

Analyse

des neuronalen Differenzierungspotentials

androgenetischer muriner embryonaler

Stammzellen *in vitro* und *in vivo*

Julius-Maximilians-

**UNIVERSITÄT
WÜRZBURG**



**Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von Soon Won Choi
geboren in Suwon, Süd-Korea**

Analyse des neuronalen Differenzierungspotentials
androgenetischer muriner embryonaler Stammzellen
in vitro und *in vivo*

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Soon Won Choi

geboren in Suwon, Süd-Korea

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Albrecht M. Müller

Gutachter: PD Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	5
Zusammenfassung	7
Summary	9
1. Einleitung	11
1.1. Stammzellen	11
1.1.1. Adulte und embryonale Stammzellen.....	11
1.1.2. Induzierte pluripotente Stammzellen.....	13
1.1.3. Humane ES Zellen.....	13
1.2. Uniparentale Stammzellen	14
1.2.1. Parthenogenese und uniparentale Embryonen.....	14
1.2.2. Uniparentale ES Zellen.....	15
1.2.3. Differenzierungspotential von uniparentalen Zellen.....	16
1.2.4. Genomisches <i>Imprinting</i> : was, wann und wie?.....	17
1.2.5. Genomisches <i>Imprinting</i> : krankheitsrelevant?.....	19
1.3. Therapeutische Perspektive patientenspezifischer Zellen	19
1.3.1. Pluripotente Zellen für zukünftige Therapien.....	19
1.3.2. <i>In vitro</i> Generation von Therapie-relevanten neuronalen Zelltypen.....	20
1.4. Zielsetzung und Experimentelle Strategien	21
2. Materialien und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.1.1. Zellen.....	23
2.1.2. Mäuse.....	23
2.1.3. Medien und Wachstumsfaktoren.....	24
2.1.4. Chemikalien und Lösungen.....	26
2.1.5. Antikörper.....	27
2.1.5. Primersequenzen.....	28
2.1.7. Geräte.....	28
2.2. Methoden	29
2.2.1. Zellkultur.....	29
2.2.2. Molekularbiologische Analysen.....	31
2.2.3. Immunhistochemische Färbungen.....	32
2.2.4. Untersuchung zur Frequenz Kolonie-bildender Zellen (CFC).....	33
2.2.5. <i>in vivo</i> Analyse von pNPCs in TBI-Modell.....	33

3. Ergebnisse	36
3.1. Neurale in vitro Differenzierung von AG und N ES Zellen	36
3.1.1. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu pNPCs	36
3.1.2. Differenzierung von AG und N pNPCs zu neuronalen Zelltypen	38
3.1.3. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu DA Neuronen	38
3.1.4. Genomisches <i>Imprinting</i> in AG und N ES Zellen, in pNPCs und in DA Neuronen	40
3.2. Neurale in vivo Differenzierung von AG und N ES Zellen in fötalen Chimären	42
3.2.1. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu DA Neuronen in E12.5 und E16.5 Embryonen.....	42
3.2.2. Verteilung von AG und N Donorzellen in E16.5 chimären Gehirnen	45
3.3. Stereotaktische Transplantation von pNPCs ins Striatum eines traumatisierten Mausgehirns	47
3.3.1. ES Zell-artige Kolonien in ES Zell-abgeleiteten pNPC-Kulturen.....	47
3.3.2. Teratombildung nach Transplantation von pNPCs	49
3.3.3. Differenzierung von 22 Tage alten pNPCs zu neuronalen Zelltypen nach Transplantation in ein traumatisiertes Gehirn	52
4. Diskussion	55
4.1. Das neurale Differenzierungspotential von AG und N ES Zellen	55
4.2. Vergleich zwischen uni- und biparentalen ES Zellen bezüglich ihrer neuronalen in vitro bzw. in vivo Differenzierungsaktivitäten	56
4.2.1. Untersuchung der Fähigkeit zur Bildung von funktionellen Gewebestammzellen	57
4.2.2. Untersuchung der Unterschiede zwischen uniparentalen und biparentalen ES Zellen	57
4.3. Pluripotente ES Zellen in der regenerativen Medizin	59
4.3.1. Humane pluripotente ES Zellen	59
4.3.2. Kandidaten für patientenspezifische pluripotente ES Zellen.....	60
4.3.3. Therapeutische Anwendungen patientenspezifischer Zellen in Krankheitsmodellen	61
4.3.4. Abwendung der Teratombildung nach Transplantation	62
4.4. Fazit	64
5. Literaturverzeichnis	65
6. Danksagung	74
7. Erklärungen	75
8. Curriculum Vitae	76
9. Publikationen	77

Abkürzungen

	Englische Bedeutung	Deutsche Bedeutung
Abb.	figure	Abbildung
AG	androgenetic	androgenetisch
AP	alkaline phosphatase	alkalische Phosphatase
AS	Angelman Syndrom	Angelman-Syndrom
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	
bp	base pair	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin	
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
cDNA	coding DNA	kodierende DNA
CFC	colony-forming cell	Kolonie-bildende Zelle
Ct	cycle time	Zykluszeit
DA	dopaminergic	dopaminerg
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH₂O	deionized and distilled water	deionisiertes und destilliertes Wasser
DEPC	diethylpyrocarbonate	Diethyl dicarbonat
DIk1	delta-like 1 homolog	
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	Desoxynukleosidtriphosphat
E12.5	embryonic day 12.5	embryonaler Tag 12,5
E16.5	embryonic day 16.5	embryonaler Tag 16,5
EB	embryoid body	
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
ESC (ES Zellen)	embryonic stem cell	embryonale Stammzelle
FCS	fetal bovine serum	fötales Kälberserum
GCV	Ganciclovir	Ganciclovir
gDNA	genomic DNA	genomische DNA
GFAP	glial fibrillary acidic protein	
GG	gynogenetic	gynogenetisch
H19	non-protein coding imprinted maternally expressed transcript	
HBSS	Hank's balanced salt solution	
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonische Säure]
hES Zelle	human embryonic stem cell	menschliche embryonale Stammzelle
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSC	hematopoetic stem cell	hämatopoetische Stammzelle

HSV-tk	herpes simplex virus thymidine kinase	
ICF	immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies	
ICM	inner cell mass	Inneren Zellmasse
IGF2	insulin-like growth factor 2	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2
IGF2r	insulin-like growth factor 2 receptor	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2 Rezeptor
IgG	immunoglobulin G	Immunglobulin G
iPS cell	induced pluripotent stem cell	induzierte pluripotente Stammzelle
LIF	leukemia inhibitory factor	Leukämie-Hemmender Faktor
MAP2	microtubule-associated protein 2	
MEF	murine embryonic fibroblast	Muriner embryonaler Fibroblast
MHC	major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
N	normal fertilized / biparental	normal befruchtet / biparental
NeuN	neuronal nucleic antigen	neuronales nukleäres Antigen
NSC	neural stem cell	neurale Stammzelle
Nurr1	nuclear receptor related 1	
PBS	phosphate buffered saline	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	
PCR	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PG	parthenogenetic	parthenogenetisch
PIPES	1,4-piperazinediethanesulfonic acid	
PITX3	pituitary homeobox 3	
pNPC	pan-neural progenitor cell	<i>pan</i> -neurale Vorläuferzelle
PWS	Prader-Willi Syndrom	Prader-Willi-Syndrom
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCNT	somatic cell nuclear transfer	Zellkerntransfer
Snrpn	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	kleine nukleäre Ribonukleinsäure Polypeptid N
SRM	serum replacement medium	Serum-ersatztes Medium
TBE	tris base, boric acid, EDTA	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBI	traumatic brain injury	Traumatisierende Gehirnschädigung
TH	tyrosin hydroxylase	Tyrosinhydroxylase
U2af1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	
Ube3a	ubiquitin protein ligase E3A	
Zim1	zink finger, imprinted 1	

Zusammenfassung

Pluripotente embryonale Stammzellen (ES Zellen) sind aufgrund ihrer Selbsterneuerung- und ihrer Multiliniendifferenzierungs-Fähigkeiten interessante Zelltypen sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die regenerative Medizin. Uniparentale Zygoten mit zwei väterlichen (androgenetisch: AG) oder zwei mütterlichen (gynogenetisch: GG; parthenogenetisch: PG) Genomen sind nicht in der Lage, lebensfähige Nachkommen zu entwickeln. Sie entwickeln sich jedoch erfolgreich bis zu Blastozysten, aus denen pluripotente ES Zellen abgeleitet werden können. Mit uniparentalen ES Zellen können zum Einen *parent-of-origin*-spezifische Einflüsse auf die Gewebeentwicklung untersucht und zum Anderen histokompatible und somit therapeutisch relevante Zellpopulationen generiert werden.

Obwohl viele Aspekte des *in vitro* und *in vivo* Differenzierungspotenzials von PG ES Zellen aus mehreren Spezies in den zurückliegenden Jahren untersucht worden sind, ist das volle Differenzierungspotenzial von AG ES Zellen bisher nicht erschöpfend analysiert worden. Zellen der Inneren Zellmasse (ICM) von PG und AG Embryonen zeigten nach Blastozysteninjektion ortsspezifische Kontribution zur Gehirnentwicklung, wobei PG Zellen bevorzugt im Cortex und im Striatum lokalisierten, während sich AG Zellen verstärkt im Hypothalamus nachzuweisen waren. Aus AG und GG ES Zellen konnten zudem *in vitro* hämatopoetische Stammzellen differenziert werden, die nach Transplantation im Mausmodell tumorfrei das gesamte hämatopoetische System repopulierten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AG ES Zellen ein mit N ES Zellen vergleichbares *in vitro* und *in vivo* Differenzierungspotential in der frühen neuralen Entwicklung besitzen.

Das Ziel meiner Arbeit war es zu untersuchen, ob murine AG ES Zellen sich zu verschiedenen neuronalen Subtypen entwickeln können und ob sie tumorfrei neurale Zelltypen nach Transplantation bilden können.

In dieser Studie wurden AG ES Zellen im Vergleich zu biparentalen (N) ES Zellen *in vitro* über *Embryoid Bodies* (EBs) zunächst zu *pan*-neuronalen Vorläuferzellen (pNPCs) und weiter zu Neuron- und Gliazell-Marker (β -III Tubulin (Tuj-1), NeuN, TH und GFAP) positiven Zellen differenziert.. Weiterhin wurde das dopaminerge (DA) Differenzierungspotential von AG ES Zellen näher untersucht, indem sie in einem Ko-Kultursystem mit Stromazellen gerichtet differenziert wurden. Diese DA Neurone wurden durch semiquantitative RT-PCR Analysen und immunhistochemische Färbungen für DA Neuronen-spezifische Marker (TH, PITX3, Nurr1) charakterisiert. Darüber hinaus wurde der *Imprinting*-Status von neun ausgesuchten *Loc*i in AG und N ES, pNPC und DA Zellkulturen durch *real-time* RT-PCR Analysen untersucht. Die hier

analysierten Gene, die im Gehirn allelspezifisch exprimiert werden, zeigten in pNPCs eine *parent-of-origin*-spezifische Genexpression mit Ausnahme von Ube3a.

Nach Blastozysteninjektion wurde die Bildung von DA Neuronen in AG und N fötalen chimären Gehirnen untersucht. Hier zeigte sich, dass TH- und PITX3-positive AG DA Neurone abgeleitet aus ES Zellen im Mittelhirn von E12.5 und E16.5 Chimären detektiert werden konnten. Diese fötalen chimären Gehirne zeigten eine verbreitete und gleichmäßige Verteilung der AG Donorzellen in den Arealen Cortex, Striatum und Hypothalamus.

Stereotaktische Transplantationen von AG und N pNPCs in ein „*Traumatic Brain Injury* (TBI) *Model*“ zeigten zudem, dass frühe Differenzierungsstufen von AG und N pNPC-Kulturen häufig Teratome generierten. Durch die Transplantation von langzeitdifferenzierten AG oder N pNPC-Kulturen konnte jedoch ein tumorfreies Anwachsen neuronaler und glialer Zellen erreicht werden. Die immunhistochemische Auswertung von Transplantaten bezüglich der Donorzellkontribution im Gehirn erfolgten bis zu drei Monaten nach der Injektion.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass AG ES Zellen neurales Differenzierungspotential, speziell zur Bildung von DA Neuronen, besitzen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass langzeitdifferenzierte AG und N pNPCs nach Transplantation im traumatisierte Mausgehirnmodell tumorfrei anwachsen und anschließend zu neuronalen Zellen differenzieren können. Trotz unbalancierter Genexpression von *imprinted* Genen lässt sich feststellen, dass AG ES Zellen therapeutisch relevant für zukünftige zelluläre Ersatzstrategien von Nervengewebe sein können.

Summary

Pluripotent embryonic stem (ES) cells are interesting cell types both for basic research and for regenerative medicine because of their enormous self-renewal and multi-lineage differentiation capacity. Uniparental zygotes with two paternal (androgenetic: AG) or two maternal (gynogenetic: GG; parthenogenetic: PG) genomes are not able to develop into viable offsprings but develop successfully up to blastocysts, from which ES cells can be derived. Uniparental ES cells can be utilized to study parent-of-origin-specific influences on tissue development and histocompatible, and therapeutically-relevant cell populations could be generated from them.

While many aspects of the *in vitro* and *in vivo* differentiation potential of PG uniparental ES cells were studied for several species, the capacity of AG ES cells have not been analyzed to the same extent. PG and AG inner cell mass (ICM) cells showed region-specific contribution in brain development following blastocyst injection. While PG cells were preferentially located in the cortex and the striatum, AG cells were most commonly found in the hypothalamus. Hematopoietic cells derived from AG and GG ES cells generated after transplantation long-term repopulating and tumor-free complete hematopoietic engraftments in irradiated transplant recipients. Furthermore, AG and N ES cells also show a comparable *in vitro* and *in vivo* neural differentiation potential during early development,

The aim of the present study was to investigate whether AG ES cells can develop into specific neuronal subtypes, and whether they can form neural cell types after transplantation, lacking teratoma formation.

In this study, AG ES cells and as controls biparental (N) ES cells were differentiated *in vitro* via embryoid bodies (EBs) into pan-neural progenitor cells (pNPCs) and consequently to cells which expressed a variety of neuron- and glial cell-specific markers, including β -III tubulin (Tuj-1), NeuN, TH, and GFAP. Furthermore the dopaminergic (DA) differentiation potential of AG ES cells was investigated more closely, by directed neuronal differentiation of AG ES cells in a co-culture system with stromal cells. The resulting neurons were characterized by semi-quantitative RT-PCR analyses and immunohistochemical stainings for DA neuron-specific markers (TH, PITX3, Nurr1). Additionally, the imprinting status of nine selected loci in AG and N ES cell, pNPC and DA cell cultures was studied by real-time RT-PCR analyses. The genes analyzed here, known to be expressed allele-specific in the brain, maintained in pNPCs a parent-of-origin-specific gene expression with the exception of UBE3A.

Following blastocyst injection the formation of DA neurons was studied in the AG and N chimeric fetal brains. TH- and PITX3-positive DA neurons derived from ES AG cells in the midbrain of E12.5 and E16.5 chimeras were detected. These chimeric fetal brains showed a widespread and balanced distribution of AG cells in the brain areas Cortex, Striatum and Hypothalamus.

Stereotactic transplantations of AG and N pNPCs in a "Traumatic Brain Injury (TBI) Model" showed that early neural differentiation stages of AG and N pNPC cultures tended to generate teratomas. Importantly, neuronal and glial tumor-free engraftments could be achieved by the transplantation of long-term differentiated AG or N pNPC cultures. The immunohistochemical assessment of the donor cell contribution of individual transplants was performed up to three months post-transplantation.

The results presented here show that AG ES cells have DA neuronal differentiation potential, and that long-term differentiated AG and N pNPCs can engraft tumor-free in a brain injury model. In spite of imbalanced imprinted gene expressions my results suggest that AG ES cells could be therapeutically relevant for future cellular replacement strategies of neural tissues.

1. Einleitung

1.1. Stammzellen

1.1.1. Adulte und embryonale Stammzellen

Stammzellen sind seltene und für den multizellulären Körper essenzielle Zelltypen, da sie ein hohes Differenzierungspotential aufweisen. Stammzellen sind durch zwei funktionelle Eigenschaften definiert. Diese besonderen Zellen können sich zum Einen durch Teilung selbst erneuern und dabei neue Stammzellen bilden und zum Anderen können sie klonal eine Vielzahl differenzierter Zelltypen erzeugen. Bei der Selbsterneuerung führt eine symmetrische Teilung zur Bildung von zwei Tochterstammzellen. Dagegen gehen aus einer asymmetrischen Teilung spezialisierte Vorläufer- bzw. Effektorzellen nebst einer Stammzelle hervor. So bilden Stammzellen einen Pool von Vorläufer- und reifen Zellen zur Homöostase verschiedener Gewebetypen. Bei der embryonalen Entwicklung entstehen zunächst die drei Keimblätter, Ekto-, Endo- und Mesoderm, und später in speziellen Nischen die somatischen Stammzellen. Im Körper ersetzen adulte Stammzellen gealterte und geschädigte somatische Zellen über Vorläuferzellen. Die multipotenten adulten Stammzellen besitzen je nach Gewebetyp ein unterschiedliches, gewebespezifisches Differenzierungspotential, während totipotente Zellen – aus Zygoten- oder Morulastadium – zu einem kompletten Organismus heranreifen können.

Adulte Stammzellen

Das natürliche Vorkommen adulter Stammzellen ist in vielen Geweben, z. B. dem Gehirn [1, 2], der Haut [3], dem Knochenmark [4], dem Dünndarm [5] und der Leber [6] nachgewiesen. Außerdem enthält das Nabelschnurblut von Neugeborenen adulte Blutstammzellen [7, 8]. Adulte Stammzellensysteme sind hierarchisch organisiert. Deutlich wird dies z. B. im am besten beschriebenen adulten Stammzellensystem, dem hämatopoetischen System. Wie in Abbildung 1 dargestellt, bilden hämatopoetische Stammzellen (HSCs) im Knochenmark alle Blutzelltypen – Erythrozyten, Lymphozyten und Makrophagen, Granulozyten – während das hierarchische System der neurale Stammzellen im Gehirn Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten erzeugen [9-13].

Embryonale Stammzellen

Im Vergleich zu den adulten Stammzellen besitzen pluripotente ES Zellen eine Multiliniendifferenzierungsfähigkeit für Derivate aller drei Keimblätter einschliesslich der Keimzellen [14-16]. Nach der Befruchtung der Eizelle entwickelt sich die Zygote über das Morula- und Blastozystenstadium zum Embryo. Für die Gewinnung der ES Zellen erfolgt die *in vitro* Kultivierung der ICM von Blastozysten. Einige Zellen der ICM bilden unter geeigneten Kulturbedingungen pluripotente ES Zelllinien [17, 18]. Neben der großen Differenzierungsfähigkeit besitzen ES Zellen durch ihr Selbsterneuerungspotential eine extrem weitreichende Vermehrbarkeit in der Gewebekultur. Zudem können ES Zellen *in vitro* zu multipotenten Stammzellen differenzieren und daraus folgend ausdifferenzierte gewebespezifische Funktionszellen bilden [14, 16]. Nach der erfolgreichen Etablierung von murinen ES Zellen im Jahr 1981 [17, 18] wurden etwa 20 Jahre später humane ES Zellen erstmals beschrieben [19]. Stammzellen sind mit diesen Eigenschaften sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die regenerative Medizin hoch interessante Zelltypen.

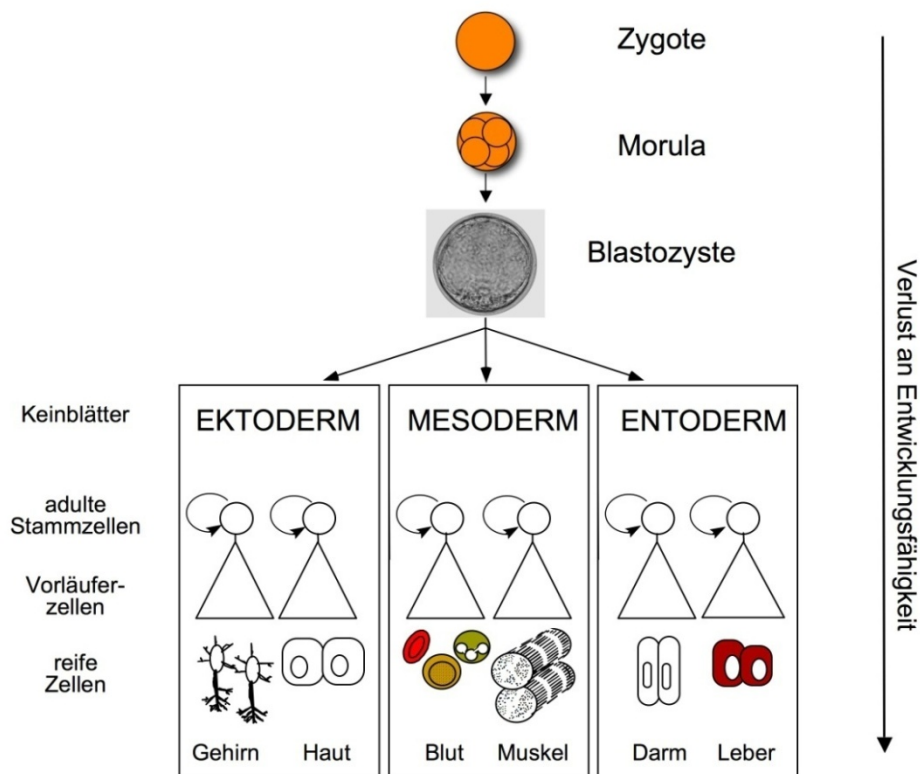


Abbildung 1: Skizze der embryonalen Entwicklung. Nach Befruchtung der Eizelle entwickelt sich die Zygote über das Morulastadium zur Blastozyste. Dabei entstehen die drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) und die adulten Stammzellen, die sich selbst erneuern und weiter zu reifen Zellen differenzieren können. Entlang des ganzen Prozesses der embryonalen bzw. fötalen Entwicklung verlieren die Zellen stetig an Entwicklungsfähigkeit. Abbildung: mit freundlicher Genehmigung von Prof. Albrecht Müller.

1.1.2. Induzierte pluripotente Stammzellen

Neben den beiden natürlich vorkommenden pluri- und multipotenten Stammzelltypen gibt es einen weiteren, künstlich erzeugten Stammzelltyp, der aus beliebigen Körperzellen durch induzierte Reprogrammierung hergestellt werden kann. Diese induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS Zellen) eröffnen einen neuen Weg zur Gewinnung patientenspezifischer pluripotenter Zellen, die bislang nur aus frühembryonalen Entwicklungsstadien hergestellt werden konnten [20, 21]. Bei der Reprogrammierung werden vier Gene – c-myc, Oct4, Klf4 und Sox2 – in ausdifferenzierte somatische Zellen mit dem Resultat eingeschleust, dass die Transgen-exprimierenden Zellen alle wichtigen molekularen und funktionellen Eigenschaften von ES Zellen aufwiesen [22]. Diese Strategie zur Gewinnung von iPS Zellen ist aus ethischer Sicht unproblematisch, da zur Erzeugung keine Eizellen benötigt werden und keine Zerstörung von lebensfähigen Embryonen stattfindet. Die Reprogrammierung erfolgt mit mehreren Genen, die auch die beiden Onkogene c-myc und Klf4 beinhalten. Diese Onkogene können bei Zelltransplantationen potenziell Teratome verursachen. Kurz nach der Beschreibung des ursprünglichen iPS Reprogrammierungs-Protokolls wurden auch iPS Zellen ohne externe c-myc und Sox2 Expression [23, 24] sowie ohne transduziertes Klf4 [25] hergestellt. Der Ansatz ohne c-myc zeigte jedoch eine geringere Reprogrammierungsfrequenz als Ansätze mit c-myc. Humane iPS Zellen können durch diese Strategie erfolgreich hergestellt werden, so dass in der Summe patienteneigene Stamm- und Funktionszellen anhand des iPS Reprogrammierungs-Protokolls leicht hergestellt werden können.

1.1.3. Humane ES Zellen

ES Zellen sind ein wichtiges Handwerkzeug für die biomedizinische Grundlagenforschung sowie für die klinische Forschung. Experimentelle Ergebnisse mit murinen ES Zellen sind jedoch nicht direkt übertragbar auf Ansätze mit humanen ES Zellen. Unter anderem wird die Selbsterneuerung von humanen ES Zellen durch externe Faktoren, anders als bei murinen ES Zellen, reguliert. Mit humanen ES Zellen sind daher weitere Analysen hinsichtlich Etablierung, Expansion und möglichem Einsatz in Grundlagenforschung bzw. Regenerativer Medizin notwendig. Die Herstellung humaner ES Zelllinien infolge einer künstlichen Befruchtung wurde erstmals 1998 beschrieben [19]. Seitdem entwickelten sich weitere Strategien zur Gewinnung von humanen ES Zellen. Eine Strategie ist die Erzeugung von Embryonen durch *in-vitro*-Fertilisation z. B. bei einer Unfruchtbarkeitsbehandlung. Die nicht für die Etablierung einer Schwangerschaft benötigten Embryonen (sogenannte überzählige Embryonen) können *in vitro* zu Blastozysten entwickelt werden. Nach der Zerstörung des Trophoblasten wird die ICM in Zellkultur genommen und eine

ES Zelllinie kann etabliert werden. Eine abgewandelte Strategie, bei der patientenspezifische ES Zellen entstehen, bildet durch Zellkerntransfer (SCNT) erzeugte Blastozysten und daraus abgeleitete ES Zellen. Dabei werden Zellkerne aus ausdifferenzierten somatischen Zellen in entkernte Eizellen injiziert. Nach einer chemischen Aktivierung entwickeln sich Zygoten zu Blastozysten, woraus wieder ES Zellen etabliert werden können. Diese durch sogenanntes therapeutisches Klonieren hergestellten ES Zellen sind zwar technisch schwierig herzustellen, aber klinisch viel versprechend. Zellen aus diesen ES Zelllinien lösen bei Transplantationen keine Immunreaktion aus, wenn Zellkernspender und Gewebeempfänger genetisch identisch sind [26, 27]. Trotz dem erfolgreichen Versuch bei Säugetieren ist die SCNT-Strategie aber ethisch fragwürdig beim Menschen und deswegen in vielen Ländern verboten. Zudem ist bisher keine erfolgreiche Herstellung von humanen SCNT-ES Zellen gelungen. Eine dritte Strategie zur Herstellung pluripotenter Zellen ist wie in Kapitel 1.1.2. beschrieben die Reprogrammierung somatischer Zellen durch ektope Expression von Pluripotenzfaktoren, Die erfolgreiche Herstellung von humanen iPS Zellen wurde erstmals 2007 beschrieben [28, 29]. Neben SCNT-ES Zellen gelten humane iPS Zellen als vielversprechender Ansatz, da sie Spender-spezifisch sind und sich so neben transplantierbaren Zellen auch Krankheitsmodelle zur Analyse ins Labor nehmen lassen. Eine weitere Strategie zur Gewinnung humaner ES Zellen stellen uniparentale Zellen dar.

