiziert: SOX2 (*SRY-related HMG BOX gene 2*), Utf1 (*undifferentiated transcription factor 1*), Rex-1 (*restricted expression 1*; auch bekannt als Zfp42, *zinc-finger protein 42*) und Nanog (Ben-Shushan et al., 1998; Kuroda et al., 2005; Nishimoto et al., 1999; Okuda et al., 1998; Okumura-Nakanishi et al., 2005). SOX2 ist nicht nur ein Ziel-Gen für Oct4, sondern auch ein transkriptionaler Ko-Faktor. Er wird in ES-Zellen und darüber hinaus in neuralen Zellen exprimiert. Zusammen mit Oct4 bildet er einen Komplex und reguliert auf diese Weise die Genexpression (Schulz and Hoffmann, 2007; Tomioka et al., 2002). Von SOX2 sowie den eng verwandten Genen SOX1 und SOX3 ist außerdem bekannt, dass eine konstitutive Expression sowohl notwendig als auch ausreichend ist, um die Ausdifferenzierung neuraler Stammzellen zu inhibieren (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). SOX1-3 sind daher

universell in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen des gesamten Zentralen Nervensystems von Wirbeltieren zu finden (Bylund et al., 2003; Pevny et al., 1998; Uwanogho et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit führte der komplette Serumentzug auch zur Hochregulierung der Expression von *c-myc* und *klf4* (*krüppel-like factor 4*). *C-myc* und *klf4* tragen zur Langzeiterhaltung des ES-Zell-Phänotyps bei und unterstützen die schnelle Proliferation von ES-Zellen in Kultur (Cartwright et al., 2005; Li et al., 2005; Yamanaka, 2007). Die Bedeutung dieser Marker für die Potenz von Stammzellen zeigte sich in jüngsten Studien, in denen Fibroblasten durch Überexpression der Gene *Oct4*, *SOX2*, *klf4* und *c-myc* zu pluripotenten Stammzellen mit Eigenschaften von ES-Zellen induziert wurden (engl. *induced pluripotent stem cells, iPS cells*) (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007). Diese induzierten pluripotenten Stammzellen sind momentan ein zentrales Objekt der Stammzellforschung. Schließlich zeigt sich an ihnen, dass durch die Überexpression von wenigen Schlüsselgenen eine Art Reprogrammierung von Fibroblasten zu pluripotenten Stammzellen möglich ist. Und genau diese vier Markergene sind in den hier beschriebenen SD-KMSZ im Vergleich zu den restlichen KMSZ hochreguliert. Hochinteressant ist in diesem Zusammenhang, dass serumfreie Konditionen die Reprogrammierung der Fibroblasten beschleunigen (Blelloch et al., 2007). Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der hier durchgeführte Serumentzug offensichtlich eine Reprogrammierung von Nestin-positiven KMSZ in Zellen mit pluripotenten Eigenschaften auslöst.

#### 4.7 Mögliche Subpopulationen pluripotenter Stammzellen im Knochenmark

Die Hochregulierung der Expression der erläuterten Marker deutete darauf hin, dass die durch Serumentzug induzierten SD-KMSZ einen neuroektodermalen und embryonalen Stamm- bzw. Progenitorzellcharakter haben. In der Literatur finden sich nur wenige Studien, die innerhalb des Knochenmarks Subpopulationen mit vergleichbaren Stammzeleigenschaften identifizieren konnten.

D'Ippolito und Kollegen isolierten aus humanem Knochenmark pluripotente Stammzellen, die sie als *marrow-isolated adult multilineage inducible cells* (MIAMI-Zellen) bezeichneten (D'Ippolito et al., 2004). Das Knochenmark wurde aus den Thorax- und Lumbalwirbeln gesunder verstorbener Spender (3-72 Jahre) innerhalb von zwei Stunden nach deren Herzstillstand gewonnen. Vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit wurde das gesamte Knochenmark – die adhärente und nicht-adhärente Fraktion – kultiviert. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (3 % O<sub>2</sub>) und einem geringen Serumanteil (5 %) im Kulturmedium führte zur Isolierung der MIAMI-Zellen. Die Autoren beschreiben die Isolierung auf diese Weise als um 100 % erfolgreicher, als wenn auf gleiche Weise durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniertes Knochenmark kultiviert wurde. Die anschließende Expansion der MIAMI-Zellen erfolgte mit nur noch 2 % Serum. Darüber hinaus wurden keinerlei Wachstumsfaktoren o.ä. dem Kulturmedium zugesetzt. Kulturen von MIAMI-Zellen aller 12 Spender waren CD45-negativ und exprimierten neben spezifischen Markern der drei Keimblätter auch Oct4, Rex-1 und hTERT. Interessanterweise ließ sich jedoch nur in den MIAMI-Zellen eines einzigen jungen Spenders (7 Jahre) die Differenzierung in Zelltypen der drei Keimblätter induzieren. Die neurale Differenzierung erzielten die Autoren über eine sequenzielle Induktion. Diese begann mit der „neuronalen Spezifizierung“ durch eine 24stündige Inkubation in DMEM-HG 20 % FKS 10 ng/ml bFGF. Einige der Zellen nahmen die bipolare, spindelförmige Morphologie neuraler Zellen an und exprimierten Nestin und GFAP. Markerproteine reiferer neuronaler Differenzierungsstadien (βIII-Tubulin, NF160, NeuN) konnten zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Die nächsten Schritte bestanden in der zweitägigen Inkubation in DMEM-HG mit 1 mM BME und 10 ng/ml NT-3 („neurale Festlegung“) und darauf folgend in DMEM-HG mit 10 ng/ml NT-3, 10 ng/ml NGF und 50 ng/ml BDNF für bis zu sieben Tage („neurale Differenzierung“). Nach erfolgter Differenzierung exprimierten die Zellen reife neuronale Markerproteine und waren in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften nicht von reifen Neuronen zu unterscheiden. Eine endodermale Differenzierung der MIAMI-Zellen in Inselzellen wurde mit einem ebenfalls sequenziellen Protokoll erreicht.

Inwiefern die SD-KMSZ mit den MIAMI-Zellen vergleichbar sind, bleibt gegenwärtig unklar. Die Gewinnung beider Zelltypen ähnelt sich zwar in dem wesentlichen Punkt der geringen Serumkonzentration bzw. des Serumentzuges, weicht jedoch in der Sauerstoffkonzentration voneinander ab. Diese wird als essentieller Aspekt der Isolierung und Expansion der MIAMI-Zellen beschrieben, um so weit wie möglich Bedingungen zu schaffen, die an die *in vivo*-Nische der meisten primitiven Stammzellen erinnert (Chow et al., 2001; Cipolleschi et al., 1993). Neben einer Oct4-

Expression, ähnlich den SD-KMSZ, weisen MIAMI-Zellen auch eine Expression von Rex-1 und hTERT auf, Marker, die von uns nicht untersucht wurden. Die Expression von SOX2, c-myc und klf4 wurde in den MIAMI-Zellen nicht untersucht. Des Weiteren konnten in Kulturen von MIAMI-Zellen erst nach dem ersten Schritt der neuronalen Differenzierung Zellen mit bipolarer, spindelförmiger Morphologie festgestellt werden, die Nestin und GFAP exprimierten.

Dass auch mit einer initialen Fraktionierung von Knochenmark pluripotente Zellen aus diesem isoliert werden können, zeigen die Studien über *multipotent adult progenitor cells* (MAPC) (Jiang et al., 2002a; Reyes et al., 2001; Zhao et al., 2002) und *very small embryonic-like* (VSEL) *stem cells* (Kucia et al., 2006a). MAPC sind eine CD45-negative, GlyA-positive Fraktion von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark. Sie sind bislang die einzigen aus dem Knochenmark stammenden Zellen, an denen nachgewiesen wurde, dass sie fähig sind, *in vivo* nach Injektion in die Blastozyste zur Bildung aller drei Keimblätter beizutragen (Jiang et al., 2002a). Die Isolierung der MAPC erfolgte durch eine initiale Dichtegradienten-Zentrifugation des Knochenmarks gesunder Spender (2-50 Jahre) mit Ficoll-Paque. Aus der resultierenden mononukleären Zellfraktion wurden die CD45<sup>+</sup>/GlyA<sup>+</sup> Zellen entfernt. Die CD45<sup>-</sup>/GlyA<sup>-</sup> Zellen wurden in Expansionsmedium (DMEM mit 40 % MCDB-201, 1× ITS, 1× Linolensäure-BSA, 10<sup>-9</sup> M Dexamethason, 10<sup>-4</sup> M Ascorbinsäure, 10 ng/ml EGF und 10 ng/ml PDGF-BB) inkubiert. Neben ihrer Differenzierbarkeit in mesodermale Zelltypen, weswegen die Zellen anfangs als *mesodermal progenitor cells* (MPC) bezeichnet wurden (Reyes et al., 2001), sind sie auch in der Lage, neuroektodermale (Zhao et al., 2002) und endodermale (Schwartz et al., 2002) Zelltypen zu generieren. MAPC ließen sich inzwischen in humanem (Reyes et al., 2001), murinem, Ratten- und Schweineknochenmark (Jiang et al., 2002a; Zeng et al., 2006), sowie in murinem Muskel und Hirn (Jiang et al., 2002b) nachweisen. Ähnlich den MIAMI-Zellen und den SD-KMSZ exprimierten MAPC aus Schweinen den Pluripotenzmarker Oct4 (Zeng et al., 2006). Eine Expression von SOX2 und Nanog konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Ulloa-Montoya et al., 2007).

Die Gruppe um Ratajczak identifizierte in murinem Knochenmark eine Subpopulation von sehr kleinen, ES-Zell-ähnlichen Stammzellen (Kucia et al., 2006a). Diese VSEL-Zellen sind eine homogene Population von Sca1<sup>+</sup>/lin<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> mononukleären Zellen. Die Zellen exprimieren den Rezeptor CXCR4 sowie die mRNA einer Vielzahl früher Marker unterschiedlicher Gewebe aller drei Keimblätter. In initialen Untersuchungen der Gruppe wurden die Zellen deshalb als *tissue committed stem cells* (TCSC) bezeichnet (Kucia et al., 2004b; Kucia et al., 2005; Ratajczak et al., 2004b). Später fanden Kucia und Kollegen heraus (Kucia et al., 2006a), dass die Zellen auch die Pluripotenzmarker Oct4, SSEA-1, Rex-1 und Nanog exprimierten. Daraufhin wurde der Begriff VSEL-Zellen verwendet. Die VSEL-Zellen haben Durchmesser von 2-4 µm und verfügen über einen großen Zellkern, der von einem schmalen Rand aus Zytoplasma umgeben ist. Des Weiteren verfügen die VSEL-Zellen über große Mengen an Euchromatin, wie es für pluripotente ES-Zellen typisch ist. *In vitro* differenzierten die VSEL-Zellen in Zelltypen aller drei Keimblätter. In Monokulturen überlebten die VSEL-Zellen nicht. Erst durch Ko-Kultivierung mit den fibroblasten-ähnlichen Stromazellen aus dem Knochenmark

ließen sie sich kultivieren. Da die beschriebenen SD-KMSZ offensichtlich auch die fibroblasten-ähnlichen Stromazellen des Knochenmarks als *Feeder*-Zellen benötigen, besteht hier eine interessante Übereinkunft mit den vorliegenden Daten.

Ratajczak und Kollegen stellten eine Hypothese auf, die den Nachweis der Existenz von Oct4-positiven pluripotenten Stammzellen im Knochenmark und auch in anderen Organen adulter Organismen erklären sollte (Ratajczak et al., 2007a). Während der Embryogenese entwickelt sich die Morula durch Bildung einer Aushöhlung im Inneren zur Blastozyste (O'Farrell et al., 2004). Diese enthält die Innere Zellmasse (Embryoblast) und Zellen, welche die extraembryonalen Gewebe (Trophoblast) bilden (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Die Zellen der Inneren Zellmasse sind pluripotent und mit den ES-Zellen gleichzusetzen. Sie differenzieren in den Hypoblasten und den Epiblasten. Der Epiblast enthält ebenfalls pluripotente Stammzellen, die Epiblasten-Stammzellen (*EPSC*). Kurz bevor diese in der Gastrulation in die drei Keimblätter differenzieren, sind im proximalen Bereich des Epiblasten die (von den EPSC abstammenden und ebenfalls) pluripotenten Vorläuferzellen der primordialen Keimzellen (engl. *primordial germ cells*, *PGC*) lokalisiert (McLaren, 2003; McLaren, 1992). Diese migrieren anschließend durch den Primitivstreifen zur Basis der Allantois (Ur-Harnsack) und treten dann in den Embryo ein, wo sie nach Erreichen der Genitalanlagen in die Gameten differenzieren (Molyneaux and Wylie, 2004). Auf dem Weg zu den Genitalanlagen migrieren die PGC durch die Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region), von der aus auch die ersten definitiven hämatopoetischen Stammzellen zur fötalen Leber migrieren (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Wie die hämatopoetischen Stammzellen sind auch die primordialen Keimzellen CXCR4-positiv und reagieren daher stark auf den aufgebauten SDF-1-Gradienten (Ara et al., 2003; Doitsidou et al., 2002).

