

Aus der Orthopädischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**Untersuchungen zur neurogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen
Stammzellen gewonnen aus dem Knochenmark und aus trabekulären
Knochenfragmenten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christine Beck
aus Sommerhausen

Würzburg, Juni 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. N. Schütze
Koreferent: Professor Dr. med. Jochen Eulert
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Isolierung, Charakterisierung und therapeutisches Potential humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs)	1
1.1.1. HMSCs aus dem Knochenmark (mhMSCs)	3
1.1.2. HMSCs aus trabekulärem Knochen (bhMSCs)	5
1.2. Nervenzellen	6
1.2.1. Ursprung und Anatomie	6
1.2.2. Neuronale Stammzellen (NSCs)	8
1.3. Peripherer Nerv und Schwann-Zellen	10
1.3.1. Anatomie peripherer Nerven	10
1.3.2. Schwann-Zellen und periphere Nervenrekonstruktion	11
1.4. Problemstellung	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Isolierung und Kultivierung von hMSCs	15
2.1.1. Patienten	15
2.1.2. MhMSCs	15
2.1.3. BhMSCs	16
2.2. Isolierung und Kultivierung von Zellen aus peripherem Nervengewebe	18
2.3. Differenzierung von hMSCs	19
2.3.1. Differenzierung in Nervenzellen	19
2.3.2. Differenzierung in Schwann-Zellen	20
2.4. Histologische und immunhistochemische Analysen	21
2.4.1. Kryoschnitte vom peripheren Nerven	21

2.4.2.	Hämalaun-Eosin Färbung	21
2.4.3.	Immunhistochemie	22
2.4.4.	Immunfluoreszenz	24
2.5.	RNA-Isolierung und RT-PCR-Analysen	25
2.5.1.	RNA-Isolierung	25
2.5.2.	cDNA-Synthese	26
2.5.3.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	26
2.5.4.	Gelelektrophorese	28
2.5.5.	Sequenzierung	29
2.6.	FACS-Analysen von hMSCs	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Differenzierung von hMSCs in Nervenzellen	32
3.1.1.	Morphologie	32
3.1.2.	Immunhistochemie	33
3.1.3.	RT-PCR-Analysen	35
3.1.4.	FACS-Analysen von undifferenzierten hMSCs	36
3.2.	Histologie peripherer Nerven	37
3.3.	Zellkultur vom peripheren Nerven	39
3.3.1.	Morphologie	39
3.3.2.	Immunfluoreszenz	40
3.3.3.	RT-PCR-Analysen	41
3.4.	Differenzierung von hMSCs in Schwann-Zellen	42
3.4.1.	Morphologie	42
3.4.2.	Immunhistochemie	42
3.4.3.	RT-PCR-Analysen	44

4.	Diskussion	45
4.1.	Methodische Überlegungen	45
4.2.	Zuverlässigkeit neurogener Marker	50
4.3.	<i>In vivo</i> Versuche und therapeutisches Potential	58
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	63

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BHA	Butylated Hydroxyanisole
bhMSCs	bone-derived human Mesenchymal Stem Cells (humane mesenchymale Stammzellen aus trabekulärem Knochen)
bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosylmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächenantigen)
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFU	colony forming unit (Kolonien-bildende Einheit)
dbcAMP	Dibutyryl-zyklisches-Adenosylmonophosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMEM/F-12	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium Ham`s F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Etylendiaminotetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
hMSCs	human Mesenchymal Stem Cells (humane mesenchymale Stammzellen)
hNSCs	human Neural Stem Cells (humane neuronale Stammzellen)
IBMX	Isobutylmethylxanthin
MAP-2	Microtubule Associated Protein-2
MBP	Myelin Basic Protein
mhMSCs	marrow-derived human Mesenchymal Stem Cells (humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark)
mMSCs	marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark)

MPZ	Myelin Protein Zero
NeuN	Neuronal Nuclear Antigen
NF-H	Neurofilament-Heavy
NF-L	Neurofilament-Light
NF-M	Neurofilament-Medium
NGF	Nerve Growth Factor
NSCs	Neural Stem Cells (neuronal Stammzellen)
NSE	Neuron Specific Enolase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PMP 22	Peripheral Myelin Protein 22
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
tau	Microtubule Associated Protein T (MAP-T)
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
trkA	Tyrosinkinase A
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Isolierung, Charakterisierung und therapeutisches Potential humaner mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Viele Gewebe des ausgewachsenen, adulten Organismus besitzen die Fähigkeit zum Ersatz von Zellen im Rahmen des normalen Verschleißes. In den meisten Geweben geht diese permanente physiologische Regeneration von Stammzellen aus. Beispiele für Stammzellen sind Kryptenzellen im Darm, Basalzellen in vielen Epithelien und hämatopoetische Stammzellen im roten Knochenmark.

Stammzellen lassen sich als Elemente definieren, deren Tochterzellen zum einen in den Stammzellpool zurückkehren und damit seinen Bestand sichern (Prozeß der Selbsterneuerung), zum anderen aber ansprechbar für Wachstumsfaktoren und Zytokine sind. Aus letzteren entstehen durch Proliferations- und Differenzierungsprozesse reife Zellen, die dem Ersatz für gestorbene Zellen dienen. Um Stammzellen hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials und auch zahlenmäßig zu erfassen, bedient man sich ihrer Fähigkeit, *in vivo* und *in vitro* Zellkolonien zu bilden. Die Anzahl solcher Kolonien korreliert zur Menge angebotener Stammzellen, da jeweils eine Kolonie aus der Proliferation einer Stammzelle, „colony forming unit“ (CFU) hervorgeht (Drenkhahn, 1994).

Im Rahmen von Krankheit, Trauma oder Verschleiß entstehen jedoch häufig große Gewebedefekte, die weder durch Proliferation von benachbarten gesunden Zellen, noch durch die Rekrutierung des Stammzellpools regeneriert werden können. Außerdem ist in einigen Zellsystemen des adulten Organismus die Fähigkeit zur Regeneration und Proliferation fast vollständig verloren gegangen. Beispiele hierfür sind der Gelenkknorpel, die Herzmuskulatur oder das Gehirn. Statt der Wiederherstellung der normalen Gewebearchitektur resultiert eine Auffüllung mit funktionell minderwertigem Ersatzgewebe (z. B. Narbengewebe, Knorpelersatzgewebe). Defektes und erkranktes Gewebe kann auch mit den derzeit zur Verfügung stehenden operativen Methoden oft nicht adäquat rekonstruiert werden.

Tissue Engineering, ein seit Anfang der neunziger Jahre erstelltes Konzept der Geweberekonstruktion unter Verwendung von Zellen, geeigneten Trägermaterialien und ge-

webespezifischen Wachstumsfaktoren hat insbesondere in Kombination mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) neue therapeutische Perspektiven eröffnet (Langer und Vacanti, 1993).

hMSCs sind multipotente Vorläuferzellen, die sich unter geeigneten Bedingungen in unterschiedliche Gewebe mesenchymalen Ursprungs wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Muskel, Knochenmarkstroma, Fett oder Dermis differenzieren lassen (Caplan et al., 1994; Pittenger et al., 1999; Jiang et al., 2002a).

Die Isolierung von hMSCs wurde zunächst aus dem Knochenmark beschrieben (Caplan, 1991). Mittlerweile lassen sich hMSCs aus vielen anderen mesenchymalen Geweben gewinnen und in einem undifferenzierten Status in Zellkultur vermehren. Für hMSCs aus Knochenmark, Periost, Fettgewebe, Muskel, Dermis, Blut, trabekulären Knochen und Synovialmembran konnte gezeigt werden, daß diese sowohl die Potenz zur Selbsterneuerung *in vivo*, als auch zur Differenzierung in Zellen und Gewebe mesenchymalen Ursprungs besitzen (Nakahara et al., 1990; Caplan, 1994; Pittenger et al., 1999; Zuk et al., 2001; Young et al., 2001; Kutznetsov et al., 2001; De Bari et al., 2001; Osyczka et al., 2002a; Nöth et al., 2002a; Jankowski et al., 2002).

Zur Charakterisierung von hMSCs aus unterschiedlichen Geweben dient unter anderem die Analyse der Oberflächenantigen-Expression. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, einen Marker zu identifizieren, der ausschließlich von hMSCs exprimiert wird.

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass gewebespezifische Stammzellen lediglich in die Zellen differenzieren, die charakteristisch für ihr Ursprungsgewebe sind. Neuere Studien zeigen, dass Stammzellen auch in andere Zelllinien als die des eigenen Gewebes differenzieren können und damit ein weitaus größeres Potential besitzen als ursprünglich angenommen. Bjornson et al. (1999) zeigten, daß NSCs nach einer Transplantation in Mäuse eine Vielzahl hämatopoetischer Zellen bilden können. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, die in den Seitenventrikel neonataler Mäuse injiziert wurden, differenzierten zu Astrozyten und Neurofilament-exprimierenden Zellen (Azizi et al., 1998; Kopen et al., 1999). Untersuchungen von Gehirnen weiblicher Leukämiepatienten, die eine Knochenmarkstransplantation von männlichen Spendern bekommen hatten, konnten zeigen, daß Y-chromosomale transplantierte Knochenmarkszellen in das Gehirn der Patienten eingewandert waren und sich in Nervenzellen differenziert hatten (Mezey et al., 2003).

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass das Differenzierungspotential von hMSCs nicht wie ursprünglich angenommen auf mesenchymale Gewebe beschränkt ist, sondern, dass sich hMSCs unter geeigneten Bedingungen auch in Gewebe ektodermalen Ursprungs (z.B. Nervenzellen) und Gewebe endodermalen Ursprungs (z.B. Leberzellen) differenzieren lassen (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000 und 2002; Deng et al., 2001; Jiang et al., 2002a und 2002b; Lodie et al., 2002; Kim et al., 2002; Zhao et al., 2003; Oh et al., 2000).

Ob adulte hMSCs ebenso wie embryonale Stammzellen ein pluripotentes Differenzierungspotential besitzen, und damit in alle Zellen eines Organismus differenzieren können, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung und wird kontrovers diskutiert (Verfaillie et al., 2003). Beim Einsatz embryonaler Stammzellen besteht jedoch die Gefahr, aufgrund der unbeschränkten Teilungsfähigkeit der Zellen Karzinome zu induzieren (Vogel et al., 2005). Außerdem können adulte hMSCs im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ohne ethische Bedenken mit Hilfe einfacher Techniken aus dem erwachsenen Organismus isoliert werden.

Die Applikation autologer (körpereigener, unter Vermeidung von Abstoßungsreaktionen), *in vitro* expandierter bzw. differenzierter hMSCs könnte die zukünftige Therapie vieler Krankheitsbilder entscheidend beeinflussen.

1.1.1. HMSCs aus dem Knochenmark (mhMSCs)

Im Knochenmark Erwachsener finden sich neben den bereits lange bekannten hämatopoetischen Stammzellen, welche lebenslang Zellen des Immun- (Lymphozyten) und Blutsystems (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten) bilden, auch nicht-hämatopoetische Stammzellen, die als Knochenmarkstromazellen, mesenchymale Vorläufer- oder mesenchymale Stammzellen (marrow-derived human Mesenchymal Stem Cells, mhMSCs) bezeichnet werden.

Auf die Existenz dieser Zellen wurde erstmals vom deutschen Pathologen Cohnheim vor mehr als 130 Jahren hingewiesen, der im Rahmen seiner Studien über die Wundheilung Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten in der Wunde entdeckte, deren Ursprung er im Knochenmark vermutete (Cohnheim, 1867). Der definitive

Beweis wurde von Friedenstein und dessen Mitarbeitern Mitte der 70er Jahre erbracht. Ihnen gelang es, adhärenz Kolonien-bildende Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten aus dem Knochenmark zu isolieren und zu kultivieren (Friedenstein et al., 1976). Seit dieser Zeit beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung dieser mesenchymalen Stammzellen.

Die heute standardisierten Isolierungstechniken von mhMSCs aus Hüftköpfen oder Knochenmarkaspiraten aus dem Beckenkamm mit einer Yamshidi Nadel basieren maßgeblich auf den Pionierarbeiten von Caplan (Caplan, 1991). Mit Hilfe eines Dichtegradienten können hämatopoetische und vaskuläre Zellen eliminiert werden (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999). Die gereinigten adhärenz mhMSCs machen lediglich einen geringen Prozentsatz aller Knochenmarkzellen aus (weniger als eine Zelle pro 1 Million mononukleärer Knochenmarkzellen), der im Laufe des Alters noch weiter absinkt (Caplan et al.; 1997). Daher ist die Expansion der Zellen *in vitro* nötig (Colter et al., 2000).

MhMSCs repräsentieren zu 95-98% eine phänotypisch homogene Zellpopulation und sind nahezu einheitlich positiv für folgende Oberflächenantigene: CD10, CD13, CD29, CD44, CD61, CD71, CD90, CD105, CD106, CD109, CD120a, CD124, CD140b, CD164 und CD172a. Außerdem sind mhMSCs negativ für CD133 und hämatopoetische Marker wie CD14 (Lipopolysaccharidrezeptor), CD34 und CD45 (Leukozytenantigen) (Pittenger et al., 1999; Vogel et al., 2003). Unter geeigneten Bedingungen können mhMSCs in eine Vielzahl mesenchymaler Gewebe wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Muskel, Knochenmarkstroma, Fett oder Dermis differenziert werden (Caplan, 1991 und 1994).

Im Rahmen verschiedener Tissue Engineering Konzepte nutzt man die Potenz von mhMSCs zur Rekonstruktion von Geweben des muskuloskeletalen Systems. Erste klinische Studien für die Therapie von Defekten langer Röhrenknochen (Quarto et al., 2001) und Defekten am Schädel und Kiefer waren erfolgreich (Cao, 2002). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von mhMSCs bei lokalen Ischämien der unteren Extremität zu einer deutlichen Zunahme der Gefäßneubildung führt (Tateishi-Yuyama et al., 2002). Ob hMSCs auch für die Therapie von Gelenkknorpel-, Meniskus-, Bandscheiben-, Sehnen-, Gelenkband- und Nervendefekten eingesetzt werden können, bleibt abzuwarten.

1.1.2. HMSCs aus trabekulärem Knochen (bhMSCs)

Die Gewinnung von Explantatzellkulturen aus Kollagenase-verdauten humanen trabekulären Knochenfragmenten wurde erstmals von Robey und Termine beschrieben (Robey und Termine, 1985). Diese Zellen wurden als humane Osteoblasten-ähnliche Zellen angesehen, da sie mehrere für Osteoblasten typische Gene exprimieren (Alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteopontin, Osteonektin, Osteokalzin) und *in vitro* eine mineralisierte extrazelluläre Matrix bilden können (Robey und Termine, 1985; Robey, 1995; Majeska, 1996).

Trabekuläre Knochenzylinder können mit Hilfe einer Yamshidi-Nadel vom Beckenkamm gewonnen werden. Für experimentelle Untersuchungen eignet sich die Gewinnung der Knochenfragmenten aus trabekulären Knochen, der bei chirurgischen Eingriffen anfällt (z.B. aus dem Hüftkopf bei der Implantation einer Hüftendoprothese). Bei der Präparation der Knochenfragmente ist die Kollagenase-Vorbehandlung von entscheidender Bedeutung. Damit können Bindegewebskomponenten, die mit der Knochenoberfläche in Verbindung stehen (z.B. Periost und Knochenmark) und in Abhängigkeit von der natürlichen Beschaffenheit des Ausgangsmaterials (Geschlecht, Patientenalter, Verhältnis von rotem Knochenmark zu Fettmark etc.) zu unterschiedlichen Anteilen heterogene Zellen enthalten, effektiv beseitigt werden (Robey und Termine, 1985; Robey, 1995).

Nach der Kultivierung der vorbehandelten Knochenfragmente im Calcium-freien Wachstumsmedium für etwa zwei Wochen, beginnen die von mineralisierter Matrix umgebenen und daher vor der Kollagenasebehandlung geschützten Zellen aus den Knochenfragmenten herauszuwachsen und zu proliferieren (Robey und Termine, 1985; Robey, 1995). Die Herkunft dieser Zellen ist bisher ungeklärt. Am wahrscheinlichsten ist es, dass sich Osteozyten aus der „Einmauerung“ des Osteoids befreit und zu mitotischen Zellen entwickelt haben (Robey, 1995). Außerdem könnten auch Gefäß-assoziierte Zellen wie Perizyten, die sich in osteoblastäre Zellen differenzieren lassen, zu der aus den Knochenfragmenten herausgewachsenen Zellpopulation beitragen (Robey, 1995; Majeska, 1996; Brighton et al., 1990; Reilly et al., 1998).

Diese humane „Osteoblastenzellkultur“ dient als sehr aufschlussreiches System zur Untersuchung der Biologie, Matrixsynthese, Zelldifferenzierung, Ansprechen auf

Wachstumsfaktoren/Hormone und Zell-Matrix bzw. Zell-Biomaterial Interaktionen (Nöth et al., 2002a).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass bhMSCs das Potenzial haben, in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren und funktionell mesenchymalen Stammzellen gleichen (Nöth et al., 2002a; Osyczka et al., 2002b). Ob bhMSCs jedoch auch in Zellen nicht-mesenchymalen Ursprungs differenzieren können wurde bisher noch nicht untersucht.

1.2. Nervenzellen

1.2.1. Ursprung und Anatomie

Die Nervenzelle ist der Träger der vorrangigen Funktion des Nervengewebes, des Informationsaustausches innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) und der Kommunikation von Gehirn und Rückenmark mit Körper und Umwelt (Drenkhahn und Zenker, 1994).

Entwicklungsgeschichtlich gehen Nervenzellen aus dem Neuroektoderm hervor. Etwa am Ende der 4. Embryonalwoche bilden sich aus Neuroepithelzellen, die in der Anlage des Rückenmarks um den Zentralkanal liegen, sog. Neuroblasten mit großen hellen Kernen, deutlichem Nukleolus und hoher mitotischer Aktivität. Im weiteren Verlauf der Entwicklung verlieren die Neuroblasten ihre Teilungsfähigkeit und werden zu noch wenig differenzierten, unreifen Nervenzellen (Proneuronen), die aus dem Neuroepithel auswandern und die Anlage der grauen Substanz von Rückenmark und Gehirn bilden. Während der weiteren Histogenese wachsen aus jedem Proneuron feine Dendriten und ein Axon aus. Es kommt zu einer Verlagerung und Ansammlung von Nervenzellen in umschriebenen Gebieten sowie zur Bündelung von Nervenfasern. Dadurch entsteht eine Gliederung des ZNS in graue nervenzellreiche Substanz (Substantia nigra) und weiße nervenfaserreiche Substanz (Substantia alba) (Schiebler et al., 1996).

Eine Nervenzelle mit allen ihren Fortsätzen wird auch als Neuron bezeichnet. Um einen Begriff von der Komplexität des Gesamtsystems zu geben, sei angeführt, dass die Zahl der Nervenzellen allein der menschlichen Großhirnrinde auf 10-18 Milliarden, die Zahl

der synaptischen Verbindungen pro Nervenzelle in der Hirnrinde auf durchschnittlich 17 000 geschätzt wird (Drenkhahn und Zenker, 1994).