1.2. Uniparentale Stammzellen

1.2.1. Parthenogenese und uniparentale Embryonen

Parthenogenese wird auch als Jungfernzeugung bezeichnet. Diese Strategie ist eine Möglichkeit der natürlichen Fortpflanzung bei manchen Pflanzen- und Tierarten wie z.B. Insekten. Dabei beginnen sich unbefruchtete Eizellen ohne Zugabe von Spermien zu teilen und zu entwickeln. Im Anschluss starten die aktivierten Oozyten die Embryogenese wobei die sich entwickelnden Zellen das gleiche Genom wie der Mutterorganismus besitzen und in der Regel keine Rekombination stattfindet. Bei Schmetterlingsmücken erfolgt keine sekundäre meiotische Teilung und die Keimzellen bleiben im diploiden Zustand. Bei Honigbienen erfolgt dagegen eine komplette Meiose und daraus entstehen haploide Eizellen. Dabei entwickeln sich unbefruchtete haploide Eizellen zu Männchen, während befruchtete diploide Eizellen zu Weibchen heranreifen. Außer Insekten können sich ebenfalls einige Wirbeltiere – wie Blumentopfschlangen und einige Salamander – parthenogenetisch vermehren. Zudem wurde die Jungfernzeugung beim Hammerhai-Weibchen im Jahr 2001 in einem Zoo in den USA beobachtet. Bei höheren Säugetieren kommt Parthenogenese selten oder gar nicht vor, da die eingeschlechtliche Vermehrung zu Entwicklungsstörungen infolge unbalancierter monoallelischer Genexpression (genomisches *Imprinting*) führt.

Uniparentale Embryonen besitzen zwei Kopien entweder von maternalen bzw. von paternalen Genomen. Zu den uniparentalen Embryonen gehören drei Typen: PG und GG Embryonen mit doppelten maternalen Allelen und AG Embryonen mit doppelten paternalen Allelen. Bei Säugetieren sind die beiden elterlichen Genome funktionell nicht gleichwertig, da einige Gene – *imprinted genes* – monoallelisch nur von einem elterlichen Allel exprimiert werden [30-35]. Murine PG und GG Embryonen, die zwei maternale Genome tragen, zeigen wegen einer schlechten extraembryonalen Entwicklung eine fehlerhafte post-Implantationsentwicklung. Sie entwickeln sich selten bis zu späten Somitenstadien [32, 35-37]. AG Embryonen mit zwei paternalen Genomen entwickeln sich ebenso fehlerhaft, aber sie bilden oft besser entwickelte extraembryonale Gewebe und reifen meistens bis zu frühen Somitenstadien [38, 39]. Außer bei Mäusen wurden PG Embryonen auch für andere Spezies hergestellt: Schaf [40, 41], Rind [42], Schwein [43, 44] und Kaninchen [45]. Ebenfalls sind AG Embryonen bei Schafen und Rindern erzeugt worden [46, 47]. Obwohl sich uniparentale Embryonen nicht bis zu einem geburtsfähigen, gesunden Embryo entwickeln können, können aus uniparentalen Blastozysten ES Zellen abgeleitet werden.

1.2.2. Uniparentale ES Zellen

Nach chemischer Aktivierung von in Meiose II arretierten Eizellen wird die Extrusion des sekundären Polkörperchens verhindert (Abb. 2). Diese aktivierten Eizellen lassen sich bis zum Blastozystenstadium kultivieren. Obwohl diese Blastozysten keine lebensfähigen Nachkommen erzeugen können, können PG ES Zelllinien etabliert werden [48-50]. PG ES Zellen sind bislang bei Mäusen, Rindern und bei Primaten inklusive Menschen erfolgreich generiert worden [47, 51-53].

Neben PG ES Zellen sind ebenso AG und GG ES Zellen beschrieben [54, 55]. Während PG ES Zellen durch eine chemische Aktivierung von unbefruchteten Eizellen entstehen, wird bei GG/AG Zelltypen ein Transfer des Pronukleus zwischen *in vitro* befruchteten Eizellen vor der Aktivierung durchgeführt (Abb. 2). Dabei werden Zygoten entweder mit zwei Kopien maternaler Genome oder mit zwei Kopien paternaler Chromosomensätzen generiert. Ähnlich wie PG Embryonen sind AG und GG Embryonen nicht in der Lage, sich zu lebensfähigen Organismen zu entwickeln. Auch sie können das Blastozystenstadium erreichen. Aus Blastozysten wurden bisher AG bzw. GG ES Zelllinien bei Mäusen und Rindern erfolgreich etabliert, aber nicht von humanen Embryonen [32, 35, 37, 47].

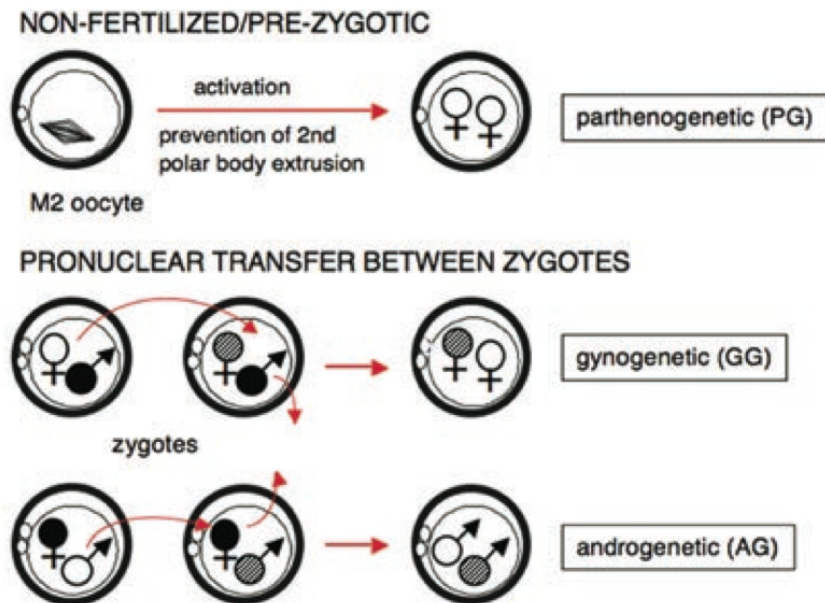


Abbildung 2: Schema der Gewinnung von drei Typen uniparentaler ES Zelltypen. Die in Meiose II arretierten Eizellen entwickelten sich nach einer chemischen Aktivierung zu PG Embryonen. Für die Herstellung von GG und AG Embryonen erfolgt nach der *in-vitro*-Fertilisation eine Übertragung des Pronukleus von einer Zygote in eine andere Zygote, aus der ein Pronukleus entfernt wurde (Abb. entnommen aus Eckardt *et al.*, 2008 *Organogenesis*).

Mit uniparentalen Embryonen könnten einige der ethischen Fragen im Zusammenhang bei der Herstellung humaner ES Zellen mit der Zerstörung von potentiell lebensfähigen befruchteten oder SCNT-Embryonen umgangen werden [27, 56, 57]. Zudem können uniparentale ES Zellen mit identischem MHC-Typ zum Keimzellspender hergestellt werden [49, 53]. Trotz dieser Vorteile besitzen uniparentale ES Zellen eine unbalancierte Genexpression infolge des Fehlens maternaler bzw. paternalen Genome. Das genomische *Imprinting* erscheint nicht relevant für die Bildung von ES Zellen, aber die abnormale Expression von *imprinted* Genen könnte das Multilinen-Differenzierungspotential der ES Zellen zu somatischen Stammzellen beeinflussen [58, 59].

1.2.3. Differenzierungspotential von uniparentalen Zellen

Obwohl uniparentale Embryonen nicht lange lebensfähig sind, können daraus Morula-, ICM- und ES Zellen isoliert werden. Um das Differenzierungspotential von uniparentalen Zellen zu verstehen, wurden Mauschimären durch Verschmelzung von N und uniparentalen Blastomeren [60, 61] oder Injektion von uniparentalen ICM- bzw. ES Zellen in N Blastozysten generiert [60-63]. Dabei wurde ihre Verteilung in allen Gewebetypen sowie in der Keimzellen beobachtet [64, 65]. Die Frequenz der uniparentalen Zellen in Mauschimären war in der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung hoch,

während der zweiten Hälfte der Gestation wurden wesentlich geringere Raten an Chimärismus festgestellt [60-63]. Grund dafür ist vermutlich ein Prozess systematischer Selektion aufgrund unbalancierter Genexpression [66]. In murinen ICM-Chimären zeigten uniparentale Zellen unterschiedliche Verteilung je nach Herkunft des Genoms. PG und GG Zellen befanden sich mehr im Gehirn, weniger in mesodermalen Gewebe und kaum in Skelettmuskeln, während AG Zellen bevorzugt in mesodermalen Derivaten gefunden wurden. Im chimären Gehirn waren uniparentale Zellen ebenso unterschiedlich verteilt. PG Zellen befinden sich hauptsächlich im Cortex und Striatum. Im Gegensatz zu PG Zellen wurden AG Zellen weniger in Cortex und Striatum gefunden, aber mehr im Hypothalamus [67].

AG Zellen haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Aggregations-, ICM- und ES Zell-Chimären [62, 63, 68]. Dabei traten abnormale Kopfgröße, Fehlbildung des Skeletts und hohe Sterblichkeit auf. Dagegen zeigten PG Zellen einen proliferativen Defekt bei entwickelnden Aggregationschimären und proliferierenden murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) [69, 70]. Experimentelle Ansätze an uniparentalen Chimären deuten darauf hin, dass das maternale bzw. paternale Genom getrennte und essentielle Rollen bei der Entwicklung eines Organismus besitzt und ihre Unausgewogenheit zu Fehlfunktionen führt.

1.2.4. Genomisches *Imprinting*: was, wann und wie?

PG Embryonen lassen sich durch die Aktivierung von unbefruchteten Eizellen und darauf folgende Verhinderung der Extrusion des sekundären Polkörperchens herstellen. Solche Embryonen besitzen einen normalen Chromosomensatz, aber sie können nicht zu lebensfähigen Organismen herangereift [32, 35, 71]. Als Erklärung hierfür gilt das Fehlen eines maternalen bzw. paternalen Genoms. Aus diesen Daten lässt sich weiterhin ableiten, dass eine Gruppe von Genen, die nur von einem elterlichen Allel exprimiert werden, vorhanden ist und dass diese für eine normale Embryogenese notwendig sind. Später wurde die neue Genklasse als Gene mit *Imprinting* benannt. Das genomische *Imprinting* bezeichnet eine genetische Ausprägung abhängig von der elterlichen Herkunft. Bei der Keimzellentwicklung wird das vorhandene *Imprinting* gelöscht und anschließend nach einem *parent-of-origin*-spezifischen Muster wiederhergestellt [72]. Während die normalen Gene entweder transkriptionell aktiv oder inaktiv sind, erfolgt bei den *imprinted* Genen eine monoallelische Genexpression je nach dem, ob die Gene durch die maternale oder paternale Keimbahn vererbt wurden [73, 74]. Dies basiert auf epigenetischer Modifikation der DNA z. B. infolge Cytosin-Methylierung, die zu einer transkriptionellen Inaktivierung des betreffenden Gens führen kann [74, 75].

Die *imprinted* Genexpression ist ein räumlich-zeitlich dynamischer Prozess. Dies bedeutet, dass die monoallelische Genexpression limitiert auf spezifische Gewebe oder während spezifischer Zeitpunkte in der Entwicklung stattfinden kann. Seit 1991 die ersten beiden *imprinted* Gene IGF2 und H19 in Mäusen identifiziert wurden [30, 76, 77], sind bis *dato* mehr als 75 *imprinted* Gene in murinen- und menschlichen Genomen beschrieben worden [75, 78]. Eine Vielzahl der *imprinted* Gene wird in der Plazenta und im Gehirn exprimiert [79, 80]. Diese Genexpression zeigt eine große Variabilität, wann in der Entwicklung, in welcher Gehirnregion und in welchem Zelltypen das *Imprinting* eine Rolle in der Genexpression spielt (Tab. 1). Obwohl viele *imprinted* Gene Gewebespezifisch in der embryonalen Entwicklung exprimiert sind, kann ihre monoallele Genexpression weiter über das postnatale bis hin zu adulten Entwicklungsstadien andauern [81, 82]. Dies deutet an, dass *imprinted* Gene einen Einfluss auf frühe Gehirnentwicklungs- und Differenzierungsstadien besitzen und auch nach der Geburt noch Funktionen tragen.

Tabelle 1: Dynamische Expression von *imprinted* Genen im Gehirn

<i>Imprinted</i> Gene	<i>parent-of-origin-spezifische</i> Expression	Dynamische Expression
Ube3a (<i>ubiquitin protein ligase E3A</i>)	maternal	Die monoallelische Expression ist auf neuronale Zellpopulationen im Riechkolben, Hippocampus und Zerebellum beschränkt. Außerhalb des Gehirns ist Ube3a biallelisch exprimiert [81, 83].
Zim1 (<i>zink finger, imprinted 1</i>)	maternal	Das Gen wird in allen Geweben außer dem neonatalen und adulten Gehirn monoallelisch exprimiert [84].
H19 (<i>non-protein coding imprinted maternally expressed transcript</i>)	maternal	Starke Expression während der embryonalen Entwicklung, wenig im Pons und Globus pallidus des adulten Gehirns [85].
IGF2 (<i>insulin-like growth factor 2</i>)	paternal	Das Gen wird außerhalb des Gehirns in fötalen Entwicklungsphasen exprimiert, während es im Globus pallidus, der Raphe-Kerne und dem Hypothalamus des adulten Gehirns allelspezifisch exprimiert wird [85].
Snrpn (<i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N</i>)	paternal	Das Gen wird im adulten Gehirn paternal exprimiert [86].
U2af1-rs1 (<i>U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 1, related sequence 1</i>)	paternal	Das Gen wird bei Mäusen paternal exprimiert, aber nicht beim Menschen [87].

1.2.5. Genomisches *Imprinting*: krankheitsrelevant?

Eine Deregulierung von *imprinted* Genen wurde bei zahlreichen Krankheiten des Menschen beobachtet. Die am besten charakterisierten Syndrome sind das Beckwith-Wiedemann- (BWS) [88] und das Prader-Willi-/ Angelman-Syndrom (PWS/AS) [89]. Das BWS ist mit dem generellen Großwuchs mit asymmetrischen Größenwachstum sowie abnormalen Vergrößerungen innerer Organe und der Zunge charakterisiert. Bei diesem Syndrom treten 10 – 20 % der Fälle familiär bedingt auf. Das sporadische und familiär bedingte BWS besitzt meistens einen kleinen Prozentsatz der uniparentalen Disomie auf Chromosom 11p15. Infolgedessen kann keine biallelische Expression von *imprinted* Genen IGF2 und H19 gewährleistet werden. Die *Imprinting*-Krankheiten können nicht nur mit einem abnormalen Wachstum assoziiert sein, sondern auch mit einer fehlerhaften Gehirnentwicklung. Assoziiert ist das PWS bzw. AS mit den neurologischen Defekten – Ataxie, Hyperaktivität und mentaler Retardierung. Der Phänotyp der beiden Syndrome tritt durch eine monoallelische Mutation von demselben Locus – Chromosom 15q11-q13 – auf. Die Mutation der maternal exprimierenden Gene Ube3a in diesen *Loci* führt zum AS, während das PWS durch das Fehlen der paternal exprimierenden Gene Snrpn verursacht wird. Außer diesen Syndromen werden andere Krankheiten mit fehlerhaftem *Imprinting* in Verbindung gebracht: Silver-Russell-Syndrom [90], ICF-Syndrom [91, 92], Rett-Syndrom [93], Albright-Syndrom [94] und *Hydatidiform mole* [95]. Die Symptome der menschlichen *Imprinting*-Krankheiten und die Untersuchungen in Mausmodellsystemen zeigen, dass viele *imprinted* Gene eine wichtige Rolle in der Regulation des embryonalen und postnatalen Wachstums spielen und dass diese vornehmlich die Gehirnfunktion und das Verhalten beeinflussen.

1.3. Therapeutische Perspektive patientenspezifischer Zellen

1.3.1. Pluripotente Zellen für zukünftige Therapien

Auf Grund der Ergebnisse vielfältiger grundlagen- bzw. anwendungsorientierter Studien mit murinen ES Zellen befinden sich humane ES Zellen im Focus aktueller biomedizinischer Forschung. Viele Krankheiten basieren auf zellulären Erkrankungen. Die Herzinsuffizienz, der Diabetes mellitus, der Schlaganfall, hämatologische Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen, die meisten Fälle von Blindheit und Taubheit, Rückenmarksverletzungen, die Arthritis und Nierenversagen ergeben sich alle aus dem Fehlen eines oder mehrerer wichtiger Populationen von Zellen, die der Körper nicht ersetzen kann. Die Möglichkeit eine klinisch relevante Menge an definierten therapeutisch wichtigen Zellen zu gewinnen, ist eine zentrale

Hoffnung an die Stammzellforschung. Wie oben erwähnt, werden ES Zellen als „pluripotent“ bezeichnet, da sie zu zellulären Derivaten der drei Keimblätter einschließlich Keimzellen differenzieren können. Zudem lassen sich pluripotente ES Zellen effizient in der Zellkultur vermehren, so dass sie in der Summe als gut charakterisierte sowie normierte Zellpopulationen hergestellt werden können. Aus diesen Gründen ist davon auszugehen, dass ES Zellen eine wichtige Rolle für die regenerative Medizin der Zukunft spielen werden [96].

Bisher haben Wissenschaftler humane pluripotente ES Zellen mit drei unterschiedlichen Strategien erfolgreich etabliert: normale ES Zellen aus sogenannten überzähligen Embryonen, uniparentale ES Zellen sowie iPS Zellen aus reprogrammierten somatischen Zellen. Die letzten zwei Strategien können der Zugang zur Gewinnung histokompatibler pluripotenter Zellen sein. Trotz der bioethischen Debatte der einzelnen Herstellungsverfahren ist es interessant zu vergleichen, ob sich die beiden patientenspezifischen ES bzw. iPS Zellen von normalen ES Zellen im Bezug auf ihr Multilinen-Differenzierungspotential und andere Stammzeleigenschaften unterscheiden.

Hinsichtlich uniparentaler ES Zelltypen wurden bisher nur PG ES Zellen beim Menschen etabliert. Im Vergleich zu N ES Zellen besaßen humane PG ES Zellen ein ähnliches Potential in der *in vitro* Differenzierung und der Teratombildung [53, 97]. Zudem war die Erzeugung von PG ES Zellen effizienter als die von N ES Zellen [98]. Die iPS Zell-Strategie von Maus und Menschen hatte im Vergleich zu normalen oder uniparentalen ES Zellen eine sehr geringe Frequenz der Generierung von pluripotenten Zelllinien [22, 28, 29]. Obwohl iPS Zellen als pluripotent gelten, zeigten humane iPS Zellen eine stark reduzierte Effizienz in der Bildung von Blutzellen und eine eindeutig gesteigerten Apoptose im Vergleich zu normalen humanen ES Zellen [99]. Außerdem konnten nicht alle getesteten humanen iPS Zelllinien zu Neuronen und Gliazellen differenziert werden [100]. Die neurale Differenzierung von iPS Zellen gelang nur mit extrem variierten Effizienzen zwischen unterschiedlichen Zelllinien. Diese Ergebnisse zeigen, dass die bisher etablierten iPS Zellen nicht gleichermaßen pluripotent sind wie ES Zellen.

1.3.2. *In vitro* Generation von Therapie-relevanten neuronalen Zelltypen

Wie oben erwähnt, bieten pluripotente ES Zellen vielfältige Möglichkeiten für zukünftige klinische Anwendungen. Zum Beispiel können DA Neurone aus pluripotenten ES Zellen differenziert werden. Da DA Neurone eine zentrale Rolle bei der Parkinsonschen Krankheit spielen, sind von ES Zellen abgeleitete DA Zellen eine interessante zukünftige Behandlungsoption für Parkinson Patienten. Aus humanen pluripotenten ES Zellen wurden DA Neurone unter Zugabe der Wachstumsfaktoren SHH und FGF8 abgeleitet [101, 102]. Nach einem beschriebenen Differenzierungsprotokoll

können ES Zellen in einem Ko-Kultursystem auf Stromazellen effizient direkt zu DA Neuronen differenziert werden [103, 104]. Nach einem anderen Protokoll differenzierten ES Zellen über Zwischenschritte von EBs und neuralen Vorläuferzellen [105]. Die Endprodukte dieser beiden Protokolle exprimieren Tyrosinhydroxylase (TH), bildeten synaptische Komplexe und zeigten messbare Aktionspotentiale. Es wurden jeweils ca. 30 % TH-positive DA Neurone nachgewiesen. Zum medizinischen Einsatz sind diese ES Zell-abgeleiteten DA Neurone jedoch bisher nicht geeignet, denn sie bildeten eine heterogene Population mit nicht TH-positiven Neuronen.

Klinisch relevante neurale Subtypen wurden ebenfalls aus iPS Zellen *in vitro* erzeugt. Nachdem sie sich zuerst zu neuralen Vorläuferzellen differenzierten, wurden sie weiter zu verschiedenen neuronalen Subtypen differenziert. Diese Kulturen bildeten bis zu 5 % TH-positiven Neurone [106]. Mehr als 80 % dieser Zellen waren positiv für die DA Neuron-spezifischen Markergene *En1*, *Nurr1* und *PITX3*. Analog erfolgte die Herstellung von DA Neuronen aus PG ES Zellen vom Primaten, wobei ES Zellen mit Stromazellen ko-kultiviert wurden [107]. Nach sechs Wochen waren 30 – 60 % der Zellen Tuj-1-positive Neuron, von welchen bis zu 70 % TH exprimierten. Daraus lässt sich schließen, dass bezüglich der Fähigkeit zur Bildung von DA Neuronen uniparentale ES und iPS Zellen gleich den N ES Zellen sind. Die *in vitro* generierten DA Neurone konnten nach Transplantation langfristig im Rezipienten-Gehirn überleben. Mit Parkinson Patienten oder mit anderen neurodegenerativen Krankheiten sind diese Zellen vielversprechende Kandidaten für eine autologe und personalisierte Stammzell-Behandlung.

1.4. Zielsetzung und Experimentelle Strategien

Uniparentale ES Zellen sind ein interessanter Zelltyp für die Grundlagenforschung und für die regenerative Medizin. Bisher wurden Stammzellfragen vornehmlich an PG ES Zellen untersucht [38, 49, 51, 53, 57, 97, 98, 108-110]. Der andere uniparentale Zelltyp – AG ES Zellen – ist bisher nicht gleichermaßen analysiert worden. In bisherigen Studien über murine AG Zellen wurde gezeigt, dass AG ICM Zellen in der embryonalen Entwicklung bevorzugt im Hypothalamus lokalisiert waren nicht aber im Cortex oder im Striatum [67], AG HSCs können zudem das hämatopoetische System nach Transplantation langfristig und tumorfrei repopulieren [54]. Desweiteren besitzen AG ES Zellen ein vergleichbares *in vitro* und *in vivo* Differenzierungspotential in der frühen neuralen Entwicklung wie N ES Zellen [111]. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte hier untersucht werden, ob AG und N ES Zellen sich in der Bildung neuronaler Subtypen unterscheiden und ob von AG ES Zellen abgeleitete neurale Vorläufer nach Transplantation ins adulte Mausgehirn proliferieren, neural differenzieren und an der funktioneller Regeneration teilnehmen können.

Wie in Abbildung 3 gezeigt, besteht die experimentelle Strategie aus drei unabhängigen Teilprojekten. *Erstens* wurden AG und N ES Zellen *in vitro* über EBs zu pNPCs differenziert. Von diesen pNPCs ausgehend erfolgte die Bildung von ausdifferenzierten neuronalen Subtypen. Zudem wurden ES Zellen mittels eines Ko-Kultursystems mit Stromazellen direkt zu DA Neuronen differenziert. Die differenzierten Zellen wurden durch RT-PCR Analysen und immunhistochemische Färbungen charakterisiert. *Zweitens* wurde nach Blastozysteninjektion die Bildung von DA Neuronen in AG chimären fötalen Gehirnen untersucht. Dafür wurden die chimären Gehirne kryokonserviert, sagittal geschnitten und immunhistochemisch analysiert. *Drittens* wurden stereotaktische Transplantationen von AG und N pNPCs in ein TBI-Modell durchgeführt. Injiziert wurden undifferenzierte ES Zellen sowie AG und N pNPCs. Die Beobachtung von Rezipienten erfolgte bis zu drei Monaten nach Transplantation bevor die Donorzellkontribution im Gehirn analysiert wurde. Bei den drei Teilprojekten wurde der *Imprinting*-Status von Genen, die ein *Imprinting* im Gehirn zeigen durch quantitative *real-time* RT-PCR analysiert.