Die Stammzellen des Epiblasten stellen also den Ursprung aller Keimblätter und auch der darin enthaltenen weniger potenten Stammzellen, aus denen in der weiteren Genese alle Gewebe und Organe werden, dar. Ratajczak und Kollegen postulierten, dass sich einige der pluripotenten Epiblasten-Stammzellen während der Gastrulation in peripheren Geweben und Organen ablagern könnten (Ratajczak et al., 2007a; Ratajczak et al., 2007b). Darüber hinaus könnten einige der primordialen Keimzellen von der AGM-Region zur fötalen Leber und schließlich ins Knochenmark migrieren (Kucia et al., 2006b) oder sich während der Migration dorthin auch in umliegenden Geweben und Organen ablagern. Dort überleben sie bis ins Erwachsenenalter und fungieren als Zellreserve zur Reparatur geschädigter Organe.

Basierend auf dieser Hypothese ist es denkbar, dass die in der Literatur vielfach beschriebenen Effekte einer KMSZ-Plastizität auf einer Präsenz von ko-isolierten, pluripotenten Stammzellen innerhalb der KMSZ beruhen. Die beschriebenen Vorgänge würden auch die Funde verschiedener Gruppen erklären, die ebenfalls Oct4-positive Zellen, jedoch in anderen Geweben, identifiziert haben: Nabelschnurblut (Baal et al., 2004; McGuckin et al., 2005), Epidermis (Dyce et al., 2004; Yu et al.,

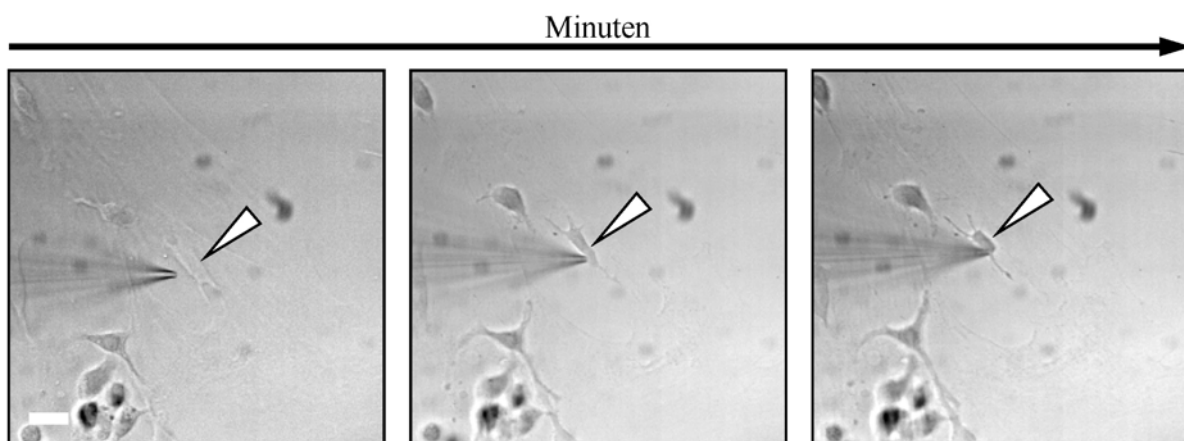
2006), Pankreas (Kruse et al., 2006), Hoden (Guan et al., 2006; Kanatsu-Shinohara et al., 2004), Bronchialepithel (Ling et al., 2006) und Retina (Koso et al., 2006).

Die Gruppe um Ratajczak hält es für möglich, dass alle beschriebenen Zellen (MIAMI, MAPC und VSEL) eine ähnliche Population von CD45-negativen Zellen beschreiben, die sich teilweise überlappen und lediglich durch unterschiedliche Isolierungsstrategien identifiziert wurden sowie unterschiedliche Namen bekommen haben (Kucia et al., 2006a; Ratajczak et al., 2007a). Inwiefern die SD-KMSZ zu diesen drei Stammzellpopulationen gehören, müssen weitere Versuche zeigen. Hervorgehoben werden muss jedoch, dass die A-KMSZ und daraus hervorgehenden SD-KMSZ eindeutig eine Subpopulation innerhalb von (Ratten-) KMSZ sind, die einen Teil ihrer Stammzeleigenschaften mit den zuvor beschriebenen Subpopulationen gemeinsam hat. Sie scheint jedoch mit keiner wirklich identisch zu sein. Der auffälligste Unterschied liegt darin, dass die SD-KMSZ ohne eine spezielle Induktion einer Differenzierung, sondern lediglich durch Serumentzug entstehen und frühe neurale und embryonale Charakteristika aufweisen.

Möglicherweise können SD-KMSZ auch als eine Art „neural festgelegte Subpopulation“, ein Begriff, den Lamoury und Kollegen für eine  $Sca1^+/Nestin^+$  Subpopulation von KMSZ verwendeten (Lamoury et al., 2006), angesehen werden. Da jedoch nicht die Expression endodermaler Marker untersucht wurde, lässt sich eine nur auf die neuroektodermale Richtung limitierte Ausrichtung der SD-KMSZ nicht mit Sicherheit bestätigen.

#### 4.8 Elektrophysiologische Untersuchungen mittels *Patch-Clamp*

Der in dieser Arbeit durchgeführte komplette Serumentzug hatte eine selektive Proliferation der A-KMSZ zur Folge. Dies war mit einer Veränderung der Morphologie und des immunzytochemischen Phänotyps der Zellen verbunden. Die Tochterzellen, die SD-KMSZ, wiesen verschiedene Merkmale von neuronalen Stammzellen auf. Um eine Aussage treffen zu können, ob die SD-KMSZ fähig sind, weiter in neuronale Richtung zu differenzieren, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Da die SD-KMSZ mit Nestin und GFAP über Proteine neuronaler Stammzellen verfügten, wurde nicht von einer möglichen Messung von Strömen, wie sie typisch für reife Neurone sind, ausgegangen. Vielmehr sollte eine potenzielle Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften mit der Umwandlung der A-KMSZ zur SD-KMSZ gemessen werden. Eine Messung der Ströme der A-KMSZ war jedoch nicht möglich. Aufgrund ihrer einerseits relativ flachen Zellkörper und andererseits ihrer hohen Empfindlichkeit (Abb. 49) konnte zwischen den A-KMSZ und der *Patch*-Pipette keine stabile Verbindung aufgebaut werden. Heubach und Kollegen berichteten von ähnlichen Problemen, die Morphologie betreffend (Heubach et al., 2004). Sie inkubierten die Zellen mit Trypsin/EDTA, wodurch sich die Zellen vom Untergrund ablösten. Die nun runden KMSZ ermöglichten dann eine stabile Verbindung mit der *Patch*-Pipette. Im vorliegenden Fall hätte eine solche Behandlung der Zellkulturen zur Folge gehabt, dass die A-KMSZ nicht mehr von den übrigen KMSZ zu unterscheiden gewesen wären. Aus diesem Grund wurde auf die Inkubation mit Trypsin/EDTA verzichtet und die elektrophysiologischen Eigenschaften der A-KMSZ konnten nicht bestimmt werden.



**Abb. 49: Zusammenziehen einer A-KMSZ beim *Patchen*.** Innerhalb weniger Minuten nach dem Annähern mit der *Patch*-Pipette (vom linken Bildrand) zog sich die A-KMSZ (Pfeil) zusammen und löste sich von der darunter liegenden KMSZ. (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ )

Die SD-KMSZ ließen sich deutlich besser *patchen*. In der Literatur finden sich bislang aber nur sehr wenige Studien über die elektrophysiologischen Charakteristika von neuronalen Stammzellen (Jelitai et

al., 2007). Die Gründe dafür liegen in der schwierigen *in situ*-Identifizierbarkeit der Zellen für eine elektrophysiologische Untersuchung (Pevny and Rao, 2003). In den bipolaren, spindelförmigen SD-KMSZ und in den kugeligen SD-KMSZ konnten zwei Typen von Auswärtsströmen charakterisiert werden. Sie waren denen ähnlich, die Heubach und Kollegen in humanen KMSZ gemessen hatten (Heubach et al., 2004). Unter den angewandten Messparametern entwickelten die SD-KMSZ keine detektierbaren Einwärtsströme, wie sie von Biella und Kollegen in neuronalen Stammzellen gefunden wurden, die von murinen ES-Zellen abstammten (Biella et al., 2007).

Die in den kugeligen SD-KMSZ festgestellte höhere Prävalenz des schnellen Auswärtsstromes ( $I_f$ ) mit Merkmalen des Kaliumstromes vom A-Typ könnte jedoch das Potenzial erkennen lassen, unter geeigneten Bedingungen neuronale Eigenschaften zu entwickeln. Kürzlich wurde die funktionelle Expression eines Kaliumstromes vom A-Typ in neuronalen Stammzellen des adulten Ratten-Hippokampus beschrieben (Guo and Zou, 2008).



#### 4.9 Serumdeprivation vs. chemischer Stress

Es ist bekannt, dass Serumentzug mit Stress gleichzusetzen ist und in der Regel auch zu Apoptose führt (Kulkarni and McCulloch, 1994; Simm et al., 1997; Zhu et al., 2006). Daher sind Ergebnisse, die durch Inkubation mit Stressoren entstehen, sorgfältig und kritisch zu prüfen. Schließlich ließ sich ein Teil der Ergebnisse vieler Studien, in denen KMSZ in neuronale Zellen differenziert worden sind (Deng et al., 2001; Krampera et al., 2007; Lei et al., 2007; Levy et al., 2003; Munoz-Elias et al., 2003; Pacary et al., 2006; Scintu et al., 2006; Tao et al., 2005; Woodbury et al., 2000; Woodbury et al., 2002), inzwischen als stressbedingte Anpassung des Zytoskeletts entkräften. Wie verschiedene Forschergruppen (Bertani et al., 2005; Croft and Przyborski, 2006; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004) eindrucksvoll nachweisen konnten, beruhen viele gezeigte Differenzierungen auf einem durch chemischen Stress hervorgerufenen Phänomen. Dabei nehmen innerhalb kürzester Zeit (meist wenige Stunden) nach Zugabe verschiedenster chemischer Agenzien (z.B. BME, DMSO, BHA) zum Induktionsmedium nahezu alle Zellen einer Kultur neuronale Morphologien und neurogliale Immunphänotypen an. An dieser Stelle zeigt sich die Bedeutung der *Time-Lapse*-Mikroskopie. So konnte nachgewiesen werden, dass es, begründet durch einen Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts, zu einem Zusammenziehen der Zellränder kommt (Bertani et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Paxillin-positive Bereiche am Zellrand (Neuhuber et al., 2004) bewirken, dass diese Stellen des Zellrandes am Untergrund haften bleiben und sich nicht mit zurückziehen. Das Ergebnis ist eine Zelle mit pseudoneuronaler Morphologie und typischen langen Ausläufern. Interessanterweise läßt sich diese neuronale Pseudodifferenzierung auch in Fibroblasten, Keratinozyten, HEK293- und PC-12-Zellen induzieren (Bertani et al., 2005; Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Des Weiteren hat auch die Inkubation mit anderen chemischen Stressoren (Detergenzien, hohe NaCl-Konzentrationen, extreme pH-Werte) eine durch Zellschrumpfung hervorgerufene pseudoneuronale Morphologie zur Folge (Lu et al., 2004). Wie mit der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, erzeugt die Exposition zu diesen Stressoren außerdem Zellkerne, wie sie typisch für apoptotische Zellen sind (Kulkarni and McCulloch, 1994; Simm et al., 1997; Zhu et al., 2006). Die Zellschrumpfung ist wiederum die Ursache für die vielfach fälschlicherweise positiv bewerteten Immunfärbungen. Nach erfolgter chemischer Induktion liegen nahezu alle Zellen des vormals konfluenten Zellrasens vereinzelt vor. Auch ohne Expression des eigentlichen Antigens bindet bei der anschließenden Immunfärbung ein Teil des Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpers unspezifisch an diese Zellen. Durch den unbewachsenen Untergrund in der Umgebung der Zellen entsteht ein nahezu optimales Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch die Zelle als positiv gefärbt interpretiert wird. Dieser Effekt wird darüber hinaus noch dadurch verstärkt, dass sich durch Zellschrumpfung die Zahl der Antigene bzw. Bindungsstellen pro Flächeneinheit erhöht, so dass eine kondensierte Zelle ein stärkeres Signal als eine flächige, nicht-induzierte Zelle aufweist (Lu et al., 2004).