Morphologisch sind Nervenzellen gekennzeichnet durch Perikaryon (Zellkörper) und Fortsätze (Dendriten, Axon) (Abb.1). Das Perikaryon ist das trophische Zentrum der Nervenzelle, das den Zellkern enthält. Lichtmikroskopisch sind mit geeigneten Färbungen die Gebiete des rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) und freie Ribosomen an ihrer Basophilie zu erkennen. Das basophile Material ist schollenförmig angeordnet und wird nach seinem Entdecker als Nissl-Substanz bezeichnet. Bei den Dendriten handelt es sich um baumartig verzweigte Fortsätze, die wie auch das Perikaryon selbst auf den Empfang von Signalen aus der Umgebung spezialisiert sind (Rezeptorapparat der Zelle). Ihre wesentliche Aufgabe ist die Erregungssummutation. Die Erregungsleitung in Dendriten ist in der Regel zum Perikaryon hin gerichtet.

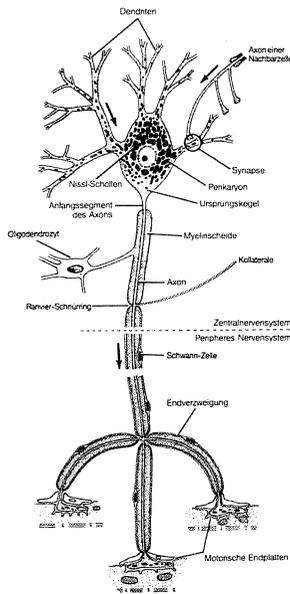


Abb.1: Schematische Darstellung eines Motoneurons. Perikaryon mit großem Zellkern und deutlichem Nukleolus; Zytoplasma mit Nissl-Substanz; baumartig verzweigte Dendriten; oben rechts tritt ein Axon eines anderen Neurons mit einer Synapse an den Dendriten; das Axon der abgebildeten Nervenzelle wird von einer Markscheide umgeben, die im ZNS von Oligodendrozyten, im peripheren Nervensystem von Schwann-Zellen gebildet wird; proximal geht vom Axon eine Kollaterale ab; distal verzweigt sich das Axon auf und bildet mit quergestreiften Muskelzellen motorische Einheiten; Pfeile zeigen die Richtung der Erregungsleitung (aus Schiebeler et al., 1996).

Jede Nervenzelle besitzt nur ein Axon, das am sog. Ursprungskegel entspringt, je nach Zelltypus unterschiedlich lang sein kann, und für die efferente, d. h. vom Perikaryon weggerichtete, Erregungsleitung zu anderen Zellen hin (z.B. Nerven-, Muskel oder Drüsenzellen) verantwortlich ist.

Nach morphologischen Gesichtspunkten unterscheidet man bipolare (2 Fortsätze: 1 Dendrit, 1 Axon), pseudounipolare (1 Fortsatz, der sich nach kurzem T-förmig in zwei Äste aufteilt, von denen einer in die Peripherie, der andere zum ZNS zieht) und multipolare (1 Axon, mehrere Dendriten) Nervenzellen (Schiebler et al., 1996).

Nervenzellen sind beim Adulten nach geltender Lehre nicht mehr teilungsfähig, zeigen aber eine beachtliche Anpassungsfähigkeit an veränderte Situationen (Plastizität) und ein begrenztes Regenerationsvermögen (Drenkhahn und Zenker, 1994).

1.2.2. Neuronale Stammzellen (NSCs)

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die Neurogenese mit der Geburt abgeschlossen ist, und dass danach keine Bildung und Regeneration von Nervenzellen möglich ist. Mittlerweile ist bekannt, dass in zwei umschriebenen Regionen des Gehirns zeitlebens die Bildung neuer Nervenzellen stattfindet, welche von neuronalen Stammzellen (NSCs) ausgeht. Diese Areale befinden sich zum einen in der subventrikulären Zone des Seitenventrikel/Bulbus olfactorius, zum anderen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Reynolds und Weiss, 1992; Luskin et al., 1993; Seki und Arai, 1993; Eriksson et al., 1998; Temple und Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000; Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2000; Pagano et al., 2000; Seki, 2002; Taupin und Gage, 2002). Weiterhin konnten NSCs auch aus anderen Regionen des ZNS in denen keine Neurogenese stattfindet isoliert werden, wie beispielsweise aus dem Septum, dem Striatum, dem Cortex, dem Hippocampus und dem Rückenmark (Palmer et al., 1995; Arsenijevic et al., 2001; Weiss et al., 1996a; Shihabuddin et al., 1997; Yamato et al., 2001). NSCs wurden bereits auch post mortem aus Hirngewebe von Mäusen und Menschen gewonnen (Laywell et al., 1999; Roisen et al., 2001; Palmer et al., 2001).

NSCs exprimieren das Intermediärfilament-Protein Nestin, welches als Marker für neuroepitheliale und ZNS-Stammzellen sowie für unreife Vorläuferzellen *in vivo* und *in*

in vitro angesehen wird (Hockfield und McKay, 1985; Frederikson und McKay, 1988; Lendahl et al., 1990). Kultivierte NSCs sind in der Lage zur Selbsterneuerung und können Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten bilden (Weiss et al., 1996b; Carpenter et al., 1999). Durch die Identifikation ihrer Oberflächenantigene mit Hilfe von FACS-Analysen können NSCs direkt aus dem ZNS isoliert werden (Uchida et al., 2000). Inzwischen wurden zwei Langzeit-Zellkultursysteme zur Expandierung von NSCs von Ratten und Menschen entwickelt. NSCs können als Monolayer in Substratbeschichteten Zellkulturflaschen oder als adherente Cluster-bildende Zellkomplexe, auch als Neurosphären bezeichnet, mit Hilfe verschiedener Mitogene (FGF-2, EGF) kultiviert werden (Reynolds und Weiss, 1992; Davis und Temple, 1994; Nakamura et al., 2000). Diese adulten Zellen scheinen jedoch im Gegensatz zu den embryonalen und fetalen Stammzellen nur eine begrenzte Lebensdauer in Zellkultur zu besitzen (Kukekov et al., 1999; Roy et al., 2000; Arsenijevic et al., 2001).

Obwohl NSCs in sämtlichen Regionen des ZNS existieren, sind sie *in vivo* lediglich in umschriebenen Regionen in der Lage neue Nervenzellen zu bilden. Eine mögliche Erklärung für die geringe Regenerationsfähigkeit des adulten ZNS ist die Bildung inhibitorischer Faktoren in den meisten ZNS-Regionen, die eine neuronale Differenzierung von endogenen NSCs verhindern. Die Zahl endogener NSCs könnte jedoch auch zu gering sein, um eine effektive Regeneration zu gewährleisten (Okano, 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. Ischämie, eine Induktion der Neurogenese im adulten Gehirn stattfindet (Liu et al., 1998; Yagita et al., 2001).

Im Rahmen zahlreicher Studien wurden embryonale und adulte NSCs in das intakte oder vorgeschädigte ZNS von Mäusen und Ratten implantiert. Die transplantierten Zellen überlebten, wanderten und integrierten sich gut im Hirngewebe und differenzierten in Neurone und Gliazellen (Louis und Alvarez-Bujilla, 1994; Sohonon et al., 1996; Svendson et al., 1997; Flax et al., 1998; Brüstle et al. 1998; Fricker et al., 1999; Uchida et al., 2000). Außerdem konnten NSCs bereits erfolgreich im Parkinson-Modell in der Ratte eingesetzt werden (Svendson et al., 1997; Studer et al., 1998; Carvey et al., 2001).

Zusammenfassend eröffnet die Entdeckung neuronaler Stammzellen im embryonalen und adulten ZNS neue Möglichkeiten zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen,

wie z.B. Morbus Parkinson oder Chorea Huntington. Durch die Transplantation undifferenzierter, in einen gewünschten Zelltyp vordifferenzierter bzw. genetisch modifizierter NSCs könnten defekte Zellen des menschlichen ZNS ersetzt oder bereits existierende endogene Stammzellen aktiviert werden (Arenas, 2002; Garcia-Verdugo et al., 2002). Vor der endgültigen klinischen Applikation dieser vielversprechenden Therapieansätze, sind jedoch noch viele *in vitro* und *in vivo* Studien zum besseren Verständnis von NSCs und Neurogenese im ZNS nötig.

1.3. Peripherer Nerv und Schwann-Zellen

1.3.1. Anatomie peripherer Nerven

Nerven existieren nur im peripheren Nervensystem. Sie bestehen aus myelinisierten und nicht myelinisierten Nervenfaserbündeln, die durch Bindegewebe (Epi-, Peri-, Endoneurium) zusammengehalten werden (Abb. 2). Myelinisiert bzw. markhaltig nennt man solche Nervenfasern, deren Axone von Markscheiden umgeben sind, die im peripheren Nervensystem von Schwann-Zellen, im ZNS von Oligodendroglia gebildet werden (Drenkhahn und Zenker, 1994).

Das Epineurium besteht aus dichtem Bindegewebe, das den Nerv als Ganzes umfasst. Vom Epineurium aus dringen gefäßführende Bindegewebssepten zwischen die Nervenfaserbündel. Das Perineurium bildet eine Perineuralscheide, die jedes Nervenfaserbündel umhüllt. Zwischen den Perineurallamellen liegen Kollagenfasern, die spiralförmig verlaufen und dadurch eine gewisse Dehnbarkeit der Nerven zulassen. In der Perineuralscheide befinden sich Bündel von Nervenfasern mit ihren Schwann-Zellen sowie lockeres Bindegewebe, Endoneurium, das jede einzelne Nervenfasern umgibt. Außerdem führt das Endoneurium Blutkapillaren, Histiozyten und sehr zarte retikuläre Fasern, die die einzelnen Nervenfasern unvollständig umhüllen und zusammen mit der Basalmembran der Schwann-Zellen die Endoneuralscheide bilden (Schiebler et al., 1996).

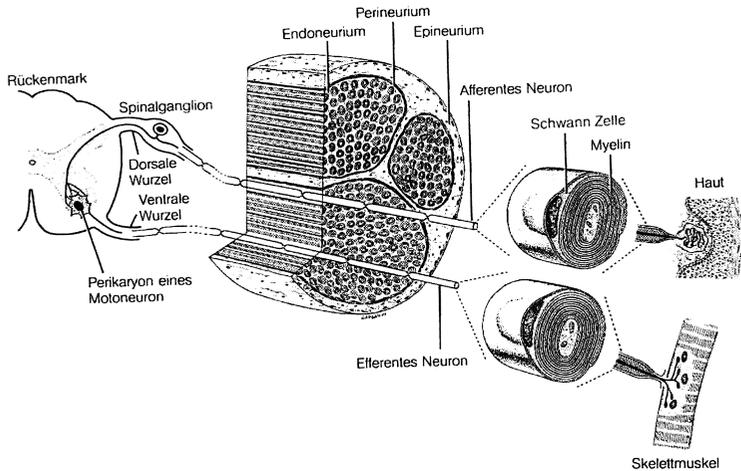


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Nerven mit afferenten und efferenten Fasern. Die afferenten Neurone werden durch Hautrezeptoren erregt, die efferenten Fasern innervieren einen quergestreiften Skelettmuskel (aus Schiebler et al., 1996).

1.3.2. Schwann-Zellen und periphere Nervenrekonstruktion

Entwicklungsgeschichtlich gehen Gliazellen ebenso wie Nervenzellen aus dem Neuroektoderm hervor. Nach der Bildung von Neuroblasten entstehen Glioblasten, Vorläufer der Gliazellen, aus dem Neuroepithel, die jedoch im Gegensatz zu den Neuroblasten im vollendeten Gehirn zu persistieren scheinen. Bei den Gliazellen des ZNS werden meist drei Gruppen unterschieden: Astrozyten (Makroglia), Oligodendroglia und Hortega-Zellen (Mikroglia). Unter den Gliazellen des peripheren Nervensystems machen neben Mantelzellen peripherer Ganglien, Teloglia der motorischen Endplatte, Stützzellen von Sinnesepithelien und Zellen in der Hülle verschiedener sensibler Endorgane, Schwann-Zellen peripherer Nervenfasern den weitaus größten Anteil aus. Gemeinsames Zeichen aller Gliazellen ist, dass sie im Gegensatz zu Nervenzellen zeitlebens ihre Teilungsfähigkeit behalten (Drenkhahn und Zenker, 1994).

Schwann-Zellen bilden die Hüllen bzw. Myelinscheiden im peripheren Nervensystem und dienen damit der elektrischen Isolierung der von ihr umgebenen Nervenfasern und ermöglichen eine schnellere Nervenleitung (Drenkhahn und Zenker, 1994). Außerdem

spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Regeneration von peripheren Nerven. Eine periphere Axonschädigung führt in der Regel zu reversiblen Veränderungen des Zellkörpers der betroffenen Nervenzelle mit Vergrößerung und Abrundung des Zellkörpers durch Wasseraufnahme, Verlagerung des Kerns in die Peripherie und Zerfallen der Nissl-Schollen (Chromatolyse). Außerdem erfolgt eine bei der Regeneration des Axons notwendige Steigerung der Stoffwechselaktivität (Lieberman, 1971). Proximal der Demarkierung schwillt das Axon an und es entwickelt sich ein Wachstumskolben, aus dem viele dünne Fortsätze aussprossen. Im distalen Nervenstumpf kommt es zur Wallerschen Degeneration, die Axon, Markscheiden und Synapse betrifft. Abbau und Entfernung degenerierter Nervenbestandteile erfolgt durch Schwann-Zellen und Makrophagen (Fawcett und Keynes, 1990). Etwa am vierten Tag nach der Schädigung setzt eine enorme Proliferation und Hypertrophie von Schwann-Zellen des distalen Stumpfes ein (Ramon y Cayal, 1928). Sie legen hintereinander in Reihen, füllen schließlich vollständig den vom Endoneurium umschlossenen ursprünglichen Nervenfaserkanal (Hanken-Büngnersche Bänder) und dienen den einwachsenden Axonen als Leitschiene. Außerdem tragen Schwann-Zellen durch die Produktion von Wachstumsfaktoren (Nerve Growth Factor, NGF) und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine (Laminin, Fibronectin) maßgeblich zur Regeneration des geschädigten Axons bei (Fawcett und Keynes, 1990; Bunge, 1994; Mirsky et al., 2002). Gelingt es den auswachsenden Sprossen nicht, die Entfernung zwischen proximalen und distalen Nervenstumpf zu überbrücken und in die geschlossenen Zellsäulen einzudringen, ist ihr Wachstum ungeordnet, und es können schmerzhafte Amputationsneurome entstehen (Fine et al., 2000).

Eine Möglichkeit zur chirurgische Nervenrekonstruktion ist die End-zu-End-Anastomisierung mit einer Nervennaht oder die Fusion mit Hilfe von Fibrinkleber bzw. Polyethylenglykol (Fine et al., 2000). Ist der Abstand der beiden Nervenenden für eine spannungsfreie Anastomisierung zu groß, besteht die Möglichkeit zur Nerven transplantation, um den entstandenen Defekt zu überbrücken. Diese Technik erfordert jedoch einen weiteren chirurgischen Eingriff zur Entnahme eines Transplantates bei Patient oder Spender. Es resultiert ein Funktionsverlust im Bereich der Entnahmestelle. Transplantate stehen lediglich begrenzt zur Verfügung und oftmals unterscheidet sich deren Durchmesser beträchtlich von dem des verletzten Axons (Rodriguez et al., 2000).

Eine vielversprechende Alternative ist der Einsatz biologischer oder synthetischer Verbindungsrohre („guidance channels“), die den Nerven isolieren und schützen und damit das Einwachsen von Bindegewebe, welches zur Narbenbildung führt, verhindern. Diese Röhren, welche bereits aus unterschiedlichsten semipermeablen, biokompatiblen und bioresorbierbaren Materialien hergestellt werden, verhindern eine Dislokation oder Rotation der Nervenstümpfe und bieten eine Leitschiene für die auswachsenden Axonsprossen (Fine et al., 2000; Rutkowski und Heath, 2002). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ein leeres Verbindungsrohr keine wesentliche Verbesserung der Nervenregeneration bewirkt (Hazari et al., 1999). Durch das Einbringen unterstützender Schwann-Zellen bzw. neurotropher Faktoren in einer geeigneten Matrix konnte eine effektive Methode zur Verbesserung der Regeneration peripherer Nerven über sonst unüberwindbare Entfernungen entwickelt werden (Fine et al., 2000). Im Rahmen des Tissue Engineering wurden zahlreiche Matrices, wie z. B. Kollagen, Fibrin, Hyaluronsäure, Alginat oder Matrigel auf ihre Biokompatibilität untersucht (Mosahebi et al., 2001). Entscheidend ist jedoch vor allem der Einsatz von Schwann-Zellen, die aus einer Nervenbiopsie isoliert werden können (Morrisey et al., 1991; Shen et al., 2001), oder von genetisch modifizierten Zellen, die durch Bildung von Hanken-Büngnerschen Bändern und durch die Sekretion extrazellulärer Matrixmoleküle, NGF und anderen Neurotrophinen maßgeblich zur Nervenregeneration beitragen (Rodriguez et al., 2000; Dezawa et al., 2001; Shen et al., 2001; Rutkowski und Heath, 2002).

1.4. Problemstellung

Aus trabekulären Knochenfragmenten isolierte Zellen wurden bisher traditionell als Osteoblasten-ähnliche Zellen bezeichnet. In Vorarbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass diese Zellen ebenso wie hMSCs aus dem Knochenmark in Zellen osteogenen, chondrogenen und adipogenen Ursprungs differenzieren können (Nöth et al., 2002a). Neuere *in vitro* Versuche zur Differenzierung von mhMSCs mit verschiedenen neurogenen Differenzierungsmedien zeigten eine unterschiedlich starke Expression bzw. Expressionszunahme einzelner neuronaler Oberflächenantigene und Proteine (Woodbury et al., 2000 und 2002; Sanchez-Ramos et al., 2000; Deng et al.,

2001; Jiang et al., 2002a und 2002b; Lodie et al., 2002; Kim et al., 2002). Aufgrund dieser Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass auch bhMSCs nicht nur in Zellen mesenchymalen Ursprungs, sondern auch in Zellen neuroektodermalen Ursprungs differenzieren können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die neuronale Differenzierung von bhMSCs *in vitro* untersucht und mit dem neurogenen Potential von mhMSCs verglichen. In Anlehnung an bisherige in der Literatur beschriebene Ergebnisse über die neuronale Differenzierung von Knochenmarkstammzellen, wurden mhMSCs und bhMSCs vor und nach der Behandlung mit einem speziellen neurogenen Differenzierungsmedium hinsichtlich ihrer Morphologie verglichen und mittels RT-PCR und immunhistochemischer Untersuchungen auf die Expression neuronaler Markergene analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Differenzierbarkeit von bhMSCs in Zellen mit Schwann-Zell Charakteristika untersucht. Da die derzeit zur Verfügung stehenden Methoden für die periphere Nervenrekonstruktion nicht immer ein zufriedenstellendes Ergebnis liefern, könnten auf Zelltherapie basierende Verfahren in Zukunft eine erfolgversprechende Alternative darstellen. Probleme für den klinischen Einsatz von aus Nervenbiopsien gewonnenen Schwann-Zellen bestehen zum einen in der Gewinnung einer ausreichend großen Zellzahl und zum anderen in der Opferung von intaktem Nervengewebe.