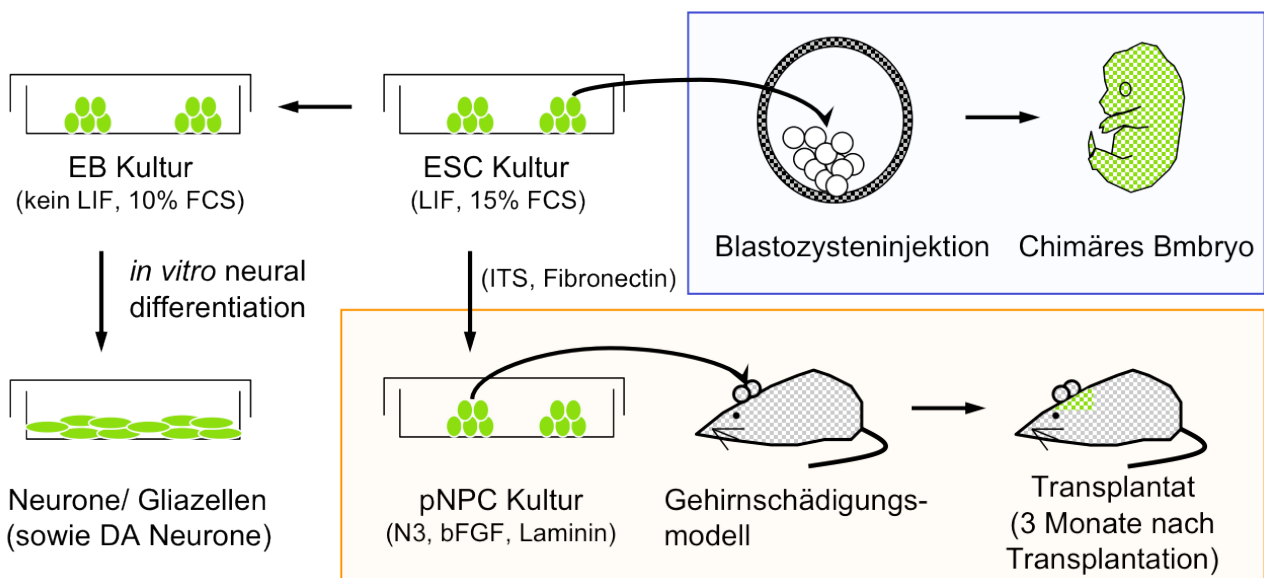


Abbildung 3: Experimentelle Strategie. Die Gesamtstrategie besteht aus drei Teilansätzen: der *in vitro* Differenzierungen zu neuronalen Zelltypen (weiß), der *in vivo* Differenzierungen nach Blastozysteninjektion (blau) sowie der stereotaktischen Transplantation ins traumatisierte Mausgehirn (orange). Die ausdifferenzierten ES Zellen in der Zellkultur, die transplantierten ES Zellen bzw. pNPCs im Gehirn wurden nach Anwachsen mittels immunhistochemischer Färbungen und RT-PCR-Analysen auf ihre zelluläre Identität hin untersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zellen

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. John McLaughlin (Nationwide Children's Hospital, Columbus, USA) wurden die AG bzw. N ES Zelllinien und Chimären, die hier verwendet wurden, hergestellt und diese wurden unserem Labor zur Verfügung gestellt (Tab. 2 und 3) [54]. AG ES Zelllinien wurden durch Transfer des paternalen Pronukleus von eGFP-transgenen B6Osb Zygoten in 129S1 Zygoten, von denen zuvor der maternale Pronukleus beseitigt worden war, erzeugt. Für die eGFP-positiven N Kontroll-Zelllinien wurden aus dem gleichen Prinzip wie AG Zellen hergestellt. Eine wildtypische ES Zelllinie wurde ebenfalls verwendet. Alle Zelllinien, die in der Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die ES Zellkulturen wuchsen und vermehrten sich auf primären MEFs, die aus 14 Tage alten NMRI-Embryonen von unserem Labor selbst hergestellt wurden. Für die Bildung der DA Neurone erfolgte eine Differenzierung von ES Zellen auf PA6 Stromazellen entsprechend eines etablierten Protokolls [103, 104].

Tabelle 2: Verwendete ES Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Genetischer Hintergrund
AGA2 (AG1)	AG ES Zellen, eGFP+ [54]	BL/6, Osb und 129
AGB6 (AG2)	AG ES Zellen, eGFP+ [54]	BL/6, Osb und 129
wtB1	N ES Zellen, eGFP+ [54]	BL/6, Osb und 129
NB3+	N ES Zellen, eGFP+ [54]	BL/6 und Osb
V6.5	Wildtypische ES Zellen	BL/6 und 129

2.1.2. Mäuse

Tabelle 3: Verwendete Versuchstiere und ihre Einsatzfelder

Mausstamm	Verwendung	Versuchsanlage	Quelle
NMRI	Isolation von embryonalen Fibroblasten	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg, Deutschland	Harlan Winkelmann, Deutschland
129 und B6Osb	Herstellung von ES Zellen und Chimären	Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research, Univ. of Pennsylvania, USA	Jackson Labor, USA
C57BL/6J	Rezipienten für die Transplantation von Zellen	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Universität Würzburg, Deutschland	Harlan Winkelmann, Deutschland

2.1.3. Medien und Wachstumsfaktoren

Tabelle 4: Komponenten des ES Zell-Expansionsmediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM High Glucose	400 mL	1,7 g Glucose / L	E15-843	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
FCS	75 mL	15 %	A11-208	PAA Laboratories
LIF-konditioniertes Medium	500 µL			Eigene Herstellung
Non Essential Amino Acids	5 mL	1x	M11-003	PAA Laboratories
L-Glutamat	5 mL	2 mM	M11-004	PAA Laboratories
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories
Natrium-Pyruvat	5 mL	1 mM	S11-003	PAA Laboratories
HEPES-Puffer	5 mL	10 mM	S11-001	PAA Laboratories
β-Mercaptoethanol	3,5 µL	100 µM	M7522	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

Tabelle 5: Zusammensetzung des ES Zell-Differenzierungsmediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM High Glucose	400 mL	1,7 g Glucose / L	E15-843	PAA Laboratories
FCS	50 mL	10 %	S0115	Biochrom, Berlin, Deutschland
Non Essential Amino Acids	5 mL	1x	M11-003	PAA Laboratories
L-Glutamat	5 mL	2 mM	M11-004	PAA Laboratories
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories
Natrium-Pyruvat	5 mL	1 mM	S11-003	PAA Laboratories
HEPES-Puffer	5 mL	10 mM	S11-001	PAA Laboratories
β-Mercaptoethanol	3,5 µL	100 µM	M7522	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Komponenten des MEF-Mediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM Low Glucose	425 mL	1 g Glucose / L	E15-806	PAA Laboratories
FCS	50 mL	10 %	S0115	Biochrom
L-Glutamat	5 mL	2 mM	M11-004	PAA Laboratories
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories
Natrium-Pyruvat	5 mL	1 mM	S11-003	PAA Laboratories

Tabelle 7: Zusammensetzung des ITS-Mediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM / Ham's F-12 Medium	500 mL		E15-813	PAA Laboratories
Insulin	500 µL	5 µg / mL	I6634	Sigma-Aldrich
Transferrin	2,5 mL	50 µg / mL	T8158	Sigma-Aldrich
Natriumselenit	30 µL	30 nM	S5261	Sigma-Aldrich
L-Glutamat	5 mL	2 mM	M11-004	PAA Laboratories
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories

Tabelle 8: Komponenten des N3-Mediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM / Ham's F-12 Medium	500 mL		E15-813	PAA Laboratories
Insulin	2,5 mL	25 µg / mL	I6634	Sigma-Aldrich
Transferrin	2,5 mL	50 µg / mL	T8158	Sigma-Aldrich
Natriumselenit	30 µL	30 nM	S5261	Sigma-Aldrich
Progesteron	500 µL	20 nM	P5780	Sigma-Aldrich
Putrescin	500 µL	100 µM	P8783	Sigma-Aldrich
L-Glutamat	5 mL	2 mM	M11-004	PAA Laboratories
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories

Tabelle 9: Zusammensetzung des neuronalen Differenzierungsmediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
Neurobasal-Medium	50 mL		21980-032	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
B27 supplement	1 mL	2 %	17504-404	Invitrogen
NeuroCult Differentiation Supplement	5 mL	10 %	05703	StemCell Technologies, St. Katharinen, Deutschland
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories

Tabelle 10: Komponenten des SRM-Mediums

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
DMEM High Glucose	425 mL	1,7 g Glucose / L	E15-843	PAA Laboratories
Serum replacement	75 mL	15 %	10828	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	0,35 µL	10 µM	M7522	Sigma-Aldrich
Penicillin Streptomycin	5 mL	10,000 U / mL 10 mg / mL	P11-010	PAA Laboratories

Tabelle 11: Liste der Zusatzstoffe und Wachstumsfaktoren für die neurale Differenzierung

Wachstumsfaktor	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
Fibronectin	5 µg/mL	F1141	Sigma-Aldrich
human BDNF	20 ng/mL	450-02	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
human FGF2 (FGF basic)	100 ng/mL	100-18B	PeptoTech
human FGF8	100 ng/mL	100-25	PeptoTech
human SHH	200 ng/mL	100-45	PeptoTech

2.1.4. Chemikalien und Lösungen

Tabelle 12: Liste an Materialien für molekularbiologische Analysen

Material	Konzentration	Bestell-Nr.	Hersteller
M - MLV Reverse Transcriptase	200 U / µL	28025-013	Invitrogen
Absolute QPCR SYBR Green Mix	2x	2908/13	ABgene, Hamburg, Deutschland
Agarose	1x	A2114	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BSA	30 %	K05-013	PAA Laboratories
DNase I	2 U / µL	AM8170G	Ambion, Austin, USA
DNase I Puffer	10x	2222	Ambion
Hank's BSS	1x	H15-008	PAA Laboratories
Leukozyte Alkaline Phosphatase Kit		85L3R	Sigma-Aldrich
Oligo (dT) Primer	0,5 µg/ µL	1328392	Invitrogen
pegGOLD RNAPure™	1x	30-1010	Peqlab, Göttingen, Deutschland
Paraformaldehyd	95 %	A3817	AppliChem
PIPES	99 %	P3768	Sigma-Aldrich
Poly-Ornithin	1x	P3655	Sigma-Aldrich
Super Taq	5 U / µL	TPO56	HT Biotechnology, Cambridge, UK
Super Taq PCR Buffer 1	10x	610041	HT Biotech
Tissue Tek	1x	4583	Sakura Finetek Zoeterwoude, die Niederlande
Triton X-100	1x	A1388	AppliChem
Trypsin-EDTA	1x	L11-004	PAA Laboratories

Tabelle 13: Liste verwendeter sonstiger Lösungen und Puffer

PBS	10x TBE	10x Ladepuffer	DEPC-Wasser
50 mM NaCl	540 g Tris	25 mL ddH ₂ O	200 mL ddH ₂ O
2 mM KH ₂ PO ₄	275 g Borsäure	25 mL 100 % Glycerol	200 µL Diethyl- pyrocarbonat
8 mM K ₂ HPO ₄	200 mL 0,5 M EDTA	100 µL 0,5 M EDTA	
2,7 mM KCl	(pH 8,0)	1 Msp. Bromphenolblau	
in 1 L ddH ₂ O, pH 7,4	auffüllen auf 5 L mit ddH ₂ O	1 Msp. Xylencyanol	

Tabelle 14: Liste der Lösungen für immunhistochemische Färbungen

Waschpuffer	Blocklösung (Gehirnschnitt)	Blocklösung (Zellkultur)	MSP
0,3 % Triton X-100 in PBS	2 % BSA 5 % Ziegeseum in Waschpuffer	5 % Ziegeseum in Waschpuffer	80 mM PIPES (pH 6,8) 1 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 0,5 % Triton X-100

2.1.5. Antikörper

Tabelle 15: Liste sekundärer Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Immunogen	Spezies	Verdünnung	Bestell-Nr.	Hersteller
Huhn	Cy2-konjugiert, Ziege	1:200	ab6960	Abcam
Kaninchen	Cy3-konjugiert, Ziege	1:200	AP132C	Chemicon
Maus	Cy3-konjugiert, Ziege	1:200	AP130C	Chemicon

Tabelle 16: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bestell-Nr.	Hersteller
<i>cleaved</i> Caspase -3	Polyklonal, Kaninchen	1:200	ab13847	Abcam
CNPase	Monoklonal, Maus	1:1000	C5922	Sigma-Aldrich
eGFP	Polyklonal, Huhn	1:1000	ab13970	Abcam
GFAP	Monoklonal, Maus	1:1000	NCL-GFAP-GA5	Novocastra
Nestin	Monoklonal, Maus	1:500	556309	BD Pharmingen
NeuN	Monoklonal, Maus	1:1000	MAB377	Chemicon
PCNA	Monoklonal, Maus	1:1000	555566	BD Pharmingen
PITX3	Polyklonal, Huhn	1:200	38-2850	ZYMED Laboratories
Synapsin I	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	ab8	Abcam
TH	Kaninchen	1:1000	T8700	Sigma-Aldrich
Tuj-1	Monoklonal, Maus	1:1000	MAB1195	R&D Systems

2.1.5. Primersequenzen

Tabelle 17: Primersequenzen für semi-quantitative RT-PCR-Analysen

Gen	Sequenz (vorwärts)	Sequenz (revers)	Temp. der Primerhybridisierung	Größe des Produkts
CD133	ACC AAC ACC AAG AAC AAG GC	GGA GCT GAC TTG AAT TGA GG	62°C	349 bp
HPRT	CAC AGG ACT AGA ACA CCT	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T	57°C	249 bp
Musashi	CAC GAC CCC TGC AAG ATG TTC	CCA TCT TAG GCT GTG CTC TTC GA	66°C	265 bp
Nanog	GTG CAT ATA CTC TCT CCT TCC C	AGC TAC CCT CAA ACT CCT GGT	66°C	209 bp
Nestin	CAG AGA GGC GCT GGA ACA GAG ATT	AGA CAT AGG TGG GAT GGG AGT GCT	65°C	469 bp
Nurr1	TGA AGA GAG CGG AGA AGG AGA TC	TCT GGA GTT AAG AAA TCG GAG CTG	61°C	255 bp
PITX3	CAC CAG CCT CTC CGG ACA GG	AAG GCG GGG TGA GCC AAG G	63°C	229 bp
Rex1	GGC CAG TCC AGA ATA CCA GA	GAA CTC GCT TCC AGA ACC TG	60°C	232 bp
TH	AGG GAT GGG AAT GCT GTT CTC A	ACC AGG TGG TGA CAC TTG TCC AA	55°C	314 bp

Tabelle 18: Primersequenzen für quantitative *real-time* RT-PCR-Analysen

Gen	Sequenz (vorwärts)	Sequenz (revers)	Temp. der Primerhybridisierung
β-actin	GAT ATC GCT GCG CTG GTC GTC	ACG CAG CTC ATT GTA GAA GGT GTG G	60°C
Dlk1	TGT CAA TGG AGT CTG CAA GG	AGG GAG AAC CAT TGA TCA CG	60°C
H19	CAT GTC TGG GCC TTT GAA	TTG GCT CCA GGA TGA TGT	60°C
IGF2	CTA AGA CTT GGA TCC CAG AAC C	GTT CTT CTC CTT GGG TTC TTT C	60°C
IGF2r	TAG TTG CAG CTC TTT GCA CG	ACA GCT CAA ACC TGA AGC G	60°C
Impact	ACG TTT CCC CAT TTT ACA AG	CTC TAC ATA TGA TTT TCT CTA C	60°C
U2af1	TAA GGC AGC ACC ACT TGG AC	CAT GGG AAG CCA GCT TAA AC	60°C
Ube3a	CAC ATA TGA TGA AGC TAC GA	CAC ACT CCC TTC ATA TTC C	60°C
Zim1	GAG AAG CCG TAC TGC TGT CA	CTT GCA CCG GTA CCT GGA GT	60°C

2.1.7. Geräte

Tabelle 19: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Digitalkamera	C-7070	Olympus, Japan
Fluoreszenzmikroskop	BZ-8000	Keyence, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	DM IRBE	Leica, Deutschland
Geldokumentationssystem	Gel Imager	Intas, Deutschland

Mikrotom	CM 1900	Leica, Deutschland
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra, Deutschland
PCR-Gerät	T Gradient	Biometra, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
<i>Real-time</i> PCR-Gerät	Rotor-Gene 3000	Corbett Life Science, Deutschland
Stereomikroskop	Stemi SV 11	Carl Zeiss, Deutschland
Zellkulturmikroskop	EVOS	AMG, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

In vitro-Differenzierung von ES Zellen zu pNPCs

ES Zellen wurden auf MEFs in ES Zell-Expansionsmedium (Tab. 4) kultiviert. Um den undifferenzierten Zustand zu erhalten, erfolgte jeden Tag ein Mediumswechsel und jeden dritten Tag die Passage der ES Zellen auf neue Zellkulturplatten, die zuvor mit Mitomycin-behandelten MEFs beschichtet wurden. Für Experimente wurden die ES Zellkultur mit Trypsin vereinzelt und auf eine Gelatine-beschichtete Zellkulturplatte (Beschichtung: 0,1 % Gelatine in PBS, 37 °C, 30 min) für eine halbe Stunde inkubiert. Danach wurden die abgesetzten, nicht adhärenen Zellen ohne MEFs behutsam abgenommen, bei 90 g zentrifugiert und das Zellpellet in neues Medium resuspendiert.

Zur Differenzierung von ES Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 10 mL ES Zell-Differenzierungsmedium (Tab. 5) auf eine 10-cm Petrischale für Suspensionskultur ausgesät. Nach zwei Tagen wurden zusätzliche 5 mL frisches ES Zell-Differenzierungsmedium zu den Kulturen gegeben. Am fünften Tag der Differenzierung wurden die zu von den ES Zellen gebildeten EBs geerntet und in 10 mL Serum-freiem ITS/Fn-Medium (Tab. 7; ITS-Medium mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fibronectin) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann auf eine 10-cm Zellkulturplatte für adhärenente Zellen ausplattiert. Jeden zweiten Tag wurde das ITS/Fn-Medium gewechselt. Fünf Tage nach der Ausplattierung der EBs wurden diese mit Trypsin abgelöst, und 5×10^6 Zellen wurden in 5 mL N3FL-Medium (Tab. 8; N3-Medium mit 100 ng/mL FGF2 und 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin) auf eine 6-cm Zellkulturplatte ausgesät, welche zuvor mit 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly-Ornithin für einen Tag und 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin für 2 Stunden beschichtet wurde. Das N3F-Medium (N3-Medium mit 100 ng/mL FGF2) wurde jeden Tag gewechselt. Die entstandenen pNPCs in der Zellkultur wurden alle drei bis vier Tage passagiert und expandiert, wobei 2 bis 3×10^6 pNPCs auf eine neue beschichtete Zellkulturplatte ausgesät wurden (Abb. 4).

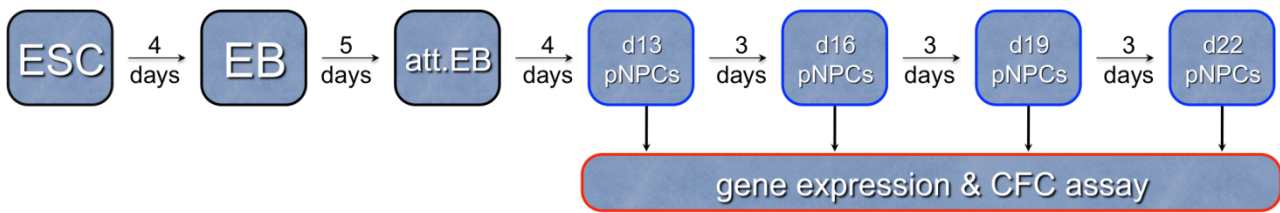


Abbildung 4: Differenzierungsschema von ES Zellen zu pNPCs. Die Differenzierung zu pNPCs erfolgte in den drei folgenden Schritten: 1.) EBs für vier Tage, 2.) adhärenente EBs für fünf Tage und 3.) pNPCs für vier Tage. Nach 13 Tagen waren die Zellen zu pNPCs differenziert und proliferierten. Die pNPCs wurden nach 13, 16, 19 oder 22 Tagen geerntet und im Folgenden als d13-, d16-, d19- und d22-pNPCs bezeichnet.

In vitro-Differenzierung von pNPCs zu neuronalen Zellen

Die Differenzierung von pNPCs fand abhängig von der Analysemethode entweder in einer 6-cm-Zellkulturschale für folgende RT-PCR-Analysen oder in einer 4-well-Zellkulturplatte auf runden Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser für weitere mikroskopische Experimente statt. Dabei wurden die Zellkulturschale und die Zellkulturplatte vor dem Gebrauch mit 15 µg/mL Poly-Ornithin für einen Tag und 1 µg/mL Laminin für 2 Stunden beschichtet.

Zum Beginn der Differenzierung der pNPCs wurden 1 bis 2 x 10⁶ Zellen/cm² auf eine Zellkulturplatte ausplattiert. Das neurale Differenzierungsmedium (Tab. 9) wurde alle zwei Tage gewechselt. Dabei wurden die Zellen eine bzw. zwei Wochen kultiviert und anschließend für die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit verschiedenen neuronalen Markern (Tab. 16) angefärbt und untersucht.

In vitro-Differenzierung von ES Zellen zu DA Neuronen

Das Differenzierungsprotokoll von ES Zellen in DA Neuronen erfolgte in einem Ko-Kultursystem mit PA6 Stromazellen in SRM-Medium (Tab. 10) [103, 104]. Vor der Ausplattierung von ES Zellen wurden die Platten mit Mitomycin-behandelten Stromazellen (5 x 10⁵ Zellen/cm²) beschichtet. Auf diesen Platten wurden ES Zellen mit einer Dichte von 50 bis 100 Zellen/cm² ausgesät und im Inkubator mit 4 % Sauerstoff kultiviert. Nach drei, fünf und sieben Tagen wurde das SRM-Medium gewechselt, wobei das SRM-Medium am fünften und siebten Tag mit *Sonic Hedgehog* und FGF8 supplementiert wurde (Tab. 11). Am achten und zehnten Tag wurde das Medium durch N3-Medium mit *Sonic Hedgehog* und FGF8 sowie FGF2 ersetzt. Abschließend wurden die differenzierenden Zellen in N3-Medium mit L-Ascorbinsäure und BDNF kultiviert. Nach 14 Tagen Differenzierung wurden die ausdifferenzierten Zellen angefärbt und analysiert.

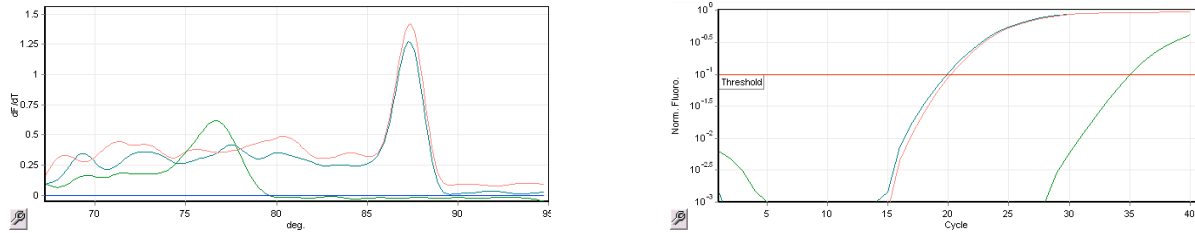


Abbildung 5: Schmelzkurve (links) und quantitative Analyse der Kopienzahl mittels *real-time* RT-PCR (rechts). Gezeigt sind die Analysen von zwei Proben (rot und blau) und Wasser (grün) als Negativkontrolle. In der quantitativen Analyse ist die Menge der amplifizierten Produkte anhand des Ct-Wertes zu erkennen.

2.2.2. Molekularbiologische Analysen

Zur Genexpressions-Analyse der neural differenzierenden Zellen wurde die RNA der Zellen mit *peqGold RNAPureTM* nach Anleitung des Herstellers isoliert. Danach wurde ein DNase-Verdau mit 2 μ g RNA durchgeführt und die Hälfte der 2 μ g DNase-behandelten RNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die zweite Hälfte ohne reverse Transkriptase diente als Kontrolle für eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA.

Die Analyse der Genexpression erfolgte sowohl durch semi-quantitative RT-PCR als auch durch quantitative *real-time* RT-PCR (Tab. 20). Im Gegensatz zur semi-quantitativen RT-PCR konnte mit der *real-time* RT-PCR die mRNA-Expression von unterschiedlichen Proben quantitativ verglichen werden. Bei dieser quantitativen RT-PCR wurde die Menge des Produkts in Echtzeit („*real-time*“) gemessen. Während der Amplifikation des Produkts waren die Initiationsphase, die Exponentialphase und die Plateauphase zu sehen. In der Mitte der Exponentialphase konnte ein Grenzwert (*Threshold*) eingesetzt werden, wobei man den Ct (*cycle time*)-Wert bestimmen und ihn zur Analyse verwenden konnte (Abb. 5).