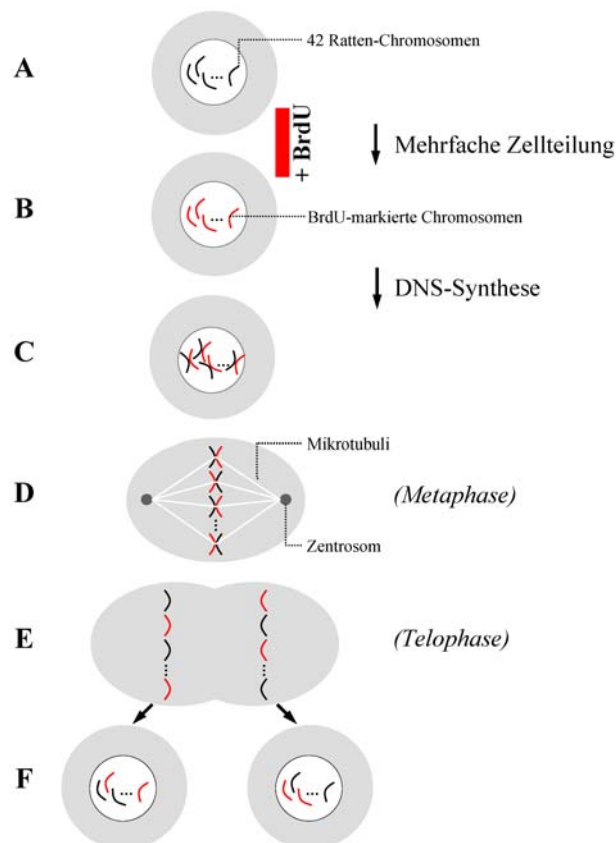
In der vorliegenden Studie können derartige stressbedingte Anpassungen des Zytoskeletts infolge eines Serumentzuges ausgeschlossen werden. In nahezu keiner SD-KMSZ wurden apoptotische Nuklei festgestellt. Die SD-KMSZ exprimieren auch nicht eine Vielzahl verschiedenster reifer Markerproteine. Mittels *Time-Lapse*-Mikroskopie und BrdU-Färbung konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die SD-KMSZ nicht durch stressbedingte Schrumpfung, sondern durch Proliferation entstehen, obwohl andere eine Zellschrumpfung von Fibroblasten während eines Serumentzuges beobachten konnten (Boraldi et al., 2008). Des Weiteren blieb auch der allgemeine Zellrasen unserer KMSZ-Kultur weitestgehend von dem Serumentzug unbeeinflusst, während es nach Zugabe von chemischen Stressoren zu einer globalen Veränderung aller Zellen kam. Die Veränderungen beschränkten sich lediglich auf die A-KMSZ, deren Anteil an der Ausgangskultur auf unter 1 % geschätzt werden kann.

#### **4.10 Markierung der Knochenmarkstammzellen mit BrdU**

In Pilotversuchen, in denen im Rahmen dieser Arbeit BrdU-markierte KMSZ in Ratten nach experimentell induziertem Schlaganfall transplantiert wurden, konnte nur einen Bruchteil der Zellen in der anschließenden Analyse der Hirne wiedergefunden werden. Kürzlich publizierte Studien zeigten, dass BrdU und andere Thymidinanaloga von den markierten Zellen, zum Teil durch Zelltod, abgegeben und von umliegenden Zellen inkorporiert werden können (Burns et al., 2006; Coyne et al., 2006).

In weiteren Untersuchungen (eigene Beobachtungen aus Ko-Kultivierung BrdU-markierter KMSZ mit kortikalen Primärkulturen bzw. intrazerebrale Transplantation BrdU-markierter KMSZ) und Studien von Kollegen, in denen die Proliferation und Neurogenese im Gyrus Dentatus von Ratten untersucht wurde (Baldauf and Reymann, 2005), konnten darüber hinaus Zellen mit unterschiedlichen Verteilungsmustern von BrdU im Zellkern detektiert werden. Außer Zellen mit vollständig und homogen gefärbtem Zellkern, was auf eine gleichmäßige BrdU-Inkorporation hinweist, wurden auch Zellen detektiert, deren Kerne nur partiell ein BrdU-Signal aufwiesen. Interessanterweise weist auch die Mehrheit transplantiert BrdU-markierter Zellen in der Literatur Zellkerne mit derartigen unvollständigen Färbemustern auf (Chen et al., 2001a; Lu et al., 2001; Munoz-Elias et al., 2004; Reubinoff et al., 2001). Trotz der Offensichtlichkeit dieses Faktes finden sich kaum Erklärungen und keine systematischen Untersuchungen dieses Phänomens. Coyne und Kollegen (Coyne et al., 2006) erwähnten in ihrer Studie das Auftreten von Zellkernen mit einer fragmentierten BrdU-Verteilung, gaben aber keine Erklärung dafür. Valero und Kollegen (Valero et al., 2005) spekulierten, dass die Fragmentierung des BrdU-Signals die Konsequenz einer punktuellen Inkorporation des BrdU während der frühen, mittleren oder späten Synthesephase der DNS-Replikation ist. Bonilla und Kollegen erklärten die Färbungen als Folge von ungleichmäßig inkorporiertem BrdU aufgrund einer hohen Zellproliferation (Bonilla et al., 2005). Abbildung 50 verdeutlicht stark vereinfacht, wie die

Proliferation von Zellen Einfluss auf das BrdU-Signal hat. Die Applikation von BrdU führt über mehrere Zellteilungen zur Markierung aller Chromosomen. Alle Zellen sind somit BrdU-positiv. Nach Entfernung des BrdU kommt es im Rahmen der nächsten Zellteilung zur DNS-Synthese. Die Chromatiden verdoppeln sich in der Prophase, wobei die neuen Chromatiden kein BrdU mehr inkorporieren können. In der folgenden Metaphase richten sich die Chromosomen äquatoriell, aber randomisiert aus. Das heißt, statistisch gesehen befinden sich nicht alle BrdU-haltigen Chromatiden auf derselben Seite der Zelle. Wäre dies der Fall, würden aus der Zellteilung eine BrdU-markierte sowie eine BrdU-unmarkierte Tochterzelle hervorgehen. So aber werden die Chromatiden auseinander gezogen und die Zellteilung resultiert in Tochterzellen, in denen einige Chromosomen BrdU-positiv und einige BrdU-negativ sind – vergleichbar mit einem Mosaik. Im mikroskopischen Bild sollten die Zellen, zumindest ab einer gewissen Anzahl von Teilungen ohne BrdU-Exposition, nach einer BrdU-Immunzytochemie inhomogen gefärbte Zellkerne aufweisen. Ab einer genügend hohen Anzahl von Teilungen gerät die verbliebene BrdU-Markierung unter die Nachweisgrenze und die zum Zeitpunkt der BrdU-Gabe erfolgte Zellteilung wird somit nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 50: Aufteilung des inkorporierten BrdU während der mitotischen Zellteilung am Beispiel von Rattenzellen.** (A) Eine unmarkierte Rattenzelle wird BrdU-exponiert. (B) Nach mehreren Zellteilungen hat statistisch jedes Chromosom BrdU inkorporiert. Die Zelle ist BrdU-positiv. (C) Teilt sich die Zelle ohne BrdU-Exposition weiter, beinhalten die neu synthetisierten Chromatide kein BrdU. (D) Während der Metaphase ordnen sich die Chromosomen am Zelläquator an. Die dabei zufällig ausgerichteten Chromatide werden in der (E) Telophase auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt. Am Ende der Zellteilung haben sich zwei Zellen gebildet, von denen manche Chromosomen BrdU-positiv und manche BrdU-negativ sind. Die Abbildung ist stark vereinfacht und stellt nur die zur Verdeutlichung relevanten Schritte dar.

In einer Zeitreihe an KMSZ wurden für die vorliegende Arbeit zum ersten Mal systematisch die zu erwartenden Veränderungen des BrdU-Signals in einer proliferierenden Zellkultur *in vitro* untersucht. Dies sollte eine Aussage ermöglichen, in welchem Zeitraum und wie stark diese „Mosaikbildung“ stattfindet und ab wann eine pulsartig markierte KMSZ nicht mehr nachweisbar ist.

Zu diesem Zweck wurde dem Kulturmedium der KMSZ BrdU zugegeben und für 4 Tage inkubiert. Nach Entfernung des BrdUs durch Auswechseln des Mediums wurden die so markierten Zellen bis zu 4 Wochen weiterkultiviert. In dieser Zeit erfolgten mehrere Passagierungen der Zellen, bevor diese konfluent wurden. Zu definierten Zeitpunkten nach Ende der BrdU-Inkubation wurden Proben der KMSZ – die Zellen wurden parallel in voneinander unabhängigen Multi-Well-Platten kultiviert – fixiert und immunzytochemisch gegen BrdU gefärbt. In der anschließenden Analyse wurden neben der Quantifizierung der BrdU-positiven KMSZ auch das Verteilungsmuster und die Intensität des BrdUs im Zellkern beurteilt. Auf diese Weise konnten die BrdU-markierten Zellen in drei Gruppen eingeteilt werden: a) „gefüllte Zellkerne“ – die Zellkerne wiesen eine weitestgehend homogene BrdU-Immunreaktivität auf; b) „segmentierte Zellkerne“ – nur in einigen größeren Bereichen (Segmenten) des Zellkerns ließ sich BrdU nachweisen; c) „punktierte Zellkerne“ – das BrdU-Signal lag lediglich vereinzelt und punktuell im Zellkern vor. KMSZ mit punktierten Zellen wurden in die Quantifizierung der positiv-markierten Zellen nicht mit einbezogen. Zwar ließen sie sich unter *in vitro*-Bedingungen einer einschichtigen Zellkultur detektieren, würden jedoch *in vivo* (d.h. im Hirnschnitt) aufgrund des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses kaum detektiert bzw. als markierte Zelle beurteilt werden.

Die viertägige Inkubation der KMSZ-Kulturen resultierte in einer Markierung von 93,4 % aller Zellen. Erwartungsgemäß verringerte sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer der Anteil BrdU-positiver KMSZ. Das Verteilungsmuster des BrdU änderte sich ebenfalls. Das anfängliche homogene und zellkernfüllende BrdU-Signal („gefüllte Zellkerne“) wurde zunehmend segmentiert und letztlich punktiert. An Tag 17 nach Beendigung der BrdU-Exposition fiel auf, dass ein Großteil der BrdU-positiven Zellen das Signal im Zytoplasma, anstatt im Zellkern, aufwies. Dieser Transfer des BrdU vom Zellkern war offensichtlich nicht durch toxische Effekte des BrdUs begründet. Wir demonstrierten, dass BrdU-behandelte Zellen weder typische morphologische Zeichen eines Zelltodes aufwiesen (Kulkarni and McCulloch, 1994; Simm et al., 1997; Zhu et al., 2006), noch Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wurde oder aktivierte Caspase-3 exprimiert wurde – beides Marker für Apoptose. Dies war jedoch der Fall, wenn wir KMSZ mit Staurosporin, einem anerkannten Induktor für Apoptose (Kruman et al., 1998; Posmantur et al., 1997), behandelten.