Um eine Vergleichbarkeit von differenzierten hMSCs mit genuinen peripherem Nervengewebe zu gewährleisten, wurden zunächst Kryoschnitte von peripheren Nerven angefertigt und Schwann-Zellen aus peripherem Nervengewebe isoliert und charakterisiert. Im Anschluß wurde versucht, mhMSCs und bhMSCs *in vitro* in Schwann-Zellen zu differenzieren. MhMSCs und bhMSCs wurden vor und nach der Differenzierung bezüglich ihrer Morphologie verglichen und mittels RT-PCR und Immunhistochemie die Expression verschiedener für Schwann-Zellen typischer Marker analysiert.

Die Untersuchungen sollen vor allem Aufschlüsse über die Plastizität von Zellen, die aus humanen trabekulären Knochenfragmenten gewonnen werden, geben und die Grundlage für eine mögliche klinische Applikation dieser Zellen zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen und für Rekonstruktion peripherer Nervenschädigungen schaffen.

2. Material und Methoden

2.1. Isolierung und Kultivierung von hMSCs

2.1.1. Patienten

Nach Prüfung durch die Ethikkommission der Universität Würzburg und Einwilligung der Patienten wurden mhMSCs und bhMSCs aus Hüftköpfen, die im Rahmen eines endoprothetischen Hüftgelenkersatzes als chirurgische Abfälle anfielen, gewonnen. Die Patienten waren zwischen 8 und 54 Jahre alt und litten weder an Osteoporose noch an einer Hüftkopfnekrose.

2.1.2. MhMSCs

Die Isolierung und Kultivierung von mhMSCs aus dem Hüftkopf erfolgte nach einem Protokoll von Haynesworth et al. (1992) und einer Modifikation von Nöth et al. (2002b). Unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank, Abzug, sterile Handschuhe) wurden aus dem Knochenmark der Schenkelhäse der Hüftköpfe 5 ml Spongiosa mit einem scharfen Löffel kurettiert und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 ml mhMSC-Medium (siehe Materialien) wurden die Spongiosastückchen 2 min gevortext, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand bestehend aus Medium und Fett mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt. Zu dem Pellet, bestehend aus Spongiosastückchen und herausgelösten Knochenmarkzellen wurden 10 ml mhMSC-Medium gegeben, 2 min gevortext und das Medium mit den herausgelösten Zellen mit einer 10 ml Spritze und einer 18 Gauge Kanüle in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang zum Herauslösen der Knochenmarkzellen aus den Spongiosastückchen wurde insgesamt fünfmal wiederholt bis die ausgewaschenen Spongiosastückchen gelblich-weiß erschienen. Die gewonnene Knochenmarkzell-Suspension wurde 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das gewonnene rote Zellpellet in 20 ml mhMSC-Medium suspensiert. Nach der Zellzählung in der Neubauer Zählkammer mit Hilfe von Trypanblau wurden 60-70 Millionen Zellen pro 150 cm² Zellkulturflasche in je 20 ml mhMSC-Medium

ausplatiert und unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂) kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt. Die adhärenen mhMSCs wurden dreimal mit PBS gewaschen und 10-14 Tage in mhMSC-Medium bis zu einem subkonfluentem Stadium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.

2.1.3. BhMSCs

Die bhMSC-Explantatkultur wurde nach einem Protokoll angefertigt, welches erstmals von Robey und Termine (1985) beschrieben und von Sinha et al. (1994) modifiziert worden war. Nachdem 5 ml Spongiosa für die Isolierung von mhMSCs kurettiert worden waren (siehe 2.1.2.), wurden trabekuläre Knochenfragmente mit einem scharfen Löffel aus den Hüftköpfen gewonnen. Die Knochenfragmente wurden in 5 ml Küvetten überführt, mit mhMSC-Medium aufgefüllt, mit einer Schere zerkleinert (5 min/Küvette), fünfmal mit Medium gewaschen, erneut zerkleinert (3 min/Küvette) und dreimal mit mhMSC-Medium gewaschen. Die zerkleinerten Knochenfragmente wurden für die Kollagenaseverdauung in eine Spinner flask mit mhMSC-Medium (250 ml) und Kollagenase XI (50 mg) transferiert und im Brutschrank auf einem Magnetrührer für 3-4 Stunden inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop kein zelluläres Material an der Knochenoberfläche mehr sichtbar war. Das Medium wurde abgesaugt, die Knochenfragmente in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und extensiv mit PBS gewaschen. Pro 150 cm² Zellkulturflasche wurden 1 ml der Knochenfragmente in 20 ml bhMSC-Medium (siehe Materialien) mit einer niedrigeren Calcium-Konzentration ausplatiert und unter Standard-Zellkulturbedingungen (siehe 2.1.2.) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden dritten bis vierten Tag. Nach 3 Wochen wurden die Knochenfragmente abgesaugt und die aus den Explantaten herausgewachsenen adhärenen Zellen zehn Tage in mhMSC-Medium bis zu einem subkonfluentem Stadium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Zur Isolierung und Kultivierung verwendete Materialien:

MhMSC-Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F12, DMEM/F12, (PAA, Linz, E15-813), 10% FBS: Fetales Kälberserum (GIBCO BRL, Darmstadt, 10270-106), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz/Österreich, P11-010), 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat (Sigma, Seelze, A-8960)

BhMSC-Medium: DMEM/F12 (Appli Chem, Darmstadt, A190,500-SA), 200 mM L-Glutamin (PAA, Linz, M11-004), 10% FBS (GIBCO BRL, Darmstadt, 10270-106), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz/Österreich, P11-010), 50 µg/ml Ascorbat-2-Phosphat (Sigma, Seelze, A-8960)

Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco 99,55g/l Aqua bidest (Biochrom, Berlin, L182-50)

Dampfsterilisator (H+P, Oberschleißheim, 400E)

Sicherheitswerkbank Klasse II (Heraeus, Hanau, HS 15)

Abzug (Waldner, Wangen, 1500)

Pipettierhilfe (Braun, Melsungen, Accujet)

Brutschrank (Heraeus, Hanau, 37 °C, 95% O₂, 5% CO₂)

Labofuge (Heraeus, Hanau, 400R)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Karlsruhe, G 560)

Wasserbad (GFL, Burgwedel, 37 °C)

150 cm² Zellkulturflasche (TPP, Tresadingen/Schweiz, 90151)

50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg)

Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen)

Trypanblau (Sigma, Seelze, Trypan Blue Solution 0,4%, T-8154)

10 ml Spritze (Dispomed, Gelnhausen, Ecoject)

Einmal-Injektionskanüle (Braun, Melsungen, Sterican Gr.1)

5 ml Küvetten (Wheaton/USA, v-vials)

Kollagenase XI (Sigma, Seelze, C9407)

Material zum Steril-Filtrieren der in mhMSC-Medium gelösten Kollagenase XI: 25 ml Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz), 50 ml Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg, Luer-Lok), Filter (Schleicher und Schuell, Düren, Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand FI 02)

1000 ml Spinner flask und Magnetrührer (Schott, Mainz)
Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, Axiovert 25)

2.2. Isolierung und Kultivierung von Zellen aus peripherem Nervengewebe

Die Isolierung und Kultivierung von Zellen aus peripherem Nervengewebe erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden:

Erste Methode:

Der bei einer Oberschenkelamputation gewonnene Nervus ischiadicus wurde in 1 mm große Stücke zerkleinert und mit in mhMSC-Medium gelöster Kollagenase XI für eine Stunde (bei 37 °C , 5% CO₂) verdaut. Anschließend wurden die Nervenstücke in 150 cm² Zellkulturflaschen mit mhMSC-Medium ausgesät. Nachdem Zellen herausgewachsen waren, wurden die Nervenstücke entfernt.

Die so gewonnenen adhärennten Zellen wurden mit Trypsin vom Boden abgelöst und in 75 cm² Zellkulturflaschen (je 1 Mio.) bzw. 2-Well Chamber Slides (20 000 pro Well) in mhMSC-Medium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.

Nach einer Woche wurde aus den Zellkulturflaschen die RNA isoliert (siehe 2.5.1.) und die Zellen in den Chamber Slides (ISC Bio Express, Kaysville/USA, Lab-Tek Chamber Slide, Permanox, 2-wells, 177429) fixiert (siehe 2.4.2.).

Zweite Methode:

Eine Explantatzellkultur vom Nervus thoracicus longus wurde uns freundlicherweise von Dr. S. Kall aus der Klinik für Plastische-, Hand- und Wiederherstellende Chirurgie der medizinischen Hochschule Hannover überlassen. Dort erfolgte die Zellisolierung nach der von Shen veröffentlichten Methode (Shen et al., 2001), mit der das extensive Auswachsen von Fibroblasten eingeschränkt werden kann.

Kultiviert wurden die Zellen in Melanocyte Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, MGM, C-24010). Der Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.

Wie bei der Zellkultur vom Nervus ischiadicus wurde nach einer Woche die RNA isoliert (siehe 2.5.1.) bzw. die Zellen fixiert (siehe 2.4.2.).

2.3. Differenzierung von hMSCs

hMSC (mhMSCs und bhMSCs) wurden im subkonfluenten Stadium mit 0,1% Trypsin/EDTA (5 ml/Flasche, 5 min) von der 150 cm² Zellkulturflasche abgelöst und im 50 ml Zentrifugenröhrchen 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Nach der Zellzählung in der Neubauer Zählkammer wurden 200 000 Zellen pro 75 cm² Zellkulturflasche (für RNA-Isolierung) bzw. 20 000 Zellen pro Well in Chamber Slides (für Immunhistochemie) mit mhMSC-Medium ausgesät und für 24 Stunden kultiviert.

Weitere Materialien:

Trypsin/EDTA 0,1% (PAA, Linz, L11-004)

75 cm² Zellkulturflasche (TPP, Tresadingen/Schweiz, 9076)

2.3.1. Differenzierung in Nervenzellen

Für die neurogene Differenzierung wurden die wie unter 2.3. ausgesäten Zellen zunächst für 24 Stunden in einem *neurogenen Prädifferenzierungsmedium* und anschließend für 6 Tage in einem *neurogenem Differenzierungsmedium* kultiviert (Woodbury et al., 2000).

Als Kontrollen dienten zum einen Zellen die für 24 Stunden (siehe 2.3.) vor der neurogenen Differenzierung und zum anderen Zellkulturen die über den Zeitraum der neurogenen Differenzierung (7 Tage) in mhMSC-Medium kultiviert wurden.

Neurogenes Prädifferenzierungsmedium:

DMEM (GIBCO BRL, Darmstadt, 41965-039), 20% FBS (GIBCO BRL, Darmstadt, 10270-106), 1 mM 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, 1.15433), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz/Österreich, P11-010)

Neurogenes Differenzierungsmedium:

DMEM (GIBCO BRL, Darmstadt, 41965-039), 10% FBS (GIBCO BRL, Darmstadt, 10270-106), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz/Österreich, P11-010), 2% DMSO: Dimethylsulfoxid (Appli Chem, Darmstadt, A 3672,0250), 200 µM BHA: Butylated Hydroxyanisole (Sigma, Seelze, B-1253), 25 mM KCl: Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe, 6781.1), 2 mM Valproat (Sigma, Seelze, P-6273), 10 µM Forskolin (Sigma, Seelze, F-6886), 1 µM Hydrocortison (Sigma, Seelze, H-8757), 5 µg/ml Insulin (Sigma, Seelze, I-6634)

2.3.2. Differenzierung in Schwann-Zellen

Die Differenzierung der ausgesäten hMSCs in Schwann-Zellen erfolgte für 6 Tage im Schwann-Zell-Differenzierungsmedium nach Lobsinger et al. (2001).

Als Negativkontrolle wurden hMSCs für 6 Tage in mhMSC-Medium kultiviert.

Schwann-Zell-Differenzierungsmedium:

DMEM (GIBCO BRL, Darmstadt, 41965-039), 10% FBS (GIBCO BRL, Darmstadt, 10270-106), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz/Österreich, P11-010), 20 µM Forskolin (Sigma, Seelze, F-6886)

2.4. Histologische und immunhistochemische Analysen

2.4.1. Kryoschnitte vom peripheren Nerven

Humane Nervenstücke des Nervus ischiadicus bzw. Nervus thoracicus longus wurden im Rahmen von Oberschenkelamputationen (Orthopädische Klinik, König-Ludwig-Haus, Universität Würzburg) und plastisch-chirurgischen Maßnahmen (Klinik für Plastische-, Hand- und Wiederherstellende Chirurgie, Medizinische Hochschule Hannover) gewonnen. Die Nervenstücke wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen 24 Stunden in Formalin (4%) und 24 Stunden in Saccharose (20%) gewaschen und in Probenbehältern mit Tissue-tek bei -20 °C eingefroren.

Am Kryostat wurden 12 µm dicke Quer- bzw. Längsschnitte angefertigt, auf Objektträger transferiert, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Material:

Formalin (Appli Chem, Darmstadt, A0823,2500)

Saccharose (Merck, Darmstadt, 1.07687.1000)

Probenbehälter (Hartenstein, Würzburg, Probenbehälter aus Polyäthylen PR10)

Tissue-tek (Sakura, Zoeterwoude/Holland, 4583)

Gefrierschrank (Bosch, Albstadt)

Kryostat (Microm, Walldorf, HM 500 0M)

Objektträger (Menzel, Braunschweig, Objektträger Super Frost)

2.4.2. Hämalaun-Eosin Färbung

Die Fixierung der in Chamber Slides ausgesäten Zellen bzw. der Nervenschnitte erfolgte für 10 Minuten in Aceton. Anschließend erfolgte die Färbung mit *Hämalaun nach Mayer* (10 min). Danach wurden die Zellen bzw. die Gewebeschnitte gespült (Aqua dest., 10 min unter fließendem warmen Leitungswasser, Aqua dest.), 1 min mit *Eosin* (1%) gegengefärbt, erneut gespült (Aqua dest.), in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 100%) entwässert und vor dem Eindecken mit Entelan zweimal je 5 min mit Xylol behandelt.

Material:

Aceton (Appli Chem, Darmstadt, CA 10)

Hämalaun nach Mayer: 1 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, 4302) in 1000 ml Aqua dest. gelöst, 0,2 g NaJO₃ (Sigma, Seelze, S4007), 50 g chemisch reines Kalialaun (Appli Chem, Darmstadt, Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat A 4396,1000), nach

Umrühren blauviolette Farbe, 50 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, 2425), 1g Zitronensäure (Merck, Darmstadt, 1.00244.1000), nach Umrühren rotviolette Farbe
Eosin G (Merck, Darmstadt, 15935)
Ethanol (Merck, Darmstadt, 1.00983.1000)
Xylol (Merck, Darmstadt, 1.08685.2500)
Entelan (Merck, Darmstadt, 1.07961.0100)
Deckgläser (Hartenstein, Würzburg)
Färbeküvetten aus Glas (Schott, Mainz)

2.4.3. Immunhistochemie

Die fixierten Zellen (s. 2.4.2.) wurden dreimal mit Tris-Puffer gewaschen und über Nacht mit dem gegen ein bestimmtes Zellantigen gerichteten *Primärantikörper* (Verdünnung mit BSA 0,5%) in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dreimal mit Tris-Puffer gewaschen, 30 min mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten *Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper* behandelt, erneut dreimal gewaschen und schließlich 30 min mit einem *Peroxidase-konjugierten Tertiärantikörper* inkubiert. Sekundär- bzw. Tertiärantikörper wurden 1:50 mit 30% humanem Frischplasma der Blutgruppe AB und 70% PBS verdünnt. Die jeweilige Inkubation erfolgte in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde dreimal mit Tris-Puffer gewaschen, die Objektträger in PBS gestellt, je 2 min mit den in Aqua dest. gelösten DAB Peroxidase Tabletten inkubiert und wieder zurück in PBS gestellt. Nach dreimaligen Waschen mit Aqua dest. wurde eine Kernfärbung mit *Hämalaun nach Mayer* durchgeführt (5 min Färbung, 15 min fließend wässern). Die Objektträger wurden in Aqua dest. gestellt und der Reihe nach mit verflüssigter Glycerol-Gelatine eingedeckt. Zusätzlich wurden Färbungen mit Serum gleichen Proteingehalts anstelle des Primärantikörperes als Negativkontrollen durchgeführt.

Material:

Primärantikörper :

Antikörper	Verdünnung
Rabbit anti-Neurofilament M (NF-M), 145 kD: polyklonal, IgG (Chemicon International Inc., Temecula/USA, AB1987)	1:100
Mouse anti-Neuron Specific Enolase (NSE): monoklonal, IgG (DPC Biermann, Bad Nauheim, BM151)	1:100
Mouse anti-Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP): monoklonal, IgG (Sigma, Seelze, G3893)	1:200
Rabbit anti-Tau: polyklonal, IgG (Chemicon International Inc., Temecula/USA, AB1512)	1:100
Rabbit anti-S-100: polyklonal, IgG (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle/U.K., NCL-S100p)	1: 80
Mouse anti-Peripheral-Myelin-Protein 22kD (PMP-22): monoklonal, IgM (Upstate Biotechnology, Biomol, Hamburg, 05-622)	1:500

Sekundär-/Tertiärantikörper (alle Peroxidase-konjugiert):

Antikörper
Goat anti-rabbit IgG (Caltag Laboratories, Wedel, L42007)
Rabbit anti-mouse IgG (DAKO, Hamburg, P0161)
Goat anti-mouse IgG/IgA/IgM (Rockland, Köln, 610-103-130)

Tris-Puffer: 6,057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris (Merck, Darmstadt, 1.08382.1000), 8,010 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, 1.06404.1000) ad 1 Liter Aqua dest., pH= 7,4

pH-Meter (MTW, Wesel, ino Lab)

Feuchte Kammer: Metallkiste mit Deckel, ausgelegt mit nassen Tüchern

Bovine Serum Albumin, BSA (0,5%) (Amersham, Freiburg, RPN 412)

3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Peroxidase Tabletten (Sigma, Seelze, Tablet Sets, DAB Peroxidase Substrat, D-4168)

Glycerol-Gelatine (Sigma, Seelze, GG-1)

2.4.4. Immunfluoreszenz

Nach der Fixierung (s. 2.5.2.) wurden die Objektträger dreimal fünf min mit PBS gewaschen und über Nacht mit dem Primärantikörper (Verdünnung in BSA 0,5%) in der feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurde erneut in PBS gewaschen (3x 5 min) und mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung mit PBS, lichtgeschützt) für eine Stunde behandelt (feuchte Kammer, Raumtemperatur). Anschließend wurde mit PBS gewaschen (3x 5 min) und in FITC-Guard Medium (Testog Inc. Department, A/05) eingedeckt.