Die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR wurden durch ein Approximationsverfahren, die delta-delta-Ct-Methode, ausgewertet. Diese Methode ermöglichte einen Vergleich der Genexpression zwischen zwei Proben („*standard*“ und „*target*“) mithilfe eines Referenzgens, zum Beispiel des Haushaltsgens HPRT. Bei der delta-delta-Ct-Methode nimmt man an, dass „*standard*“ und „*target*“ ähnliche Amplifikationseffizienzen haben. Die Kalkulation mit einer Effizienz von 100 % lautet: $2^{\text{delta-delta-Ct}}$. Der Wert von delta-delta-Ct wurde mit der folgenden Formel ausgerechnet werden: $[(\text{Ct}(\text{standard-Referenzgen}) - \text{Ct}(\text{target-Referenzgen})) - (\text{Ct}(\text{standard-Zielgen}) - \text{Ct}(\text{target-Zielgen}))]$. Dabei ist der delta-delta-Ct-Wert von *standard* auf eins eingesetzt und der Wert von *target* wurde als Differenz („*fold change*“) im Vergleich zum *standard* angezeigt.

Tabelle 20: Pipettierschema der *real-time* RT-PCR-Ansätze

20 μ L-Reaktionsansatz		
10,0	μ L	2x SYBR Green Mix
0,5	μ L	Primerpaar (100 p mol / μ L für jeden Primer)
1,0	μ L	cDNA
8,5	μ L	destilliertes Wasser

2.2.3. Immunhistochemische Färbungen

In vitro und *in vivo* differenzierte bzw. transplantierte Zellen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert. Je nach Probe und unterschiedlichen spezifischen Proteinen erfolgten unterschiedliche Färbungsansätze. In den Experimenten wurden insgesamt vier verschiedene Färbeprotokolle angewandt.

Für die intrazellulären Färbungen wurden die oben beschriebenen beiden Färbeprotokolle für die eingefrorenen Gehirnschnitte der transplantierten Rezipienten und für die Zellen, die auf dem Deckgläschen in 4-well- bzw. 24-well-Platten kultiviert wurden, verwendet. Um intranukleäre Färbungen zum Nachweis von PCNA, *cleaved* Caspase-3, PITX3 durchzuführen, wurde ein zusätzlicher Schritt in den Färbeprotokollen ergänzt. Vor der Inkubation der Proben in Blocklösung wurden die Gehirnschnitte bzw. die Zellen auf den Deckgläschen in Citratlösung für sechs Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die gefärbten Proben wurden bei 4°C aufbewahrt und einem Tag nach der Färbung fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Färbeprotokoll für Kryogehirnschnitte

Die Gehirnschnitte auf Objektträgern wurden:

- für eine halbe Stunde bei der Raumtemperatur aufgetaut,
 - einmal für 10 Minuten in PBS und einmal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen,
 - für eine Stunde in Blocklösung inkubiert,
 - mit primären Antikörpern in Blocklösung über Nacht bei 4 °C inkubiert,
 - zweimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen,
 - mit sekundären Antikörpern in Blocklösung für eine Stunde inkubiert,
 - zweimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen,
 - mit DAPI (1:500 verdünnt in PBS) für fünf Minuten inkubiert,
 - einmal für fünf Minuten in PBS und kurz in destilliertem Wasser gewaschen,
 - in Moviol eingebettet und mit dem Deckgläsern eingedeckt.
-

Färbeprotokoll für Zellen auf Deckgläschen

Deckgläschen wurden:

- kurz in PBS gewaschen,
 - für 30 Sekunden in MSP inkubiert,
 - für drei Minuten in Methanol bei – 20 °C fixiert,
 - dreimal für fünf Minuten im Waschpuffer gewaschen,
 - für 30 Minuten in Blocklösung inkubiert,
 - mit primären Antikörpern für eine Stunde inkubiert,
 - dreimal für fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen,
 - mit sekundären Antikörpern für eine Stunde inkubiert,
 - dreimal für fünf Minuten im Waschpuffer gewaschen,
 - mit DAPI (1:500 verdünnt in PBS) für fünf Minuten inkubiert,
 - einmal für fünf Minuten in PBS und kurz in destilliertem Wasser gewaschen,
 - auf Objektträger mit einem Tropfen Moviol aufgelegt.
-

2.2.4. Untersuchung zur Frequenz Kolonie-bildender Zellen (CFC)

Um die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien zu untersuchen, wurden ES Zellen bzw. differenzierte ES Zellen unter ES Zell-Bedingungen kultiviert. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt und in unterschiedlichen Zelldichten (200 bis 500 für ES Zellen bzw. 10^3 bis 10^5 für differenzierte ES Zellen) auf 24-well-Platten mit MEFs ausplattiert. Fünf Tage wurden diese Zellen in ES Zell-Expansionsmedium kultiviert. Zur Analyse von alkalische Phosphatase (AP)-aktiven Kolonien wurden die Kulturen fixiert und anhand „*Leukozyte Alkaline Phosphatase*“ Kit (Tab. 12) nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Danach wurde die Zahl der Kolonien gezählt und mit der eingesetzten Zellzahl die CFC-Frequenz im Ansatz errechnet.

2.2.5. *in vivo* Analyse von pNPCs in TBI-Modell

Um das Differenzierungspotenzial von pNPCs *in vivo* zu untersuchen, wurde ein TBI-Modellsystem verwendet [112, 113]. Die Arbeiten mit diesem Modellsystem erfolgten in Kooperation mit Professor Dr. Anna-Lenna Sirén von der neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg. Dabei wurden die Herstellung der Donorzellen und die Analyse der Donorzellkontribution nach der Transplantation von mir durchgeführt, die stereotaktischen Transplantationen wurden von Prof. Dr. A.-L. Sirén durchgeführt. Im TBI-Modellsystem wurden 4-Wochen-alte Mäuse narkotisiert, die Kopfhaut wurde durch einen Schnitt geöffnet und eine Kryoläsion wurde stereotaktisch auf den

rechten, parietalen Cortex erzeugt (Koordinaten vom Bregma: 1,5 mm posterior und 1,5 mm lateral). Dafür wurde die Spitze eines konischen Kupfer-Zylinders mit dem Durchmesser von 1 mm zunächst mit flüssigem Stickstoff gekühlt und danach zur Erzeugung der Kryoläsion verwendet. Anschließend wurden die Mäuse für 10 Tage bis zur Transplantation in der Tierhaltung gehalten.

Als Donorzellen für stereotaktische Transplantate in ein adultes Hirnschädigungsmodell wurden aus ES Zellkulturen differenzierte pNPCs eingesetzt. Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, wurden pNPCs mit verschiedenen Kultivierungszeiten geerntet. Zur stereotaktischen Transplantation wurde der parietale Schädel durchbohrt. Anschließend wurden je 1 μ L HBSS mit 100.000 Zellen an drei verschiedenen Stellen ins Striatum injiziert (Koordinaten vom Bregma: 1,5 mm posterior und 1, 2, und 3 mm lateral). Nach der Transplantation wurden die Rezipienten bis zu drei Monate täglich beobachtet und vor Analyse getötet. Bei motorischer Auffälligkeit wurde das Tier vorher getötet. Das narkotisierte Tier wurde erst mit 50 mL PBS-Lösung perfundiert, bevor es endgültig eingeschläfert wurde. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und zur Fixierung über Nacht in 4 % Paraformaldehyd in PBS inkubiert. Zur Vorbereitung für die Histologie wurde das Gehirn zwei Tage in 16 % Glucose in PBS inkubiert und bei -80°C in *Tissue Tek* eingebettet.

Zur histologischen Analyse wurden die eingefrorenen Gehirne mit dem Mikrotom bei -20°C geschnitten. Um sagittale Schnitte zu machen, wurden die Gehirne schon bei der Einbettung sagittal positioniert. Die ersten zehn 10- μm -dicken Gehirnschnitte wurden auf zehn Objektträger überführt und die folgenden zehn Schnitte auf die gleichen Objektträger aufgetragen. Auf die gleiche Weise wurden 40 Gehirnschnitte (400- μm -dickes Gewebe) auf insgesamt zehn Objektträger überführt, wobei sich jeweils vier Schnitte auf einem Objektträger befanden (Abb. 7).

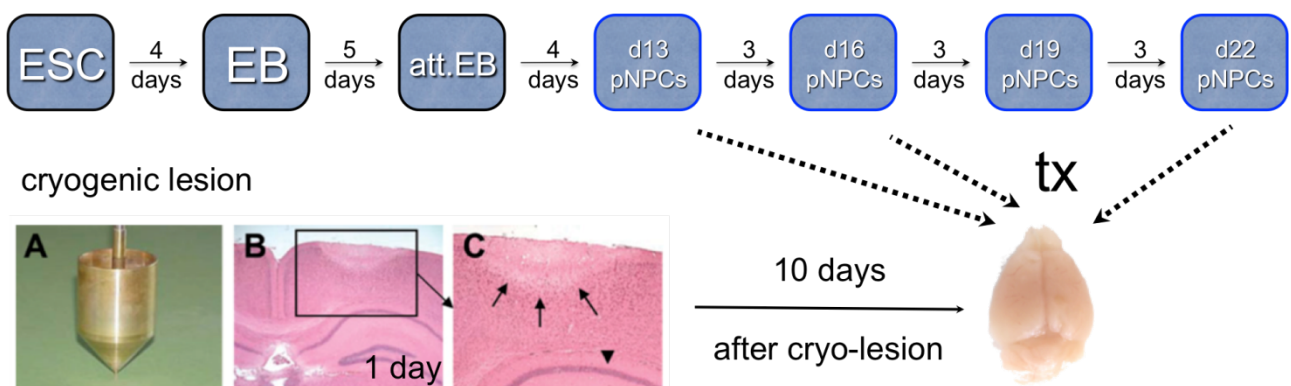


Abbildung 6: Transplantationsschema von pNPCs ins geschädigte Gehirn. Für die stereotaktische Transplantation wurden ES Zellen unterschiedlich lang differenziert (13, 16 bzw. 22 Tage). Die Donorzellen wurden an drei verschiedenen Stellen ins Striatum eines Tieres injiziert. 10 Tage vor der Transplantation wurden die Gehirne der Rezipienten durch einen kalten, konischen Kupfer-Zylinder (A) geschädigt. In B und C ist eine Kryoläsion am parietalen Cortex nach einem Tag in einem histologischen Gehirnschnitt zu sehen [113].

Um die Donorzellen im Gehirn der Rezipienten zu untersuchen, wurde zuerst eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung durchgeführt. Hierdurch wurden die Läsion als auch die Einstichkanäle der Transplantationen lokalisiert. Die so ausgesuchten Schnitte wurden nach den oben genannten Färbeprotokollen mit verschiedenen Antikörpern gegen die Donorzellen (anti-eGFP), gegen die neuronalen Marker (anti-NeuN, anti-GFAP und anti-CNPase) sowie gegen Proliferations-Marker (anti-PCNA) immunhistochemisch gefärbt und analysiert.

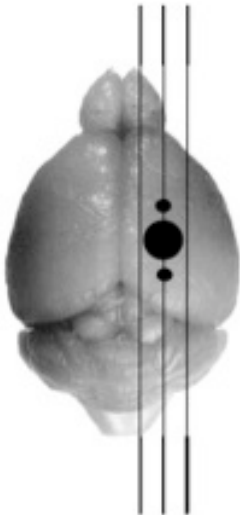


Abbildung 7: Schema der Schnittführung. Es sind die Ebenen für die sagittalen Schnitte, die Position der gesetzten Läsion (großer schwarzer Kreis) und der drei Transplantationsinjektionen (drei schwarze Kreise) abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Neurale *in vitro* Differenzierung von AG und N ES Zellen

Murine ES Zellen besitzen die beiden funktionellen Stammzeleigenschaften: Selbsterneuerungs- und Multiliniendifferenzierungspotenzial [14, 16]. Eine ektodermale Ausrichtung der Multiliniendifferenzierung resultiert in neuronalen Vorläuferzellen bzw. in differenzierten neuronalen und glialen Zelltypen. Die Fähigkeit der neuronalen Differenzierbarkeit ist bisher für uniparentale AG ES Zellen nicht erschöpfend untersucht worden. In meiner Doktorarbeit wurde daher das neurale Differenzierungspotenzial von AG im Vergleich zu N ES Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert.

3.1.1. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu pNPCs

Um zu untersuchen, ob AG wie N ES Zellen *in vitro* zu neuronalen Zelltypen differenzieren können, wurden parallel AG und N ES Zellen in der Zellkultur nach einem etablierten Protokoll [114, 115] über zunächst freischwimmende und adhärente EBs zu pNPCs differenziert (Abb. 8A und 8B a bis d) [114]. Die pNPCs wuchsen als adhärente Zellen auf Poly-Ornithin-beschichteten Zellkulturschalen. Wie in Abbildung 8A (e) und 8B (e) gezeigt, färbten sich sowohl AG als auch N pNPCs in der Immunfluoreszenzfärbung positiv für Nestin, einem Marker neuraler Vorläuferzellen.

Zudem wurde die Genexpression in undifferenzierten ES Zellen sowie in 13, 16, 19 Tage und 22 Tage differenzierte pNPC-Kulturen mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Während der Differenzierung reduzierte sich die Expression der Pluripotenzgene Nanog und Rex1 und parallel wurden in pNPC-Kulturen die Transkripte für Nestin, CD133 und Musashi, die spezifisch für neurale Vorläuferzellen sind, nachgewiesen (Abb. 8C).

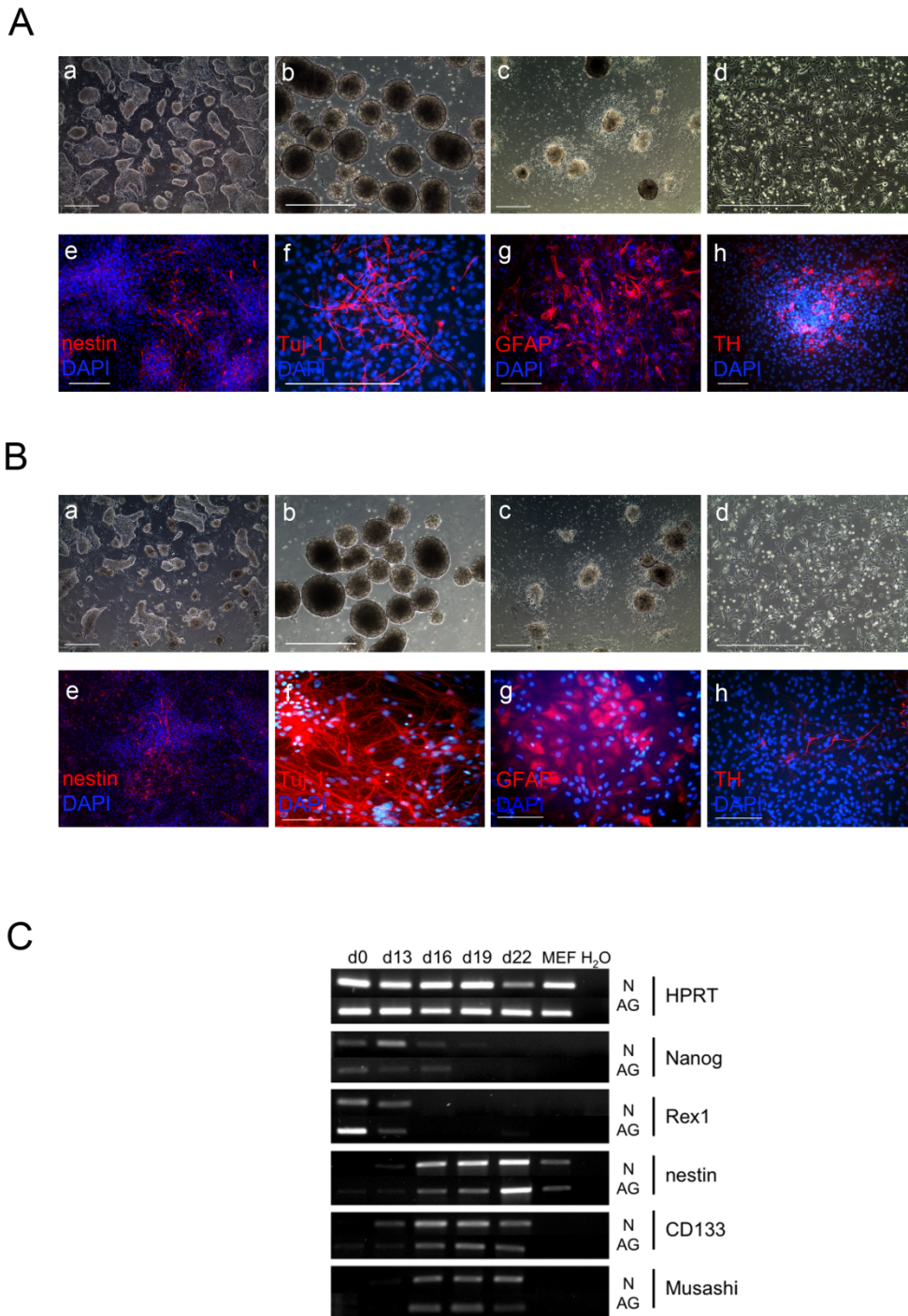


Abbildung 8: Neurale *in vitro* Differenzierung von AG und N ES Zellen. **(A).** Gezeigt ist die Differenzierung von AG Zellen ausgehend von undifferenzierten ES Zellen (Tag 0 der Differenzierung, Feld a) über EBs (Tag 4, Feld b), adhären EBs (Tag 9, Feld c) und pNPCs (Tag 13, Feld d). Ebenfalls gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen von undifferenzierten pNPCs mit anti-Nestin Antikörper (neurale Vorläufer, Feld e) und von 2 Wochen differenzierten pNPCs mit Anti-Tuj-1 (neuronalen Zellen, Feld f), Anti-GFAP (astrogliale Zellen, Feld g) und anti-TH Antikörpern (DA Neuronen, Feld h). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 0,5 mm. **(B).** Gezeigt ist die neurale Differenzierung und Immunfluoreszenzfärbungen von N Kontroll-ES Zellen, wie in A beschrieben. **(C).** RT-PCR-Analyse der Pluripotenzgene Nanog und Rex1 und der in neuronalen Zellen exprimierten Gene Nestin, CD133 und Musashi in N und AG Zellen während der neuralen Differenzierung. Gezeigt sind undifferenzierte ES Zellen (d0), 13 (d13), 16 (d16), 19 (d19) und 22 Tage differenzierte pNPCs (d22). Ebenfalls dargestellt sind RT-PCR-Analysen von RNA aus MEFs. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet (H₂O). Als Ladekontrolle ist die Expression des Haushaltsgens HPRT dargestellt. Biologische Replikate: n=3.

3.1.2. Differenzierung von AG und N pNPCs zu neuronalen Zelltypen

Um die Fähigkeit der neuronalen Differenzierung von AG pNPCs zu analysieren, erfolgte ausgehend von pNPCs ein weiterer Differenzierungsschritt. Nach der Generierung von AG und N pNPCs wurden diese für weitere zwei bis drei Wochen unter neuronalen Differenzierungsbedingungen kultiviert. Dabei wurde die Differenzierung zu neuronalen Zelltypen durch *NeuroCult* Medium (Mixtur von verschiedenen Wachstumsfaktoren) stimuliert. Die Abbildungen 8A und 8B (f bis h) zeigen den immunhistochemischen Nachweis von differenzierten AG und N pNPCs anhand von Markern für Neuronen (Tuj-1), Astrozyten (GFAP) und DA Neuronen (TH). Die differenzierten AG und N pNPCs wiesen die typische Morphologie von Neuronen und Astrozyten mit langen bzw. vielen verästelten Fortsätzen auf. Die Frequenzen der AG und N pNPCs gebildeten Neurone bzw. Astrozyten sind bereits früher in der Arbeitsgruppe bestimmt worden und unterscheiden sich nicht zwischen AG und N [111]. Die Frequenz für Neurone ist $94,0 \pm 2,7$ % bei AG und $95,0 \pm 2,1$ % bei N. Die Frequenz für Astrozyten beträgt $3,4 \pm 1,9$ % bei AG und $5,2 \pm 2,8$ % bei N.

3.1.3. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu DA Neuronen

Um das Differenzierungspotenzial von AG ES Zellen zu neuronalen Subtypen weiter zu untersuchen, wurden AG und N ES Zellen gezielt zu DA Neuronen differenziert. Diese Differenzierung wurde auf Mitomycin-inaktivierten PA6 Stromazellen unter der Zugabe von SHH, FGF8, BDNF und Ascorbinsäure durchgeführt (Abb. 9A). Am Tag 14 der Differenzierung wurden die Zellen immunhistochemisch gegen TH (Marker für DA Neurone) und Synapsin I (Marker für synaptische Vesikeln) gefärbt. Die gefärbten Zellen zeigten lange, typisch neuronale Fortsätze (Abb. 9B). Die Frequenzen von TH-positiven DA Neuronen betragen $6,3 \pm 1,6$ % bei AG und $4,5 \pm 2,2$ % bei N.

Darüber hinaus wurde die Expression der DA Neuronen-spezifischen Gene TH, PITX3 und Nurr1 in ES Zellen und DA Neuronenkultur sowie in Stromazellen mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Die AG DA Neurone zeigten die Expression der drei Markergene, während diese Gene in ES und Stromazellen nicht exprimiert waren (Abb. 9C).

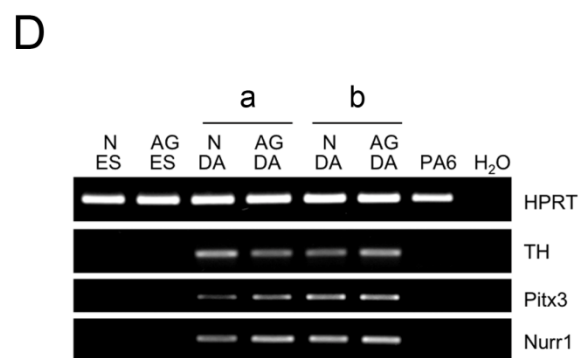
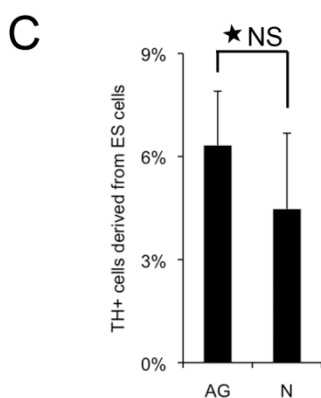
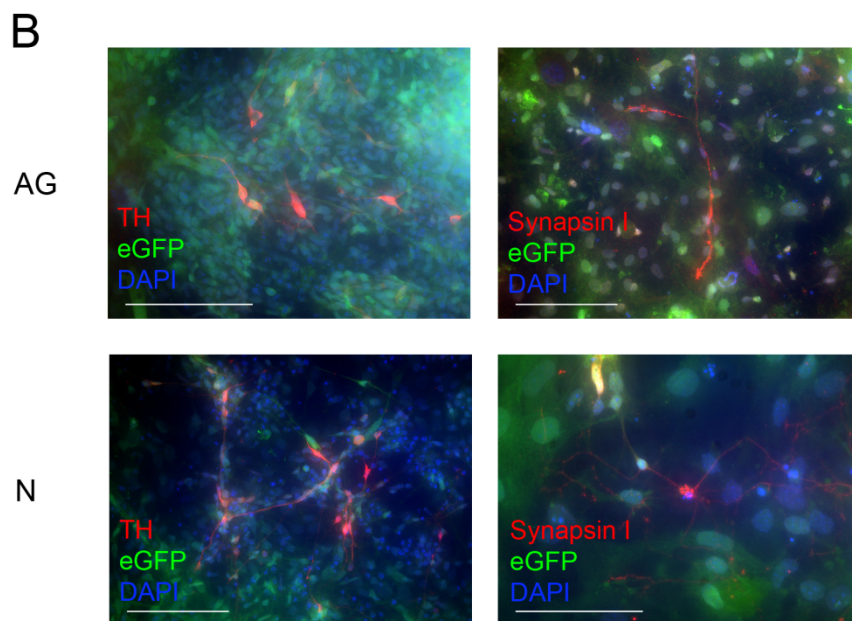
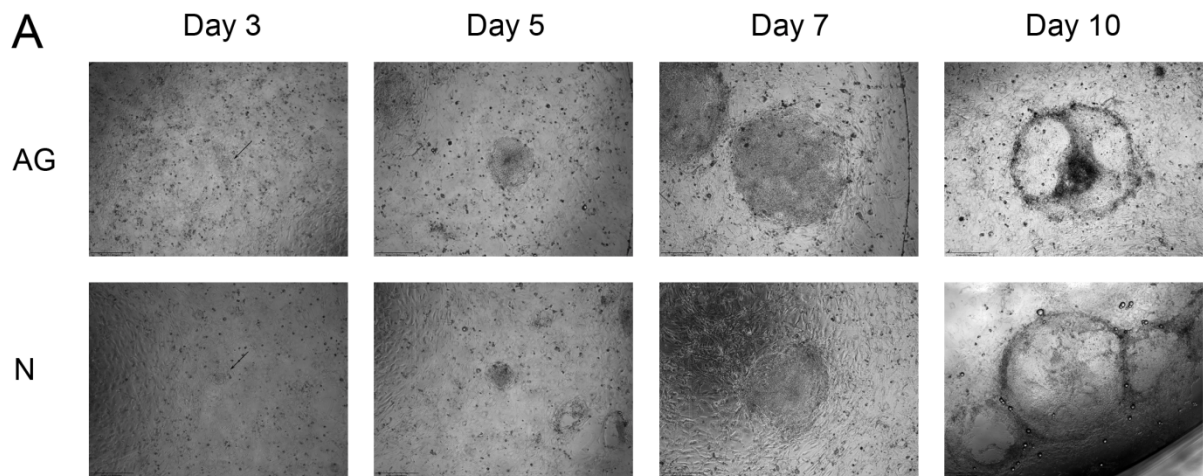


Abbildung 9: *In vitro* Differenzierung von AG und N ES Zellen in einem Ko-Kultursystem auf PA6 Stromazellen zu DA Neuronen. **(A)**. Dargestellt ist die Induktion der Differenzierung von ES Zellen zu DA Neuronen (Phasenkontrast-Aufnahmen). **(B)**. Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen der Differenzierungskultur von AG und N ES Zellen spezifisch für TH und Synapsin I. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die weißen Balken entsprechen 1 mm. n=3. **(C)**. Dargestellt sind Frequenzen von TH-positiven AG und N DA Neuronen 14 Tage nach Differenzierungsbeginn. ★NS: nicht signifikant ($p = 0,098$). **(D)**. Die Expression von DA Neuronen-spezifischen Markern (TH, PITX3 und Nurr1) wurde in AG und N DA Neuronen von zwei unabhängigen Differenzierungen (a und b) mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Als Kontrollen wurden undifferenzierte ES Zellen (ES), Stromazellen (PA6) und Wasser (H₂O), als Ladekontrolle wurde HPRT verwendet. n=3.