Andere Studien (Burns et al., 2006; Coyne et al., 2006) demonstrierten kürzlich mit *in vitro*- und *in vivo*-Ansätzen sehr eindrucksvoll, dass Thymidinanaloga wie BrdU nicht stabil in die DNS integriert und im Fall eines Zelltodes aus dem Zellkern entfernt werden. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass die freigesetzten Marker von umgebenden Zellen aufgenommen wurden. Dieses Phänomen impliziert zwei Konsequenzen: a) ein fehlendes Signal in den primär markierten Zellen und daraus resultierende falsch-negative Ergebnisse und b) die Inkorporation von freigewordenem Marker (BrdU o.ä.) durch

andere Zellen und daraus resultierende falsch-positive Ergebnisse. Obwohl diese Studien das Schicksal BrdU-markierter Zellen nach Transplantation untersuchten, gingen sie nicht auf die zeitabhängige Veränderung des BrdU-Signals ein.

Diese Studie an KMSZ (Sauerzweig et al. 2008, eingereicht) zeigt zum ersten Mal, dass inkorporiertes BrdU innerhalb von zwei bis drei Wochen vom Zellkern in das Zytoplasma transferiert wurde. Die molekularen Vorgänge sind gegenwärtig noch unklar, doch es ist zu vermuten, dass unter anderem DNS-Reparaturmechanismen beteiligt sind, die so das körperfremde Nukleotid aus der Zelle entfernen. So freigesetzt, kann es dann von den Nachbarzellen aufgenommen werden (Bonilla et al., 2005; Taupin, 2007)

Diese Ergebnisse haben konkrete Konsequenzen für Transplantationsstudien mit BrdU-markierten Zellen. So kann BrdU als Zellmarker für die Spenderzellen nicht empfohlen werden, wenn die Versuchsdauer einen Zeitraum von 2 Wochen übersteigt – es sei denn, ähnliche Versuche werden zuvor durchgeführt, um die individuelle Stabilität des BrdU in den jeweiligen Versuchszellen zu bestimmen.

Neben Thymidinanaloga gibt es verschiedene alternative Markierungsmethoden: Transgene Ansätze, die beispielsweise GFP (Bühnemann et al., 2006; Petersen et al., 1999; Priller et al., 2001; Zhao et al., 2002) oder  $\beta$ -Galaktosidase (Gussoni et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Mezey et al., 2003) verwenden. In eigenen Versuchen gab es jedoch gravierende Schwierigkeiten bei der Verwendung von Zellen aus GFP-transgenen Tieren. KMSZ aus einer Ratte, die unter dem Thy1-Promotor (= CD90) GFP exprimierten, wiesen lediglich in wenigen Zellen eine schwache Fluoreszenz auf. Die Verwendung von KMSZ aus transgenen B6.Cg-TgN (Thy1-YFP) 16Jrs-Mäusen, von denen im Labor organotypische hippocampale Schnittkulturen angelegt wurden (Neumann et al., 2006), funktionierte nicht, da die KMSZ nach der ersten Passagierung die Proliferation einstellten. Darüber hinaus ist von transgenen Markierungsansätzen bekannt, dass es zu einer Expressionsminderung des Transgens mit fortschreitender Zelldifferenzierung kommen kann (Theise et al., 2003). Die von Bühnemann und Kollegen (Bühnemann et al., 2006) verwendeten murinen ES-Zellen exprimierten eGFP unter dem ubiquitären  $\beta$ -Aktin-Promotor. Dennoch wiesen einige Zellen nach ihrer Differenzierung in funktionelle Neurone eine deutlich abgeschwächte Fluoreszenz auf (Bühnemann, persönliche Mitteilung).

Auch *sex-mismatch*-Transplantationen von Zellen männlicher Spender in weibliche Empfänger sind etabliert (Alison et al., 2000; Krause et al., 2001; Weimann et al., 2003). Wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, erfordert der Nachweis der männlichen Chromosomen ein exaktes Schneiden der Präparate, um die Ebene des Y-Chromosoms nicht zu verfehlen. Darüber hinaus kann die Interpretation immunhistochemischer Färbungen problematisch sein, wenn das angefärbte Y-Chromosom (kernlokalisiert) nicht mit dem Markerprotein (z.B. MAP-2, Synaptophysin) in einer optischen Ebene liegt.

Verschiedene membran- oder intrazellulär-bindende Farbstoffe werden ebenfalls verwendet, da mit ihnen die Zellen effizient und einfach markiert werden können. Die Erfahrung zeigt, dass sie sich jedoch nicht für (Langzeit-) *in vivo*-Studien eignen, da es auch hier mit jeder Zellteilung zu einer Verdünnung des Farbstoffes kommt. Außerdem ist eine Aufnahme frei gewordenen Farbstoffes (z.B. durch Zelltod) durch andere Zellen möglich, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

Zusammenfassend sollte, wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, in jedem Fall individuell die Stabilität eines Markers für die jeweilige Fragestellung und Zelltyp geprüft werden oder auch verschiedene Marker kombiniert werden. In der instabilen und unzuverlässigen Markierung der transplantierten Zellen kann ein wesentlicher Hinderungsgrund für eine erfolgreiche Charakterisierung von KMSZ nach Transplantation gesehen werden.

#### **4.11 Therapie neurologischer Erkrankungen mit Knochenmarkstammzellen**

Knochenmarkstammzellen sind ein Schlüsselkandidat für potenzielle Zelltherapien. Als bedeutendster Vertreter der adulten Stammzellen – sieht man von den hämatopoetischen Stammzellen mit ihrer Indikation bei Erkrankungen des blutbildenden Systems ab – weisen sie den Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) gegenüber verschiedene Vorteile auf.

KMSZ lassen sich verhältnismäßig unkompliziert durch Knochenmarkpunktion von Spendern gewinnen, während ES-Zellen aus der Inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden. Eine Transplantation von ES-Zellen ist daher auch nur allogene möglich und birgt das Risiko einer Transplantatabstoßung (engl. *graft-versus-host-reaction*). Bei der Gewinnung von ES-Zellen kommt es zur Zerstörung des Embryos. Überzählige Embryonen aus *in vitro*-Fertilisationen (IVF) könnten zwar als Quelle für ES-Zellen dienen, da diese im Rahmen der IVF zwangsläufig anfallen und nach erfolgreicher Schwangerschaft nur selten benötigt werden, doch gibt es gravierende ethische und moralische Bedenken. Aus diesem Grund ist in Deutschland die Gewinnung humaner ES-Zellen verboten und auch die Forschung nur an Zellen aus dem Ausland erlaubt, sofern diese vor einem gesetzlich festgelegten Stichtag isoliert wurden. ES-Zellen sind aufgrund des ontogenetischen Zeitpunktes ihrer Gewinnung pluripotent und somit in fast jeden Zelltyp differenzierbar. Ihr hohes Potenzial hat jedoch zur Folge, dass sie nach Implantation *in vivo* zur Tumorbildung neigen (Erdo et al., 2003; Reubinoff et al., 2000). Das tumorgene Risiko lässt sich jedoch sowohl durch Vordifferenzierung der Zellen (Brüstle et al., 1999; Kim et al., 2002), als auch durch xenogene Transplantation (Erdo et al., 2003) verringern. So konnten Bühnemann und Kollegen nach Transplantation muriner, in Nestin-positive Zellen vordifferenzierter ES-Zellen in Ratten nach experimentellem Schlaganfall keine Tumorbildung beobachten (Bühnemann et al., 2006).

Die kürzlich erzielten iPS-Zellen (engl. *induced pluripotent stem cells*) könnten eine bestmögliche Alternative zu ES-Zellen darstellen. Durch Transduktion mit definierten Transkriptionsfaktoren (Oct4,

SOX2, c-myc, klf4) können ausdifferenzierte, somatische Zellen in pluripotente Stammzellen „reprogrammiert“ werden. Auf diese Weise können nicht nur ethische Bedenken umgangen werden, sondern auch Abstoßungsprozesse beim Empfänger vermieden werden. Hypothetisch könnte der Patient Zellen spenden (z.B. Fibroblasten) und diese entweder als iPS-Zellen oder als in der benötigten Weise vordifferenzierte Zelltypen zurück erhalten. Die Forschung an iPS-Zellen steht jedoch noch am Anfang und benötigt darüber hinaus die ES-Zellen als Positiv-Kontrolle.

KMSZ bergen nach heutigem Kenntnisstand aufgrund ihrer eingeschränkten Potenz kein Risiko zur Tumorbildung. Definiert als multipotente Stammzellen des Mesoderms bieten sie sich vorrangig zur Gewebereparatur von Knochen (Noth et al., 2008; Tzaribachev et al., 2008; Wang et al., 2006), Knorpel (Dickhut et al., 2008; Magne et al., 2005; Niemeyer et al., 2006) und Muskel (Dezawa et al., 2005; Fukuda and Fujita, 2005; Hahn et al., 2008) an.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre offenbarten das Potenzial von KMSZ, auch in neuroektodermale Zelltypen zu differenzieren (Bossolasco et al., 2005; Brazelton et al., 2000; Hermann et al., 2004; Kopen et al., 1999; Mezey et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000; Wislet-Gendebien et al., 2003; Woodbury et al., 2000). Diese Demonstrationen der Plastizität hatten viele Untersuchungen zur Folge, KMSZ zur Reparatur bei Erkrankungen des Zentralen Nervensystems zu nutzen (Akiyama et al., 2002; Chen et al., 2001a; Dezawa et al., 2004; Mahmood et al., 2001; Mimura et al., 2004; Weimann et al., 2003). Gerade die Indikation Schlaganfall stellt einen wesentlichen Fokus für eine Zelltherapie mit KMSZ dar. Die aus dem ischämischen Insult resultierenden Vorgänge erfordern die Restoration eines untergegangenen Gewebes, welches neben den unterschiedlichen Neuronentypen auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Blutgefäße umfasst. Interessanterweise kristallisierten sich aus der Vielzahl von *in vivo*-Studien zwei wesentliche Mechanismen heraus, mit denen der therapeutische Effekt einer KMSZ-Transplantation erklärt wird:

I) Sezernierung von trophischen Faktoren, die zu einer Aktivierung verschiedener endogener restaurativer Vorgänge, wie z.B. Neurogenese, Synaptogenese, Angiogenese, Vaskulogenese, führen. Viele Studien, in denen nach Schlaganfall KMSZ transplantiert wurden, zeigen motorische Verhaltensverbesserungen der Tiere (Akiyama et al., 2002; Chen et al., 2001b; Chen et al., 2001a; Li et al., 2001a; Li et al., 2001b; Zhao et al., 2002), doch wurden diese auf trophische Faktoren durch die KMSZ zurückgeführt (Akiyama et al., 2002; Chen et al., 2002; Kurozumi et al., 2005; Lu et al., 2001; Mahmood et al., 2004b; Mahmood et al., 2004a; Zhao et al., 2002). Auch wir zeigten, dass KMSZ einen positiven Einfluss auf ischämisch geschädigtes Hirngewebe ausübten. *In vitro* wurden dafür organotypische hippokampale Schnittkulturen Sauerstoff- und Glukose-depriviert (engl. *oxygen-glucose-deprivation*, *OGD*) und anschließend mit KMSZ ko-kultiviert. Dies hatte eine Neuroprotektion zur Folge, wie wir durch einen signifikant geringeren Zelltod in den KMSZ-behandelten Schnitten erkennen konnten (Sarnowska et al. 2008, eingereicht).

II) Als zweiter Mechanismus wird die Differenzierung der KMSZ in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten und die Integration dieser neugebildeten Zellen in das bestehende Gefüge

angesehen. *In vitro*-Befunde für das Differenzierungspotenzial der KMSZ gibt es hinreichend viele – die möglichen Ursachen dafür, sei es nun durch die Präsenz pluripotenter Stammzellen oder Transdifferenzierungen, sollen hier nicht noch einmal diskutiert werden. Die neuroektodermale Differenzierung von KMSZ auch *in vivo*, also nicht unter artifiziellen *in vitro*-Kulturbedingungen, nachzuweisen, ist ein Problem. Das größte Hindernis dabei stellen die unzureichenden Markierungsmöglichkeiten der zu transplantierenden Zellen dar (siehe 4.10). Die Herunterregulierung des Marker-Transgens, Ausschleusen von BrdU oder die Freisetzung von Membranfarbstoffen können Gründe dafür sein, dass transplantierte Zellen nicht wiedergefunden werden. Dies führt zu dem möglicherweise falschen Schluss, dass die Zellen nicht im Schadensgebiet angekommen, etwaige lange Studienzeiträume nicht überleben und gar nicht differenzieren können.