Primärantikörper:

Rabbit anti-S-100 (s. 2.4.3.)

Mouse anti-Peripheral-Myelin-Protein 22 kD (s. 2.4.3.)

Sekundärantikörper: alle Fluorescein-Isothiozyanat (FITC)-konjugiert

Antikörper
Goat anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch , West-Grove/USA, 111-095-144)
Goat anti-Mouse IgM (Rockland, Köln, 610-1207)

Die Dokumentation der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Mikroskop (Axioskop, Zeiss) und Computer (Programme: Image Pro Plus, Chromophor Analysen Technik GmbH, Duisburg; Photoshop, Adobe, USA).

2.5. RNA-Isolierung und RT-PCR-Analysen

2.5.1. RNA-Isolierung

Die Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen und RNA wurde mit dem RNeasy Kit isoliert. Die Zellen wurden mit RLT-Puffer (1 ml) und 2-Mercaptoethanol (10 µl) lysiert, mit dem Zellschaber vom Boden der Flaschen abgelöst und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol 70% dazupipettiert,

mit der Pipette homogenisiert und jeweils 700 µl auf ein RNeasy Säulchen im 2 ml Sammelröhrchen überführt und zentrifugiert (15 s, 10 000 U/min). Das Zentrifugat wurde abgekippt und der letzte Schritt so oft wiederholt bis sich die komplette RNA auf dem Säulchen befand. Das Säulchen wurde mit 700 µl RW1-Puffer durch Zentrifugieren (15 s, 10 000 U/min) gewaschen, auf ein neues 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und mit 500 µl RPE-Puffer (15 s, 10 000 U/min) gewaschen. Es wurde erneut 500 µl RPE-Puffer auf das Säulchen pipettiert und dessen Gelmembran durch zweimaliges Zentrifugieren (2 min, dann 1 min bei maximaler Geschwindigkeit) getrocknet. Zum Eluieren wurde das Säulchen auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, 40 µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy-Gelmembran pipettiert und 1 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Abschließend wurde die Menge der eluierten RNA im Photometer gemessen.

Material:

RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, 74106): RLT-Puffer, RNeasy Säulchen, 2 ml Sammelröhrchen, RW1-Puffer, RPE-Puffer, RNase-freies Wasser

2 Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, 1.15433)

Zellschaber (TPP, Tresadingen/Schweiz, 24 cm, 9902)

15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg)

Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, 1,5 ml)

Ethanol (Merck, Darmstadt, 1.00983.1000)

Photometer (Eppendorf, Hamburg, Bio Photometer 6131)

Tischzentrifuge (Heraeus, Hanau, Biofuge pico)

2.5.2. cDNA-Synthese

Es wurden stets gleiche RNA-Mengen (500 ng) eingesetzt. Die RNA wurde jeweils auf 13 µl mit RNase-freiem Wasser im 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis verdünnt. Zu jeder Probe wurde 1 µl Oligo dT pipettiert, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Unterdessen wurde ein Master-Mix aus 5x-Puffer (4 µl pro Probe), dNTP-Mix (1µl pro Probe) und Reverse Transkriptase RT (1µl pro Probe) angefertigt,

gevoertext und anschließend jeweils 6 µl der Mischung auf die anzentrifugierten Proben pipettiert. Diese wurden eine Stunde bei 42°C inkubiert und die synthetisierte cDNA schließlich mit je 30 µl sterilem Aqua dest. verdünnt.

Material:

Oligo dT (Promega, Mannheim, 500µg/ml, C110A)

5x-Puffer (Promega, Mannheim, M-MLV RT 5x Buffer M531A)

dNTP-Mix (Promega, Mannheim, PCR Nucleotide Mix 10mM, C1145)

Reverse Transkriptase, RT (Promega, Mannheim, M-MLV RT RNase H(-)Point Mutant, M 368C)

Heizblock (Grant Boeckel BBA)

2.5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung der RT-PCR wurden 1 µl cDNA (bei Nestin 2 µl), Master-Mix (1 µl dNTP-Mix, 3 µl 10x- PCR-Puffer, 2,5 Units Taq DNA Polymerase, 22,5 µl bzw. bei Nestin 21,5 µl steriles Aqua dest.) und 2 µl Primer-Mix in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend die jeweiligen Genabschnitte bei entsprechenden Bedingungen im PCR-Cycler vervielfältigt.

Die Proben wurden bei 94°C 3 min denaturiert, gefolgt von 22-40 Zyklen (Aktin 22 Zyklen, EF 1a 22 Zyklen, Nestin 40 Zyklen, NSE 35 Zyklen, NF-M 40 Zyklen, GFAP 40 Zyklen, MPZ 40 Zyklen, PMP 22 40 Zyklen) mit 94°C 1 min (Denaturierung), 1 min Annealing (Aktin 54°C, EF 1a 54°C, Nestin 57°C, NSE 55°C, NF-M 56°C, GFAP 53°C, MPZ 53°C, PMP 22 53°C) und 1 min 72°C (Extension). Abschließend folgten 5 min bei 72°C und Abkühlung auf 4°C. Zyklenzahl und Annealing-Temperatur wurden für jedes Primerpaar separat ausgetestet, um die höchstmögliche Sensitivität und Spezifität der Reaktion zu erreichen.

Verwendete Primer (alle von MWG-Biotech AG, Ebersberg):

Gen	Primersequenz: sense/antisense	Produktgröße (bp)	Pos-Pos	Datenbank-eintrag
<i>Interne Kontrolle</i>				
Aktin	5' - CGGGAATCGTGCGTGACAT - 3' 5' - GAACTTTGGGGGATGCTCGC - 3'	711	689-708 1400-1381	NM_001101
EF 1a	5' - AGGTGATTATCCTGAACCATCC - 3' 5' - AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC - 3'	234	1077-1098 1311-1290	BC018641
<i>Stammzell-Marker</i>				
Nestin	5' - GAGAGGGAGGACAAAGTCCC - 3' 5' - TCCCTCAGAGACTAGCGCAT - 3'	197	4513-4532 4710-4691	X65964
<i>Neurogene Marker</i>				
NSE	5' - CCCAGAACTTCCCTGATTGA - 3' 5' - AAGTGAAGACACGTGGGAC - 3'	295	1634-1653 1929-1910	NM_001975
NF-M	5' - AAGGAAGTAACCCAGAGTGACTAAG - 3' 5' - ATTGCAAAGTGTGCATGTCAACGAG - 3'	445	2728-2752 3173-3149	NM_005382
GFAP	5' - CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT - 3' 5' - TCATCGCTCAGGAGGTCCTT - 3'	382	1678-1698 2060-2041	NM_002055
<i>Myelin-Marker</i>				
MPZ	5' - ATCCTCTGCCCTTACACCCATGAC - 3' 5' - CACTCCCTGACCTATGAGGATCC - 3'	229	1258-1281 1487-1465	NM_000530
PMP 22	5' - GCTTGTGGCATTGGCATACTTG - 3' 5' - GAAAATGTGGGAGTGATGAAGG - 3'	295	1280-1301 1575-1555	NM_000304

Material:

0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit Deckel (Hartenstein, Würzburg, RK 02)

Master-Mix: dNTP-Mix (s. 2.5.2.), 10x PCR-Puffer (Amersham, Freiburg, 10x Konzentrat), Taq DNA Polymerase (Amersham, Freiburg, Cloned for PCR, 5 U/μl), Aqua dest.

Primer-Mix: Die jeweiligen sense- und antisense-Primer (Lösungsvolumen: 1000 pmol/μl) wurden im Verhältnis 1:1:8 mit Aqua dest. verdünnt.

PCR-Cycler (Biozym, Hessisch Oldendorf, MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Multi Cycler)

2.5.4. Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte (15 µl) wurden nach Zugabe von DNA loading buffer 10x (1,5 µl) im Agarosegel (1%) in der Gelelektrophoresekammer bei 130 V nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ein externer Marker (5 µl eines 100 bp Markers) diente zur Kontrolle. Anschließend erfolgte die densitometrische Auswertung und Photodokumentation.

Material:

DNA loading buffer 10x: 30% Glycerol 3 ml, 0,1M EDTA pH = 8,0 2 ml, 1% SDS 1ml, 0,25% Bromphenolblau 5 mg, 0,25% Xylene Cyanol 5 mg, Aqua dest. 4 ml

Agarosegel (1%): 1 g Agarose (Roth, Karlsruhe, Agarose GTQ 6352.4), 100ml TBE-Puffer (s. unten), 5 µl Ethidiumbromid (GIBCO BRL, Darmstadt, Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, 15585-011) wurden in der Mikrowelle (Panasonic 800 W) erhitzt, in die Gelelektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe, MIDI Horizontale Gelelektrophoresekammer mit Kamm) gegossen und dort 30 min getrocknet.

TBE-Puffer: 108 g Trisbase (Merck, Darmstadt, Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1.08382.1000), 55 g Borsäure (Merck, Darmstadt, 1.00165.1000), 40 ml EDTA 0,5 M (Fluka, Deisenhofen, 03700) pH = 8,0, ad 1000 ml Aqua dest.

100 bp Marker (Peqlab, Erlangen, 100bp DNA-Leiter Plus 25-2020)

Consort Electrophoresis power supply (Sigma, Seelze, , E 835, 230 V, 50/60 Hz)

Densitometer (LTF, Wasserburg, Darkroom with camera support for table, Programm: Biocapture)

Computerprogramm: Photoshop (Adobe, USA)

2.5.5. Sequenzierung

Zur Kontrolle der Identität der PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierung entweder direkt aus dem PCR-Produkt oder aus der eluierten Bande.

Die *Gelelution* erfolgte mit Hilfe eines Gel Elutions-Kits: Die Bande wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 60 μ l Gelauflösepuffer mindestens 20 min bei 50°C inkubiert (alle 3 Minuten wurde gemischt, um die Gelauflösung zu gewährleisten). Anschließend wurde der Ansatz in ein Zentrifugensäulchen im 2 ml Waschgefäß pipettiert und 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein neues 2 ml Waschgefäß überführt, mit 700 μ l Waschpuffer L2 beladen, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde erneut 1 min zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde das Zentrifugensäulchen in ein 1,5 ml Auffanggefäß überführt, direkt in die Mitte des Säulchens 50 μ l warmer TE-Puffer aufgetragen, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 2 min bei 13 000 U/min zentrifugiert.

Material:

Gel Elutions-Kit (Quiagen, Hilden, MiniElute Gel Extraction Kit, 28606): Zentrifugationssäulchen, 2 ml Waschgefäß, 1,5 ml Auffanggefäß, Gelauflösepuffer L1, Waschpuffer L2, TE-Puffer

Die DNA aus Geleluat bzw. PCR-Produkt wurde zunächst auf Auto seq-Säulchen mit Waschgefäß pipettiert und durch Zentrifugieren (3 min, 6 000 U/min) gereinigt. Anschließend erfolgte der PCR-Ansatz aus gereinigter DNA (11 μ l), Enzymmix (8 μ l) und dem entsprechenden sense- oder antisense-Primer (1 μ l). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 3 min (Denaturierung), 25 Zyklen bei 94°C für 30 sek (Denaturierung), 50°C für 1 min (Annealing), 60°C für 1 min (Extension); abschließend 72 °C für 5 min und Abkühlung auf 4°C.

Das neue PCR-Produkt wurde mit Hilfe von Auto seq-Säulchen gereinigt (s. oben). Zur gereinigten Probe wurden 8,1 μ l 3M Na-acetat pH=4,6, 60 μ l Aqua dest. und 220 μ l Ethanol (100%) pipettiert, gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 13 000 U/min), der Überstand abgekippt und in der Speed vac 10 min getrocknet. Die „trockene“ Probe wurde in 25 μ l TSR-Puffer aufgenommen, in 0,5 ml Zentrifugenröhrchen mit Deckel überführt, 3 min bei 94 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Nach der erfolgten Sequenzierung wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Internet-Datenbank von NCBI ausgewertet bzw. kontrolliert.

Material:

Auto seq-Säulchen (Amersham, Freiburg, Auto Seq G-50, 27 5340-03)

Waschgefäß (Hartenstein, 2 ml Reaktionsgefäß ohne Deckel RK20)

Enzymmix (Applied Biosystems, Darmstadt, Big Dye Terminator, Cycle Sequencing, Ready Reaction, 4303152)

3M Na-acetat pH 4,6: 49,22 g Na-acetat, wasserfrei (Merck, Darmstadt, 6268) in 200 ml Aqua dest. lösen, pH 4,6 mit Essigsäure (Merck, Darmstadt, 2500) einstellen

Speed vac (Savant Instruments Inc., Farmingdale/USA, SC 110)

0,5 ml Zentrifugenröhrchen (Applied Biosystems, Darmstadt, ABI PRISM Genetic Analyzer 0,5 ml Sample Tubes, 401957) mit Deckel (Applied Biosystems, Darmstadt, ABI PRISM Genetic Analyzer Septa for 0,5 ml Sample Tubes, 401956)

Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, 310 Genetic Analyzer; Programm: ABI PRISM 310 Collection)

Internet-Datenbank von NCBI (www.ncbi.com)

2.6. FACS-Analysen von hMSCs

Die bis zu einer Konfluenz von 80% expandierten und noch unpassagierten mhMSCs bzw. bhMSCs wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in 50 ml Tubes bei 1400 U/min 5 min zentrifugiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Für jede Probe wurden ca. 500 000 Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 2 min bei 2 000 U/min zentrifugiert und anschließend in 50 µl PBS für 20 min mit dem Anti-körper (5 µl CD133) im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS (500 µl) gewaschen, in 500 µl PBS aufgenommen und in FACS-Reagenzröhrchen pipettiert. Die FACS-Analysen erfolgten in Kooperation mit Professor Dr. med. Tony, Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg.

Material:

Antikörper: CD133 Fluorescein Isothiocyanat, FITC (R&D Systems, Wiesbaden, FAB1133F)

FACS-Reagenzröhrchen (Hartenstein, Würzburg, Reagenzröhrchen aus Polystyrol REO 3)

FACS-Gerät (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Heidelberg)

3. Ergebnisse

3.1. Differenzierung von hMSCs in Nervenzellen

3.1.1. Morphologie

Die für 24 Stunden im mhMSC-Medium kultivierten undifferenzierten mhMSCs bzw. bhMSCs zeigten die für mesenchymale Stammzellen typische, Fibroblasten-ähnliche Morphologie (Abb. 3A und D). Nach etwa acht Tagen erreichten sie ein konfluentes Stadium (Abb. 3B und E). Im Verlauf der neurogenen Differenzierung zeigten beide Zelltypen eine deutliche Reduktion der Proliferation und erreichten im Vergleich zu undifferenzierten Zellen nach acht Tagen keine Konfluenz (Abb. 3C und F). Weiterhin fand eine Veränderung der Zellmorphologie statt. Die meisten Zellen erschienen kleiner und hatten typischerweise lange Fortsätze (bi-, multipolar), die sich teilweise mehrfach verzweigten (Abb. 4A-D). Der Zellkörper wurde zunehmend sphärisch und „refraktiv“; zum Teil fand sich v.a. perinukleär scholliges Zytoplasma, welches an die für Nervenzellen charakteristische Nissl-Substanz erinnerte. Einige Zellen behielten ihre Stammzell-ähnliche Morphologie.

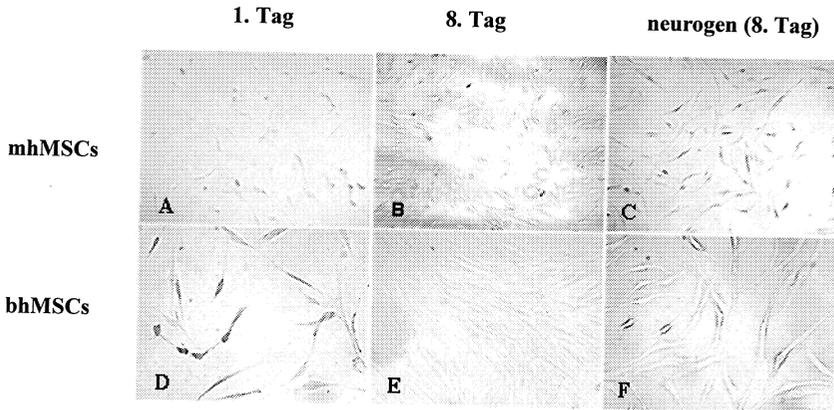


Abb. 3: Representative phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Morphologie von undifferenzierten und neurogen differenzierten mhMSCs bzw. bhMSCs. Undifferenzierte mhMSCs (A) bzw. bhMSCs (D), die subkonfluent ausgesät und für einen Tag kultiviert worden waren, zeigten eine homogene Fibroblasten-ähnliche Morphologie. Die über den Zeitraum der neurogenen Differenzierung in mhMSC-Medium (8. Tag) kultivierten mhMSCs (B) bzw. bhMSCs (E) erreichten ein konfluentes Stadium. Neurogen differenzierte mhMSCs (C) bzw. bhMSCs (F) erreichten nach acht Tagen keine Konfluenz. A-C in 20-, D-F in 10-facher Vergrößerung.

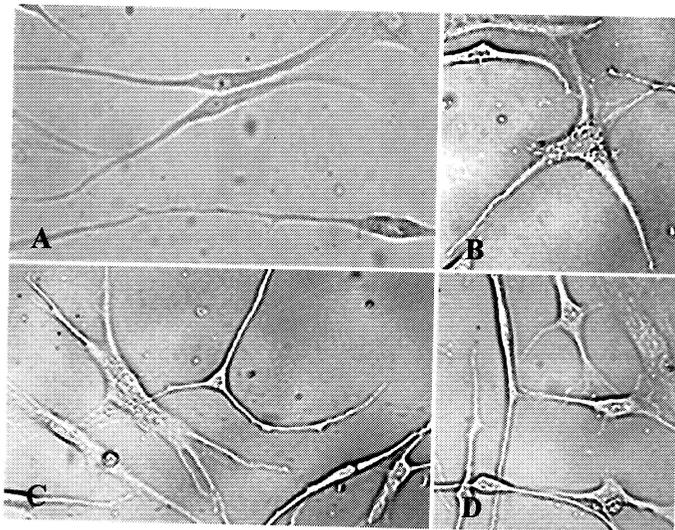


Abb. 4: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von neurogen differenzierten bhMSCs in 20-facher Vergrößerung. Typische Neuronen-ähnliche bi- (A) bzw. multipolare (B, C) Zellen mit zum Teil scholligem Zytoplasma (B, C) und langen interagierenden Zellfortsätzen (D).