3.1.4. Genomisches *Imprinting* in AG und N ES Zellen, in pNPCs und in DA Neuronen

AG Zellen besitzen zwei Kopien der paternalen Allele. Um das genomische *Imprinting* von ES Zellen, pNPCs und DA Neuronen mit AG und N Genomen zu vergleichen, erfolgten quantitative RT-PCR Analysen von Genen, deren Expression im Gehirn ein *Imprinting* zeigt. Die Expression von fünf paternal (IGF2, Dlk1, Impact, Snrpn und U2af1) und vier maternal exprimierten Genen (IGF2r, Ube3a, Zim1 und H19) wurde in undifferenzierten ES Zellen und in daraus abgeleiteten pNPCs sowie DA Neuronen untersucht. Die hier untersuchten *imprinted* Gene, die im Gehirn allelspezifisch exprimiert sind, sind in undifferenzierten AG wie in N ES Zellen biallelisch exprimiert. In 13 Tage differenzierten AG pNPCs zeigt z.B. das paternal exprimierte Gen IGF2 in AG Zellen eine doppelt so hohe Genexpression wie in N Zellen während das maternal exprimierte Gen Zim1 in AG im Vergleich zu N Zellen deutlich weniger bzw nicht exprimiert wird. In der Summe ist eine monoallele Genexpression bei allen untersuchten Genen außer bei Ube3a zu beobachten. Die paternal exprimierten Gene IGF2 und Dlk1 und die maternal exprimierten Gene IGF2r, H19 und Zim1 behielten ihr *Imprinting*-Muster in 22 Tage alten AG pNPCs während die Gene Impact, U2af und Ube3a eine Relaxation ihrer reprimierten Genexpression in 22 Tage alten AG pNPCs zeigten (Abb. 10B).

Zusätzlich wurde eine Analyse der Genexpression von Genen mit *Imprinting* im Gehirn auch an DA Neuronenkulturen durchgeführt. Wie AG pNPCs exprimierten AG DA Neurone im Vergleich zu N doppelt so viel IGF2 und Dlk1, während die Genexpression von H19 und Zim1 in AG DA Neuronen stark reduziert war (Abb. 10C). Diese Analysen zeigen, dass das genomische *Imprinting* in neuralen Zellen, die aus AG ES Zellen abgeleitet sind, bei einer Vielzahl der Gene erhalten bleibt.

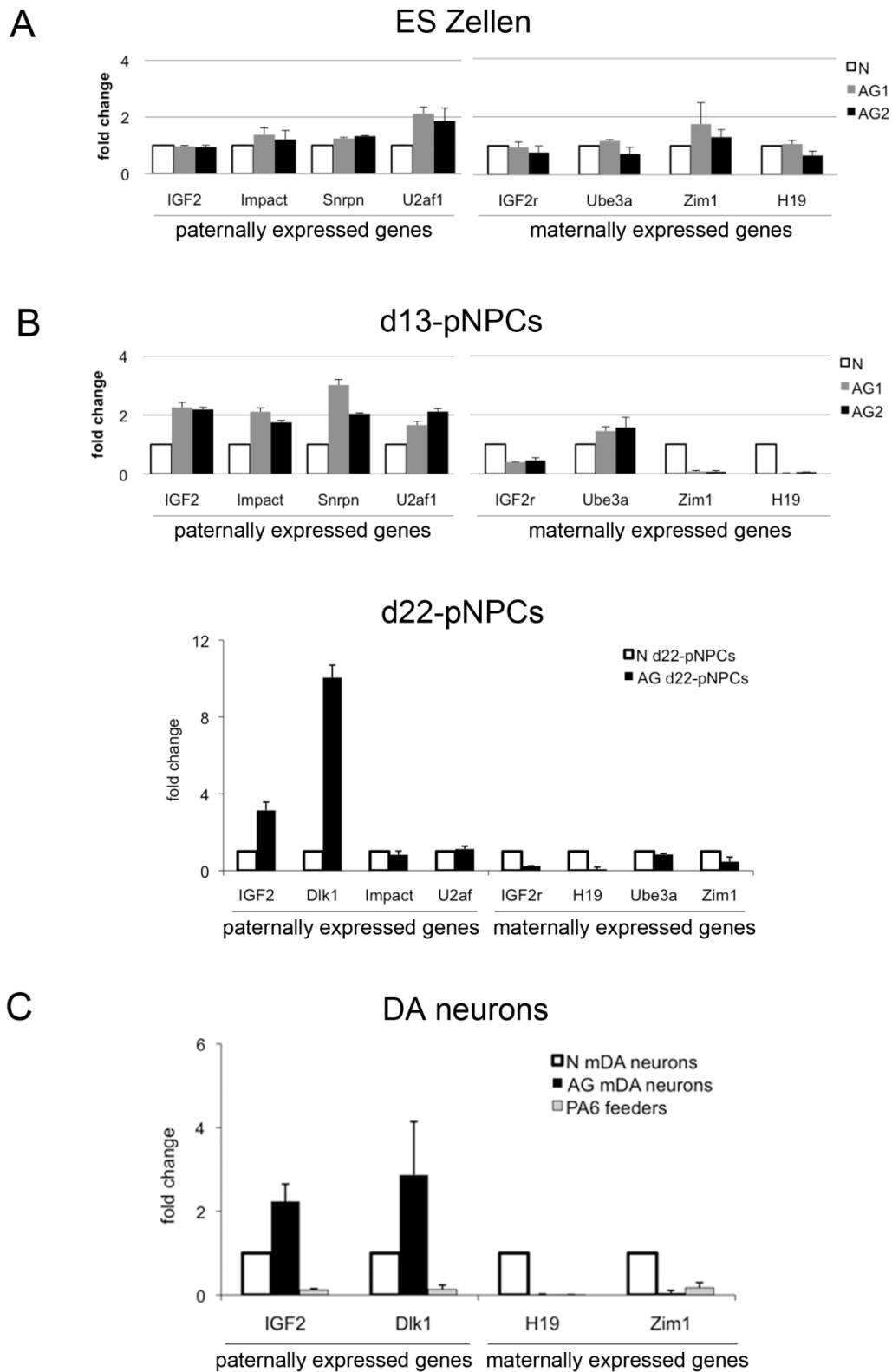


Abbildung 10: Analyse der Expression von *imprinted* Genen. **(A).** Quantitative Genexpressionsanalyse von paternal (IGF2, Impact, Snrpn und U2af1) und maternal (IGF2r, Ube3a, Zim1 und H19) exprimierten Genen in undifferenzierten N ES Zellen sowie in zwei AG ES Zelllinien (AG1 und AG2). Die Genexpression in N ES Zellen wurde auf eins normalisiert. **(B).** Gezeigt ist die Genexpressionsanalyse in den für 13 Tage differenzierten pNPCs (d13-pNPCs) und den für 22 Tage differenzierten Zellen (d22-pNPCs). **(C).** Ebenso wurde die quantitative RT-PCR in DA Neuronen und Stromazellen (PA6) durchgeführt. Zur Berechnung des Werts *fold change* wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode mit dem Referenzgen β -Actin angewendet. $n=3$.

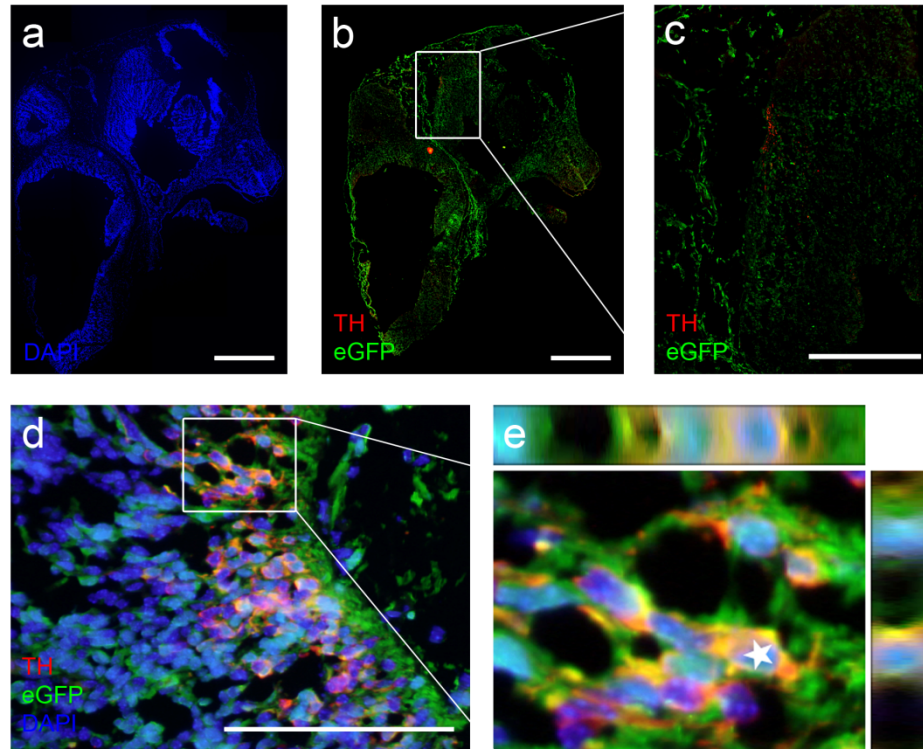
3.2. Neurale *in vivo* Differenzierung von AG und N ES Zellen in fötalen Chimären

Um zu untersuchen, ob AG ES Zellen *in vivo* zu neuronalen Zelltypen differenzieren können, wurden Chimärembryonen durch Blastozysteninjektion von AG bzw. N ES Zellen generiert. Nach der Injektion von ES Zellen in Blastozysten nehmen diese an der Entwicklung des Embryos teil und sind im ganzen embryonalen Körper verteilt. Die AG und N chimären Gehirne am embryonalen Tag 12,5 (E12.5) und 16,5 (E16.5) wurden im Labor von Prof. K. J. McLaughlin isoliert und uns zur Analyse zugesandt. Untersucht wurde das Vorhandensein von neural-differenzierten AG Donorzellen in chimären E12.5 sowie E16.5 Gehirnen.

3.2.1. Differenzierung von AG und N ES Zellen zu DA Neuronen in E12.5 und E16.5 Embryonen

Um die zelluläre Identitäten von AG und N Donorzellen in chimären Gehirnen zu untersuchen, wurden zunächst sagittale Kryoschnitte von den Köpfen von E12.5 und E16.5 Chimärembryonen angefertigt. Anschließend wurden diese zur Detektion reifer neuronaler Zelltypen mit TH- und PITX3-spezifischen Antikörpern immunhistochemisch angefärbt (Abb. 11 und 12). In AG E12.5 chimären Gehirnen wurden TH-positive Zellen im Mittelhirn gefunden von denen einige eGFP-positiv, also Abkömmlinge der AG Zellen, waren (Abb. 11A d und e). Gleiches wurde in N chimären Gehirnen beobachtet. Diese doppelt-positiven Zellen stellen DA Neurone im Mittelhirn dar, die aus AG bzw. aus N Donorzellen hervorgegangen sind. Analog zur Analyse von E12.5 Embryonen wurden E16.5 Gehirne immunhistochemisch analysiert. Die TH- und PITX3-positiven Signale waren im Mittelhirn vorhanden und ein Teil dieser Signale zeigte in AG und N chimären Gehirnen Ko-Lokalisation mit dem eGFP-Marker (Abb. 12A c und d). Dies zeigt, dass AG wie N ES Zellen *in vivo* in der embryonalen Umgebung chimärer Gehirne zu DA Neuronen differenzieren können.

A



B

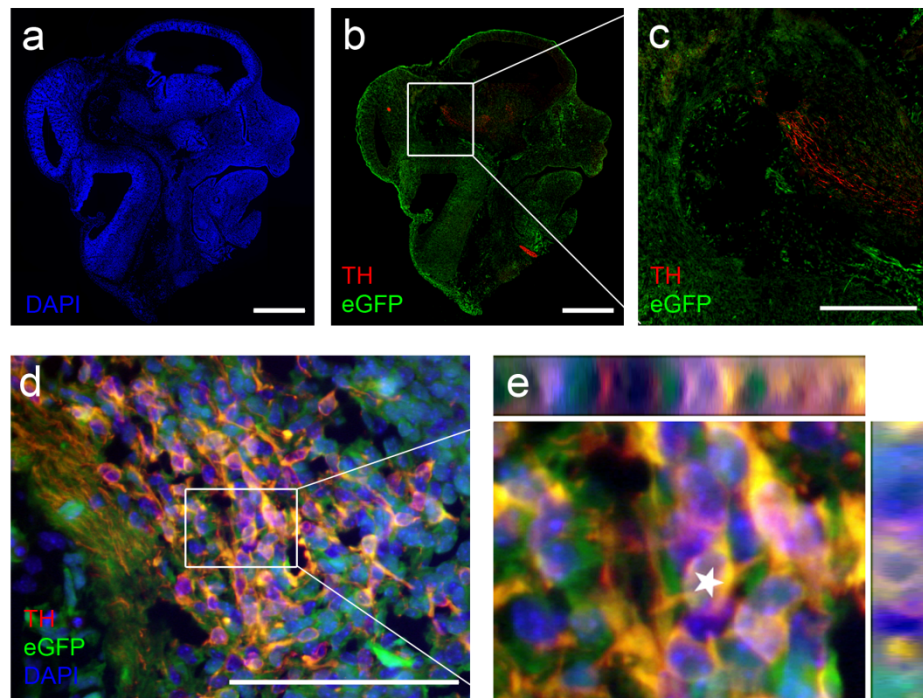


Abbildung 11: Neurale *in vivo* Differenzierung von AG und N ES Zellen (eGFP-transgen) in chimären E12.5 Embryonen nach Blastozysteninjektion. **(A)**. Abgebildet ist ein Übersichtsbild, das aus 13 Einzelbildern zusammengesetzt wurde. Dieser E12.5 sagittale Gehirnschnitt wurden mit DAPI (Feld a; weißer Balken entspricht 2 mm) sowie immunhistochemisch gegen TH und eGFP (Feld b) gefärbt. Ebenso dargestellt sind eine Ausschnittsvergrößerung von Feld b (Feld c, weißer Balken entspricht 1 mm) und eine Immunfluoreszenzanalyse mit dreifacher Färbung gegen TH, eGFP sowie DAPI (Feld d; weißer Balken entspricht 0,1 mm). Eine weitere Vergrößerung von Feld d wurde zudem als Z-stack analysiert (Feld e). Die Ko-Lokalisation von TH, eGFP und DAPI Signalen in einer Zelle wurde mit einem Stern signalisiert. **(B)**. Ein E12.5 chimäres Gehirn nach Blastozysteninjektion von N ES Zellen wurde so analysiert, wie in Teil A beschrieben. Dieses Übersichtsbild wurde aus 16 Einzelbildern zusammengesetzt.

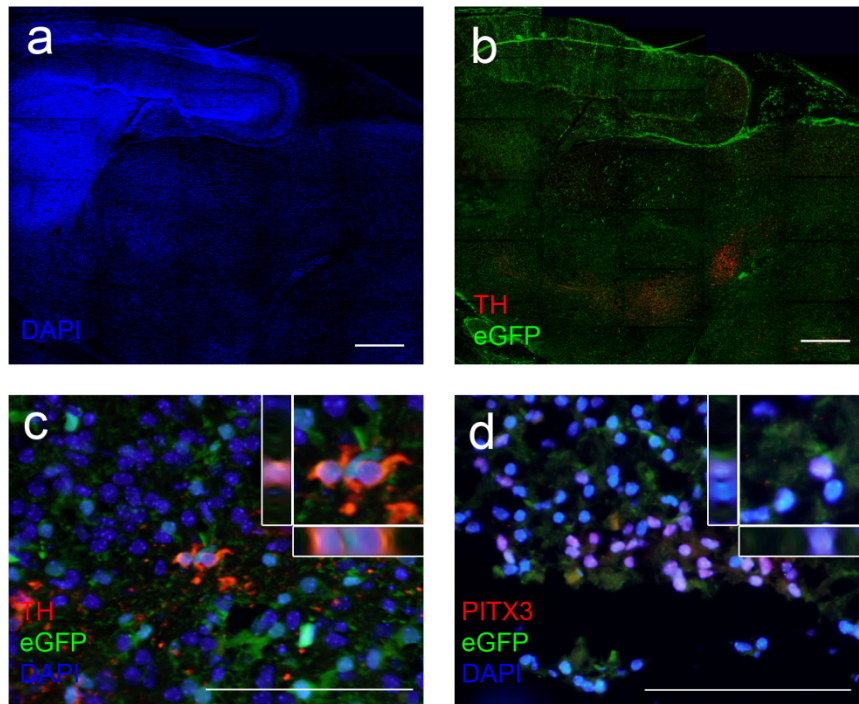
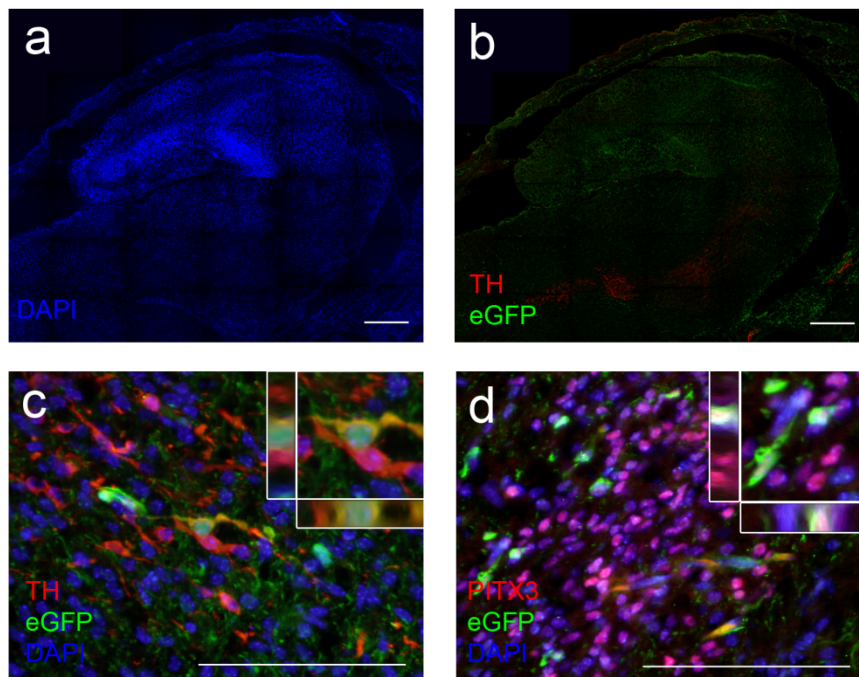
A**B**

Abbildung 12: DA Neurone in E16.5 chimären Gehirnen. **(A).** Die beiden sagittalen Übersichtsbilder des Mittelgehirns von AG Chimären sind durch DAPI (Feld a), und immunhistochemisch für eGFP und TH (Feld b) gefärbt (weiße Balken entsprechen 2 mm). Die Felder c und d stellen vergrößerte Ausschnitte der immunhistochemischen Färbungen gegen TH (c) und PITX3 (d) dar. Weiße Balken entsprechen 0,1 mm. **(B).** Eine Analyse von N Donorzellen in E16.5 Chimären ist wie in Teil A beschrieben gezeigt.

In Tabelle 21 sind die Frequenzen von TH- bzw. PITX3 positiven DA Donorzellen in fünf AG (AG-2, AG-3, AG-4, AG-b und AG-c) und fünf N (N-5, N-8, N-9, N-b und N-c) chimären Gehirnen dargestellt. Die Frequenz der eGFP-positiven Donorzellen im Hypothalamus wurde mit den Frequenzen der eGFP- und TH- bzw. PITX3-doppelt-positiven DA Neurone im Mittelhirn verglichen. Dabei variierte die Frequenz der Donorzellen im Hypothalamus einzelner Embryonen. Die Analyse zeigte zudem, dass innerhalb eines Gehirnes die Häufigkeit von DA Donorzellen vergleichbar mit der Frequenz der Donorzellen im Hypothalamus ist. Dies trifft sowohl auf AG als auch auf N chimäre Gehirne zu. Folglich sind keine Unterschiede der Neurogenese zwischen AG und N ES Zellen in fötalen Chimären nachweisbar.

3.2.2. Verteilung von AG und N Donorzellen in E16.5 chimären Gehirnen

In vormals publizierten Studien wurde berichtet, dass im Gehirn eines chimären Aggregationsembryos, der aus der Aggregation zwischen einer AG ICM und einer N Morula hervorging, AG und PG Zellen unterschiedliche Gehirnregionen besiedeln [67, 116]. So waren AG im Vergleich zu N Donorzellen bevorzugt im Hypothalamus und weniger im Cortex oder im Striatum lokalisiert. Um zu untersuchen, ob AG ES Zellen (im Gegensatz in AG ICM Zellen) ebensolch eine Präferenz im chimären Gehirn zeigen, wurden die sagittalen Gehirnschnitte immunhistochemisch gegen eGFP und MAP2 gefärbt (Abb. 13A). Anschließend folgte in vier verschiedenen Regionen des chimären Gehirns das Auszählen der eGFP-positiven Donorzellen und der durch DAPI markierten Zellkerne. Die Frequenzen der Donorzellen im Cortex, Striatum und Hypothalamus wurden auf die Frequenz an Donorzellen in der Medulla normiert, so dass die Rate der Donorzellen in der Medulla von AG und N Chimärembryonen 100 % ist. In den drei Gehirnregionen zeigten die AG Donorzellen eine weite Verteilung, ähnlich wie die N Donorzellen (Abb. 13B). Daraus lässt sich schließen, dass bezüglich der Lokalisation von Donorzellen in chimären Gehirnen AG und N ES Zellen im Unterschied zu ICM Zellen keine Präferenz zeigen.

Tabelle 21: Frequenzen von TH+ und PITX3+ Donorzellen in fötalen chimären Gehirnen

	E 12.5						E 16.5			
	AG-2	AG-3	AG-4	N-5	N-8	N-9	AG-b	AG-c	N-b	N-c
Donorzellen* in Hypothalamus	76.1 % 761/1000	53.5 % 535/1000	24.7 % 247/1000	86.5 % 865/1000	70.0 % 700/1000	58.1 % 581/1000	24.4 % 163/669	24.0 % 191/797	12.0 % 69/574	2.3 % 20/879
TH-positiv Donorzellen**	60.5 % 150/248	32.5 % 108/332	21.2 % 11/52	72.0 % 126/175	63.8 % 30/47	39.3 % 103/262	18.8 % 39/207	35.3 % 72/204	3.1 % 5/162	0.3 % 1/329
PITX3-positiv Donorzellen**	56.9 % 202/355	39.2 % 129/329	25.1 % 48/191	68.0 % 168/244	65.4 % 121/185	39.7 % 105/264	34.4 % 52/151	35.8 % 71/198	8.9 % 27/303	36.3 % 114/314

*) eGFP+ Zellen / DAPI+ Zellen

***) eGFP+ Zellen / TH+ oder PITX3+ Zellen

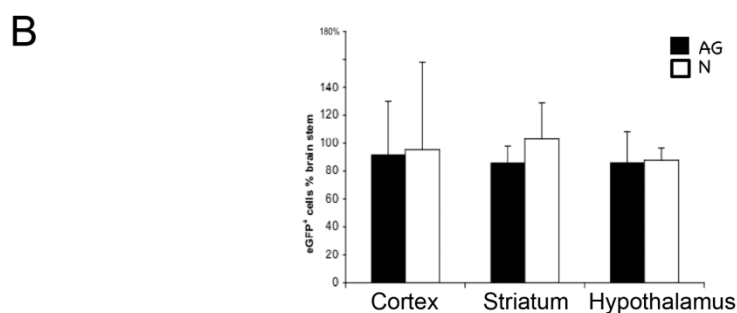
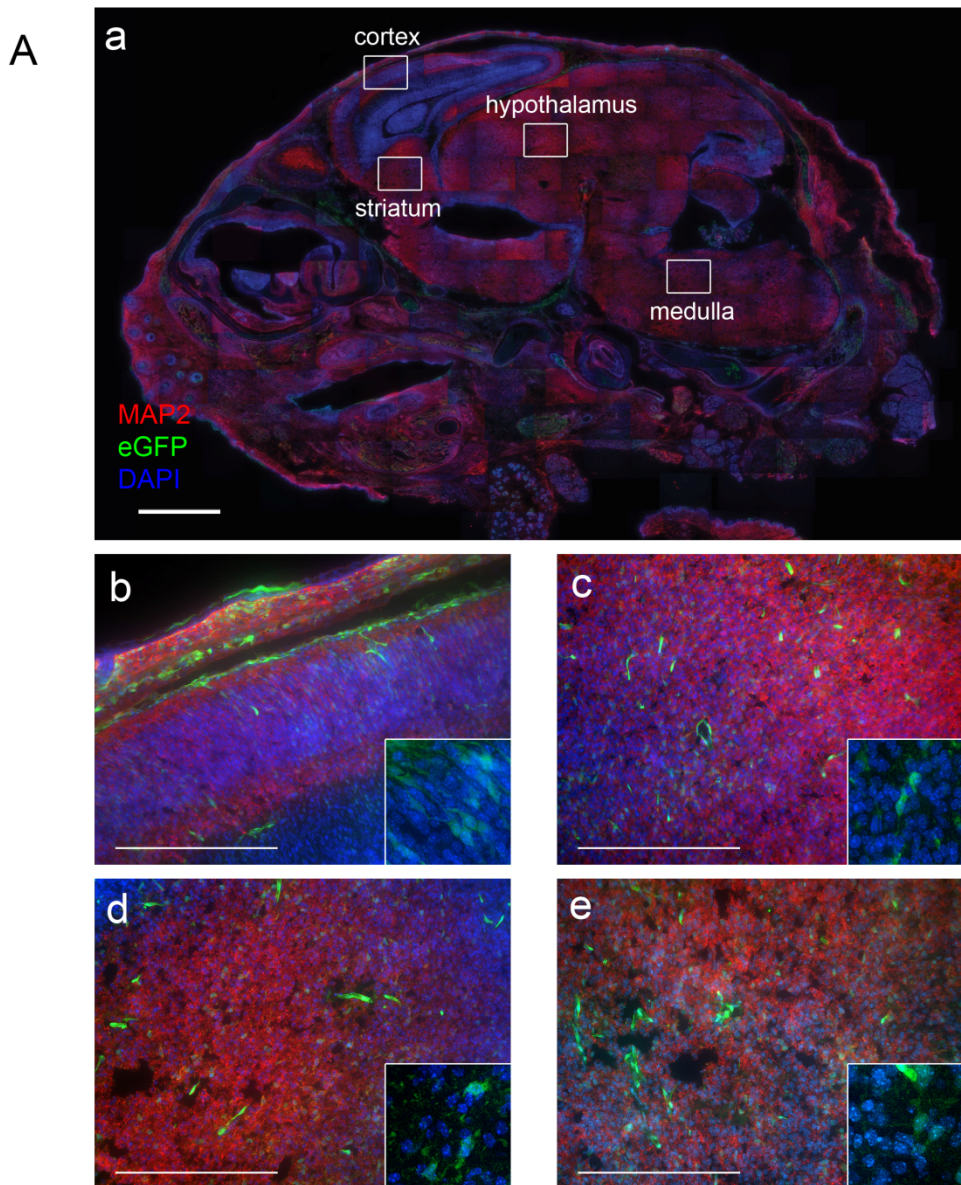


Abbildung 13: Immunhistochemische Analyse von E16.5 Gehirnen nach Blastozysteninjektion von AG und N ES Zellen. **(A).** Von AG ES Zellen abgeleitete Zellen sind durch anti-eGFP grün markiert, Neuronen sind durch anti-MAP2 (Neuronen-spezifischer Marker) rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Im Übersichtsbild des Gehirns (Feld a, weißer Balken entspricht 2 mm), das aus Einzelbildern zusammengesetzt wurde, sind vier verschiedene Gehirnregionen markiert. In Feld b bis e sind die Ausschnittsvergrößerungen von Cortex (b), Striatum (c), Hypothalamus (d) und Medulla (e) dargestellt (weiße Balken entsprechen 1 mm). Die Teilvergrößerungen in Feld b bis e zeigen Überlappungen von DAPI und eGFP Signalen. **(B).** Die Frequenz von eGFP-positiven Donorzellen nach Blastozysteninjektion von AG oder N ES Zellen wurde in E16.5 Gehirnen im Cortex, Striatum und Hypothalamus durch mikroskopisches Auszählen bestimmt. Die Frequenz im Bereich der Medulla wurde 100 % gesetzt. n=2.