Eine weitere Ursache für das Ausbleiben erfolgreicher *in vivo*-Studien liegt eventuell in der Kultivierung der KMSZ im Vorfeld einer Transplantation. Eine optimale Ausnutzung des Differenzierungspotenzials der Zellen *in vivo* setzt eine angepasste Kultivierung *in vitro* voraus. Die Kulturparameter müssen dabei so gewählt werden, dass die Stammzellsubpopulation einerseits nicht abstirbt, andererseits aber auch proliferieren kann, um eine therapeutisch wirksame Zellzahl zu erreichen. Hierbei müssen die Zellen ihr Differenzierungspotenzial beibehalten.

Die weitere Erforschung der pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ist somit unverzichtbar. Es ist zu klären, inwiefern sich die beschriebenen Stammzellpopulationen (SD-KMSZ, MIAMI-Zellen, MAPC, VSEL-Zellen) überschneiden oder sogar identisch sind. Auch müssen Kultivierungsprotokolle entwickelt werden, unter denen die Stammzellen optimal auf eine Differenzierung nach Transplantation vorbereitet werden.

Das komplexe Zellgefüge des Knochenmarks stellt die Nische für die hämatopoetischen Stammzellen dar. Aus diesem Grund ist es plausibel, dass die Zellen dieser Stammzellnische im Hirn Faktoren freisetzen, die zur Aktivierung endogener Reparaturprozesse führen. Die Forschungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die Zusammensetzung des Knochenmarks weit heterogener als ursprünglich angenommen ist. Es lässt sich nicht mehr nur in hämatopoetische Stammzellen, Mesenchymale Stammzellen und unterstützende Zellen einteilen, sondern enthält darüber hinaus noch weitere Stammzellpopulationen.

Daher wird es letztendlich keiner der beiden diskutierten Mechanismen ausschließlich sein, der für die dokumentierten Effekte *in vivo* allein verantwortlich ist. Sowohl die Aktivierung endogener Prozesse als auch die Differenzierung von Stammzellen werden sich gegenseitig ergänzen und zu einer Regeneration des geschädigten Gewebes beitragen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Knochenmark stellt eine leicht zugängliche Quelle für adulte Stammzellen dar, die für einen Einsatz in multiplen zellbasierten Therapien geeignet zu sein scheinen. Einige wenige Studien der letzten Jahre deuteten die Existenz von pluripotenten Stammzellen innerhalb der Knochenmarkstammzellen (KMSZ) an. Als entscheidender Parameter dieser pluripotenten Stammzellen, die als MAP-, MIAMI- und VSEL-Zellen bezeichnet werden, gilt die Expression verschiedener embryonaler und gewebespezifischer Stammzellmarker.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen eines totalen Serumentzuges auf eine Subpopulation von bereits existierenden, kleinzelligen Nestin-positiven KMSZ (sog. A-KMSZ) aus der Ratte *in vitro*. Es konnte demonstriert werden, dass eine dreitägige Phase der Serumdeprivation zu einer Proliferation der A-KMSZ, verbunden mit einer Änderung ihrer Morphologie, Genexpression und ihres Immunphänotypes, führt. Die Tochterzellen, als Serumdeprivation-induzierte Knochenmarkstammzellen (SD-KMSZ) bezeichnet, verfügen über runde bzw. bipolare Somata, wie sie charakteristisch für neurale Stammzellen (NSZ) sind. Das Expressionsmuster der SD-KMSZ, sie sind Nestin-positiv und ko-exprimieren darüber hinaus GFAP (92 %) und S100 $\beta$  (91 %), ähnelt ebenfalls dem neuraler Stammzellen des Hippokampus und der Subventrikulärzone. Des Weiteren konnte in den SD-KMSZ die Expression der Pluripotenzgene Oct4 und SOX2 nachgewiesen werden. Wie qRT-PCR-Untersuchungen zeigten, induzierte die Serumdeprivation, bezogen auf die mRNA-Menge unter Basalbedingungen, einen Expressionsanstieg von Nestin (2,1fach), GFAP (5,7fach), S100 $\beta$  (1,8fach), Oct4 (6,3fach), SOX2 (37,8fach), c-myc (1,6fach) und klf4 (6,5fach). Wie andere Gruppen kürzlich zeigten, führt die Überexpression von Oct4, SOX2, c-myc und klf4 zur Transformation von adulten Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (*iPS cells*). Man kann daher annehmen, dass die A-KMSZ und die von ihnen abstammenden SD-KMSZ, ähnlich wie MAP-, MIAMI- und VSEL-Zellen, Abkömmlinge einer Fraktion pluripotenter Stammzellen innerhalb des Knochenmarks sind und aus diesem Grund die genannten Pluripotenz- und NSZ-Marker aufweisen. Die Genese der SD-KMSZ könnte möglicherweise durch eine epigenetische Reprogrammierung ausgelöst werden, die durch den Serumentzug in Gang gesetzt wird. Der in dieser Arbeit beschriebene Expressionsanstieg einiger für die Pluripotenz von Stammzellen wichtiger Schlüsselgene ist ein wichtiger Beleg für eine solche Reprogrammierung. Möglicherweise stellt diese Reprogrammierung eine Strategie der Zellen dar, trotz der fehlenden Wachstumsfaktoren weiter zu proliferieren, um eventuell unter dem erneuten Einfluss von Faktoren wieder in spezialisierte Zellen auszudifferenzieren. Der komplette Entzug des Serums repräsentiert somit möglicherweise eine einfache, aber effiziente Möglichkeit, um pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark zu selektieren und *in vitro* anzureichern. Dieses Vorgehen könnte für zukünftige Transplantationsstrategien mit KMSZ von großer Bedeutung sein.

Im Kontext eigener Transplantationsstudien im Tiermodell wurde für diese Arbeit *in vitro* die Langzeitstabilität einer Bromdesoxyuridin (BrdU)-Markierung an KMSZ untersucht. Es wurde gezeigt, dass es zur erwartungsgemäßen Fragmentierung des BrdU-Signals in Folge der Chromatidenaufteilung während des Zellzyklusses kommt. Darüber hinaus konnte erstmalig demonstriert werden, dass auch eine Ausschleusung der BrdU-Nukleotide aus dem Kern ins Zytoplasma stattfindet. Im zeitlichen Verlauf der Studie ließ sich in einer Vielzahl von KMSZ BrdU im Zytoplasma nachweisen. Auf welchen Mechanismen dieser Effekt beruht, ist nicht bekannt. Es ist zu vermuten, dass es sich um DNS-Reparaturprozesse handelt, die zur Entfernung der körperfremden Nukleotide führen.

Zusammenfassend haben die Markierungsergebnisse gezeigt, dass BrdU nicht geeignet ist, um *in vitro*-markierte KMSZ 4 Wochen nach Transplantation im Empfängerorganismus wiederzufinden. Eine Untersuchung der Differenzierung transplantierte SD-KMSZ *in vivo* erfordert somit den Einsatz anderer Markierungstechniken bzw. die Kombination mit diesen.

**6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A-KMSZ	auf anderen Zellen aufliegende, Nestin-positive Knochenmarkstammzelle
Abb.	Abbildung
Alpha-MEM	Minimum essentielles Medium, Alpha-modifiziert
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHA	Butylhydroxyanisol
BLBP	<i>brain lipid binding protein</i>
BME	β-Mercaptoethanol
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cDNS	komplementäre (engl. <i>complementary</i> ) DNS zur mRNS
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CMFDA	<i>5-chloromethylfluorescein diacetate</i>
CNPase	<i>cyclic nucleotide phosphodiesterase</i>
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid
dbcAMP	<i>dibutyryl cyclic adenosine monophosphate</i>
DCX	<i>doublecortin</i>
DiI	<i>dioctadecyl-tetramethylindocarbocyanine perchlorate</i>
DIV	<i>days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPX	Diethylphenylxanthin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
et al.	<i>et alii</i>

---

etc.	<i>et cetera</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	<i>gauge</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GalC	<i>galactosylceramidase</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlyA	<i>glycophorin A</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
I-KMSZ	innerhalb des Zellrasens liegende Knochenmarkstammzelle
IBMX	Isobutylmethyl-Xanthin
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KMSZ	Knochenmarkstammzelle
lin	<i>lineage</i>
MAP-2	<i>microtubule associated protein 2</i>
min	Minute
NA	numerische Apertur
NeuN	<i>neuron-specific nuclear protein</i>
NF200	Neurofilament 200 kDa
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NSE	<i>neuron specific enolase</i>
NSZ	neurale Stammzellen
o.ä.	oder Ähnliche(s)
o.g.	oben genannt
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i> ; siehe POU5F1
Pax-6	<i>paired box gene 6</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI	Propidiumjodid
PKH26	rot fluoreszierender Zellmembran-Farbstoff; benannt nach Paul Karl Horan
POU5F1	<i>POU domain class 5, transcription factor 1</i> ; siehe Oct4

---

PSA-NCAM	<i>polysialic acid-neural cell adhesion molecule</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>
RC2	<i>radial cell 2</i>
Rex-1	<i>restricted expression 1</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
Sca1	<i>stem cell antigen 1</i>
SCF1	<i>stem cell factor 1,</i>
SD-KMSZ	Serumdeprivation-induzierte Knochenmarkstammzelle
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SGZ	Subgranulärzone
sog.	sogenannte(n)
SOX2	<i>SRY-related HMG BOX gene 2</i>
SSEA-1	<i>stage-specific embryonic antigen 1</i>
SVZ	Subventrikulärzone
Tab.	Tabelle
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
u.a.	und andere(s)
vs.	<i>versus</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Rahman, B., Fiddler, M., Rappolee, D. and Pergament, E.** (1995). Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 10, 2787-2792.
- 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.
- Akiyama, Y., Radtke, C. and Kocsis, J. D.** (2002). Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J. Neurosci.* 22, 6623-6630.
- Alison, M. R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J. and Wright, N. A.** (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257.
- Altman, J.** (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp Neurol.* 137, 433-457.
- Altman, J. and Das, G. D.** (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp Neurol.* 124, 319-335.
- Altman, J. and Das, G. D.** (1967). Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214, 1098-1101.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287-293.
- Anderson, D. J., Gage, F. H. and Weissman, I. L.** (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.* 7, 393-395.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y. and Nagasawa, T.** (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 5319-5323.
- Baal, N., Reisinger, K., Jahr, H., Bohle, R. M., Liang, O., Munstedt, K., Rao, C. V., Preissner, K. T. and Zygmunt, M. T.** (2004). Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. *Thromb. Haemost.* 92, 767-775.
- Bachoud-Levi, A. C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Boisse, M. F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M. J., Bourdet, C., Remy, P. et al.** (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 5, 303-309.
- Bachoud-Levi, A. C., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B. et al.** (2000). Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356, 1975-1979.
- Backlund, E. O., Granberg, P. O., Hamberger, B., Knutsson, E., Martensson, A., Sedvall, G., Seiger, A. and Olson, L.** (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg.* 62, 169-173.
- Baldauf, K. and Reymann, K. G.** (2005). Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res.* 1056, 158-167.
- Barker, R. A. and Widner, H.** (2004). Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx.* 1, 472-481.

- Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A. and Moyses, E.** (2005). In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130, 75-90.
- Ben-Hur, T., Idelson, M., Khaner, H., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A. and Reubinoff, B. E.** (2004). Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem cells* 22, 1246-1255.
- Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J. and Bergman, Y.** (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol. Cell Biol.* 18, 1866-1878.
- Bernier, P. J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M. and Parent, A.** (2002). Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 11464-11469.
- Bertani, N., Malatesta, P., Volpi, G., Sonego, P. and Perris, R.** (2005). Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J. Cell Sci.* 118, 3925-3936.
- Bianco, P., Riminucci, M., Kuznetsov, S. and Robey, P. G.** (1999). Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 9, 159-173.
- Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K. L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M. and Barde, Y. A.** (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat. Neurosci.* 7, 1003-1009.
- Biella, G., Di, F. F., Goffredo, D., Moiana, A., Taglietti, V., Conti, L., Cattaneo, E. and Toselli, M.** (2007). Differentiating embryonic stem-derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials. *Neuroscience* 149, 38-52.
- Bjorklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R. H., Dunnett, S. B. and Gage, F. H.** (1983). Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand. Suppl* 522, 9-18.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and Vescovi, A. L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J. and Ramalho-Santos, M.** (2007). Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1, 245-247.
- Block, F. and Schwarz, M.** (1999). [Neuroprotection in stroke. A critical overview]. *Nervenarzt* 70, 101-110.
- Blondheim, N. R., Levy, Y. S., Ben-Zur, T., Burshtein, A., Cherlow, T., Kan, I., Barzilai, R., Bahat-Stromza, M., Barhum, Y., Bulvik, S. et al.** (2006). Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev.* 15, 141-164.
- Boiani, M. and Schöler, H. R.** (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 872-884.
- Bonilla, S., Silva, A., Valdes, L., Geijo, E., Garcia-Verdugo, J. M. and Martinez, S.** (2005). Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience.* 133, 85-95.
- Bonnet, D.** (2003). Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 69, 219-229.