3.1.2. Immunhistochemie

Zur Beurteilung der Expression neurogener Marker auf Protein-Ebene wurden hMSCs von vier Patienten verwendet. Es wurden jeweils mhMSCs und bhMSCs isoliert und anschließend wie beschrieben sechs Tage neurogen differenziert. Als undifferenzierte Zellen dienten stets die für 24 Stunden im mhMSC-Medium ausgesäten hMSCs. Für jeden Primärantikörper wurde zunächst die optimale Konzentration ermittelt.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten keinen Effekt der Differenzierung auf die Expression des neurogenen Markers NF-M. Bei sechs Differenzierungen exprimierten bereits die undifferenzierten hMSCs (3x mhMSCs, 3x bhMSCs) NF-M; nach der sechstägigen Differenzierung war keine weitere Expressionszunahme erkennbar (Abb. 5A, B, G und H). Bei zwei Differenzierungen (1x mhMSCs, 1x bhMSCs) war die Färbung vor und nach der Differenzierung negativ.

Die Differenzierung hatte außerdem keinen reproduzierbaren Effekt auf die Expression des Astrozytenmarkers GFAP. Zweimal waren die mhMSCs, einmal die bhMSCs vor und nach der Differenzierung negativ. Dreimal waren die bhMSCs vor und nach der Differenzierung positiv. Bei einer der Differenzierungen fand sich dagegen eine Expressionsabnahme (mhMSCs); bei einer anderen eine Zunahme von GFAP nach der Differenzierung (mhMSCs). Da anhand dieser Untersuchungen sowohl für undifferenzierte als auch für neurogen differenzierte Stammzellen keine einheitliche, reproduzierbaren Aussagen über die Expression von GFAP gemacht werden können, wurde auf eine Abbildung der Immunhistochemie verzichtet.

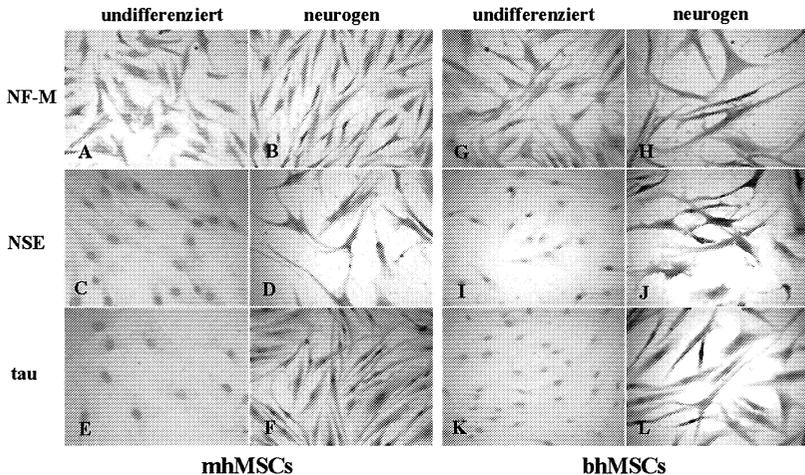


Abb. 5: Representative Darstellung immunohistochemischer Untersuchungen: NF-M-positive undifferenzierte (A, G) bzw. differenzierte (B, H) mhMSCs bzw. bhMSCs; NSE-negative undifferenzierte (C, I) bzw. NSE-positive differenzierte (D, J) mhMSCs bzw. bhMSCs; tau-negative undifferenzierte (E, K) bzw. tau-positive differenzierte (F, L) mhMSCs bzw. bhMSCs. 20-fache Vergrößerung.

Es zeigte sich jedoch immer eine Expressionszunahme des neurogenen Markers NSE (Abb. 5C, D, I und J). Siebenmal wurde NSE bereits von den undifferenzierten hMSCs (4x bhMSCs, 3x mhMSCs) leicht exprimiert; einmal fand sich keine Expression (mhMSCs) vor der Differenzierung. Nach der Differenzierung zeigten mhMSCs und bhMSCs immer eine Zunahme der Expression von NSE; besonders stark färbte sich der Zellkörper von Zellen mit typischer neuronaler Morphologie (Abb. 5D und J).

Außerdem fand sich bei sieben von acht Differenzierungen (4x mhMSCs, 3x bhMSCs) eine starke Expressionszunahme des neurogenen Markers tau (microtubule associated protein T, MAPT) (Abb. 5E, F, K und L), der bei den undifferenzierten hMSCs nur leicht (3x bhMSCs, 2x mhMSCs) oder gar nicht (2x mhMSCs) exprimiert wurde. Nach der neuronalen Differenzierung waren sowohl die Zellkörper als auch die Fortsätze der Zellen stärker gefärbt. Bei einer bhMSC-Isolierung fand sich vor und nach der Differenzierung keine Expression von tau auf Protein-Ebene.

3.1.3. RT-PCR-Analysen

Zur Genexpressionsanalyse dienten undifferenzierte und differenzierte mhMSCs bzw. bhMSCs von fünf Patienten.

Für die beiden Kontrollgruppen (siehe 2.3.1.) erfolgte die RNA-Isolierung der undifferenzierten mhMSCs bzw. bhMSCs sowohl nach 24 Stunden als auch nach einer Kultivierung von insgesamt 8 Tagen im mhMSC-Medium. Im Vergleich der unterschiedlich lange im mhMSC-Medium kultivierten mhMSCs bzw. bhMSCs zeigte sich kein Unterschied in der Expression der verwendeten Marker (Nestin, NSE, NF-M, GFAP) nach 24 Stunden bzw. nach 7 Tagen auf der RNA-Ebene.

Bei neun von zehn Differenzierungen (4x mhMSCs, 5x bhMSCs) zeigte sich eine Zunahme des bei den undifferenzierten hMSCs nur leicht exprimierten neurogenen Differenzierungsmarkers NSE (Abb. 6). Lediglich bei einer Differenzierung (mhMSCs) fand sich vor und nach der neurogenen Differenzierung eine gleichbleibende NSE-Expression.

Bei sechs Differenzierungen (3x mhMSCs, 3x bhMSCs) fand sich eine Expressionsabnahme von NF-M. Dagegen fand sich bei vier weiteren Differenzierungen (2x mhMSCs, 2x bhMSCs,) eine gleichbleibende NF-M Expression (Abb. 6).

Die neurogene Differenzierung zeigte keinen reproduzierbaren Effekt auf die Genexpression von GFAP. Einmal fand sich vor und nach der Differenzierung keine Expression (bhMSCs), dreimal eine gleichbleibende Expression (1x mhMSCs, 2x bhMSCs) (Abb. 6), dreimal eine Zunahme (2x mhMSCs, 1x bhMSCs) und dreimal eine Abnahme (2x mhMSCs, 1x bhMSCs).

Eine Expressionsabnahme des ZNS-Stammzellmarkers Nestin nach der Differenzierung fand sich zweimal bei den bhMSCs. Hier zeigten die jeweiligen undifferenzierten bhMSCs sehr schwache Banden, die nach der Differenzierung nicht mehr detektierbar waren. Bei den restlichen Differenzierungen (5x mhMSCs, 3x bhMSCs) fand sich sowohl bei den undifferenzierten als auch bei den differenzierten hMSCs keine Expression von Nestin, weshalb auf eine Abbildung verzichtet wurde.

Das „housekeeping“-Gen Aktin diente als interne Kontrolle.

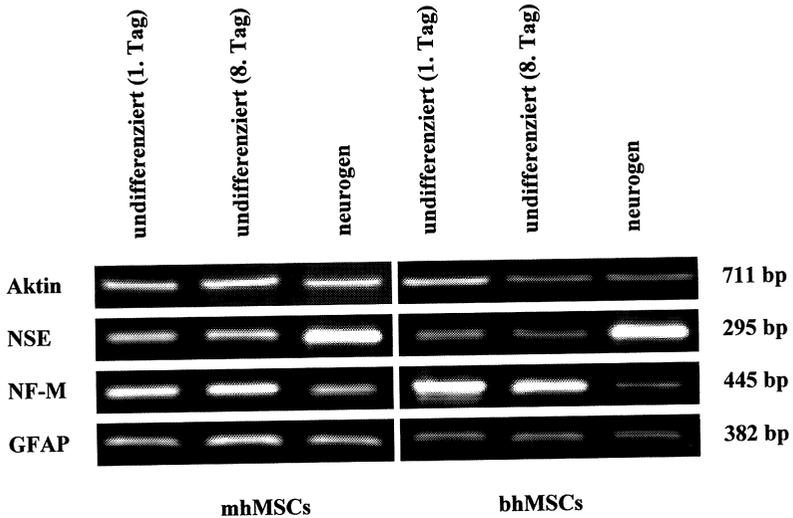


Abb. 6: Typisches Genexpressionsmuster von mhMSCs und bhMSCs vor und nach neurogener Differenzierung: Der Vergleich von undifferenzierten (nach einem bzw. nach 8 Tagen) und neurogen differenzierter mhMSCs bzw. bhMSCs zeigte eine Expressionszunahme von NSE, eine Expressionsabnahme von NF-M und eine gleichbleibende Expression von GFAP vor und nach der Differenzierung. Das „housekeeping“-Gen Aktin diente als Kontrolle.

3.1.4. FACS-Analysen von undifferenzierten hMSCs

Zur FACS-Analyse dienten undifferenzierte, unpassagierte mhMSCs und bhMSCs von drei Patienten. Berechnet wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Messungen.

Die Analysen zeigten, dass mhMSCs zu 99,18% (Standardabweichung 0,27) und bhMSCs zu 98,96% (Standardabweichung 0,06) negativ für das von neurogenen Stammzellen exprimierte Oberflächenantigen CD133 sind (Abb. 7).

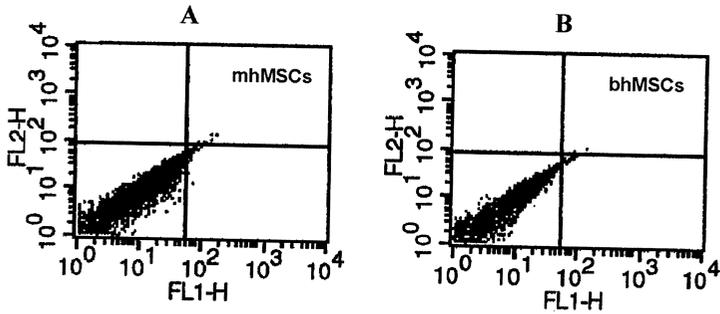


Abb. 7: FACS-Analysen von undifferenzierten, unpassagierten mhMSCs (A) und bhMSCs (B).

3.2. Histologie vom peripheren Nerven

Zur Darstellung der Morphologie wurde von den 12 μm dicken Längs- und Querschnitten des Nervus ischiadicus bzw. Nervus thoracicus longus zunächst eine Hämalaun-Eosin Färbung angefertigt (Abb. 8).

Die mit dem Schwann-Zell-Marker S 100 durchgeführte Immunfluoreszenz färbte das charakteristischerweise um die einzelnen Axone liegende Zytoplasma der Schwann-Zellen (Abb. 9).

Mit Hilfe des Myelin-Markers PMP 22 konnten in der Immunhistochemie selektiv die von den Schwann-Zellen gebildeten Myelinscheiden einzelner Axone sichtbar gemacht werden (Abb.10).

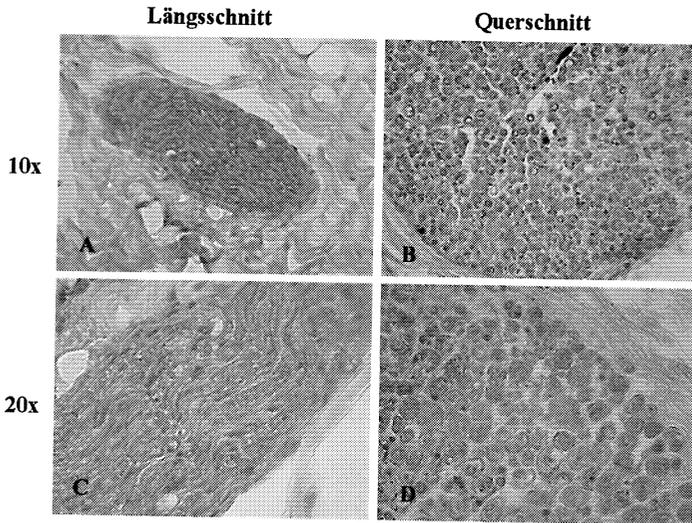


Abb. 8: Hämalaun-Eosin Färbung zur Darstellung der Morphologie eines peripheren Nerven im Längs- (A, C) und Querschnitt (B, D) in 10- (A, B) bzw. 20-facher (C, D) Vergrößerung.

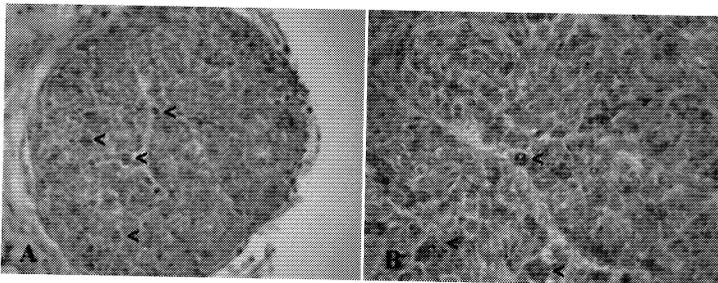


Abb. 9: Immunhistochemie eines peripheren Nerven im Querschnitt: Darstellung von Myelinscheiden (<) einzelner Axone mit PMP 22 in 10- (A) bzw. 20-facher (B) Vergrößerung.

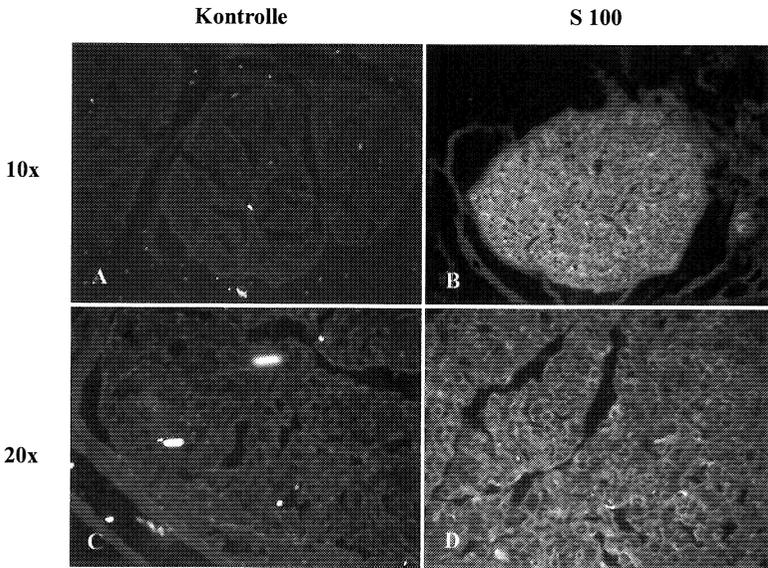


Abb. 10: Immunfluoreszenz eines peripheren Nerven im Querschnitt in 10- (A, B) bzw. 20-facher (C, D) Vergrößerung; Darstellung der um die einzelnen Axone liegenden Schwann-Zellen (B, D) durch S 100; links (A, C) die entsprechenden Negativkontrollen (ohne Primärantikörper).

3.3. Zellkultur vom peripheren Nerven

3.3.1. Morphologie

Die aus dem peripheren Nerven herausgewachsenen Zellen bildeten mit ihren zahlreichen langen Fortsätzen ein regelrechtes Netzwerk. Es fanden sich bipolare, spindelförmige Zellen mit zwei von einem „refraktiven“ ovalären Zellkörper ausgehenden langen Fortsätzen. Andere Zellen dagegen waren multipolar mit mehreren (3-6) Zellfortsätzen (Abb. 11).

Mit Hilfe der zweiten Isolierungsmethode konnte das extensive Fibroblastenwachstum gegenüber der ersten Isolierung vom N. ischiadicus eingeschränkt werden. Dennoch zeigten sich auch bei der Zellisolierung aus dem N. thoracicus longus einzelne große, flache fibroblastäre Zellen.

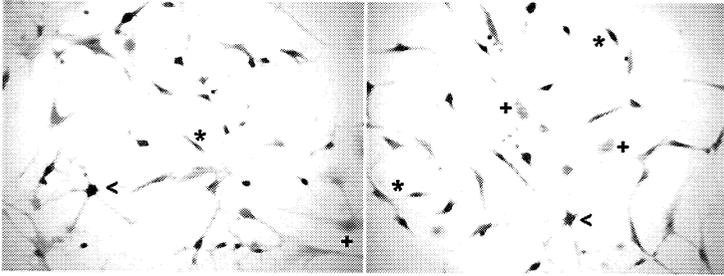


Abb. 11: Hämalaun-Eosin Färbung zur Darstellung der Morphologie von aus dem Nervus thoracicus longus herausgewachsenen Zellen, 20-fache Vergrößerung: bipolare Zellen (*) und multipolare Zellen (<) bilden mit ihren Fortsätzen ein Netzwerk; vereinzelt finden sich große, flache Fibroblasten (+).

3.3.2. Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz zeigten die isolierten Zellen keine Expression des peripheren Myelinproteins 22 (nicht dargestellt). Die fortsatzreichen Zellen färbten sich jedoch kräftig mit dem Schwann-Zell-Marker S 100. Die Fibroblasten dagegen blieben ungefärbt (Abb.12).

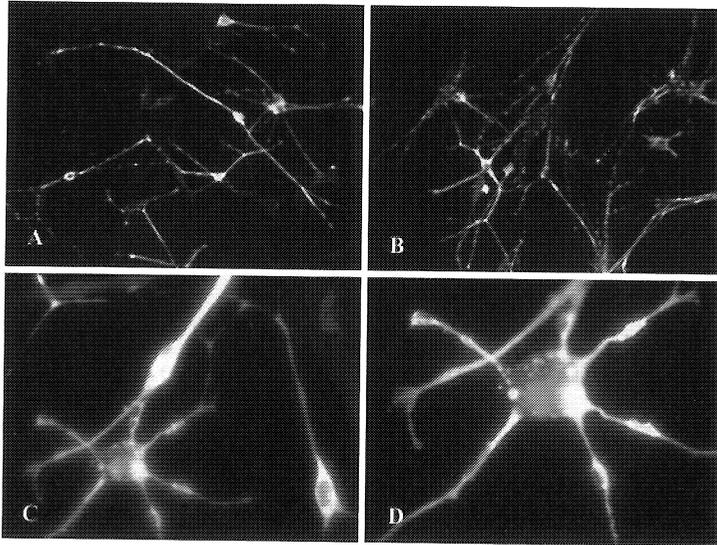


Abb. 12: Immunfluoreszenz, S 100: Zellen aus dem Nervus thoracicus longus in 20- (A, B), 63- (C) und 100-facher (D) Vergrößerung exprimierten den Schwann-Zell-Marker S 100.

3.3.3. RT-PCR

Sowohl die aus dem Nervus ischiadicus als auch die aus dem Nervus thoracicus longus isolierten Zellen zeigten neben einer starke Expression von PMP 22 kräftige Banden für MPZ (Myelin Protein Zero), dem Hauptprotein des kompakten Myelin (Abb. 13).