3.3. Stereotaktische Transplantation von pNPCs ins Striatum eines traumatisierten Mausgehirns

Pluripotente Stammzellen sind interessant für therapeutische Ansätze des geschädigten Gehirns, da die berechtigte Hoffnung besteht, sie zu einer Vielzahl klinisch relevanter neuraler Zelltypen differenzieren zu können. In den letzten Jahren wurden murine ES Zellen bzw. ihre differenzierten neuralen Vorläuferzellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach Transplantation im Mausgehirn anzuwachsen und sich in bestehende neurale Netzwerke zu integrieren [117, 118]. Das Gehirnschädigungsmodell stellt eine Variante dieser Transplantationsansätze dar. Dabei werden Zellen stereotaktisch ins Striatum eines vorher durch Kälte traumatisierten Gehirns transplantiert. In Folge der Kryoläsion kommt es zu einer Nekrose des geschädigten Areals, einhergehend mit einem Heilungsprozess, der nach ca. neun Monaten abgeschlossen ist [113]. Die transplantierten Zellen sollen den Heilungsprozess und die Regeneration der traumatisierten Region unterstützen. Wir haben das Gehirnschädigungsmodell im Zusammenhang mit der Transplantation von AG Zellen genutzt, um das neurale *in vivo* Differenzierungspotenzial von aus AG ES Zellen abgeleiteten pNPCs näher zu untersuchen. Prof. Dr. A.-L. Sirén hat dafür die Krypläsionen in Rezipienten-Gehirnen erzeugt und unterschiedlich lange kultivierte pNPCs stereotaktisch in den läsierten Bereich und den Randbereich der Läsion transplantiert. Drei Monate nach der Transplantation wurden die Donorzellen bezüglich ihrer Teratombildung und Differenzierung zu neuralen Zelltypen analysiert.

3.3.1. ES Zell-artige Kolonien in ES Zell-abgeleiteten pNPC-Kulturen

Um eine zuverlässige, tumorfreie Transplantation zu erreichen, wurde zuerst das Koloniebildungspotenzial der zu transplantierenden pNPC-Kulturen *in vitro* untersucht. Diese Analyse umfasste die Aussaat unterschiedlich lange kultivierter pNPC-Kulturen unter ES Zell-Kulturbedingungen und die anschließende Detektion von AP-aktiven Kolonien durch ein AP-Nachweisreagenz. Aktive AP ist in ES Zellen in großen Mengen vorhanden und wird als ein Nachweis pluripotenter Zellen eingesetzt. So wurde eine erste Abschätzung möglich, wie viele ES Zell-artige Zellen mit potenziellem Vermögen Teratome zu verursachen im Transplantat vorhanden waren.

ES Zellen und 13 bis 22 Tage alte pNPCs aus fünf verschiedenen Zelllinien wurden auf MEFs ausplattiert und in ES Zell-Expansionsmedium kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen auf AP-Aktivität untersucht (Abb. 14). Aus dieser Analyse ergaben sich die Frequenzen von ES Zell-artigen Zellen, die noch in den unterschiedlich lang differenzierten pNPC-Kulturen vorhanden waren. Eine Zusammenfassung der Frequenzen zeigt Tab. 22. Die vier unterschiedlichen ES Zelllinien zeigten im undifferenzierten Zustand vergleichbare CFC Frequenzen (20 bis 30 % der Zellen bilden AP-aktive Kolonien). Die CFC Frequenzen aller fünf ES Zelllinien verringerte sich nach Differenzierung deutlich (Abb. 14B; Tab. 22). Obwohl die ES Zelllinien abhängig von ihrem genetischen Hintergrund unterschiedliche CFC Frequenzen aufweisen, zeigten die beiden ES Zelllinien AGA2 und wtB1 nach 22 Tagen Differenzierung die wenigsten CFC- Frequenzen.

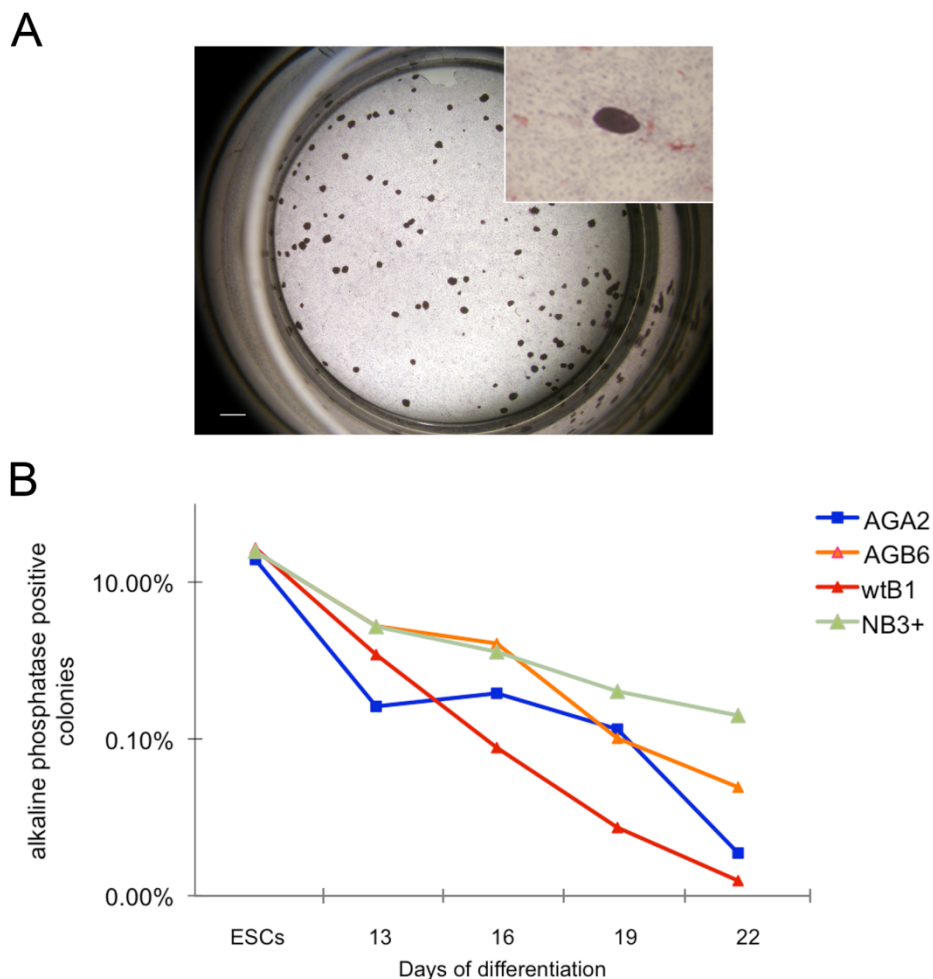


Abbildung 14: Frequenz ES Zell-artiger Zellen in differenzierenden pNPC-Kulturen. **(A).** Dargestellt ist die AP-Färbung von Kolonien, die von AG pNPCs (Linie: AGA2) gebildet wurden, welche zuvor für 13 Tage differenzierten. Das Insert zeigt eine Vergrößerung einer AP-positiven ES Zell-artigen Kolonie. Der weiße Balken entspricht einer Strecke von 1 mm. **(B).** AP-aktive Koloniebildung von undifferenzierten ES Zellen sowie von d13-, d16-, d19- bzw. d22-pNPC-Kulturen. Analysiert wurden die ES Zelllinien AGA2, AGB6 sowie die wildtypischen ES Zelllinien wtB1, NB3+. n \geq 3.

Tabelle 22: Frequenzen ES Zell-artiger AP-aktiver Kolonien in pNPC-Kulturen

Zelllinie	ES Zellen	d13-pNPCs	d16-pNPCs	d19-pNPCs	d22-pNPCs
AGA2	19,4 ± 0,3 %	0,3 ± 0,1 %	0,4 ± 0,4 %	0,1 ± 0,18 %	0,004 ± 0,002 %
AGB6	24,3 ± 1,5 %	2,8 ± 0,9 %	1,6 ± 0,8 %	0,1 ± 0,06 %	0,024 ± 0,018 %
wtB1	27,1 ± 2,7 %	1,2 ± 0,7 %	0,1 ± 0,1 %	0,01 ± 0,01 %	0,002 ± 0,001 %
NB3+	24,8 ± 2,0 %	2,7 ± 0,9 %	1,3 %*	0,4 ± 0,19 %	0,2 ± 0,04 %

n≥3

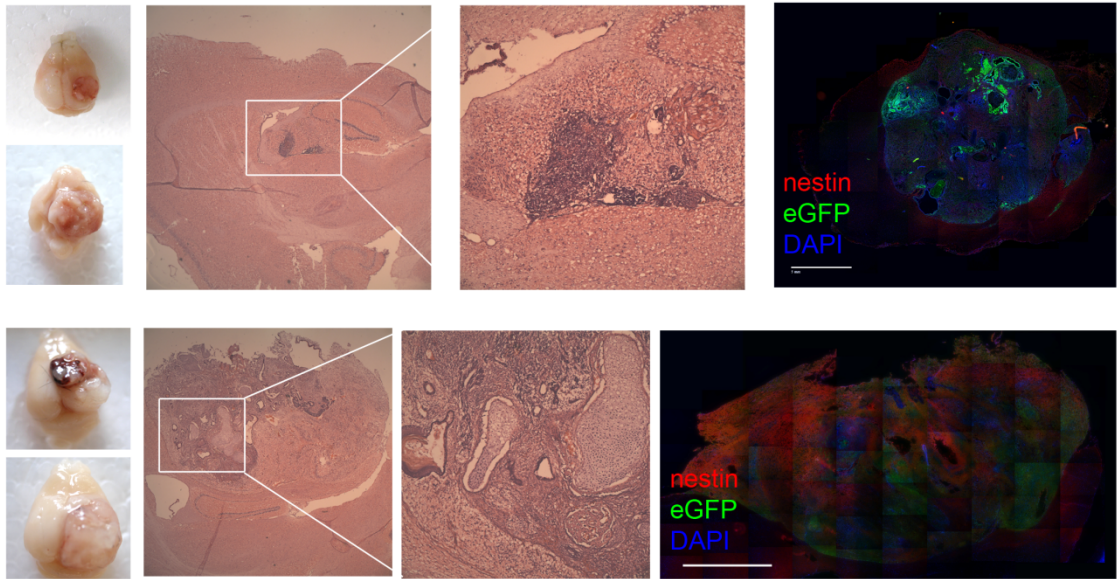
*) Diese Frequenz stammt aus einem einzigen Experiment.

3.3.2. Teratombildung nach Transplantation von pNPCs

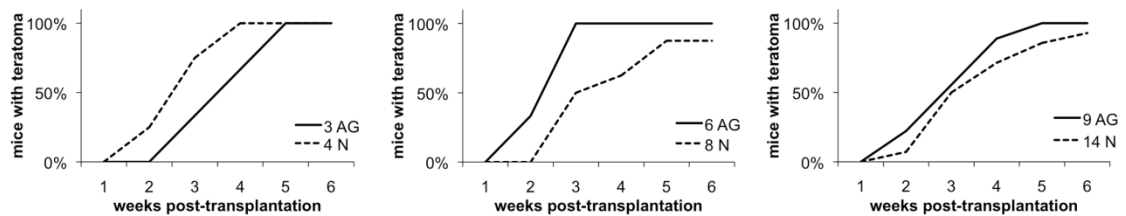
Um die Konditionen des Gehirnschädigungsmodellsystems zu optimieren, wurden zwei Faktoren – die Zellzahl und die Länge der Differenzierung – variiert. Im ersten Vorversuch wurden 300.000 13 Tage alte pNPCs einmal ins Striatum injiziert und die Gehirne wurden nach einem Monat analysiert. Nach dieser Transplantation konnten keine transplantierten Zellen im Rezipientengehirn nachgewiesen werden. Daraufhin wurden stereotaktische Injektionen mit jeweils 500.000 Tag 13 pNPCs in zwei unterschiedliche Regionen des geschädigten Gehirns durchgeführt. Aus diesem zweiten Vorversuch resultierte in allen drei Tieren eine Teratombildung nach Injektion von AG Zellen. Um die Teratombildung zu vermeiden, wurden die pNPCs für die folgenden Transplantationen länger differenziert und die Zellzahl pro Injektion reduziert. Im dritten Vorversuch wurden 10.000 bzw. 100.000 Tag 22 pNPCs dreimal in unterschiedliche Stellen neben dem traumatisierten Gewebe injiziert. Einen Monat nach der Transplantation ließen die 30.000 transplantierten pNPCs nicht mehr Rezipientengehirn nachweisen, während die 300.000 Zellen angewachsen waren, ohne Teratome zu bilden.

Um die Bildung von Teratomen genauer zu untersuchen, wurden pro Gehirn 1000 ES Zellen bzw. 100.000 pNPCs jeweils in drei unterschiedliche Areale injiziert. Auf Teratombildung wurde bis zu sechs Wochen nach Injektion untersucht (Abb. 15B). Innerhalb dieser sechs Wochen bildeten alle sieben ES Zell-Rezipienten (drei transplantiert mit AG Zellen und vier mit N ES Zellen) Teratome. Des Weiteren entwickelten sich Teratome bei folgenden Rezipienten: 6 von 6 AG d13-pNPCs; 7 von 8 N d13-pNPCs; 9 von 9 AG d16-pNPCs; 13 von 14 N d16-pNPCs (Abb. 15A). Im Gegensatz dazu zeigten die Transplantationen von Tag 22 pNPCs keine Teratombildung für die zwei Zelllinien AGA2 und wtB1 (Abb. 15C). Diese beiden Zelllinien zeigten *in vitro* auch die niedrigsten CFC-Frequenzen (Tab. 23).

A



B



C

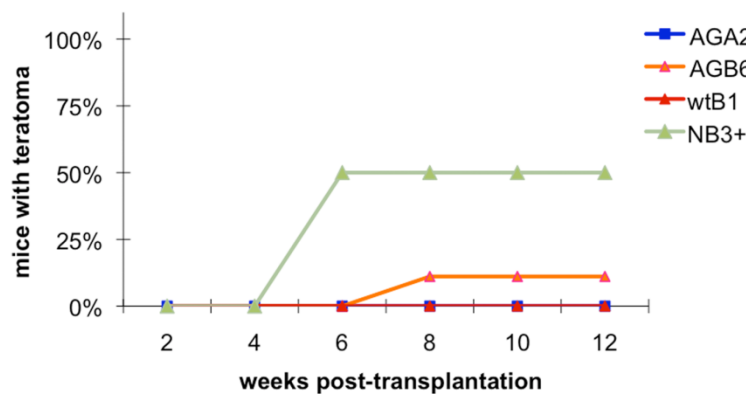


Abbildung 15: Teratombildung nach Injektion von AG (oben) und N (unten) pNPCs in ein murines Gehirnschädigungsmodell. Zehn Tage nach der Kryoläsion wurden 3x je 100.000 pNPCs stereotaktisch transplantiert. Nach bis zu sechs Wochen wurden die Gehirne isoliert und auf Teratombildung untersucht. **(A)**. Dargestellt sind die präparierten Gehirne, die infolge der Injektion von Tag 13 AG pNPCs Teratome entwickelten. Ebenfalls sind Hämatoxylin-/Eosin-Färbungen (10x Vergrößerung und Ausschnittsvergrößerungen) sowie immunhistochemische Färbungen gegen Nestin und eGFP gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die weißen Balken entsprechen 2 mm. **(B)**. Frequenzen der Teratomentwicklung nach Injektion von AG und N ES Zellen (3 AG und 4 N Rezipienten, links) und pNPCs, die für 13 Tage (6 AG und 8 N Rezipienten, Mitte) oder 16 Tage (9 AG und 14 N Rezipienten, rechts) differenziert wurden. **(C)**: Gezeigt sind die Frequenzen der Teratombildung nach Injektion 22 Tage differenzierter pNPCs verschiedener ES Zelllinien (6 AGA2 Rezipienten, 9 AGB6, 6 wtB1, und 4 NB3+).

Tabelle 23: Korrelation von AP-aktiver Koloniefrequenz und Teratombildung nach Injektion von d22-pNPCs in traumatisierte Gehirne

Zelllinie	AGA2	AGB6	wtB1	NB3+
CFC-Frequenz*	0,004 %	0,024 %	0,002 %	0,2 %
Teratombildung**	0 / 6	1 / 9	0 / 6	2 / 4

*) in vitro Experiment

***) in vivo Experiment

Zudem wurde die Expression von *imprinted* Genen in AG und N Teratomen untersucht. RNA Proben wurden aus einem vom Gewebe gut abgegrenzten AG bzw. N Teratom isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expressionsanalysen ergaben, dass in AG Teratomen die Gene IGF2, Dlk1, U2af1, IGF2r, und H19 ihr *Imprinting*-Muster behalten, während die Gene Impact, Ube3a und Zim1 eine Relaxation der *imprinted* Genexpression zeigen (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass die maternal und paternal exprimierten Gene im Großen und Ganzen ihr *Imprinting*-Muster behalten.

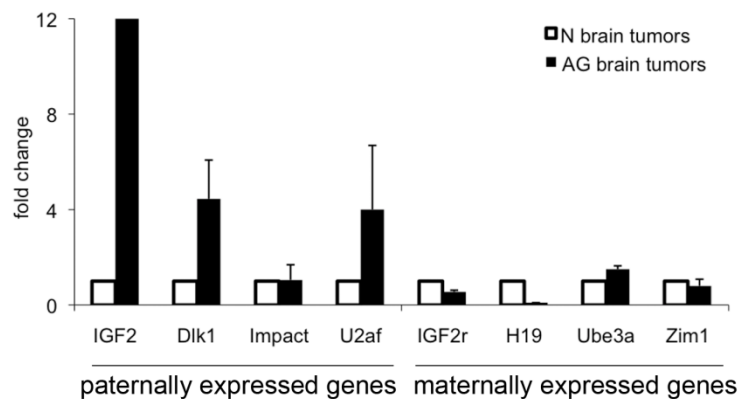


Abbildung 16: Analyse von AG und N Teratomen bezüglich der Expression von Genen, die im Gehirn ein *imprinting* zeigen. In Gehirnen, in die 13 Tage alte AG und N pNPCs injiziert wurden, entwickelten sich Teratome, aus denen RNA präpariert, cDNA synthetisiert und mittels quantitativer RT-PCR, wie für Abbildung 11 detailliert untersucht wurde. n=2.

3.3.3. Differenzierung von 22 Tage alten pNPCs zu neuronalen Zelltypen nach Transplantation in ein traumatisiertes Gehirn

Um die Fähigkeit der neuronalen Differenzierung *in vivo* zu evaluieren, wurden AG und N pNPCs in ein Hirnschädigungsmodell transplantiert und die Nachkommen der injizierten Zellen wurden auf ihre zelluläre Identität hin analysiert. Hierzu wurden die drei Zelllinien mit der niedrigsten CFC-Frequenz in 22 Tage alten pNPC-Kulturen (AGA2, AGB6 und wtB1, eGFP-transgen) für 22 Tage differenziert und stereotaktisch ins Striatum traumatisierter Rezipienten-Gehirne transplantiert. Drei Monate nach der Injektion wurden die Gehirne isoliert und als sagittale Kryoschnitte präpariert. Zur Lokalisation der Donorzellen erfolgte eine Hämatoxylin-/ Eosin-Färbung von jedem zehnten Gehirnschnitt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Schnitte derjenigen Gehirne, die Donorzellen enthielten, mittels neuronaler (NeuN), glialer (GFAP und CNPase) und präsynaptischer (Synapsin I) Marker immunhistochemisch gefärbt (Abb. 17). Die grünen eGFP-positiven Signale der Donorzellen zeigten eine Ko-Lokalisation mit den roten Signalen der unterschiedlichen neuronalen Marker (Abb. 17 a – b bzw. d – e). Mehr als die Hälfte der Rezipienten-Gehirne enthielten Donorzellen mit unterschiedlicher Frequenz (Tab. 24, 25 und 26). Dies wurde sowohl für AG als auch für N Donorzellen beobachtet. Die Frequenzen der neuronalen Zelltypen variierten zwischen einzelnen Tieren, aber nicht zwischen einzelnen Zelllinien.

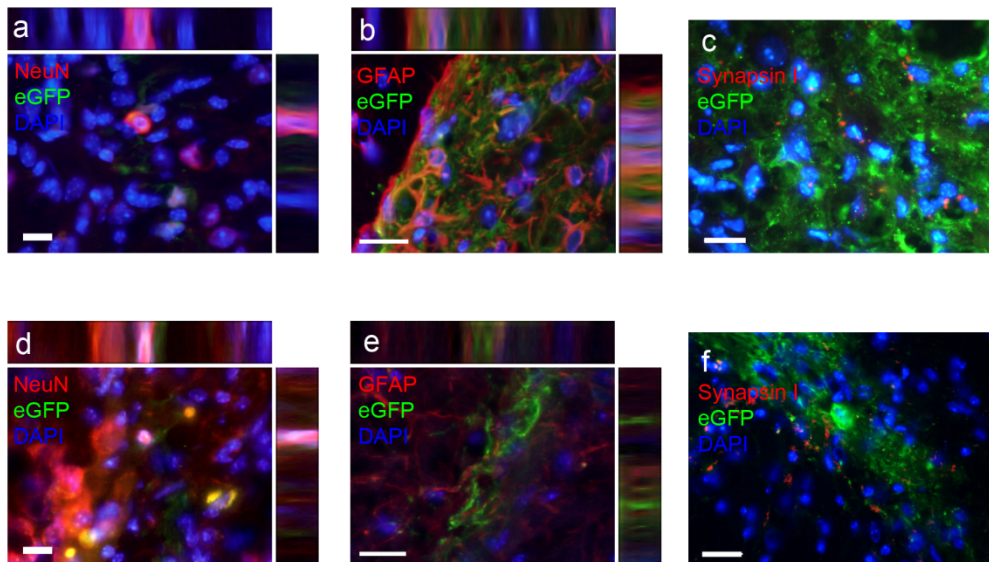


Abbildung 17: *In vivo* Differenzierung von 22 Tage alten AG und N pNPCs in neuronale und gliale Zelltypen drei Monaten nach stereotaktischer Transplantation in ein traumatisiertes Gehirn. Der immunhistochemische Nachweis von eGFP-positiven AG bzw. N Neuronen (anti-NeuN, Feld a und d) und glialen Zellen (anti-GFAP, Feld b und e) ist durch Z-stack Aufnahme von Gehirnschnitten gezeigt. Ebenfalls dargestellt ist eine immunhistochemische Färbung gegen Synapsin I (präsynaptischer Marker, Feld c und f). Die weißen Balken entsprechen jeweils 10 µm.