- Boraldi, F., Annovi, G., Paolinelli-Devincenzi, C., Tiozzo, R. and Quagliano, D.** (2008). The effect of serum withdrawal on the protein profile of quiescent human dermal fibroblasts in primary cell culture. *Proteomics*. 8, 66-82.
- Borlongan, C. V., Tajima, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. and Sanberg, P. R.** (1998). Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp. Neurol.* 149, 310-321.
- Bossolasco, P., Cova, L., Calzarossa, C., Rimoldi, S. G., Borsotti, C., Deliliers, G. L., Silani, V., Soligo, D. and Polli, E.** (2005). Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp. Neurol.* 193, 312-325.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. and Robertson, E.** (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
- Braun, H., Bühnemann, C., Neumann, J. and Reymann, K. G.** (2006). Preparation of a tissue-like cortical primary culture from embryonic rats using Matrigel and serum free Start V Medium. *J. Neurosci. Methods* 157, 32-38.
- Braun, H., Schafer, K. and Holtt, V.** (2002). BetaIII tubulin-expressing neurons reveal enhanced neurogenesis in hippocampal and cortical structures after a contusion trauma in rats. *J. Neurotrauma* 19, 975-983.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. and Blau, H. M.** (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 290, 1775-1779.
- Brederlau, A., Correia, A. S., Anisimov, S. V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U. et al.** (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem cells* 24, 1433-1440.
- Breunig, J. J., Arellano, J. I., Macklis, J. D. and Rakic, P.** (2007). Everything that glitters isn't gold: a critical review of postnatal neural precursor analyses. *Cell Stem Cell* 1, 612-627.
- Brockes, J. P. and Kumar, A.** (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 566-574.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S. E.** (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* 64, 278-294.
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D. and McKay, R. D.** (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-756.
- Bühnemann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C. Y., Braun, H., Schachner, M., Reymann, K. G. and Dihne, M.** (2006). Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129, 3238-3248.
- Bull, N. D. and Bartlett, P. F.** (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J. Neurosci.* 25, 10815-10821.
- Burns, T. C., Ortiz-Gonzalez, X. R., Gutierrez-Perez, M., Keene, C. D., Sharda, R., Demorest, Z. L., Jiang, Y., Nelson-Holte, M., Soriano, M., Nakagawa, Y. et al.** (2006). Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. *Stem Cells*. 24, 1121-1127.



- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. and Muhr, J.** (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* 6, 1162-1168.
- Calissano, P., Moore, B. W. and Friesen, A.** (1969). Effect of calcium ion on S-100, a protein of the nervous system. *Biochemistry* 8, 4318-4326.
- Cameron, H. A. and McKay, R. D.** (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* 435, 406-417.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S. and Gould, E.** (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.
- Campbell, K., Kalen, P., Victorin, K., Lundberg, C., Mandel, R. J. and Bjorklund, A.** (1993). Characterization of GABA release from intrastriatal striatal transplants: dependence on host-derived afferents. *Neuroscience* 53, 403-415.
- Caplan, A. I.** (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641-650.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. and Dalton, S.** (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885-896.
- Cattaneo, E. and McKay, R.** (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347, 762-765.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X. and Chopp, M.** (2001a). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J. Neurol. Sci.* 189, 49-57.
- Chen, J., Sanberg, P. R., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Willing, A. E., Sanchez-Ramos, J. and Chopp, M.** (2001b). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32, 2682-2688.
- Chen, L. B., Jiang, X. B. and Yang, L.** (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* 10, 3016-3020.
- Chen, X., Li, Y., Wang, L., Katakowski, M., Zhang, L., Chen, J., Xu, Y., Gautam, S. C. and Chopp, M.** (2002). Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology.* 22, 275-279.
- Chiu, D., Krieger, D., Villar-Cordova, C., Kasner, S. E., Morgenstern, L. B., Bratina, P. L., Yatsu, F. M. and Grotta, J. C.** (1998). Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: feasibility, safety, and efficacy in the first year of clinical practice. *Stroke* 29, 18-22.
- Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M. and Papoutsakis, E. T.** (2001). Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys. J.* 81, 675-684.
- Cipolleschi, M. G., Dello, S. P. and Olivetto, M.** (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031-2037.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. and Prockop, D. J.** (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3213-3218.

- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H. G. and Aigner, L.** (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1-14.
- Coyne, T. M., Marcus, A. J., Woodbury, D. and Black, I. B.** (2006). Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells.* 24, 2483-2492.
- Croft, A. P. and Przyborski, S. A.** (2006). Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells.* 24, 1841-1851.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., Roos, B. A. and Schiller, P. C.** (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell Sci.* 117, 2971-2981.
- 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.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. and Prockop, D. J.** (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 148-152.
- Dezawa, M., Ishikawa, H., Hoshino, M., Itokazu, Y. and Nabeshima, Y.** (2005). Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.* 3, 257-266.
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H. et al.** (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest* 113, 1701-1710.
- Dickhut, A., Gottwald, E., Steck, E., Heisel, C. and Richter, W.** (2008). Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci.* 13, 4517-4528.
- DiGirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R. and Prockop, D. J.** (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* 107, 275-281.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A.** (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-397.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and varez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. and varez-Buylla, A.** (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046-5061.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Kopranner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T. and Raz, E.** (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.
- Domen, J. and Weissman, I. L.** (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today* 5, 201-208.

- Dominici, M., Le, B. K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E.** (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 315-317.
- Dunnett, S. B., Carter, R. J., Watts, C., Torres, E. M., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. and Morton, A. J.** (1998). Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 154, 31-40.
- Dyce, P. W., Zhu, H., Craig, J. and Li, J.** (2004). Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 651-658.
- Dziewczapolski, G., Lie, D. C., Ray, J., Gage, F. H. and Shults, C. W.** (2003). Survival and differentiation of adult rat-derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. *Exp. Neurol.* 183, 653-664.
- Eckenhoff, M. F. and Rakic, P.** (1988). Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J. Neurosci.* 8, 2729-2747.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T. and Hevner, R. F.** (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247-251.
- Erdo, F., Buhle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Focking, M., Kustermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J. et al.** (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 780-785.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. and Kempermann, G.** (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* 23, 373-382.
- Frederiksen, K. and McKay, R. D.** (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J. Neurosci.* 8, 1144-1151.
- Freed, C. R., Breeze, R. E., Rosenberg, N. L., Schneck, S. A., Kriek, E., Qi, J. X., Lone, T., Zhang, Y. B., Snyder, J. A., Wells, T. H. et al.** (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 327, 1549-1555.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q. et al.** (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 710-719.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. and Lalykina, K. S.** (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393-403.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. and Kulagina, N. N.** (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267-274.
- Frisen, J., Johansson, C. B., Torok, C., Risling, M. and Lendahl, U.** (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* 131, 453-464.

- Fukuda, K. and Fujita, J.** (2005). Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int.* 68, 1940-1943.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y. and Hisatsune, T.** (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 9357-9366.
- Gallo, V. and Armstrong, R. C.** (1995). Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J. Neurosci.* 15, 394-406.
- Gandarillas, A. and Watt, F. M.** (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* 11, 2869-2882.
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G. and Sofroniew, M. V.** (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7, 1233-1241.
- Gates, M. A., Thomas, L. B., Howard, E. M., Laywell, E. D., Sajin, B., Faissner, A., Götz, B., Silver, J. and Steindler, D. A.** (1995). Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J. Comp Neurol.* 361, 249-266.
- Goldman, S. A. and Nottebohm, F.** (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 2390-2394.
- Good, P., Yoda, A., Sakakibara, S., Yamamoto, A., Imai, T., Sawa, H., Ikeuchi, T., Tsuji, S., Satoh, H. and Okano, H.** (1998). The human Musashi homolog 1 (MS11) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics* 52, 382-384.
- Götz, M., Stoykova, A. and Gruss, P.** (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 1031-1044.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L.** (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749-765.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W. and Gimble, J. M.** (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiol* 189, 54-63.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. and Shi, S.** (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13625-13630.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W. et al.** (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-1203.
- Guo, H. B. and Zou, F.** (2008). [Electrophysiological properties of outward voltage-gated potassium channels of neural stem cells from adult rat hippocampus]. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 88, 179-184.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and Mulligan, R. C.** (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Haan, E. A., Boss, B. D. and Cowan, W. M.** (1982). Production and characterization of monoclonal antibodies against the "brain-specific" proteins 14-3-2 and S-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 7585-7589.

- Hahn, J. Y., Cho, H. J., Kang, H. J., Kim, T. S., Kim, M. H., Chung, J. H., Bae, J. W., Oh, B. H., Park, Y. B. and Kim, H. S.** (2008). Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 933-943.
- Hakim, A. M.** (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol. Sci.* 14, 557-559.
- Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M. and Isacson, O.** (1992). Intrastratial transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 4187-4191.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. and Götz, M.** (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15-30.
- Hay, D. C., Sutherland, L., Clark, J. and Burdon, T.** (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem cells* 22, 225-235.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. et al.** (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 117, 4411-4422.
- Hermann, A., Liebau, S., Gastl, R., Fickert, S., Habisch, H. J., Fiedler, J., Schwarz, J., Brenner, R. and Storch, A.** (2006a). Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J. Neurosci. Res.* 83, 1502-1514.
- Hermann, A., Maisel, M. and Storch, A.** (2006b). Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6, 653-670.
- Herschman, H. R., Levine, L. and De, V. J.** (1971). Appearance of a brain-specific antigen (S-100 protein) in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 18, 629-633.
- Herzog, E. L., Chai, L. and Krause, D. S.** (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Heubach, J. F., Graf, E. M., Leutheuser, J., Bock, M., Balana, B., Zahanich, I., Christ, T., Boxberger, S., Wettwer, E. and Ravens, U.** (2004). Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J. Physiol.* 554, 659-672.
- Hockfield, S. and McKay, R. D.** (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5, 3310-3328.
- Hossmann, K. A.** (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36, 557-565.
- Hurtig, H., Joyce, J., Sladek, J. R., Jr. and Trojanowski, J. Q.** (1989). Postmortem analysis of adrenal-medulla-to-caudate autograft in a patient with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 25, 607-614.
- Isacson, O., Bjorklund, L. M. and Schumacher, J. M.** (2003). Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3, S135-S146.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. and Goodell, M. A.** (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest* 107, 1395-1402.

- Jelitai, M., Anderova, M., Chvatal, A. and Madarasz, E.** (2007). Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: study with an immortalized neuroectodermal cell line. *J. Neurosci. Res.* 85, 1606-1617.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. et al.** (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. and Verfaillie, C. M.** (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896-904.
- Jin, K., Mao, X. O., Batteur, S., Sun, Y. and Greenberg, D. A.** (2003). Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. *Exp. Neurol.* 184, 78-89.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S. et al.** (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-1012.
- Kang, S. K., Lee, D. H., Bae, Y. C., Kim, H. K., Baik, S. Y. and Jung, J. S.** (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 183, 355-366.
- Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Jiang, Y., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M. and Low, W. C.** (2003). Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transplant.* 12, 201-213.
- Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C., Masel, J., Yenari, M. A., Weissman, I. L., Uchida, N. et al.** (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11839-11844.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H.** (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kendall, A. L., Rayment, F. D., Torres, E. M., Baker, H. F., Ridley, R. M. and Dunnett, S. B.** (1998). Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat. Med.* 4, 727-729.
- Kessler, D., Levine, L. and Fasman, G.** (1968). Some conformational and immunological properties of a bovine brain acidic protein (S-100). *Biochemistry* 7, 758-764.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. et al.** (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50-56.
- Kim, W. S. and Stocum, D. L.** (1986). Retinoic acid modifies positional memory in the anteroposterior axis of regenerating axolotl limbs. *Dev. Biol.* 114, 170-179.
- Kondo, T., Johnson, S. A., Yoder, M. C., Romand, R. and Hashino, E.** (2005). Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 4789-4794.

- Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K. R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E. M., McGrogan, M. et al.** (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55, 565-569.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. and Phinney, D. G.** (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10711-10716.
- Kopyov, O. V., Jacques, S., Lieberman, A., Duma, C. M. and Eagle, K. S.** (1998). Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp. Neurol.* 149, 97-108.
- Kordower, J. H., Freeman, T. B., Chen, E. Y., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., Hauser, R. A., Snow, B. and Olanow, C. W.** (1998). Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13, 383-393.
- Kordower, J. H., Freeman, T. B., Snow, B. J., Vingerhoets, F. J., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., Hauser, R. A., Smith, D. A., Nauert, G. M., Perl, D. P. et al.** (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 332, 1118-1124.
- Kordower, J. H., Rosenstein, J. M., Collier, T. J., Burke, M. A., Chen, E. Y., Li, J. M., Martel, L., Levey, A. E., Mufson, E. J., Freeman, T. B. et al.** (1996). Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J. Comp Neurol.* 370, 203-230.
- Koso, H., Ouchi, Y., Tabata, Y., Aoki, Y., Satoh, S., Arai, K. and Watanabe, S.** (2006). SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev. Biol.* 292, 265-276.
- Kotton, D. N., Summer, R. and Fine, A.** (2004). Lung stem cells: new paradigms. *Exp. Hematol.* 32, 340-343.
- Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A. et al.** (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone.* 40, 382-390.
- Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J. and May, W. S.** (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84, 691-701.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S. J.** (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Kruman, I., Guo, Q. and Mattson, M. P.** (1998). Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 51, 293-308.
- Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A. E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D. H. and Wedel, T.** (2006). Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann. Anat.* 188, 503-517.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2004a). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J. Mol. Histol.* 35, 233-245.

- Kucia, M., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2005). Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol. Cell* 97, 133-146.
- Kucia, M., Ratajczak, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, M. Z.** (2004b). Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol. Dis.* 32, 52-57.
- Kucia, M., Reza, R., Campbell, F. R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2006a). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20, 857-869.
- Kucia, M., Zuba-Surma, E., Wysoczynski, M., Dobrowolska, H., Reza, R., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2006b). Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *J. Physiol Pharmacol.* 57 Suppl 5, 5-18.
- Kuhn, H. G., Conklin-Anson, H. and Gage, F. H.** (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. and Gage, F. H.** (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17, 5820-5829.
- Kulkarni, G. V. and McCulloch, C. A.** (1994). Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 5), 1169-1179.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T.** (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell Biol.* 25, 2475-2485.
- Kurozumi, K., Nakamura, K., Tamiya, T., Kawano, Y., Ishii, K., Kobune, M., Hirai, S., Uchida, H., Sasaki, K., Ito, Y. et al.** (2005). Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.* 11, 96-104.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L. and Grompe, M.** (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6, 1229-1234.
- Lamoury, F. M., Croitoru-Lamoury, J. and Brew, B. J.** (2006). Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy.* 8, 228-242.
- Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C. and Steindler, D. A.** (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13883-13888.
- Lee, J. B., Kuroda, S., Shichinohe, H., Yano, S., Kobayashi, H., Hida, K. and Iwasaki, Y.** (2004). A pre-clinical assessment model of rat autogeneic bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 14, 37-44.
- Lee, M. K., Rebhun, L. I. and Frankfurter, A.** (1990). Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7195-7199.
- Lei, Z., Yongda, L., Jun, M., Yingyu, S., Shaoju, Z., Xinwen, Z. and Mingxue, Z.** (2007). Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol. Int.* 31, 916-923.



- 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.
- Lenington, J. B., Yang, Z. and Conover, J. C.** (2003). Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 99.
- Leuner, B., Gould, E. and Shors, T. J.** (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216-224.
- Levitt, P. and Rakic, P.** (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp Neurol.* 193, 815-840.
- Levy, Y. S., Merims, D., Panet, H., Barhum, Y., Melamed, E. and Offen, D.** (2003). Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells. *J. Mol. Neurosci.* 21, 121-132.
- Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G. and Hoffman, R. M.** (2003). Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9958-9961.
- Li, Y., Chen, J. and Chopp, M.** (2001a). Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant.* 10, 31-40.
- Li, Y., Chen, J., Wang, L., Lu, M. and Chopp, M.** (2001b). Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56, 1666-1672.
- Li, Y., Chen, J., Wang, L., Zhang, L., Lu, M. and Chopp, M.** (2001c). Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 316, 67-70.
- Li, Y., Chopp, M., Chen, J., Wang, L., Gautam, S. C., Xu, Y. X. and Zhang, Z.** (2000). Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 20, 1311-1319.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C. and Chan, R. J.** (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635-637.
- Lichtenwalner RJ and Parent JM.** (2006). Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1-20.
- Lin, F., Cordes, K., Li, L., Hood, L., Couser, W. G., Shankland, S. J. and Igarashi, P.** (2003). Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1188-1199.
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D. et al.** (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574-577.
- Ling, T. Y., Kuo, M. D., Li, C. L., Yu, A. L., Huang, Y. H., Wu, T. J., Lin, Y. C., Chen, S. H. and Yu, J.** (2006). Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 9530-9535.
- Liu, F. C., Dunnett, S. B. and Graybiel, A. M.** (1992). Influence of mesostriatal afferents on the development and transmitter regulation of intrastratial grafts derived from embryonic striatal primordia. *J. Neurosci.* 12, 4281-4297.

- Lopez-Martin, E., Caruncho, H. J., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M. J. and Labandeira-Garcia, J. L.** (1999). Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. *J. Comp Neurol.* 406, 199-206.
- Lu, D., Mahmood, A., Wang, L., Li, Y., Lu, M. and Chopp, M.** (2001). Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12, 559-563.
- Lu, P., Blesch, A. and Tuszynski, M. H.** (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77, 174-191.
- Lundberg, C., Martinez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R. D. and Bjorklund, A.** (1997). Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* 145, 342-360.
- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N.** (2005). Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells* 10, 1001-1014.
- Magne, D., Vinatier, C., Julien, M., Weiss, P. and Guicheux, J.** (2005). Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol. Med.* 11, 519-526.
- Mahmood, A., Lu, D. and Chopp, M.** (2004a). Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 55, 1185-1193.
- Mahmood, A., Lu, D. and Chopp, M.** (2004b). Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 21, 33-39.
- Mahmood, A., Lu, D., Wang, L., Li, Y., Lu, M. and Chopp, M.** (2001). Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 49, 1196-1203.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. and Götz, M.** (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751-764.
- Mannello, F. and Tonti, G. A.** (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem cells* 25, 1603-1609.
- Martin, G. R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7634-7638.
- McBride, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E. Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N. and Kordower, J. H.** (2004). Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J. Comp Neurol.* 475, 211-219.
- McGuckin, C. P., Forraz, N., Baradez, M. O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R. and Denner, L.** (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 38, 245-255.
- McKay, R. D.** (1999). Brain stem cells change their identity. *Nat. Med.* 5, 261-262.
- McLaren, A.** (1992). Development of primordial germ cells in the mouse. *Andrologia* 24, 243-247.
- McLaren, A.** (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, 1-15.

- Medvinsky, A. and Dzierzak, E.** (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Vinuela, A., Ferrari, D., Bjorklund, L., Dagher, A. and Isacson, O.** (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain* 128, 1498-1510.
- Menezes, J. R. and Luskin, M. B.** (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J. Neurosci.* 14, 5399-5416.
- Metcalf, D.** (2007). On hematopoietic stem cell fate. *Immunity.* 26, 669-673.
- Mets, T. and Verdonk, G.** (1981). In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech. Ageing Dev.* 16, 81-89.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and McKercher, S. R.** (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- Mezey, E., Key, S., Vogelsang, G., Szalayova, I., Lange, G. D. and Crain, B.** (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1364-1369.
- Miller, M. W. and Nowakowski, R. S.** (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 457, 44-52.
- Mimura, T., Dezawa, M., Kanno, H., Sawada, H. and Yamamoto, I.** (2004). Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J. Neurosurg.* 101, 806-812.
- Modo, M., Stroemer, R. P., Tang, E., Patel, S. and Hodges, H.** (2002). Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 33, 2270-2278.
- Mokry, J. and Nemecek, S.** (1998). Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol. (Praha)* 44, 155-161.
- Molyneaux, K. and Wylie, C.** (2004). Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 537-544.
- Moore, B. W.** (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 739-744.
- Morrison, S. J. and Weissman, I. L.** (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1, 661-673.
- Munoz-Elias, G., Marcus, A. J., Coyne, T. M., Woodbury, D. and Black, I. B.** (2004). Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J. Neurosci.* 24, 4585-4595.
- Munoz-Elias, G., Woodbury, D. and Black, I. B.** (2003). Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem cells* 21, 437-448.
- Nacher, J., Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J. and McEwen, B. S.** (2005). Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* 81, 753-761.
- Nakao, N., Ogura, M., Nakai, K. and Itakura, T.** (1999). Embryonic striatal grafts restore neuronal activity of the globus pallidus in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* 88, 469-477.

- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer, I.** (2004). Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77, 192-204.
- Neumann, J., Gunzer, M., Gutzeit, H. O., Ullrich, O., Reymann, K. G. and Dinkel, K.** (2006). Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* 20, 714-716.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. and Smith, A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Niemeyer, P., Krause, U., Kasten, P., Kreuz, P. C., Henle, P., Sudkam, N. P. and Mehlhorn, A.** (2006). Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 1, 21-27.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A. and Muramatsu, M.** (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell Biol.* 19, 5453-5465.
- 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.
- Noth, U., Steinert, A. F. and Tuan, R. S.** (2008). Technology Insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*
- O'Farrell, P. H., Stumpff, J. and Su, T. T.** (2004). Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? *Curr. Biol.* 14, R35-R45.
- Obrenovitch, T. P.** (1995). The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* 7, 297-323.
- Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H. and Nishikawa, S.** (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 174, 63-71.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. and Nishimune, Y.** (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. and Hamada, H.** (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-472.
- Okano, H.** (2002). Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J. Med.* 51, 115-128.
- Okano, H., Imai, T. and Okabe, M.** (2002). Musashi: a translational regulator of cell fate. *J. Cell Sci.* 115, 1355-1359.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S.** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 448, 313-317.
- Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi, T., Nabeshima, Y., Kuro-o M, Nabeshima, Y., Boon, K., Keaveney, M. et al.** (1998). UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17, 2019-2032.

- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. and Ishikawa, F.** (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307-5317.
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J. et al.** (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54, 403-414.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al.** (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N. and Phinney, D. G.** (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8407-8411.
- Owen, M. and Friedenstein, A. J.** (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42-60.
- Pacary, E., Legros, H., Valable, S., Duchatelle, P., Lecocq, M., Petit, E., Nicole, O. and Bernaudin, M.** (2006). Synergistic effects of CoCl<sub>2</sub> and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *J. Cell Sci.* 119, 2667-2678.
- Padovan, C. S., Jahn, K., Birnbaum, T., Reich, P., Sostak, P., Strupp, M. and Straube, A.** (2003). Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant.* 12, 839-848.
- Park, K. I.** (2000). Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med. J.* 41, 825-835.
- Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O. and Prockop, D. J.** (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4857-4861.
- Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J. and Schöler, H.** (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71, 89-98.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Pevny, L. and Rao, M. S.** (2003). The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* 26, 351-359.
- Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M. and Lovell-Badge, R.** (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125, 1967-1978.
- Philpott, L. M., Kopyov, O. V., Lee, A. J., Jacques, S., Duma, C. M., Caine, S., Yang, M. and Eagle, K. S.** (1997). Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations. *Cell Transplant.* 6, 203-212.
- Piccini, P., Lindvall, O., Bjorklund, A., Brundin, P., Hagell, P., Ceravolo, R., Oertel, W., Quinn, N., Samuel, M., Rehncrona, S. et al.** (2000). Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann. Neurol.* 48, 689-695.
- Piper, D. R., Mujtaba, T., Rao, M. S. and Lucero, M. T.** (2000). Immunocytochemical and physiological characterization of a population of cultured human neural precursors. *J. Neurophysiol.* 84, 534-548.

- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R.** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pochampally, R. R., Smith, J. R., Ylostalo, J. and Prockop, D. J.** (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103, 1647-1652.
- Posmantur, R., McGinnis, K., Nadimpalli, R., Gilbertsen, R. B. and Wang, K. K.** (1997). Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 68, 2328-2337.
- Priller, J., Flugel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C. A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B. A. et al.** (2001). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* 7, 1356-1361.
- Prockop, D. J.** (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Raff, M.** (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 1-22.
- Raff, M. C., Abney, E. R. and Miller, R. H.** (1984). Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev. Biol.* 106, 53-60.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Majka, M., Reza, R. and Ratajczak, J.** (2004a). Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem. Cytobiol.* 42, 139-146.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Reza, R., Majka, M., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, J.** (2004b). Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 18, 29-40.
- Ratajczak, M. Z., Machalinski, B., Wojakowski, W., Ratajczak, J. and Kucia, M.** (2007a). A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 21, 860-867.
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E. K., Machalinski, B. and Kucia, M.** (2007b). Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J. Appl. Genet.* 48, 307-319.
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A. and Ben-Hur, T.** (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1134-1140.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. and Bongso, A.** (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399-404.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. and Verfaillie, C. M.** (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. and Evans, M.** (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Roche, S., Richard, M. J. and Favrot, M. C.** (2007). Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J. Cell Biochem.* 101, 271-280.

- Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W. and Staudt, L. M.** (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686-692.
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F. and Goldman, S. A.** (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat. Med.* 12, 1259-1268.
- Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S. et al.** (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol.* 176, 230-242.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N. et al.** (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247-256.
- Schmidt, W. and Reymann, K. G.** (2002). Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 334, 153-156.
- Schöler, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H. and Gruss, P.** (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 9, 2185-2195.
- Schulz, W. A. and Hoffmann, M. J.** (2007). Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics.* 2, 37-42.
- Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. and Verfaillie, C. M.** (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest* 109, 1291-1302.
- Scintu, F., Reali, C., Pillai, R., Badiali, M., Sanna, M. A., Argioli, F., Ristaldi, M. S. and Sogos, V.** (2006). Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC. Neurosci.* 7:14., 14.
- Seale, P. and Rudnicki, M. A.** (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 218, 115-124.
- Sell, S.** (1990). Is there a liver stem cell? *Cancer Res.* 50, 3811-3815.
- Simm, A., Bertsch, G., Frank, H., Zimmermann, U. and Hoppe, J.** (1997). Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 7), 819-828.
- Song, J., Lee, S. T., Kang, W., Park, J. E., Chu, K., Lee, S. E., Hwang, T., Chung, H. and Kim, M.** (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci. Lett.* 423, 58-61.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L.** (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B. O., Carvey, P. M., Kupsch, A. and Schwarz, J.** (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp. Neurol.* 170, 317-325.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S. et al.** (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.

- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 663-676.
- Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C. and Raff, M. C.** (2001). Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291, 868-871.
- Tao, H., Rao, R. and Ma, D. D.** (2005). Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev. Growth Differ.* 47, 423-433.
- Taupin, P.** (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res. Rev.* 53, 198-214.
- Taupin, P.** (2006). Adult neurogenesis and neuroplasticity. *Restor. Neurol. Neurosci.* 24, 9-15.
- Taupin, P. and Gage, F. H.** (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 69, 745-749.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W.** (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 416, 542-545.
- Theise, N. D., Krause, D. S. and Sharkis, S.** (2003). Comment on "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells". *Science* 299, 1317.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z. and Lindvall, O.** (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem cells* 24, 739-747.
- Tohyama, T., Lee, V. M., Rorke, L. B., Marvin, M., McKay, R. D. and Trojanowski, J. Q.** (1992). Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 66, 303-313.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. and Miller, F. D.** (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3, 778-784.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M. and Okuda, A.** (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* 30, 3202-3213.
- Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. and Bron, D.** (2004). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72, 319-326.
- Tzaribachev, N., Vaegler, M., Schaefer, J., Reize, P., Rudert, M., Handgretinger, R. and Muller, I.** (2008). Mesenchymal stromal cells: a novel treatment option for steroid-induced avascular osteonecrosis. *Isr. Med. Assoc. J.* 10, 232-234.
- Uchida, N. and Weissman, I. L.** (1992). Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J. Exp. Med.* 175, 175-184.



- Ulloa-Montoya, F., Kidder, B. L., Pauwelyn, K. A., Chase, L. G., Luttun, A., Crabbe, A., Geraerts, M., Sharov, A. A., Piao, Y., Ko, M. S. et al.** (2007). Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol.* 8, R163.
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M. and Hu, W. S.** (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 12-27.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E. J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P. J. and Sharpe, P. T.** (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech. Dev.* 49, 23-36.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS and Alonso JR.** (2005). Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res Protoc.* 15, 127-134.
- Van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F. H.** (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R. and Russell, D. W.** (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
- Veizovic, T., Beech, J. S., Stroemer, R. P., Watson, W. P. and Hodges, H.** (2001). Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 32, 1012-1019.
- Verfaillie, C. M.** (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 12, 502-508.
- Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D. and Weiss, S.** (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11, 951-966.
- Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W. and Buhring, H. J.** (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88, 126-133.
- Wagers, A. J. and Weissman, I. L.** (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Wahlgren, N. G. and Ahmed, N.** (2004). Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc. Dis.* 17 Suppl 1, 153-166.
- Wang, Z., Goh, J., Das, D. S., Ge, Z., Ouyang, H., Chong, J. S., Low, S. L. and Lee, E. H.** (2006). Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng* 12, 1753-1761.
- Weimann, J. M., Charlton, C. A., Brazelton, T. R., Hackman, R. C. and Blau, H. M.** (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2088-2093.
- Weir, C., Morel-Kopp, M. C., Gill, A., Tinworth, K., Ladd, L., Hunyor, S. N. and Ward, C.** (2008). Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Characterisation and In Vivo Fluorescent Dye Tracking. *Heart Lung Circ.*
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E. and Jaenisch, R.** (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 448, 318-324.

- Whetton, A. D. and Graham, G. J.** (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 9, 233-238.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Navarrete-Santos, A., Anisimov, S. V., Steinfarz, B., Tarasov, K. V., Brugh, S. A., Zahanich, I., Ruschenschmidt, C. et al.** (2006). Signals from embryonic fibroblasts induce adult intestinal epithelial cells to form nestin-positive cells with proliferation and multilineage differentiation capacity in vitro. *Stem cells* 24, 2085-2097.
- Willing, A. E., Lixian, J., Milliken, M., Poulos, S., Zigova, T., Song, S., Hart, C., Sanchez-Ramos, J. and Sanberg, P. R.** (2003). Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J. Neurosci. Res.* 73, 296-307.
- Wislet-Gendebien, S., Bruyere, F., Hans, G., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B.** (2004). Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC. Neurosci.* 5, 33.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J. M., Moonen, G. and Rogister, B.** (2005a). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem cells* 23, 392-402.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B.** (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 116, 3295-3302.
- Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P. and Rogister, B.** (2005b). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res. Bull.* 68, 95-102.
- Woodbury, D., Reynolds, K. and Black, I. B.** (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 69, 908-917.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B.** (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370.
- Wu, D. M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L. and Raymond, P. A.** (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2115-2124.
- Yamanaka, S.** (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 39-49.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Yu, H., Fang, D., Kumar, S. M., Li, L., Nguyen, T. K., Acs, G., Herlyn, M. and Xu, X.** (2006). Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am. J. Pathol.* 168, 1879-1888.
- Zeng, L., Rahrman, E., Hu, Q., Lund, T., Sandquist, L., Felten, M., O'Brien, T. D., Zhang, J. and Verfaillie, C.** (2006). Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem cells* 24, 2355-2366.
- Zhao, L. R., Duan, W. M., Reyes, M., Keene, C. D., Verfaillie, C. M. and Low, W. C.** (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.* 174, 11-20.

**Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J. and Janson, A. M.** (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7925-7930.

**Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S. and Chen, X.** (2006). Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem cells* 24, 416-425.

**Zimmer, D. B. and Van Eldik, L. J.** (1987). Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am. J. Physiol* 252, C285-C289.

**Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R.** (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

**Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K. and Habener, J. F.** (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-533.

## 8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus G. Reymann dafür danken, dass er mir die Bearbeitung dieses interessanten und aktuellen Themas ermöglicht hat. Darüber hinaus danke ich ihm und Frau Christel Mühlenberg für ihre Unterstützung während meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Holger Braun für seine hervorragende Betreuung, seine Unterstützung, seinen Rat und nicht zuletzt für das kritische Lesen der Dissertation. Auch danke ich ihm dafür, dass er mir oft neue Sichtweisen eröffnet hat und mich an seinen Kenntnissen teilhaben ließ.

Weiterhin danke ich Dr. Claudia Bühnemann für ihre Hilfe und ihren Rat in allen wissenschaftlichen Angelegenheiten und die unterhaltsamen Stunden, die wir oft im Labor und außerhalb hatten.

Bei Anja Günther-Kern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die Immunhisto- und zytochemie, das Confocal und die OP-Methoden geduldig näher gebracht hat.

Dr. Kathrin Baldauf gilt mein Dank für ihre Hilfe bei statistischen Fragen und ihre sehr hilfreichen Anmerkungen beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Jens Neumann und Raik Rönicke danke ich für die unzähligen anregenden Gespräche, die Unterstützung und die produktiven Tagungsreisen.

Mein weiterer Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des FAN-Teams für die Unterstützung und die schöne Zeit: Conny Garz, Susanne von Kenne, Markus Scharm, Dr. Ulrich Schröder, Katrin Böhm, Karla Krautwald, Jenny Schneeberg, Marlen Schumann, Corinna Klette, Dr. Monika Riek-Burchardt, Cathleen Knape, Ines Heinemann, Katja Müller, Markus Aswendt, Maika Dökert, Anja Klemm, Dr. Claudia Pforte, Jessica Zajontz, Dorothee Terhardt, Susanne Schöwe, Doris Trzeciak, Dr. Klaus Dinkel, Diane Schrader, Dr. Torsten Hecht, Dr. Maria Straßburger, Claudia Ladwig und Kristin Peters.

Außerdem bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Volkmar Leßmann und Dr. Thomas Munsch für ihre Unterstützung bei den elektrophysiologischen Messungen. Bei Dr. Heiner Sann möchte ich mich für seine Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie bedanken.

Danke sage ich meinen Eltern und meinem Bruder dafür, dass sie mir den Weg zur Promotion ermöglichten.

Abschließend danke ich meiner Frau Jenny, dass sie mir in den Jahren meiner Promotion eine große Unterstützung war, mich immer wieder aufgemuntert und oft auch ausgehalten hat.

Meinem Sohn Mika danke ich dafür, dass es ihn gibt.

Magdeburg, 25.08.2008

## 9 PUBLIKATIONEN

J. Neumann, **S. Sauerzweig**, R. Rönicke, F. Gunzer, K. Dinkel, O. Ullrich, M. Gunzer and K. G. Reymann. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes – a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 2008, 28(23):5965-75

A. Sarnowska, H. Braun, **S. Sauerzweig**, K. G. Reymann. Neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. (eingereicht)

**S. Sauerzweig**, K. G. Reymann und H. Braun. A population of serum deprivation-induced bone marrow stem cells (SD-BMSC) expresses marker typical for embryonic and neural stem cells. (eingereicht)

**S. Sauerzweig**, K. Baldauf, H. Braun und K. G. Reymann. Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker. (eingereicht)

**10 LEBENS LAUF**

Name	Sauerzweig
Vorname	Steven
Geburtsdatum	24.04.1980
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	verheiratet
Kinder	ein Sohn
Staatsangehörigkeit	deutsch

**Schulbildung**

1986-1991	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Erich Weinert“ in Magdeburg
1991-1993	Besuch des „Werner-von-Siemens-Gymnasium“ in Magdeburg
1993-1998	Besuch der IGS „Willy Brandt“ in Magdeburg

**Wehrdienst**

1998-1999	Absolvierung des Grundwehrdienstes
	11/1998-12/1998: Panzergrenadier in Bad Segeberg
	01/1999-08/1999: Panzerpionier in Lüneburg

**Berufsausbildung**

1999-2004	Studium der Biotechnologie an der Hochschule Anhalt, Standort Köthen (FH)
2004	Abschluss als Dipl.-Ing. (FH)
2004-2008	Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. K. G. Reymann am Leibniz-Institut für Neurobiologie

Magdeburg, 25.08.2008