3.4. Differenzierung von hMSCs in Schwann-Zellen

3.4.1. Morphologie

Die für sechs Tage im Schwann-Zell-Differenzierungsmedium kultivierten Zellen proliferierten langsamer als die während dieser Zeit mit mhMSC-Medium behandelten Zellen. Die differenzierten hMSCs waren im Gegensatz zu den undifferenzierten

flachen Fibroblasten-ähnlichen Stammzellen meist spindelförmig und zeigten eine für Schwann-Zellen typische fischzugartige Ausrichtung.

3.4.2. Immunhistochemie

Zur Beurteilung der Expression von Schwann-Zell-Markern auf Protein-Ebene dienten mhMSCs bzw. bhMSCs von vier Patienten, die wie beschrieben sechs Tage mit dem Schwann-Zell-Differenzierungsmedium behandelt wurden. Die als Kontrolle dienenden undifferenzierten Zellen wurden während dieser Zeit im mhMSC-Medium kultiviert.

Bei allen Differenzierungen fand sich sowohl bei den undifferenzierten als auch bei den differenzierten mhMSCs bzw. bhMSCs keine Expression von PMP 22 (Abb. 13).

Dagegen zeigte sich bei vier Differenzierungen (2x mhMSCs, 2x bhMSCs) eine kräftige Expressionszunahme des Schwann-Zell-Markers S 100 (Abb. 14). Die Färbungen der undifferenzierten Zellen waren zweimal negativ und zweimal leicht positiv. Die differenzierten Zellen färbten sich besonders stark.

Bei vier weiteren Differenzierungen fand sich keine Expression von S 100 bei undifferenzierten und differenzierten Zellen (nicht dargestellt).

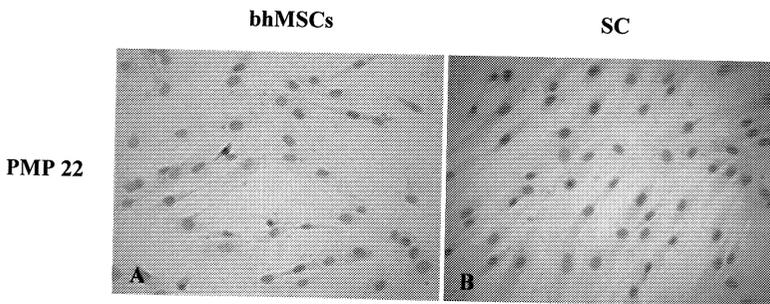


Abb. 13: Representative Darstellung der Immunhistochemie (20-fache Vergrößerung): bhMSCs vor (A) und nach (B) der Differenzierung zeigten keine Expression von PMP 22.

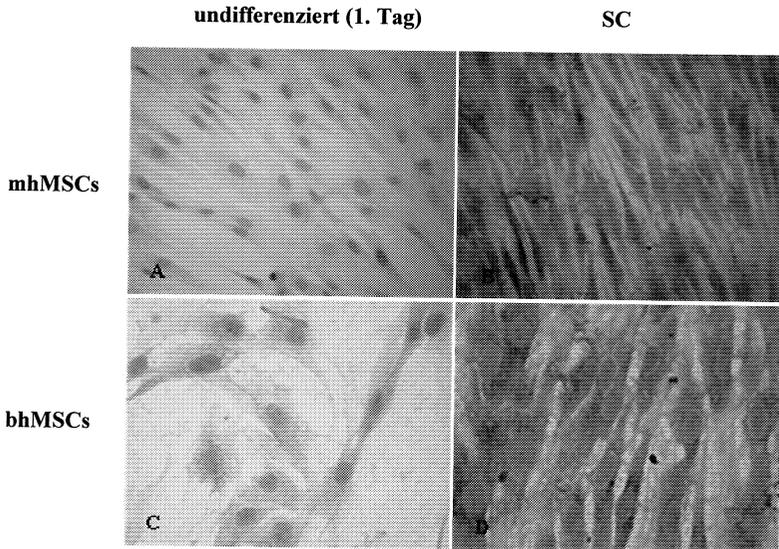


Abb. 14: Representative Darstellung der Immunhistochemie: differenzierte mhMSCs (B) bzw. bhMSCs (D) zeigten eine Expressionszunahme von S 100 gegenüber den undifferenzierten mhMSCs (A) bzw. bhMSCs (C). Differenzierte Zellen zeigten eine für Schwann-Zellen typische fischzugartige Ausrichtung (B, D). A, B in 10- C, D in 20-facher Vergrößerung.

3.4.3. RT-PCR

Zur Genexpressionsanalyse dienten undifferenzierte (sechs Tage mhMSC-Medium) und differenzierte (sechs Tage Schwann-Zell-Differenzierungsmedium) hMSCs. MhMSCs wurden von sieben Patienten und bhMSCs von vier dieser sieben Patienten isoliert.

Es zeigte sich bei neun der elf Differenzierungen (6x mhMSCs, 3x bhMSCs) eine starke Expressionszunahme (Abb. 15) des von den undifferenzierten Zellen nur schwach exprimierten peripheren Myelinprotein 22. Lediglich bei zwei Differenzierungen (1x mhMSCs, 1x bhMSCs) fanden sich bei differenzierten und undifferenzierten Zellen gleich starke Banden für PMP 22.

Auch bei der Expression von MPZ konnte in den meisten Fällen (5x mhMSCs, 1x bhMSCs) nach der Differenzierung eine Zunahme des bei den undifferenzierten Zellen ebenfalls nur sehr schwach exprimierten Markers festgestellt werden (Abb. 15). Dagegen fand sich bei den undifferenzierten Zellen keine Expression von MPZ (2x mhMSCs, 3x bhMSCs), waren auch die differenzierten Zellen negativ.

Das „housekeeping“-Gen Aktin diene als Kontrolle.

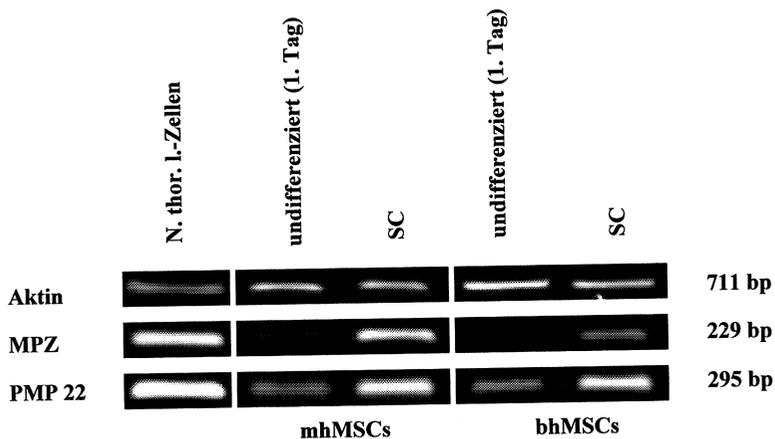


Abb. 15: RT-PCR: Vom Nervus thoracicus longus isolierte Zellen exprimieren die Myelinmarker MPZ und PMP 22. Der Vergleich von undifferenzierte (1. Tag) und differenzierter mhMSCs bzw. bhMSCs (SC) zeigte eine Expressionszunahme von MPZ und PMP 22 nach der Differenzierung. Das „housekeeping“-Gen Aktin diene als Kontrolle.

4. Diskussion

4.1. Methodische Überlegungen

Die Isolierung der hMSCs erfolgte wie bereits erwähnt nach mehrfach beschriebenen Protokollen. MhMSCs wurden aus Knochenmarkaspiraten und Hüftköpfen nach dem Kriterium der Adhärenz in der Zellkulturflasche aus Plastik gewonnen (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999). Untersuchungen von Lodie et al. (2002) konnten zeigen, dass zwischen unterschiedlich isolierten mhMSCs (Kultivierung adhärenter Zellen, „Magnetic Bead“ selection mit CD105+, CD45- oder GlyA-) kein Unterschied hinsichtlich Morphologie, Expansionsfähigkeit in vitro, Oberflächenantigenexpression und Differenzierungspotential besteht. Die bhMSC-Explantatzellkulturen wurden anschließend aus dem trabekulären Knochen der Hüftköpfe wie unter 2.1.3 beschrieben

gewonnen (Robey und Termine, 1985; Sinha et al., 1994). Um mögliche Einflussfaktoren zu minimieren, wurden mhMSCs und bhMSCs stets von den selben Patienten isoliert. Außerdem litt keiner der Patienten an Osteoporose oder avaskulärer Nekrose und alle waren jünger als 60 Jahre. Dennoch kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Varianz des Patientenalters (zwischen 8 und 54 Jahren) nicht ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass der Prozentsatz von mhMSCs im Knochenmark im Laufe des Alters sinkt (Caplan et al.; 1997). Eigene Beobachtungen zeigten auch eine wesentlich geringere Proliferationsrate von Zellen älterer Patienten. Weiterhin könnte sich das Alter auch auf die Genexpression und das Differenzierungspotential von hMSCs auswirken. Hierzu liegen jedoch widersprüchliche Studien vor.

MhMSCs wurden für 10 Tage im mhMSC-Medium, einem Wachstumsmedium mit 10% FCS, L-Ascorbat-2-Phosphat und Penicillin/Streptomycin zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination, bis zu einem subkonfluentem Stadium kultiviert. BhMSCs wurden zunächst im bhMSC-Medium kultiviert, welches sich vom mhMSC-Medium durch einen niedrigeren Calciumgehalt unterscheidet. Nachdem die bhMSCs aus den Knochenstücken herausgewachsen waren, wurden die trabekulären Knochenfragmente abgesaugt und die Zellen ebenfalls im mhMSC-Medium für 10 Tage kultiviert. Anschließend an die zehntägige Kultivierung im mhMSC-Medium wurden die bisher unpassagierten mhMSCs bzw. bhMSCs zur Differenzierung ausgesät und mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium behandelt. Mit Hilfe dieses standardisierten Vorgehens sollte versucht werden, vergleichbare Ausgangsbedingungen zwischen den beiden Stammzellarten bzw. den verschiedenen Isolierungstechniken zu schaffen.

Für die neurogene Differenzierung wurden die Zellen subkonfluent ausgesät (Woodbury et al., 2000), um genügend Raum für die Ausbildung neuritenartiger Zellfortsätze zu lassen aber auch eventuelle Zell-Zell-Interaktionen zwischen den Stammzellen zu ermöglichen.

Bei der Auswahl des neurogenen Differenzierungsmediums wurden die Ergebnisse erster Studien zur neurogenen Differenzierung von mhMSCs in vitro verglichen und letztlich die Differenzierung nach Woodbury et al. (2000) als am effektivsten erachtet. Im Differenzierungsmedium nach Woodbury et al. (2000) zeigten mehr als 50% der Zellen (von Ratten bzw. Menschen) die Morphologie einer Nervenzelle, und bereits

nach fünf Stunden exprimierten sie verschiedenste neuronale Marker (wie z.B. NSE, NF-M, tau, NeuN und trkA) auf Proteinebene.

Bei der von Sanchez-Ramos et al. (2000) veröffentlichten neurogenen Differenzierung mit BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) und all-trans-Retinsäure dagegen zeigten lediglich 0,2-5% der mhMSCs (von Mäusen bzw. Menschen) die Morphologie von Nervenzellen. Die Differenzierung bewirkte einen Expressionsanstieg von NeuN (neuronales Kernprotein) auf Proteinebene nach sieben Tagen. BDNF, ein u.a. von Nervenzellen produzierter neurotropher Faktor, wird zur Differenzierung humaner neuronaler Vorläuferzellen in reife Nervenzellen *in vitro* verwendet (Uchida et al., 2000). Retinsäure induziert u.a. die Differenzierung embryonaler und neuronaler Stammzellen in Nervenzellen (Bain et al., 1995; Takahashi et al., 1999). Außerdem reguliert Retinsäure die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren wie MASH1 oder NeuroD, die für eine frühe neuronale Determination verantwortlich sind, und sie führt zur erhöhten Reaktionsfähigkeit der Zellen gegenüber neurotrophen Faktoren (Johnson et al., 1992; von Holst et al., 1995; Takahashi et al., 1999).

Eine Differenzierung mit dbcAMP (Dibutyryl-zyklisches-Adenosylmonophosphat) und IBMX (Isobutylmethylxanthin) zeigte nach sechs Tagen bei 25% der mhMSCs eine neuronale Morphologie und den Anstieg von NSE, trkA und Vimentin im Western blot (Deng et al., 2001). IBMX, ein Phosphodiesteraseinhibitor, und dbcAMP, ein cAMP-Analagon, führen zu einer Verlängerung der Zellfortsätze (Moore et al., 1996) und können über eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung die Zellproliferation verringern und beispielsweise Prostatatumorzellen in neuroendokrine Zellen differenzieren (Bang et al., 1994). Eine erhöhte cAMP-Konzentration scheint auch bei der Regeneration des ZNS von entscheidender Bedeutung zu sein (Song et al., 1997).

Das in dieser Arbeit verwendete neurogene Prädifferenzierungsmedium nach Woodbury (2000) bestand aus DMEM, einer erhöhten Serumkonzentration von 20%, 2-Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin. Die antioxidativen Eigenschaften von 2-Mercaptoethanol, die das Überleben von Neuronen *in vitro* sichern (Ishii et al., 1993), könnten teilweise für die neuronale Induktion verantwortlich sein. Der genaue Mechanismus durch den 2-Mercaptoethanol die neuronale Differenzierung induziert ist jedoch unklar (Woodbury et al., 2000). Nach 24 Stunden folgte das neurogene Differenzierungsmedium aus DMEM, Dimethylsulfoxid (DMSO), Butylated Hydroxyanisole (BHA),

10% FBS, Forskolin, Valproat, Hydrocortison, Insulin, KCl und Penicillin/Streptomycin (Woodbury et al., 2000) für 6 Tage. Die Serumreduktion erklärt die sphärische und „refraktive“ Morphologie der differenzierten Zellen. Sowohl DMSO als auch BHA alleine führen zum Wachstum neuritenartiger, langer Zellfortsätze. In der Addition der verwendeten Konzentrationen (2% DMSO, 200 μ M BHA) scheint der Effekt hinsichtlich der neuronalen Morphologie am effektivsten zu sein (Woodbury et al., 2000). Neuste Veröffentlichungen führen die morphologischen Veränderungen der mMSCs nicht auf eine zelluläre Differenzierung, sondern auf die zelluläre Toxizität von BME, DMSO, BHA und das serumfreie Medium zurück (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Lu et al. beschrieben identische Veränderungen nach der Inkubation mit anderen chemischen Stressoren wie Triton X, Tween, extremen pH-Werten oder nach massiv erhöhten NaCl-Konzentrationen bei mMSCs sowie bei verschiedenen anderen Zellen ohne typische Stammzeleigenschaften. Im Rahmen der Differenzierung mit dem von Woodbury et al. verwendeten Differenzierungsmedium beobachteten Lu et al. kein neues Wachstum neuritenartiger Fortsätze, sondern lediglich eine massive Zellschrumpfung, aus welcher letztlich das Zurückbleiben einiger feiner Zellfortsätze resultierte.

Forskolin ist in der Lage axonale Signale nachzuahmen und über einen cAMP-Anstieg die Reaktionsfähigkeit der Zellen auf Wachstumsfaktoren zu erhöhen (Dezawa et al., 2001). Valproat, eine verzweigte Fettsäure, führt, vergleichbar der Wirkung neurotropher Faktoren, über die Aktivierung von ERKs (extrazelluläre Signale regulierende Kinasen) zur neuronalen Zelldifferenzierung und sichert Überleben und Plastizität von Nervenzellen (Yuang et al., 2001). Alle weiteren Substanzen (Hydrocortison, Insulin, KCl und Penicillin/Streptomycin) des Differenzierungsmediums gelten als Bestandteile normaler Wachstumsmedien und dienen lediglich dem Überleben der Zellen. Sie sind folglich nicht für die neurogene Differenzierung der Zellen verantwortlich.

Eine weitere beschriebene neurogene Differenzierung von mhMSCs mit der Kombination von Forskolin und Retinsäure führte lediglich zu einer Induktion der Expression von β -Tubulin auf Protein-Ebene (Lodie et al., 2002).

Auch neuere Differenzierungsmedien mit bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) scheinen nicht effektiver zu sein als das in dieser Arbeit verwendete Medium nach

Woodbury et al. (2000) (Kim et al., 2002; Jiang et al., 2002a und 2002b). FGF (bFGF, FGF-2) dient als Mitogen für mhMSCs und humane osteoblastäre Zellen und trägt durch die Aktivierung von MAP- (Mitogen-Activated Protein) Kinasen zum Wachstum und zur Differenzierung von Zellen bei (Chaudhary und Avioli, 1997). Außerdem ermöglicht FGF die Kultivierung und Expandierung von NSCs in einem undifferenzierten Stammzellstadium; erst nach der Entfernung von FGF differenzieren NSCs in Neurone und Gliazellen (McKay, 1997; Villa et al., 2000; Gage et al., 2000).

Verglichen mit alleine in BDNF und all-trans-Retinsäure differenzierten mMSCs (von Mäusen), zeigten mMSCs, die für zwei Wochen zusammen mit fetalen Neuronen aus dem Mesenzephalon und Striatum von Ratten kultiviert wurden waren, eine mindestens doppelt so große Anzahl an NeuN positiven Zellen (Sanchez-Ramos et al., 2000). Neben zahlreichen Erfolgen bei der Transplantation undifferenzierter mMSCs im Tiermodell unterstützt diese Studie die Hypothese, dass Zell-Zell-Kontakte und die Kommunikation über Wachstumsfaktoren und Zytokine zwischen Neuronen und mMSCs eine wichtige Rolle für die Differenzierung von mMSCs spielen. Die mit Neuronen kultivierten mMSCs zeigten jedoch keine Expression von MAP-2, einen für reifere Nervenzellen typischen Marker, was durch die zu kurze Inkubationszeit erklärt werden könnte (Sanchez-Ramos et al., 2000). Im Rahmen einer neueren Arbeit gelang es Nestin exprimierende mMSCs durch eine Kultivierung zusammen mit Neuronen des Kleinhirns in erregbare, Nervenzell-ähnliche Zellen zu differenzieren (Misset-Gendebien et al., 2005).

Vor kurzem wurde die spontane Zellfusion als mögliche Erklärung für die Stammzellplastizität angeführt (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Tatsächlich ist der Fusionsprozeß mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu einer Million sehr ineffizient und deshalb lediglich von untergeordneter Bedeutung (Mezey et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit, bei der ausschließlich hMSCs, die niemals zusammen mit gewebespezifischen oder embryonalen Stammzellen kultiviert worden waren, zur Differenzierung verwendet wurden, kann eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch spontane Zellfusion völlig ausgeschlossen werden.