Darüber hinaus wurden die Donorzellen in Bezug auf Proliferation und Apoptose analysiert. Die Gehirnschnitte wurden gegen PCNA (Proliferationsmarker) und Caspase-3 (Marker für Apoptose) gefärbt und ebenfalls mittels Z-stack Aufnahme auf Ko-Lokalisation der Signale analysiert. In den Gehirnen der Rezipienten waren sowohl AG als auch N Donorzellen bis zu 30 % positiv für den Proliferationsmarker, während kaum Apoptose-positive Donorzellen vorhanden waren (siehe hierzu Tab. 24, 25 und 26). Mit diesen Analysen wurde gezeigt, dass pNPCs mit N und auch AG Hintergrund drei Monate nach Transplantation in geschädigten Gehirnen proliferieren und zu Neuronen, Gliazellen und Astrozyten differenzieren können.

Tabelle 24: Frequenzen von Donorzellen in AGA2 Rezipienten drei Monaten nach Injektion

Marker	Tx609	Tx611	Tx613	Tx614	Tx615	Tx618
NeuN+ / eGFP+	3/132	0/49	49/348	0	0	15/1462
GFAP+ / eGFP+	3/41	5/65	61/983	0	0	47/1121
CNPase+ / eGFP+	2/124	3/95	23/339	0	0	16/642
PCNA+ / eGFP+	5/131	6/23	47/227	0	0	22/254
Caspase3+ / eGFP+	3/170	0	1/98	0	0	0/84

0) Keine Donorzellen in Gehirnschnitten gefunden.

Tabelle 25: Frequenzen von AGB6 Donorzellen in Gehirnen drei Monaten nach Injektion

Marker	Tx402	Tx403	Tx512	Tx513	Tx701	Tx703	Tx706	Tx707
NeuN+ / eGFP+	0	6/11	0	6/569	0/625	75/630	0/726	17/675
GFAP+ / eGFP+	0	6/86	0	33/357	57/646	53/548	0/658	36/689
CNPase+ / eGFP+	0	0/3	0	23/493	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
PCNA+ / eGFP+	0	0	0	37/640	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Caspase3+ / eGFP+	0	0/63	0	4/469	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

0) Keine Donorzellen in Gehirnschnitten gefunden.

n.a.) nicht analysiert.

Tabelle 26: Frequenzen von wtB1 Donorzellen in transplantierten Gehirnen nach drei Monaten

Marker	Tx401	Tx404	Tx510	Tx511	Tx516	Tx517	Tx712
NeuN+ / eGFP+	78/286	3/41	0	5/28	0	0	8/587
GFAP+ / eGFP+	47/124	22/57	0	4/19	0	0	16/520
CNPase+ / eGFP+	7/42	0	0	1/31	0	0	n.a.
PCNA+ / eGFP+	1/55	0	0	11/30	0	0	n.a.
Caspase3+ / eGFP+	0	0/6	0	0/13	0	0	n.a.

0) Keine Donorzellen in Gehirnschnitten gefunden.

n.a.) nicht analysiert.

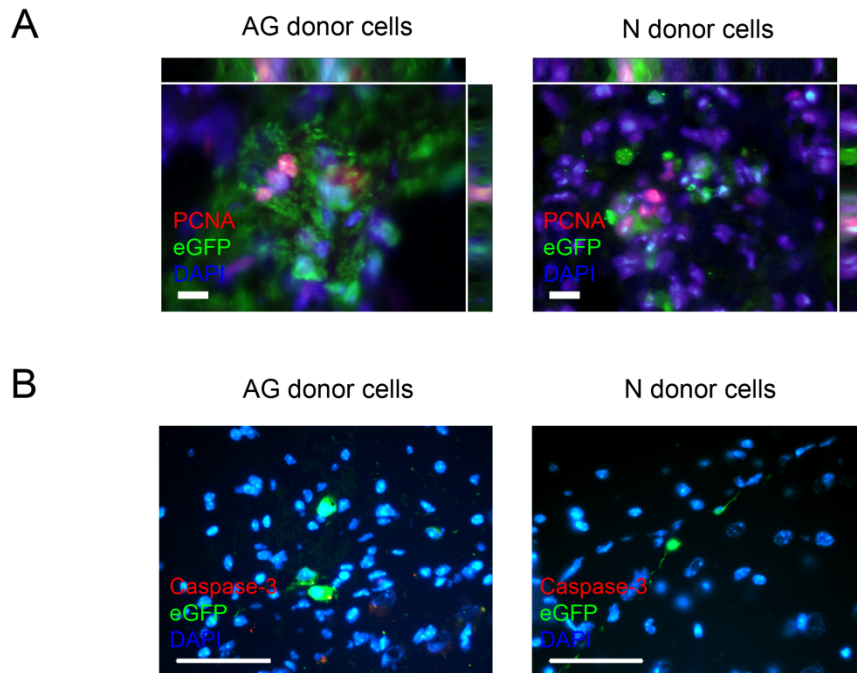


Abbildung 18: Analyse der Zellproliferation und Apoptose drei Monate nach der Injektion von Tag 22 pNPCs in ein traumatisiertes Gehirn. **(A).** Dargestellt sind immunhistochemischen Färbungen gegen PCNA (Proliferationsmarker) in AG und N transplantierten, eGFP-positiven Donorzellen. Die weißen Balken entsprechen 10 μm . **(B).** Ebenso wurden die Gehirnschnitte mit anti-*cleaved* Caspase-3 immunhistochemisch auf Apoptose untersucht. Die weißen Balken entsprechen einer Strecke von 0,1 mm.

4. Diskussion

4.1. Das neurale Differenzierungspotential von AG und N ES Zellen

In der vorliegenden Doktorarbeit habe ich das neurale Differenzierungspotential von uniparentalen AG ES Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Unter neuronalen Differenzierungsbedingungen nach einem Protokoll, das im Labor von Oliver Brüstle entwickelt wurde [114], konnten in der Zellkultur pNPCs aus AG ES Zellen generiert werden. Diese neuronalen Vorläuferzellen exprimierten auf RNA-Ebene die neuronalen Stammzellmarker Nestin, CD133 und Musashi. Zudem waren die Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung positiv für Nestin. Nach weiterer Differenzierung der pNPCs konnten Tuj-1-positive Neurone, GFAP-positive Astrozyten und TH-positive DA Neurone detektiert werden. Diese Zellen besaßen lange und viele Fortsätze, die charakteristisch für den Phänotyp neuronaler Zellen sind. Um zu zeigen, dass AG Zellen auch zu einem spezifischen neuronalen Zelltyp differenzieren können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ko-Kultursystem von AG ES Zellen mit Stromazellen etabliert, in dem sich durch Zugabe definierter Wachstumsfaktoren DA Neurone entwickeln. Diese AG DA Neurone waren positiv für den DA Neuron-spezifischen Marker TH und für den synaptischen Marker Synapsin I. Sowohl AG als auch N ES Zellen differenzierten mit einer Effizienz von 5 – 10 % zu TH-positive Neuronen. AG und N Zellen zeigten in neuronalen *in vitro* Differenzierungskulturen keine Unterschiede.

AG Zellen tragen zwei Kopien von paternalen Allelen. Manche Gene werden gewebespezifisch nur von väterlichen oder mütterlichen Allelen exprimiert. Da es auch im Gehirn solche *imprinted* Gene gibt, war es notwendig, die Expression dieser Gene in AG pNPCs zu untersuchen. Während auf Ebene von ES Zellen keine Unterschiede zwischen AG und N bezüglich der Expression dieser Gene festgestellt werden konnte, zeigten junge Passagen von AG und N pNPCs bzw. DA Neurone eine *parent-of-origin*-spezifische Expression. Eine Relaxation des zu erwartenden *Imprintings*, d.h. den Verlust der monoallelischen Genexpression und die daraus folgende Etablierung der biallelischen Expression, wurde für das Gen *Ube3a* sowie bei länger differenzierten pNPCs für weitere Gene *Impact* und *U2af1* beobachtet.

Für die *in vivo* Analyse des Differenzierungspotentials wurden AG und N ES Zell-Chimären nach Blastozysteninjektion untersucht. Jede untersuchte Chimäre enthielt einen unterschiedlichen Anteil an Donorzellen im Hypothalamus, in dem sich die DA Neurone befinden. Die Frequenzen von TH- bzw. PITX3-positiven Neuronen in E12.5 und E16.5 chimären Gehirnen unterschieden sich zwar zwischen den untersuchten Chimären, aber nicht zwischen AG und N Zelllinien. Darüber hinaus wurde die Verteilung von AG ES Zellen in E16.5 chimären Gehirnen nach Blastozysteninjektion

untersucht. Dabei zeigten sich balancierte Chimärismen in drei verschiedenen Gehirnregionen zwischen AG und N ES Zell-Chimären.

Ergänzend wurden stereotaktische Transplantationen von pNPCs in traumatisierte adulte Mausgehirne durchgeführt. Injektionen von 13, 16 und teilweise auch 22 Tage neural differenzierter AG und N ES Zellen verursachten die Entwicklung von Teratomen. Zwei von fünf ES Zelllinien wiesen zum Einen eine geringe CFC-Frequenz auf und zum Anderen entwickelten sich keine Tumoren nach ihrer Transplantation. Dies war abhängig vom genetischen Hintergrund, aber stellte keinen Unterschied zwischen AG und N Zellen dar. Drei Monaten nach der Transplantation wurde das Anwachsen und die Proliferation von 22 Tage alten pNPCs analysiert und deren Differenzierung in NeuN-positiven Neuronen, GFAP-positiven Astrozyten und CNPase-positiven Oligodendrozyten bestimmt. Dabei zeigten sich vergleichbare neurale Aktivitäten von AG und N pNPCs in transplantierten Gehirnen. Insgesamt lassen die durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Analysen die Schlussfolgerung zu, dass AG ES Zellen ein neurales Differenzierungspotential besitzen, was vergleichbar mit dem N ES Zellen ist.

4.2. Vergleich zwischen uni- und biparentalen ES Zellen bezüglich ihrer neuronalen *in vitro* bzw. *in vivo* Differenzierungsaktivitäten

Uniparentale PG ES Zellen wurden sowohl in der Maus und im Primaten als auch beim Menschen etabliert und konnten bezüglich ihrer MHC-Ausstattung histokompatibel zum jeweiligen Keimzellspender selektioniert werden [49, 53]. Aus diesem Grund stellen sie einen interessanten Zelltypen mit potentiell therapeutischer Nutzbarkeit dar. Es stellt sich jedoch die Frage, ob uniparentale Zellen mit ihrer unausgewogenen Genexpression aufgrund des elterlichen *Imprintings* überhaupt funktionelle Gewebestammzellen bilden können. In einer Studie der Arbeitsgruppe um K. John McLaughlin wurde der komplette Ersatz des hämatopoetischen Systems durch von GG bzw. AG ES Zellen abgeleiteten HSCs in bestrahlten adulten Rezipienten gezeigt [54]. Dies weist darauf hin, dass bei der adulten HSC-Entwicklung das *Imprinting* keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Alternative Erklärungen könnten dabei eine Relaxation des *Imprintings* oder eine Selektion von mit *Imprinting* wenig belasteten Klonen sein. Im Gegensatz dazu könnte das *Imprinting* bei der Gehirnentwicklung anders als im hämatopoetischen System fungieren [75, 119-121]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob AG ES Zellen auch funktionelle neuronale Zelltypen und neurale Gewebestammzellen nach Transplantation bilden können.

4.2.1. Untersuchung der Fähigkeit zur Bildung von funktionellen Gewebestammzellen

Um uniparentale ES Zellen auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, neurale Gewebestammzellen zu bilden, wurden bereits in frühen Studien einerseits *in vitro* Zellkulturtechniken und andererseits *in vivo* Chimärenanalysen durchgeführt. In der neuronalen *in vitro* Differenzierung zeigte sich eine vergleichbare Effizienz zwischen N und AG sowie PG ES Zellen [51, 107, 111, 122]. In diesen Studien wurden AG und PG ES Zellen zu neuronalen Zelltypen differenziert und durch die immunhistochemische Färbung für die neuronalen Marker Tuj-1, GFAP und O4 charakterisiert. Des Weiteren bildeten PG ES Zellen TH-positive Neurone.

Im Gegensatz dazu zeigten Keverne und seine Kollegen Unterschiede im neuronalen Differenzierungspotential zwischen AG, PG und N ICM Zellen in Aggregationschimären [67]. In dieser Studie wurde beschrieben, dass in chimären embryonalen Gehirnen AG und PG Zellen abgeleitet von ICM Zellen unterschiedliche Gehirnregionen bevorzugt besiedelten. Im Cortex und Striatum befanden sich mehr PG Zellen als AG Zellen, während im Hypothalamus mehr AG Zellen lokalisiert waren. Ähnlich wie Keverne *et al.* zeigte eine weitere Studie, dass AG und PG Zellen Unterschiede in der Proliferation und der Seneszenz aufwiesen [69]. MEFs, die aus AG Embryonen gewonnen wurden, hatten im Vergleich zu N MEFs einen kürzeren Zellzyklus und konnten länger passagiert werden. PG MEFs gingen hingegen frühzeitig in Seneszenz. Die Autoren deuteten an, dass dieses Resultat auf die unausgewogene Expressionen der *imprinted* Gene p57, IGF2r und IGF2 zurückgeführt werden könnte. Daten meiner Analysen von AG ES Zellen zeigten dagegen weder in der Lokalisation im chimären Gehirn noch in der Proliferation in der Zellkultur und in Transplantaten Unterschiede, obwohl die *imprinted* Gene IGF2, Dlk1, IGF2, H19 und Zim1 in den ES Zell-abgeleiteten neuronalen Zellen erhalten blieben.

4.2.2. Untersuchung der Unterschiede zwischen uniparentalen und biparentalen ES Zellen

Wie Hernandez *et al.* diskutierten, könnten die Unterschiede der uniparentalen MEFs in der Proliferation und der Seneszenz durch das genomische *Imprinting* erklärt werden [69]. Gene mit *imprinting*, die abhängig von ihrer elterlichen Herkunft unterschiedlich exprimiert sind, machen etwa 1 % aller Gene aus. Ein großer Teil davon wird im Gehirn exprimiert und ist zum Teil neuropathologisch relevant [75]. Zum Beispiel spielt Ube3a eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung und -funktion und seine Mutation ist beim Menschen mit dem Angelmann-

Syndrom verbunden. Außerdem ist Dlk1 an der Bildung von DA Neuronen beteiligt [123]. Dies lässt vermuten, dass es Unterschiede zwischen AG und N Zellen hinsichtlich ihrer neuronalen Differenzierungsaktivitäten geben könnte. Allerdings offenbarten die hier vorgestellten Daten keine Unterschiede zwischen AG und N ES Zellen in Bezug auf ihre neuronalen Differenzierungsaktivitäten – weder *in vitro* noch *in vivo*. Desgleichen haben Dinger *et al.* keine Unterschiede des Differenzierungspotentials von AG und N ES Zellen hinsichtlich der *in vitro* Differenzierungseffizienz und der Lokalisation bzw. Proliferation in E12.5 chimären Gehirnen gezeigt [54, 111].

Warum spielen *imprinted* Gene bei der Bildung somatischer Stammzellen offensichtlich keine Rolle? Warum sehen wir keinen Proliferationsunterschied zwischen uniparentalen Zellen, wie den uniparentalen MEFs, die von Hernandez *et al.* beschrieben wurden? Möglicherweise könnten *imprinted* Gene potenziell unwichtig für die Entwicklung sein oder doch eine Rolle spielen, aber nur diejenige Zellklone, die eine Lockerung des *Imprintings* erfahren haben, wurden untersucht.

Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanzen könnten folgende sein:

(1) ICM Zellen sind zwar der Ursprung von ES Zellkulturen, aber sie sind nicht identisch zu ES Zellen. Das heißt, dass sich die ES Zellen durch Anpassung an die Gewebekultur gegenüber ICM Zellen verändern könnten. Diese Veränderung könnte ursächlich für die verschiedenen Ergebnisse sein, die zum einen in dieser Arbeit und Dinger *et al.* vorgestellt wurden und zum anderen an Aggregationschimären von Keverne *et al.* gezeigt wurden.

(2) Das genomische *Imprinting* kann gelockert werden. Die *imprinted* Gene sind infolge methylierter Histone bzw. DNA monoallelisch exprimiert. Bei einer Relaxation des *Imprintings* gehen epigenetische Modifikationen vor sich und infolgedessen ist vorstellbar, dass die *Loci* von *imprinted* Genen demethyliert wird. In den hier vorgestellten Expressionsdaten von *imprinted* Genen in neuronalen Zellen wurde gezeigt, dass das genomische *Imprinting* im Großen und Ganzen erhalten blieb, aber einige Gene wie z.B. Ube3a ihre ursprungsspezifische allelspezifische Expression verloren haben. Dieser Verlust der genomischen Ausprägung wurde in der Zellkultur bestätigt. In pNPCs, die für 22 Tage differenziert waren, zeigte sich eine stärkere Relaxation von *imprinted* Genen als in 13 Tage alten pNPCs (Abb. 10B). In anderen Studien wurde das Defizit der Methylierung auf mehreren *imprinted Loci* in PG ES Zellen beobachtet [54, 109], aber keine Zunahme der Methylierung auf anderen *Loci* [110]. Offensichtlich verstärkt sich nach längerer Kultur der Effekt der Lockerung von *imprinted* Genen, was auf Demethylierung des Promotorbereichs zurückzuführen sein kann.

(3) In den meisten Fällen erfolgt die monoallelische Genexpression, die in N Zellen entweder vom väterlichen oder mütterlichen Allel stammt, ausschließlich in spezifischen Geweben und in einem bestimmten Entwicklungszeitraum. In Tabelle 1 gezeigt, sind allelspezifische Expressionen von

imprinted Genen z.B. IGF2, Ube3a, Zim1 und H19 im Gehirn dynamisch reguliert [83-85, 124]. Allerdings ist die Bedeutung des genomischen *Imprintings* für spezifische adulte Gewebefunktion meist unbekannt. Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass AG ES Zellen wegen einer Relaxation des *Imprintings* und einer ausschließlich gewebespezifisch monoallelischen Expression von *imprinted* Genen ein vergleichbares Differenzierungsvermögen wie N ES Zellen besitzen.

4.3. Pluripotente ES Zellen in der regenerativen Medizin

4.3.1. Humane pluripotente ES Zellen

Nachdem es Evans und Kaufmann 1981 gelungen war, pluripotente Stammzellen aus Mausblastozysten zu gewinnen [17], können seit 1998 auch humane pluripotente ES Zellen etabliert und kultiviert werden [19]. Dieser Durchbruch eröffnete vielfältige Einsatzmöglichkeiten eines sich im Prinzip unbegrenzt teilenden Stammzelltypus für Erforschung von Krankheiten sowie für Zell- und Gewebeersatz. Jedoch birgt die ES Zell-Strategie einige Probleme in sich. Die differenzierten Abkömmlinge einer humanen ES Zelllinie können nicht in jeden beliebigen Menschen transplantiert werden, da der genetische und MHC- Hintergrund unter Umständen nicht mit dem Empfänger kompatibel ist. Somit kann eine Transplantation eine Immunantwort auslösen und die Donorzellen werden in Folge dessen vom Rezipienten abgestoßen. Um die Immunreaktion zu vermeiden, wurde eine alternative Strategie zur Herstellung von immunkompatiblen pluripotenten ES Zellen entwickelt. Im Tiermodell kann ein somatischer Zellkern durch Kerntransfer in eine entkernte Eizelle injiziert (SCNT) und dann später die genetisch identischen ES Zellen aus so entstandenen Blastozysten etabliert werden [26, 27, 125]. Diese ES Zellen sind dann histokompatibel zum Patienten, von dem der somatische Zellkern stammte. Trotz erfolgreicher SCNT-ES Zellgewinnung in Tieren wurden bisher mittels dieser Methode keine humanen ES Zellen erzeugt [126-128]. Die Herstellung von humanen SCNT-ES Zellen ist zum einen äußerst ineffizient und zum anderen aus ethischer Sicht umstritten.

Das bioethische Problem ist die weitere Hürde bei der Anwendung von ES Zellen als Ausgangsmaterial in der regenerativen Medizin. Um humane ES Zellen herzustellen, ist die Verwendung humaner Oozyten notwendig und dies könnte zur Belastung der Eizellspenderinnen führen. Zudem kann die SCNT-Strategie prinzipiell auch zum Klonieren eines Menschen verwendet werden zudem werden bei der Herstellung von ES Zellen lebens- und entwicklungsfähige Embryonen zerstören. Dies führt zu kontroversen bioethischen Debatten. Deshalb werden alternative Methode für die Etablierung patientenspezifische pluripotente ES Zellen dringend benötigt.

4.3.2. Kandidaten für patientenspezifische pluripotente ES Zellen

Einige Strategien zur Herstellung humaner patientenspezifischer ES Zellen und deren Problemfelder wurden in Tabelle 27 zusammengefasst. Eine Strategie ist die Reprogrammierung von Körperzellen zu iPS Zellen. Diese reprogrammierten iPS Zellen wurden zunächst im Mausmodell beschrieben [22] und im Folgejahr auch im Menschen [28, 29]. In der iPS Zell-Strategie werden Körperzellen mittels viraler Transfektion von vier Reprogrammierungsgenen *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* und *Klf4* ohne den Einsatz von Oozyten reprogrammiert. Daher findet bei dieser Methode auch keine Zerstörung von lebensfähigen Embryonen statt. In den letzten Jahren wurden mit iPS Zellen zwei therapeutische Anwendungen gezeigt. Es konnten differenzierte Derivate von iPS Zellen das komplette Blutsystem im Tiermodell der Sichelzellanämie ersetzen [129] und neurale Zellen, welche aus iPS Zellen differenziert wurden, zeigten nach der Transplantation eine Verbesserung der Krankheitssymptome in einem Parkinson Modell [106]. Trotz der erfolgreichen Anwendungen wies die iPS Zell-Strategie eine geringe Effizienz in der Herstellung und einige Limitierungen auf, wie z.B. Tumorbildung und frühe Seneszenz der hämatopoetischen Derivate [99].

Eine zweite alternative Strategie stellen uniparentale ES Zellen dar. Die Etablierung dieser Zellen erfolgt aus der ICM von uniparentalen Blastozysten, die entweder nur das väterliche oder nur das mütterliche Genom besitzen und sich daher nicht zu einem lebensfähigen Fetus entwickeln können. Aus diesem Grund werden bei der Herstellung von uniparentalen ES Zellen keine lebensfähigen Embryonen zerstört und sie sind daher ethisch weniger fraglich als normale, N humane ES Zellen, da nur das Problemfeld der Eizellspende bleibt. Laut Studien zur erfolgreichen Herstellung von PG ES Zellen zeigten ihre Derivate identische MHC-Proteinkomplexe mit dem Donoroozyten und ein vielfältiges Differenzierungspotential [49, 53]. Uniparentale ES Zellen sind jedoch ethisch nicht völlig unproblematisch, da Donoroozyten für ihre Gewinnung nötig sind. Zudem brachten uniparentale Zellen ein neues Problem mit sich, die unausgewogene Expression von *imprinted* Genen. Obwohl die Anzahl solcher Gene nicht sehr groß ist, werden viele davon im Gehirn exprimiert und spielen eine Rolle bei der Entwicklung und der Funktion des Gehirns. PG Zellen, die kein paternales *Imprinting* besitzen, führen aufgrund der monoallelischen Expression der *imprinted* Gene zu Funktionsstörungen und sie könnten demzufolge einen Einfluss auf die Gehirnfunktion besitzen [75]. Allerdings sind uniparentale ES Zellen bei heterozygoten, autosomal-dominanten Krankheiten z.B. β -Thalassämie von großen Nutzen. Zur Behandlung können uniparentale ES Zellen von Patienten hergestellt und die mit zwei genetisch gesunden Allelen selektioniert werden, so dass bei dieser Strategie keine komplexe Gentherapie erfolgen muss. Solche Gentherapie – DNA-Reparatur oder transgene Insertion bei homologer Rekombination – kann in Mäusen leicht durchgeführt werden, aber nicht mit humanen pluripotenten Zellen [130].

Tabelle 27: Kandidaten für patientenspezifische pluripotente ES Zellen

	ES Zellen	SCNT-ES Zellen	iPS Zellen	Uniparentale ES Zellen
Bedarf an Donoroozyten	Ja	Ja	Nein	Ja
Zerstörung lebensfähiger Embryonen	Ja	Ja	Nein	Nein
Multilini-Differenzierung	Ja	Ja	Ja	Ja
Identität von MHC-Ausstattung	Nein	Ja	Ja	Ja*
Etabliert für den Menschen	Ja	Nein	Ja	Ja (nur PG)

*) Die Zellen, die den gleichen MHC-Typ zum Patienten haben, können selektiert werden.

Die beiden beschriebenen Alternativen zur Gewinnung pluripotenter ES Zellen (iPS Zell-Strategie und uniparentale Zellen) erzeugen transplantations-taugliche histokompatible Zelltypen und sie sind bioethisch wenig problematisch. In einer neueren Studie wurde jedoch nachgewiesen, dass humane iPS Zellen zwar funktionelle neuronale und gliale Zellen bilden konnten, aber die Effizienz der Differenzierung beträchtlich reduziert war und sich die Variabilität zwischen einzelnen Klonen erhöht [100]. Außerdem zeigte eine andere Studie, dass sich PG ES Zellen im Vergleich zu N Zellen weniger effizient differenzierten [108]. Daher stellt wohl keine der beiden Strategien einen „Generalschlüssel“ dar, der die Tür für die regenerative Medizin uneingeschränkt öffnet. Vielmehr kann man mittels beider Strategien patientenspezifische ES Zellen gewinnen, deren Potential und Differenzierungseigenschaft weiter untersucht und optimiert werden müssen.