Bei der Präparation der Zellen vom peripheren Nerven besteht v.a. die Schwierigkeit in der Reinheit der Zellkultur (Boutry et al., 1992). Auch in dieser Arbeit konnte selbst bei der verbesserter Isolierungstechnik (Shen et al., 2001) eine Kontamination mit Fibro-

blasten nicht vollständig vermieden werden. MhMSCs und bhMSCs dagegen repräsentieren zu über 95% eine phänotypisch homogene Zellpopulation und zeigen wie bereits unter 1.1.1. erwähnt eine nahezu einheitliche Expression bestimmter Oberflächenantigene (Pittenger et al., 1999; Vogel et al., 2003). Außerdem können mhMSCs und bhMSCs aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate in vitro beliebig vermehrt werden. Bei der Zellisolierung vom peripheren Nerven besteht dagegen das Problem, eine für eine Transplantation ausreichend große Anzahl von Schwann-Zellen zu gewinnen. Aus einer kleinen Nerven-biopsie kann lediglich eine geringe Menge an adulten Schwann-Zellen isoliert werden, die sich in vitro kaum expandieren lassen (Boutry et al., 1992). Deshalb wurden bereits mehrere immortalisierte Schwann-Zell-Linien entwickelt (Boutry et al., 1992; Lobsinger et al., 2001).

Es ist bekannt, dass adulte Schwann-Zellen vermutlich aufgrund autokriner „Überlebenskreisläufe“ im Gegensatz zu Schwann-Zell-Vorläuferzellen auch ohne Kontakt zu Axonen in vitro überleben (Meier et al., 1999; Mirsky et al., 2002). Bei diesen Zellen kommt es jedoch zu einer Dedifferenzierung, d.h. zu einer Änderung von Morphologie und Genexpression, die zu einer Regression in der Entwicklung der adulten Schwann-Zelle führt. Es resultiert neben einer Drosselung der Myelinproduktion eine für unreife Schwann-Zellen typisch starke Expression von N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule, neuronales Zell-Adhäsionsmolekül) und NGF-Rezeptoren. Proliferation, Sekretion verschiedener neurotropher Faktoren und Dedifferenzierung der Schwann-Zellen bilden in vivo die Basis der Nervenregeneration. In vitro lässt sich beispielsweise bereits nach einer Woche eine massive Expressionsabnahme sämtlicher Myelinmarker feststellen (Brockes et al., 1980; Mirsky et al., 2002). Durch eine Kultivierung zusammen mit Nervenzellen oder mit Hilfe von Serum und Forskolin, was über einen cAMP-Anstieg zur Nachahmung axonaler Signale führt, kann eine Redifferenzierung mit Hochregulation sämtlicher Myelinmarker erreicht werden (Boutry et al., 1992; Jessen und Mirsky, 1992; Lobsinger et al., 2001, Mirsky et al., 2002).

Die Differenzierung von mhMSCs bzw. bhMSCs in Schwann-Zellen erfolgte für 6 Tage im Schwann-Zell-Differenzierungsmedium aus DMEM, FCS, Forskolin und Penicillin/Streptomycin. Forskolin diente u.a. zur Differenzierung von Schwann-Zell-Vorläuferzellen der Ratte in reife Myelin-bildende Schwann-Zellen (Lobsinger et al., 2001). Über

einen Anstieg von cAMP und die Stimulation der Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren erhöht Forskolin die Reaktionsfähigkeit der Zellen auf Mitogene und neurotrophe Faktoren (Dezawa et al., 2001). Außerdem können mit Forskolin axonale Signale nachgeahmt werden, die bei Schwann-Zell-Vorläuferzellen zu einer Expressionszunahme von S100 und Myelingenen (Oct-6, MPZ, PMP22) führen (Lemke und Chao, 1988; Monuki et al., 1989; Tayler et al., 1995; Lobsinger et al., 2001).

Zur Charakterisierung bzw. zum Vergleich von undifferenzierten und differenzierten hMSCs dient neben der Beschreibung der Zellmorphologie v.a. die Expressionsanalyse hinsichtlich verschiedener für bestimmte Zellen spezifischer Marker.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von RT-PCR-Analysen Aussagen über die Expression auf RNA-Ebene gemacht werden. Analysen auf Protein-Ebene erfolgten mittels Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz. Diese verwendeten Methoden lieferten jedoch lediglich semiquantitative Ergebnisse und ermöglichten deshalb keinen konkreten quantitativen Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten Stammzellen. Außerdem erfolgten keine funktionellen und elektrophysiologischen Beurteilungen der Zellen. Kim et al. (2002) konnten in mit FGF und Retinsäure differenzierten mhMSCs mit Hilfe der Patch-clamp Technik kein Aktionspotential nachweisen. Bisher fehlen jedoch weitere Aussagen über die Funktionalität neurogen differenzierte hMSCs in vitro. Im Rahmen erster Tierversuche konnten mit einem Schwann-Zell-Differenzierungsmedium behandelte Knochenmarksstammzellen von der Ratte bereits erfolgreich zur Regeneration und Myelinisierung des Nervus ischiadicus eingesetzt werden (Dezawa et al., 2001; Tohill et al., 2004).

4.2. Zuverlässigkeit neurogener Marker

Für die Charakterisierung einer Nervenzelle benötigt man eine Kombination mehrerer Methoden, wie die Beschreibung der Anatomie und des Phänotyps, elektrophysiologische Untersuchungen und den Nachweis, dass die Zellen die Fähigkeit besitzen, nach einer Transplantation die für Nervenzellen typischen funktionellen synaptischen Verbindungen wiederherstellen zu können.

Zellen, die aus neuronalem Gewebe oder NSCs hervorgehen, werden auch ohne den Beweis mittels dieser verschiedenen Techniken eher als Nervenzellen angesehen als neurogen differenzierte Zellen eines nicht neuroektodermalen Ursprungs.

Bei der Charakterisierung neurogen differenzierter hMSCs, von denen ursprünglich angenommen wurde, dass sie lediglich in Zellen, die aus dem Keimblatt des Mesoderms hervorgehen, differenzieren können, ist es deshalb besonders wichtig, durch eine Kombination der erwähnten Methoden die Zellen möglichst genau zu beschreiben.

Im Verlauf der 6-tägigen neurogenen Differenzierung zeigte sich offensichtlich eine Veränderung der Zellmorphologie. Die meisten differenzierten Zellen erschienen kleiner und bildeten lange, für Nervenzellen typische Zellfortsätze (bi-, multipolar) aus, die sich teilweise mehrfach verzweigten. Außerdem fand sich gelegentlich perinukleäres scholliges Zytoplasma. Neuere Veröffentlichungen führen diese Veränderungen auf die zelluläre Toxizität des Differenzierungsmediums zurück (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Bei zahlreichen serumfreien Differenzierungsmedien bzw. Medien mit sehr geringer Serumkonzentration, die eine Synchronisation der Zellen bewirken, könnte die massive Änderung der Morphologie aber auch lediglich einen „Zellkollaps“ im Sinne von Apoptose darstellen, der nach der Entfernung des Serums auf einen Mangel an Substrat zurückzuführen ist. Hierbei handelt es sich um ein bei vielen Zelltypen bekanntes Phänomen (Svendson et al., 2001).

Die anatomische Beschreibung ist ein wichtiges und gefordertes Kriterium zur Identifikation einer Nervenzelle. Eine reine anatomische Beurteilung birgt jedoch einige Hindernisse: wie lange müssen die Axone sein und wie viele Dendriten muß eine Zelle haben, um sie als Nervenzelle zu definieren? Können andere Zellen diese Morphologie imitieren (Svendson et al., 2001)?

Bei der Charakterisierung einer Nervenzelle ist es deshalb von entscheidender Bedeutung neben der Anatomie auch die Gen- bzw. Proteinexpression der Zelle zu analysieren. Zahlreiche Marker finden Verwendung zur Beschreibung einer Nervenzelle. Viele werden jedoch nur transient während eines bestimmten Entwicklungsstadiums exprimiert. Andere „neuronalen Marker“ werden nicht ausschließlich von Nervenzellen, sondern auch von Zellen anderen Ursprungs exprimiert und können daher nicht als Zelltyp-spezifisch angesehen werden. Das Fehlen von exakt definierten

neuronalen Markern stellt ein entscheidendes Problem bei der Charakterisierung einer Nervenzelle dar und ist Grund zahlreicher aktueller Diskussionen.

Nestin, ein Intermediärfilament-Protein der Klasse IV, wird charakteristischer Weise von neuroepithelialen und ZNS-Stammzellen sowie von unreifen Vorläuferzellen *in vivo* und *in vitro* exprimiert (Hockfield und McKay, 1985; Frederikson und McKay, 1988; Lendahl et al., 1990). Sobald diese keinen Zellzyklus mehr durchlaufen und damit zu adulten Nervenzellen heranreifen, kommt es zur Expressionsabnahme von Nestin, während andere Intermediärfilamente (z.B. die Neurofilamente) kompensatorisch nach oben reguliert bzw. induziert werden (Reynolds und Weiss, 1992; Dahlstrand et al., 1992; Davis und Temple, 1994). Daher gilt Nestin als Marker für NSCs.

Lediglich bei zwei der elf durchgeführten neurogenen Differenzierungen zeigten undifferenzierten bhMSCs sehr schwache Banden für Nestin in der RT-PCR, die dann nach der Differenzierung völlig verschwunden waren. Eine Expressionsabnahme von Nestin beobachteten auch Woodbury et al. (2000) bei der neurogenen Differenzierung von mMSCs der Ratte. Dieser Effekt könnte als Übergang neurogener Stammzellen bzw. von Stammzelle, die in der Lage sind Neurone hervorzubringen, in adulte Nervenzellen gewertet werden. Bei den restlichen Differenzierungen fand sich sowohl bei den undifferenzierten als auch bei den differenzierten hMSCs keine Expression von Nestin auf RNA-Ebene.

Es ist jedoch zu erwähnen, dass Nestin u.a. auch von Astrozyten-Vorläuferzellen, reaktiven Astrozyten und Muskelzellen exprimiert wird und daher nicht als alleiniges Kriterium zur Identifizierung einer NSC gelten kann (Sejersen und Lendahl, 1993; Clarke et al., 1994).

NF-M (Neurofilament Medium), ebenfalls ein Klasse IV Intermediärfilament, dient häufig als Marker für adulte Neurone. Die Expression von NF-M wird assoziiert mit der Ausbildung von Nervenzellfortsätzen und von der für adulte Nervenzellen charakteristischen Morphologie (Carden et al., 1987).

Bei allen durchgeführten neurogenen Differenzierungen fand sich bereits bei den undifferenzierten mhMSCs und bhMSCs, die eine für Stammzellen typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie zeigten und keine langen Nervenzellfortsätze hatten, eine Expression von NF-M auf RNA-Ebene. Bei mehr als der Hälfte der neurogenen Differenzierungen, folgte eine Expressionsabnahme von NF-M. Undifferenzierte Zellen,

die NF-M lediglich mäßig stark exprimierten, zeigte keine Veränderung in der Expressionsstärke nach der Differenzierung. Auch die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnten trotz der Entwicklung langer für Nervenzellen typischer Zellfortsätze keinen Effekt der Differenzierung auf die Expression des neurogenen Markers NF-M zeigen.

Woodbury et al. (2000) beobachteten dagegen keine Expression von NF-M bei undifferenzierten mMSCs (von der Ratte) aber eine *de novo* Expression bei neurogen differenzierten Zellen. Diese Ergebnisse konnten von Woodbury et al. mit einem modifizierten neurogenen Differenzierungsmedium 2002 erneut bestätigt werden (Woodbury et al., 2002). Auch Kim et al. (2002) beobachteten eine Expressionszunahme von NF-M nach einer Differenzierung mit FGF; hier fand sich aber bereits auch eine leichte Expression bei undifferenzierten humanen Stammzellen. Bei der Differenzierung von Deng et al. (2001) mit IBMX und dbcAMP zeigte sich bei undifferenzierten und differenzierten mhMSCs keine Expression von NF-M auf Proteinebene.

In einer ersten ausführlichen Genexpressionsanalyse von undifferenzierten mhMSCs zeigte sich die Expression von RNAs vieler verschiedener Zelltypen (Tremain et al., 2001). Unter den neuronalen Markern wurde hier u.a. NF-H (Neurofilament Heavy), ein weiteres Klasse IV Intermediärfilament, angeführt, welches charakteristischer Weise erst in einem sehr späten Reifungsstadium, d.h. noch nach NF-L (Neurofilament Light) und NF-M, von Neuronen exprimiert wird (Carden et al., 1987). Diese und die vorliegende Arbeit zeigen, dass Neurofilamente nicht ausschließlich von adulten Nervenzellen exprimiert werden. Außerdem scheint es von entscheidender Bedeutung zu sein, zunächst die undifferenzierten Stammzellen genau auf die Expression sog. neurogener Marker zu untersuchen und nicht einfach davon auszugehen, dass die Expression eines neurogenen Markers nach der Differenzierung stets mit einer *de novo*-Expression gleichzusetzen ist, wovon bei einigen veröffentlichten Differenzierungen scheinbar ausgegangen wurde (Jiang et al., 2002a und 2002b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die Änderung der Morphologie mit keiner Expressionsänderung von NF-M auf Protein-Ebene und in mehr als der Hälfte der Fälle sogar mit einer Expressionsabnahme auf RNA-Ebene einherging.

GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), ein Klasse III Intermediärfilament, gilt als klassischer Astrozyten-Marker und ermöglicht damit eine Unterscheidung von Astrozyten gegenüber adulten Nerven- oder anderen Gliazellen (Eng et al., 1971). Weiterhin findet sich auch eine Expression von GFAP bei neuroglialen Vorläuferzellen (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000).

Bei den durchgeführten Differenzierungen zeigte sich bei mhMSCs und bhMSCs im undifferenzierten Zustand eine Expression von GFAP auf RNA- und oftmals auch bereits auf Protein-Ebene. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese von Woodbury et al. (2002), dass es sich bei hMSCs um Neuroglia-Vorläuferzellen, d.h. um Stammzellen, die in der Lage sind Nerven- und Gliazellen hervorzubringen, handeln könnte.

Die neurogene Differenzierung zeigte jedoch keinen reproduzierbaren Effekt auf die Expression dieses Markers und lässt daher keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich des Differenzierungseffektes zu.

Deng et al. (2001) beschrieb keine Expression von GFAP vor und nach der Differenzierung. Bei Sanchez-Ramos et al. (2000) dagegen waren undifferenzierte und differenzierte mhMSCs positiv für GFAP. Woodbury et al. (2000) beobachteten keine Expression von GFAP bei undifferenzierten und differenzierten Zellen und deuteten deshalb den Effekt des Induktionsmediums als neurogene und nicht als Gliazell-Differenzierung. In einer neueren Veröffentlichung von Woodbury et al. (2002) dagegen waren die undifferenzierten Zellen positiv, die im neu modifizierten Differenzierungsmedium kultivierten Zellen negativ für GFAP auf Protein-Ebene. Außerdem beobachteten Woodbury et al. eine Expressionsabnahme von neuroD, einem neuronalen Transkriptionsfaktor, der neben anderen neuronalen Genen (Aldolase C, Syntaxin u.a.) von den undifferenzierten Zellen stark exprimiert wurde und bezeichnete deshalb mMSCs (von der Ratte) ebenfalls als Neuroglia-Vorläuferzellen. Diese Ergebnisse und die Expression von RNAs unterschiedlichster Zelllinien ließen Woodbury et al. (2002) vermuten, dass es sich bei den mMSCs nicht um undifferenzierte, sondern eher um „multidifferenzierte“ Stammzellen handelt, und dass die neurogene Differenzierung eher eine quantitative Modulation der Genexpression als ein einfaches An-/Abschalten Neuronen-spezifischer Gene ist.

NSE (Neuron Specific Enolase) ist ein Enzyme, das charakteristischer Weise sehr früh in der Entwicklung von Nervenzellen exprimiert wird (Deng et al., 2001).

Bei den durchgeführten neurogenen Differenzierungen fand sich meist bereits bei den undifferenzierten hMSCs eine leichte Expression von NSE. Nach der Differenzierung zeigten mhMSCs und bhMSCs dagegen stets eine sehr starke Expression auf RNA- und Protein-Ebene. Diese Expressionszunahme von NSE, die mit der Veränderung der Morphologie einherging, stimmt mit den von Woodbury et al. (2000), Deng et al. (2001) und Suon et al. (2004) veröffentlichten Daten überein und kann als Bestätigung gewertet werden, dass es sich bei undifferenzierten mhMSCs um neuronale Vorläuferzellen handelt, deren Gen- bzw. Proteinexpression des für unreife Nervenzellen typischen neuronalen Markers NSE durch die Inkubation im verwendeten neuronalen Differenzierungsmedium nach oben reguliert werden kann. Lu et al. (2004) führten die erhöhte vor allem perinukleär lokalisierte Expression von NSE auf Proteinebene nach der Differenzierung ebenso wie die veränderte Morphologie auf die Zellschrumpfung und das kondensierte Zytoplasma zurück und beschrieben eine vergleichbare Expressionszunahme nach der Inkubation der Zellen mit Triton X, Tween oder NaOH sowie bei mit einem Proteinsyntheseinhibitor vorbehandelten mMSCs. Die mit bhMSCs angefertigten neuronalen Differenzierungen zeigten ebenfalls eine Expressionszunahme von NSE und legen nahe, dass auch bhMSCs nicht auf die Differenzierung in Zellen mesenchymale Ursprungs beschränkt sind, sondern wie bereits für mhMSCs gezeigt ein weitaus größeres Potential haben als ursprünglich angenommen.

Tau (microtubule associated protein T, MAPT) gilt als Marker für differenzierte Nervenzellen und wird besonders in den neuronalen Zellfortsätzen exprimiert (Svendson et al., 2001). Außerdem ist bekannt, dass tau bei einigen neuropathologischen Läsionen, den sog. „Tauopathien“, im Zellkörper von Neuronen akkumuliert und z.B. bei Morbus Alzheimer die für die Krankheit charakteristischen intrazellulären Fibrillen bildet (Poeck und Hacke, 2001; Buee et al., 2002).

Bei den durchgeführten neurogenen Differenzierungen fand sich sowohl bei mhMSCs als auch bei bhMSCs eine starke Expressionszunahme von tau auf Protein-Ebene. Tau wurde von den undifferenzierten Zellen gar nicht oder nur sehr leicht exprimiert. Woodbury et al. (2000 und 2002) beobachteten eine *de novo* Expression von tau bei neurogen differenzierten mMSCs der Ratte. Deng et al. (2001) dagegen fanden keine Expression von tau vor bzw. nach der Differenzierung.

Mögliche Erklärungen für die angeführten unterschiedlichen Aussagen zur Expression einiger Marker bei den undifferenzierten mMSCs, sind die Heterogenität unter den Spendern (Ratte-Mensch aber auch innerhalb einer Spezies), verschiedene Proliferations- bzw. Passagestadien der verwendeten Zellkultur, unterschiedliche Isolierungstechniken und der Einsatz verschiedener Proliferationsmedien mit bzw. ohne Wachstumsfaktoren. Die Tatsache, dass bereits undifferenzierte hMSCs neurogliale Marker exprimieren (Tremain et al., 2001; Woodbury et al., 2002, Suon et al., 2004; Tondreau et al., 2004; Lu et al., 2004) konnte in dieser Arbeit für mhMSCs bestätigt und erstmals auch für bhMSC beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass es sich bei mhMSCs und bhMSCs um Neuroglia-Vorläuferzellen handelt, die in der Lage sind in neuronale Zellen zu differenzieren (Woodbury et al., 2002). Diese Behauptung wird gestützt von der Expressionszunahme der neuronalen Marker NSE und tau und der Entwicklung einer für Nervenzellen typischen Anatomie. Meist ließ sich jedoch keine *de novo* Expression dieser neuronalen Marker nachweisen.