4.3.3. Therapeutische Anwendungen patientenspezifischer Zellen in Krankheitsmodellen

Wie oben erwähnt, können pluripotente ES Zellen viele therapeutisch relevante Zelltypen produzieren. In verschiedenen Modellansätzen konnten bereits erfolgreiche Transplantationen mit differenzierten ES Zellen unternommen werden. Die aus humanen ES Zellen abgeleiteten Herzmuskelzellen haben nach Transplantation in Rezipienten überlebt, proliferierten und reiften zu funktionellen Zellen heran [131, 132]. In anderen intramuskulären Transplantations-Experimenten zeigten vordifferenzierte ES Zellen, die positiv für PDGF- α -Rezeptor selektiert wurden, eine verbesserte Muskelkontraktion [133]. Eine weitere Studie hat auch beschrieben, dass die aus humanen ES Zell-abgeleiteten Zellen die visuelle Funktion in *Crx-knock out* Mäusen wiederhergestellt haben [134]. Ebenso wurden patientenspezifisch gewonnene pluripotente ES Zellen in autologen Transplantations-Experimenten untersucht. In einem Tiermodell der

Sichelzellenanämie zeigten iPS Zellen eine erfolgreiche Behandlung [129]. In dieser Studie wurden Fibroblasten von kranken Tieren isoliert und zu iPS Zellen reprogrammiert. Nach Korrektur des genetischen Defekts wurden sie *in vitro* zu Blutstammzellen differenziert und anschließend zurück in kranke, bestrahlte Tiere transplantiert. Im Folgenden wurde das komplette Blutsystem durch gesunde Blutzellen ersetzt. Dies zeigt als *proof-of-principle*, dass im Mausmodell die Sichelzellenanämie durch iPS Zellen nach genetischer Reparatur geheilt werden kann. Auch im murinen Krankheitsmodell des Morbus Parkinson wurden iPS Zellen verwendet [106]. Wiederum erfolgte zunächst die Reprogrammierung von Hautzellen zu iPS Zellen und im Anschluss die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen. Diese Zellen wurden dann ins Gehirn transplantiert und die Krankheitssymptome der Parkinsonschen Krankheit haben sich in Folge dessen verbessert, wobei sich Donorzellen zu funktionellen DA Neuronen differenziert haben.

Analog zum Einsatz von iPS Zellen im Parkinson Modell zeigten uniparentale ES Zellen ebenfalls Erfolg. Sanchez-Pernaute und Kollegen differenzierten zunächst Primaten PG ES Zellen zu DA Neuronen und transplantierten diese dann ins Striatum von Ratten. Diese DA Neurone waren im Gehirn angewachsen und zeigten eine Verbesserung der Symptome in Verhaltenstests [38]. Uniparentalen ES Zellen wurden außerdem im hämatopoetischen System auf ihren therapeutischen Nutzen hin untersucht. In dieser Studie wurde AG und GG ES Zellen hergestellt und dann zu Blutstammzellen differenziert. Nach Transplantation in bestrahlte Rezipienten konnten AG bzw. GG Donorzellen das komplette Blutsystem ersetzen [54]. Auch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten zeigen eine erfolgreiche Transplantation von pNPCs, die aus AG ES Zellen differenziert wurden. Die AG Donorzellen sind nach der Transplantation im Rezipientengehirn angewachsen und zu neuronalen Zellen differenziert (Abb 17). Die hier gewonnenen Erkenntnisse zusammen mit früher veröffentlichten Ergebnissen bezüglich des Differenzierungspotentials uniparentalen Zellen lässt den Schluss zu, dass diese Zellen eine Rolle in der regenerativen Medizin spielen könnten.

4.3.4. Abwendung der Teratombildung nach Transplantation

Bezüglich einer potentiellen zukünftigen Therapie ausgehend von ES Zellen gibt es einen nicht unerheblichen Risikofaktor, die Teratombildung. Injektionen von undifferenzierten pluripotenten ES Zellen in Rezipienten führen in der Regel zur Bildung von Keimzelltumoren die differenzierte Zellen verschiedenster Gewebetypen enthalten [135, 136]. Folglich kann auch eine geringe Restmenge von pluripotenten Zellen in einer eigentlich differenzierten Zellkultur die Entstehung von Teratomen nach Transplantation auslösen. Eine Lösung dafür könnte sein, dass vor Transplantation Donorzellen vordifferenzieren lassen. Neurale Vorläuferzellen bzw. DA Neurone, die aus ES Zellen

abgeleitet wurden, versprechen daher bei neurodegenerativen Erkrankungen viel Erfolg. Der Vorteil neuraler Vorläuferzellen besteht darin, dass sie sich bereits auf die Nervenbahn spezialisiert haben und deshalb auch keine fremden oder krebsartigen Zellen mehr bilden können. In vielen Studien über Transplantation neuraler Vorläuferzellen ins chemisch geschädigte oder traumatisierte Gehirn wurde gezeigt, dass die Zellen in transplantierten Gehirnen angewachsen und dort langfristig überlebt haben, ohne Tumore zu bilden [137-139]. In solchen Studien ohne Teratombildung ist unklar, ob sich die offensichtliche Abwesenheit von Tumoren auf die eigene Eigenschaft von transplantierten Zellen bezogen wurde oder eher ein Niveau der Immunreaktion widerspiegelt. Auf jeden Fall zeigten andere Studien mit vordifferenzierten Zellen im Transplantations-Versuchen eine Teratombildung [117, 118, 135].

Wie kann eine Teratombildung vermieden werden? Eine Lösung könnte sein, die Donorzellen – differenzierte ES Zellen – für lange Zeit vordifferenzieren zu lassen. Hierdurch wird erreicht, dass das tumorgene Potential der Donorzellpopulation vollständig reduziert wird [140-142]. In einer anderen Studie wurden ES Zellen unterschiedlich lang in der Zellkultur vordifferenziert und die Bildung von Teratomen nach Transplantation beobachtet [117]. Je länger die Zellen vordifferenziert wurden, desto weniger Teratomen entwickelten sich, wobei das Niveau jedoch nie auf 0 % reduziert werden konnte. Um solche „Verunreinigungen“ der zu transplantierenden Zellpopulation zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Experiment durchgeführt. Die ES Zell-artigen Kontaminanten unter den vordifferenzierten Donorzellen wurden als AP-positive Kolonien nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 14 und Tab. 22). Diese Frequenz korrelierte mit der Zahl von Rezipienten, deren Gehirne nach der Transplantation Tumore entwickelten, und konnte deswegen gut die Wahrscheinlichkeit der Teratombildung voraussagen. Weitere und genauere Verfahren zur Identifizierung und Elimination von verbliebenen ES Zellen in differenzierten Kulturen sind essentiell für den Fortschritt der Stammzell-basierten regenerativen Medizin.

Außerdem wurden weitere Strategien zur Vermeidung von Tumoren diskutiert. HSV-tk-Gen ist ein Gen von *Herpes-simplex*-Viren und wirkt zusammen mit dem Pro-Pharmakon Ganciclovir (GCV) toxisch auf Zellen [143-145]. Diese Kombination führt zu „Selbstmord“- und „Zuschauer“-Effekten und wurde somit für die Tumorthherapie verwendet. In einer Studie zeigten unter GCV-Behandlung keine Tumore bei fünf aus acht Patienten nach Transplantation von HSV-tk-transduzierten Lymphozyten [146]. Für ES Zell-Transplantation könnte das HSV-tk-Gen in den Oct4-Promotor transfiziert werden und infolgedessen die Oct4-exprimierenden undifferenzierten Zellen nach Transplantation unterdrückt werden.

4.4. Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das neuronale *in vitro* und *in vivo* Differenzierungspotential von AG ES Zellen vergleichbar mit dem von N ES Zellen ist. Ebenso wurden langzeit-differenzierte pNPCs abgeleitet aus AG ES Zellen ins traumatisierte Mausgehirnmodell erfolgreich tumorfrei transplantiert. AG ES Zellen können in der Grundlagenforschung zur Untersuchung von unausgewogenen *imprinted* Genexpressionen auf somatische Stammzellentwicklung genutzt werden. Zudem können AG ES Zellen als eine nützliche Quelle zur Gewinnung patientenspezifischer, therapeutisch relevanter Zelltypen dienen und sie sind bei der Behandlung autosomal-dominanter Krankheiten von großen Nutzen. Somit können AG ES Zellen eine bedeutende Rolle für die künftige regenerative Medizin spielen.

5. Literaturverzeichnis

1. Weiss, S., et al., *Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis*. J Neurosci, 1996. **16**(23): p. 7599-609.
2. Weiss, S., et al., *Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?* Trends Neurosci, 1996. **19**(9): p. 387-93.
3. Watt, F.M., *Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. **353**(1370): p. 831-7.
4. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 313-9.
5. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
6. Morrison, S.J., et al., *The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10302-6.
7. Fauser, A.A. and H.A. Messner, *Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood*. Blood, 1978. **52**(6): p. 1243-8.
8. Knudtzon, S., *In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood*. Blood, 1974. **43**(3): p. 357-61.
9. Broughton, S.K., et al., *Large-scale generation of highly enriched neural stem-cell-derived oligodendroglial cultures: maturation-dependent differences in insulin-like growth factor-mediated signal transduction*. J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 628-38.
10. Haynesworth, S.E., et al., *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**(1): p. 81-8.
11. Matsushita, K., et al., *Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes*. Hypertension, 2006. **48**(6): p. 1095-102.
12. Merkle, F.T. and A. Alvarez-Buylla, *Neural stem cells in mammalian development*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 704-9.
13. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 57-64.
14. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
15. Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-6.
16. Wobus, A.M., R. Grosse, and J. Schoneich, *Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro*. Biomed Biochim Acta, 1988. **47**(12): p. 965-73.

17. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
18. Martin, G.R., *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, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
19. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
20. Conrad, S., et al., *Generation of pluripotent stem cells from adult human testis*. Nature, 2008. **456**(7220): p. 344-9.
21. Kossack, N., et al., *Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 138-49.
22. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
23. Kim, J.B., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells*. Nat Protoc, 2009. **4**(10): p. 1464-70.
24. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
25. Lyssiotis, C.A., et al., *Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(22): p. 8912-7.
26. Hochedlinger, K. and R. Jaenisch, *Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy*. N Engl J Med, 2003. **349**(3): p. 275-86.
27. Jaenisch, R., *Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2787-91.
28. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
29. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
30. Barlow, D.P., et al., *The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus*. Nature, 1991. **349**(6304): p. 84-7.
31. Cattanach, B.M. and M. Kirk, *Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice*. Nature, 1985. **315**(6019): p. 496-8.
32. McGrath, J. and D. Solter, *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes*. Cell, 1984. **37**(1): p. 179-83.
33. Morison, I.M., J.P. Ramsay, and H.G. Spencer, *A census of mammalian imprinting*. Trends Genet, 2005. **21**(8): p. 457-65.
34. Solter, D., *Imprinting today: end of the beginning or beginning of the end?* Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 12-6.

35. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris, *Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis*. Nature, 1984. **308**(5959): p. 548-50.
36. Kaufman, M.H., S.C. Barton, and M.A. Surani, *Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage*. Nature, 1977. **265**(5589): p. 53-5.
37. Surani, M.A. and S.C. Barton, *Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos*. Science, 1983. **222**(4627): p. 1034-6.
38. Sanchez-Pernaute, R., et al., *Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease*. Brain, 2008. **131**(Pt 8): p. 2127-39.
39. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris, *Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome*. Cell, 1986. **45**(1): p. 127-36.
40. Loi, P., et al., *Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols*. Biol Reprod, 1998. **58**(5): p. 1177-87.
41. Feil, R., et al., *Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep*. Mamm Genome, 1998. **9**(10): p. 831-4.
42. Fukui, Y., et al., *Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation*. Mol Reprod Dev, 1992. **33**(3): p. 357-62.
43. Kure-bayashi, S., et al., *Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig*. Theriogenology, 2000. **53**(5): p. 1105-19.
44. Zhu, J., et al., *In vitro and in vivo developmental competence of ovulated and in vitro matured porcine oocytes activated by electrical activation*. Cloning Stem Cells, 2003. **5**(4): p. 355-65.
45. Ozil, J.P., *The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation*. Development, 1990. **109**(1): p. 117-27.
46. Hagemann, L.J., et al., *In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones*. Mol Reprod Dev, 1998. **50**(2): p. 154-62.
47. Lagutina, I., et al., *Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: a comparative study*. Biol Reprod, 2004. **70**(2): p. 400-5.
48. Graham, C.F., *The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1974. **49**(3): p. 399-424.
49. Kim, K., et al., *Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis*. Science, 2007. **315**(5811): p. 482-6.
50. Mann, J.R., *Deriving and propagating mouse embryonic stem cell lines for studying genomic imprinting*. Methods Mol Biol, 2001. **181**: p. 21-39.

51. Cibelli, J.B., et al., *Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates*. Science, 2002. **295**(5556): p. 819.
52. Graham, C.F., *Parthenogenetic mouse blastocysts*. Nature, 1970. **226**(5241): p. 165-7.
53. Revazova, E.S., et al., *Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts*. Cloning Stem Cells, 2007. **9**(3): p. 432-49.
54. Eckardt, S., et al., *Hematopoietic reconstitution with androgenetic and gynogenetic stem cells*. Genes Dev, 2007. **21**(4): p. 409-19.
55. McGrath, J. and D. Solter, *Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1300-2.
56. Daley, G.Q., et al., *Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research*. Science, 2007. **315**(5812): p. 603-4.
57. Hipp, J. and A. Atala, *Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy*. J Exp Clin Assist Reprod, 2004. **1**(1): p. 3.
58. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
59. Morali, O.G., et al., *IGF-II promotes mesoderm formation*. Dev Biol, 2000. **227**(1): p. 133-45.
60. Stevens, L.C., D.S. Varnum, and E.M. Eicher, *Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos*. Nature, 1977. **269**(5628): p. 515-7.
61. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.H. Kaufman, *Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilised embryos*. Nature, 1977. **270**(5638): p. 601-3.
62. Barton, S.C., et al., *Influence of paternally imprinted genes on development*. Development, 1991. **113**(2): p. 679-87.
63. Mann, J.R., et al., *Androgenetic mouse embryonic stem cells are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: implications for genetic imprinting*. Cell, 1990. **62**(2): p. 251-60.
64. Narasimha, M., S.C. Barton, and M.A. Surani, *The role of the paternal genome in the development of the mouse germ line*. Curr Biol, 1997. **7**(11): p. 881-4.
65. Stevens, L.C., *Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse*. Nature, 1978. **276**(5685): p. 266-7.
66. Fundele, R., et al., *Systematic elimination of parthenogenetic cells in mouse chimeras*. Development, 1989. **106**(1): p. 29-35.
67. Keverne, E.B., et al., *Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development*. Brain Res Dev Brain Res, 1996. **92**(1): p. 91-100.
68. Mann, J.R. and C.L. Stewart, *Development to term of mouse androgenetic aggregation chimeras*. Development, 1991. **113**(4): p. 1325-33.
69. Hernandez, L., et al., *Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13344-9.

70. Nagy, A., M. Sass, and M. Markkula, *Systematic non-uniform distribution of parthenogenetic cells in adult mouse chimaeras*. *Development*, 1989. **106**(2): p. 321-4.
71. Barton, S.C., M.A. Surani, and M.L. Norris, *Role of paternal and maternal genomes in mouse development*. *Nature*, 1984. **311**(5984): p. 374-6.
72. Walter, J. and M. Paulsen, *Imprinting and disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2003. **14**(1): p. 101-10.
73. Efstratiadis, A., *Parental imprinting of autosomal mammalian genes*. *Curr Opin Genet Dev*, 1994. **4**(2): p. 265-80.
74. Solter, D., *Imprinting*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(7): p. 951-4.
75. Wilkinson, L.S., W. Davies, and A.R. Isles, *Genomic imprinting effects on brain development and function*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(11): p. 832-43.
76. Bartolomei, M.S., S. Zemel, and S.M. Tilghman, *Parental imprinting of the mouse H19 gene*. *Nature*, 1991. **351**(6322): p. 153-5.
77. DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. *Cell*, 1991. **64**(4): p. 849-59.
78. Morison, I.M. and A.E. Reeve, *A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(10): p. 1599-609.
79. Constancia, M., et al., *Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 19219-24.
80. Davies, W., A.R. Isles, and L.S. Wilkinson, *Imprinted gene expression in the brain*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. **29**(3): p. 421-30.
81. Albrecht, U., et al., *Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons*. *Nat Genet*, 1997. **17**(1): p. 75-8.
82. Davies, W., et al., *Xlr3b is a new imprinted candidate for X-linked parent-of-origin effects on cognitive function in mice*. *Nat Genet*, 2005. **37**(6): p. 625-9.
83. Rougeulle, C., H. Glatt, and M. Lalande, *The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain*. *Nat Genet*, 1997. **17**(1): p. 14-5.
84. Kim, J., X. Lu, and L. Stubbs, *Zim1, a maternally expressed mouse Kruppel-type zinc-finger gene located in proximal chromosome 7*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(5): p. 847-54.
85. Pham, N.V., et al., *Dissociation of IGF2 and H19 imprinting in human brain*. *Brain Res*, 1998. **810**(1-2): p. 1-8.
86. Runte, M., et al., *SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome*. *Hum Genet*, 2004. **114**(6): p. 553-61.
87. Zhang, Z., et al., *Comparative analyses of genomic imprinting and CpG island-methylation in mouse Murr1 and human MURR1 loci revealed a putative imprinting control region in mice*. *Gene*, 2006. **366**(1): p. 77-86.

88. Cooper, W.N., et al., *Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(9): p. 1025-32.
89. Buiting, K., et al., *Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(3): p. 571-7.
90. Gicquel, C., et al., *Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 1003-7.
91. Hansen, R.S., et al., *The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14412-7.
92. Xu, G.L., et al., *Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 187-91.
93. Amir, R.E., et al., *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 185-8.
94. Weinstein, L.S. and S. Yu, *The Role of Genomic Imprinting of Galpha in the Pathogenesis of Albright Hereditary Osteodystrophy*. Trends Endocrinol Metab, 1999. **10**(3): p. 81-85.
95. Kim, S.J., et al., *Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(3): p. 411-8.
96. Lerou, P.H. and G.Q. Daley, *Therapeutic potential of embryonic stem cells*. Blood Rev, 2005. **19**(6): p. 321-31.
97. Mai, Q., et al., *Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts*. Cell Res, 2007. **17**(12): p. 1008-19.
98. Chen, Z., et al., *Birth of parthenote mice directly from parthenogenetic embryonic stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2136-45.
99. Feng, Q., et al., *Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence*. Stem Cells, 2010.
100. Hu, B.Y., et al., *Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010.
101. Perrier, A.L., et al., *Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12543-8.
102. Yan, Y., et al., *Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(6): p. 781-90.
103. Barberi, T., et al., *Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1200-7.
104. Kawasaki, H., et al., *Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 31-40.
105. Lee, S.H., et al., *Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(6): p. 675-9.

106. Wernig, M., et al., *Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5856-61.
107. Sanchez-Pernaute, R., et al., *Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyto-1) after transplantation*. Stem Cells, 2005. **23**(7): p. 914-22.
108. Hikichi, T., et al., *Differentiation potential of parthenogenetic embryonic stem cells is improved by nuclear transfer*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 46-53.
109. Horii, T., et al., *Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 79-88.
110. Li, C., et al., *Correlation of expression and methylation of imprinted genes with pluripotency of parthenogenetic embryonic stem cells*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(12): p. 2177-87.
111. Dinger, T.C., et al., *Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells in vivo and in vitro*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1474-83.
112. Makri, G., et al., *Transplantation of embryonic neural stem/precursor cells overexpressing BM88/Cend1 enhances the generation of neuronal cells in the injured mouse cortex*. Stem Cells, 2010. **28**(1): p. 127-39.
113. Siren, A.L., et al., *Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin*. Brain, 2006. **129**(Pt 2): p. 480-9.
114. Brustle, O., et al., *In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14809-14.
115. Okabe, S., et al., *Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro*. Mech Dev, 1996. **59**(1): p. 89-102.
116. Allen, N.D., et al., *Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10782-6.
117. Dihne, M., et al., *Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1458-66.
118. Shear, D.A., et al., *Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury*. Brain Res, 2004. **1026**(1): p. 11-22.
119. da Rocha, S.T., et al., *Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain*. Trends Genet, 2008. **24**(6): p. 306-16.
120. Greer, P.L., et al., *The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc*. Cell, 2010. **140**(5): p. 704-16.
121. Jelinic, P. and P. Shaw, *Loss of imprinting and cancer*. J Pathol, 2007. **211**(3): p. 261-8.
122. Eckardt, S., et al., *In vivo and in vitro differentiation of uniparental embryonic stem cells into hematopoietic and neural cell types*. Organogenesis, 2008. **4**(1): p. 33-41.

123. Christophersen, N.S., et al., *Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation*. *Exp Neurol*, 2007. **204**(2): p. 791-801.
124. Yamasaki, K., et al., *Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(8): p. 837-47.
125. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. *Nature*, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
126. Rideout, W.M., 3rd, et al., *Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy*. *Cell*, 2002. **109**(1): p. 17-27.
127. Wakayama, T., et al., *Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer*. *Science*, 2001. **292**(5517): p. 740-3.
128. Weissman, I.L., *Medicine: politic stem cells*. *Nature*, 2006. **439**(7073): p. 145-7.
129. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1920-3.
130. Giudice, A. and A. Trounson, *Genetic modification of human embryonic stem cells for derivation of target cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(5): p. 422-33.
131. Caspi, O., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(19): p. 1884-93.
132. Laflamme, M.A., et al., *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(9): p. 1015-24.
133. Darabi, R., et al., *Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells*. *Nat Med*, 2008. **14**(2): p. 134-43.
134. Lamba, D.A., J. Gust, and T.A. Reh, *Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(1): p. 73-9.
135. Brederlau, A., et al., *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*, 2006. **24**(6): p. 1433-40.
136. Erdo, F., et al., *Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. **23**(7): p. 780-5.
137. Ben-Hur, T., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats*. *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1246-55.
138. Daadi, M.M., A.L. Maag, and G.K. Steinberg, *Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model*. *PLoS One*, 2008. **3**(2): p. e1644.

139. Ideguchi, M., et al., *Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets*. J Neurosci, 2010. **30**(3): p. 894-904.
140. Arnhold, S., et al., *Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum*. J Neurosurg, 2000. **93**(6): p. 1026-32.
141. Brustle, O., et al., *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants*. Science, 1999. **285**(5428): p. 754-6.
142. Reubinoff, B.E., et al., *Neural progenitors from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(12): p. 1134-40.
143. Matuskova, M., et al., *HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells*. Cancer Lett, 2010. **290**(1): p. 58-67.
144. Portsmouth, D., J. Hlavaty, and M. Renner, *Suicide genes for cancer therapy*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(1): p. 4-41.
145. Pulkkanen, K.J., et al., *HSV-tk gene therapy for human renal cell carcinoma in nude mice*. Cancer Gene Ther, 2001. **8**(7): p. 529-36.
146. Bonini, C., et al., *HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1719-24.

6. Danksagung

Herrn Prof. Albrecht Müller danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas. Zudem danke ich ihm für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Unterstützung mit viel Geduld bei der Erstellung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Manfred Gessler und PD Dr. Robert Hock für ihre Betreuung und Ratschläge sowie als Zweitgutachter zu fungieren. Ebenso geht mein besonderer Dank an Herrn Prof. K. John McLaughlin und Dr. Sigrid Eckardt für die Herstellung uniparentaler embryonaler Stammzellen und chimäre Embryonen und für die offene Diskussion. Außerdem danke ich besonders Prof. Dr. Anna-Leena Sirén für ihre Unterstützung sowie für Ihr Augenmerk auf die klinischen Aspekte der Stammzellbiologie.

Für die Bereitstellung aller Kollegen danke ich von ganzem Herz. Nadine Obier und Timo Dinger danke ich besonders für sprachliche und theoretische Unterstützung während der Korrektur meiner Doktorarbeit. Doris Heim und Veronika Hornich danke ich ebenfalls für ihre bemerkenswerte praktische Hilfe.

Meine Doktorarbeit wurde durch das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK 1048 „*Organogenese*“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Von daher danke ich für die finanzielle Unterstützung und hilfsreiche wissenschaftliche Veranstaltungen.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern sowie meinem Bruder für ihre verständnisvolle Beratung und liebevolle und geistige Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

7. Erklärungen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von ihm angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre, dass diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Außerdem erkläre ich, dass ich früher keine akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht hat.

Würzburg, den 16.04.2010

Soon Won Choi

9. Publikationen

Wissenschaftliche Zeitschrift

Dinger TC, Eckardt S, **Choi SW**, Camarero G, Kurosaka S, Hornich V, McLaughlin KJ, Müller AM. Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells in vivo and in vitro. **Stem Cells**. 2008 Jun;26(6):1474-83. Epub 2008 Mar 27.

Choi SW, Eckardt S, Ahmad R, McLaughlin KJ, Sirén AL, Müller AM. Two parental genomes are compatible with dopaminergic *in vitro* and *in vivo* differentiation. *Int J Dev Biol*. (eingereicht).

Choi SW, Wolber W, Eckardt S, McLaughlin KJ, Sirén AL, Müller AM. Androgenetic ES cells can form tumor-free neural progenitors following transplantation into a traumatic brain injury model. (in Vorbereitung)

Bücher – Kapitel

Müller, A. M., Obier, N., Choi, S. W., Li, X., Dinger, T. C. und Brousos, N.. Möglichkeiten und Chancen der Stammzellforschung: Stammzellen für Alle? In: Hilpert, K. (Hg.). *Forschung contra Lebensschutz?: Der Streit um die Stammzellforschung*. Herder Verlag, 2009 (ISBN-10: 3451022338)