Außerdem zeigten undifferenzierte mhMSCs und bhMSCs keine Expression des Oberflächenantigens CD133. CD133, ein Transmembranprotein, diente u.a. zur direkten Isolierung von hNSCs aus fetalem Hirngewebe (Uchida et al., 2000). Bei einem Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenantigene zwischen mhMSCs und hNSCs zeigte jedoch lediglich eine Subpopulation der hNSCs eine Expression von CD133 (Vogel et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben mhMSCs auch bhMSCs ein weitaus größeres Differenzierungspotential besitzen und nicht wie ursprünglich angenommen auf mesenchymale Gewebe beschränkt sind. MhMSCs und bhMSCs können unter geeigneten Bedingungen eine für Nervenzellen typische Morphologie entwickeln und die Expression einzelner neuronaler Marker steigern.

Ob die *in vitro* differenzierten Zellen jedoch auch die komplexen Funktionen von Nervenzellen besitzen und beispielsweise Aktionspotentiale generieren und Synapsen ausbilden können ist jedoch noch offen. Deshalb scheint es sicherer, neurogen differenzierte hMSCs vor der Erfüllung dieses für die Charakterisierung einer Zelle wichtigen Kriteriums nicht als Nervenzellen, sondern lediglich als Zellen mit typischen neuronalen Eigenschaften zu bezeichnen (Svendson et al., 2001).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zunächst Zellen, die aus dem peripheren Nerven isoliert worden waren, charakterisiert. Es fand sich eine Expression der für Myelinbildende Schwann-Zellen typischen Marker MPZ (Myelin Protein Zero, P₀) und PMP 22 (Peripheral Myelin Protein 22kD) auf RNA-Ebene. MPZ gilt als Hauptprotein des kompakten Myelins, ermöglicht Zell-Zell-Kontakte und vermittelt die intrazelluläre Kompartimentierung der Zelle. PMP 22, ein Glykoprotein mit 22kD, ist v.a. von Bedeutung bei der Diagnostik zahlreicher hereditärer demyelinisierender motorischer und sensibler Neuropathien, die mit einer Mutation in diesem Gen einhergehen (Poock und Hacke, 2001). MPZ und PMP 22 werden zusammen mit dem Gen für MBP (Myelin Basic Protein) von adulten Schwann-Zellen während der Myelinbildung und bei der Nervenregeneration exprimiert (Kuhn et al., 1993; Mirsky et al., 2002).

Bei der durchgeführten Immunfluoreszenz ließen sich die fortsatzreichen Zellen kräftig mit dem klassischen Schwann-Zell-Marker S 100 anfärben; fibroblastäre Zellen dagegen zeigten keine Expression.

S 100, ein im Zytoplasma lokalisiertes Calcium-bindendes Protein, gilt als Marker für adulte Schwann-Zellen von Ratten und Mäusen – Schwann-Zell-Vorläuferzellen dagegen zeigen keine oder nur eine sehr geringe Expression von S 100 (Mirsky et al., 2002). Mit MPZ, PMP 22 und S 100 besitzen die aus dem peripheren Nerven isolierten Zellen drei typischer Weise von adulten Schwann-Zellen exprimierten Genen.

Bei der Schwann-Zell-Differenzierung von mhMSCs und bhMSCs mit der Substanz Forskolin, von der bekannt ist, dass sie bei Schwann-Zellen von Ratten und Mäusen zu einer Expressionssteigerung von S 100 und sämtlicher Myelinmarker führt (Lobsinger et al., 2001; Mirsky et al., 2002), zeigte sich eine starke Expressionszunahme des von den undifferenzierten Zellen nur schwach exprimierten peripheren Myelinprotein 22 auf RNA-Ebene. Auch bei der Expression von MPZ fand sich meist eine Zunahme; bei MPZ-negativen undifferenzierten hMSCs konnte jedoch keine *de novo* Genexpression induziert werden.

Die Entwicklung einer spindelförmigen Morphologie und der für Schwann-Zellen typischen fischzugartige Ausrichtung ging in der Hälfte der Fälle mit einer kräftigen Expressionszunahme bzw. *de novo* Expression des Schwann-Zell-Markers S 100 einher. Bei den restlichen Differenzierungen zeigte sich sowohl bei den undifferenzierten als auch bei den differenzierten hMSCs keine Expression von S 100.

Auch Dezawa et al. (2001) beobachtete keine oder lediglich eine sehr geringe Expression von S 100 bei undifferenzierten mMSCs von der Ratte und eine Expressionszunahme nach der Inkubation in einem Schwann-Zell-Differenzierungsmedium.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen in Anlehnung an die Hypothese von Woodbury et al. (2002; siehe Seite 55) vermuten, dass es sich bei undifferenzierten bhMSCs ebenso wie bei den mhMSCs um Schwann-Zell-Vorläuferzellen handelt, die unter geeigneten Bedingungen in der Lage sind, eine für Schwann-Zellen typische Morphologie zu entwickeln und die Expression einzelner Schwann-Zell-Marker zu steigern. Bisher können jedoch noch keine Aussagen zur Funktionalität der differenzierten mhMSCs und bhMSCs gemacht werden.

4.3. In vivo Versuche und therapeutisches Potential

HMSCs haben gegenüber hNSCs den Vorteil, dass sie einfach isoliert und unbegrenzt expandiert werden und stellen gerade deshalb eine vielversprechende Alternative zur Therapie neurologischer Erkrankungen dar.

Erste Studien zur Transplantation von mMSCs in das Knochenmark im Tierversuch zeigten eine Migration der Zellen über den Blutkreislauf in des Gehirn und eine Differenzierung in Gliazellen innerhalb weniger Tage (Eglitis und Mazey et al., 1997). Auch Azizi et al. (1998) und Kopen et al. (1999) konnten nach einer Transplantation von mMSCs in das intakte ZNS von Ratten deren Wanderung und anschließende Differenzierung in neuronale Zellen beobachten.

Anschließend an diese ersten Erfolge bei der Transplantation von mMSCs in gesunde Tiere folgten zahlreiche Studien zum Einsatz von mMSCs bei Tieren mit neurologischer Vorschädigung.

Nach der Transplantation in das adulte ZNS einer Ratte, mit induziertem Schlaganfall, zeigten mMSCs einen neuronalen Phänotyp und konnten die neurologischen funktionellen Defizite verringern (Chen et al., 2000; Zhao et al., 2002; Li et al., 2002). Es wurde vermutet, dass die Fähigkeit von mMSCs Wachstumsfaktoren zu bilden maßgeblich zur Kompensation der Funktion beigetragen haben könnte (Li et al., 2002).

Chopp et al. (2000) beobachteten, daß eine Transplantation von mMSCs in den traumatisch vorgeschädigten Spinalkanal der Ratte zu einem signifikanten funktionellen Ersatz führt. Lu et al. (2001) injizierten mMSCs intravenös in Ratten mit einem traumatischen Gehirnschaden. Diese wanderten in das verletzte Hirnparenchym, exprimierten neuronale Marker und waren in der Lage, motorische und neurologische Defizite im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant zu reduzieren.

Außerdem konnten mMSCs bereits erfolgreich im Parkinson-Modell in der Ratte eingesetzt werden (Li et al., 2001). MMSCs, die in das Striatum injiziert wurden, überlebten, exprimierten das zur Dopaminsynthese notwendige Protein Tyrosinhydroxylase und sorgten für eine funktionelle Verbesserung.

Eine mögliche Erklärung für diese *in vivo* Erfolge könnte sein, dass undifferenzierte Zellen aufgrund ungeklärter Mechanismen (z.B. durch die Produktion bestimmter Faktoren von ungeschädigten Nachbarzellen) in die Bereiche des ZNS einwandern, in denen sie zur physiologischen Regeneration oder aufgrund eines pathologischen Zellverlusts benötigt werden und dort auf noch unbekannt Weise durch das „Mikromilieu“ zur neuronalen Differenzierung induziert werden.

Diese Studien verdeutlichen bereits das therapeutische Potential von MSCs im Einsatz als Vehikel für Zell- und Gentherapie bei vielen Krankheiten des ZNS (Schlaganfall, ZNS- und Rückenmarkstraumen, neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson u.a.) und lassen auf eine zukünftige Verbesserung aktuell bestehender und oft nur begrenzter Therapiemöglichkeiten hoffen.

In wieweit eine Vordifferenzierung der Zellen beispielsweise mit dem in dieser Arbeit verwendeten neurogenen Differenzierungsmedium von Bedeutung ist, bleibt abzuwarten. Für die Behandlung einzelner neurologischer Krankheiten wie z.B. der Parkinsonschen Krankheit könnte es beispielsweise von Nutzen sein, die Stammzellen vor der Transplantation gezielt in einen gewünschten Zelltyp wie z.B. dopaminerge Neurone vorzudifferenzieren bzw. genetisch zu modifizieren.

Ein weiteres aktuelles Tissue Engineering Konzept ist der Einsatz von Schwann-Zellen zur Rekonstruktion peripherer Nerven. Bei den aus peripheren Nervenbiopsien isolierten Schwann-Zellen besteht einerseits das Problem, eine für die klinische Applikation notwendige große Anzahl an Zellen zu gewinnen, andererseits kann trotz

aufwendiger Isolierungstechniken nur eine mangelnde Reinheit der Zellkultur erreicht werden.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, versucht man MSCs *in vivo* in Zellen mit Schwann-Zell-Eigenschaften zu differenzieren.

In einer ersten Studie konnten differenzierte mMSCs erfolgreich zur Nervenregeneration bei der Ratte eingesetzt werden (Dezawa et al., 2001). Die von Ratten isolierten mMSCs wurden zunächst 24 Stunden in BME, dann 3 Tage in einem Medium mit 10% FBS und all-trans-Retinsäure und schließlich 7 Tage in einem Medium mit 10% FBS, bFGF, PDGF, Heregulin- β und 5 μ M Forskolin kultiviert. Anschließend wurden die differenzierten Zellen in Matrigel resuspendiert, in ein 1,5 cm langes leeres Rohr eingebracht und zur Überbrückung eines Nervus ischiadicus-Defekts in die Ratte transplantiert. Innerhalb von 3 Wochen kam es im Transplantat zu einer Regeneration vieler Nervenzellfortsätze und zur Bildung von Myelin durch die transplantierten Zellen. Die Kontrolltiere, bei denen undifferenzierte mMSCs zur Transplantation verwendet wurden, zeigten eine wesentlich geringere Anzahl regenerierter Axone, deren Länge viel kürzer war. Außerdem ließ sich elektronenmikroskopisch keine Myelinbildung nachweisen.

Eine mögliche Erklärung warum auch undifferenzierte Zellen in der Lage sind die Nervenregeneration, wenn auch in einem wesentlich geringeren Maße, zu induzieren, ist die Produktion von Zytokinen durch mMSCs *per se*. mMSCs sezernieren z.B. IL-6, welches als trophischer Faktor für regenerierende Axone gilt (Gimble et al; 1991; Shuto et al., 2001).

In wie weit auch die in dieser Arbeit beschriebenen im Schwann-Zell-Medium mit 20 μ M Forskolin kultivierten mhMSCs bzw. bhMSCs zur Nervenregeneration beitragen können, bleibt zu klären. Mit S 100 und den Myelinmarker MPZ und PMP 22 exprimieren sie jedoch bereits einige für Schwann-Zellen typische Marker.

5. Zusammenfassung

hMSCs lassen sich mit Hilfe unterschiedlicher Isolierungstechniken aus vielen mesenchymalen Geweben gewinnen und unter Zellkulturbedingungen expandieren. Sie besitzen sowohl die Potenz zur Selbsterneuerung *in vivo*, als auch zur Differenzierung in Zellen und Gewebe mesenchymalen Ursprungs.

Die Isolierung hMSCs wurde zunächst aus dem Knochenmark beschrieben. MMSCs können aus Hüftköpfen oder Knochenmarkspiraten aus dem Beckenkamm nach der Eliminierung hämatopoetischer und vaskuläre Zellen mit Hilfe eines Dichtegradienten gewonnen werden. Die gereinigten adhärennten mhMSCs, die lediglich einen geringen Prozentsatz aller Knochenmarkszellen ausmachen, können unter geeigneten Bedingungen in eine Vielzahl mesenchymaler Gewebe wie Knochen, Knorpel, Sehnen/Bänder, Muskel, Knochenmarkstroma, Fett oder Dermis differenziert werden. Neuere Studien konnten zeigen, dass sich mhMSCs *in vitro* auch in Gewebe nicht-mesenchymalen Ursprungs, wie Nervenzellen (Ektoderm) und Leberzellen (Endoderm) differenzieren lassen.

Die Isolierung von bhMSC-Explantatzellkulturen erfolgt aus humanen trabekulären Knochenzylinder vom Beckenkamm oder aus Knochenfragmenten anderer trabekulärer Knochen (z.B. aus dem Hüftkopf). Bei der Präparation der Explantatkultur ist die Kollagenase-Vorbehandlung von entscheidender Bedeutung. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bhMSCs das Potenzial haben, in Zellen der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Linie zu differenzieren und somit ein multipotentes Differenzierungspotential besitzen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mhMSCs und bhMSCs in einem neurogenen Prädifferenzierungsmedium mit BME und anschließend mit einem Differenzierungsmedium mit BHA und DMSO behandelt und mit den jeweiligen undifferenzierten, im normalen Wachstumsmedium kultivierten, mhMSCs bzw. bhMSCs verglichen. Im Verlauf der 6-tägigen neurogenen Differenzierung zeigte sich eine Veränderung der Zellmorphologie. Die meisten differenzierten Zellen erschienen kleiner und bildeten lange, für Nervenzellen typische Zellfortsätze aus, die sich teilweise mehrfach verzweigten. Neben dieser neuronalen Morphologie fand sich bei den differenzierten mhMSCs und bhMSCs eine Expressionszunahme bzw. eine *de novo* Expression der

neuronalen Marker NSE und tau auf Gen- bzw. Protein-Ebene. Es konnte jedoch keiner Expressionsänderung von NF-M auf Protein-Ebene und in mehr als der Hälfte der Fälle sogar einer Expressionsabnahme auf RNA-Ebene gefunden werden. Die Differenzierung zeigte keinen reproduzierbaren Effekt auf die Expression des Astrozyten-Markers GFAP. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl bei den mhMSCs als auch bei den bhMSCs und lassen vermuten, dass bhMSCs ein ähnliches Potential besitzen wie mhMSCs und nicht wie ursprünglich vermutet, auf die Differenzierung in Zellen mesenchymalen Ursprungs beschränkt sind.

Die Tatsache, dass bereits undifferenzierte hMSCs neurogliale Marker (NF-M, NSE, GFAP) exprimieren konnte in dieser Arbeit für mhMSCs bestätigt und erstmals auch für bhMSC beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung von Woodbury et al. (2002), dass es sich bei mhMSCs und bhMSCs um Neuroglia-Vorläuferzellen handelt, die in der Lage sind in neuronale Zellen (Nerven- und Gliazellen) zu differenzieren, und dass die neurogene Differenzierung eher eine quantitative Modulation der Genexpression als ein einfaches An-/Abschalten Neuronenspezifischer Gene bewirkt.

Ein weiteres aktuelles Tissue Engineering Konzept ist der Einsatz von Schwann-Zellen zur Rekonstruktion peripherer Nerven. Durch das Einbringen unterstützender Schwann-Zellen bzw. neurotropher Faktoren in einer geeigneten Matrix in biologische oder synthetische Verbindungsrohre, konnte eine effektive Methode zur Verbesserung der Regeneration peripherer Nerven über sonst unüberwindbare Entfernungen entwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zunächst Zellen vom peripheren Nerven isoliert und anschließend charakterisiert. Die aus dem peripheren Nerven herausgewachsenen spindelförmigen bzw. multipolaren Zellen bildeten mit ihren zahlreichen langen Fortsätzen ein regelrechtes Netzwerk und zeigten eine Expression der für Myelinmarker MPZ und PMP 22 sowie des Schwann-Zell-Markers S 100.

Abschließend wurden mhMSCs und bhMSCs für 6 Tage in einem Schwann-Zell-Differenzierungsmedium mit Forskolin kultiviert. Die differenzierten spindelförmigen Zellen zeigten eine für Schwann-Zellen typischen fischzugartige Ausrichtung. Es fand sich eine starke Expressionszunahme der von den undifferenzierten Zellen nur schwach

exprimierten Myelinmarker MPZ und PMP 22 auf RNA-Ebene. In der Hälfte der Fälle zeigte sich auch eine kräftige Expressionszunahme bzw. *de novo* Expression des Schwann-Zell-Markers S 100.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bhMSCs ebenso wie mhMSCS unter geeigneten Bedingungen in der Lage sind, eine für Schwann-Zellen typische Morphologie zu entwickeln und die Expression einzelner Schwann-Zell-Marker zu steigern.

In wie weit sie auch funktionell Schwann-Zellen gleichen und damit entscheidend zur peripheren Nervenregeneration beitragen können, bleibt jedoch noch zu klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634 (2002).
2. Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:795-808 (2002).
3. Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol* 170:48-62 (2001).
4. Azizi SA, Strokes D, Augelli BJ, DiGirolimo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats: similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3908-3913 (1998).
5. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168:342-357 (1995).
6. Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5330-5334 (1994).
7. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:354 (1999).
8. Bounury JM, Haww JJ, Gansmüller A, Di-Bert N, Pouchelet M, Baron-Van Evercooren A. Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J Neurosci Res* 32:15-26 (1992).
9. Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop* 275:287-299 (1990).
10. Brookes JP, Raff MC, Nishiguchi DJ, Winter J. Studies on cultured rat Schwann cells. III. Assay for peripheral myelin proteins. *J Neurocytol* 9:67-77 (1980).
11. Brüstle O, Choudhary K, Karram K, Huttner A, Murrey K, Dubois-Dalcq M, McKay RD. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of

- fetal human brain cells into embryonic rats. *Nature Biotech* 16:1040-1044 (1998).
12. Buee L, Hamdane M, Delabel P, Sambo AV, Begard S, Ghestem A, Sergeant N, Delacourte A. Tau story: from frontotemporal dementia to other tauopathies. *J Soc Biol* 196:103-108 (2002).
 13. Bunge RP. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 241:19-21 (1994).
 14. Cao Y. *Tissue Eng* 8:(Abstract)1116 (2002).
 15. Caplan AI, Bruder SP. Cell and molecular engineering of bone regeneration. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, eds., *Principles of Tissue Engineering*. San Diego, CA, Academic Press:603-618 (1997).
 16. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21:429-435 (1994).
 17. Caplan, AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650 (1991).
 18. Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, Lee VW. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *Neurosci* 7:3489-3504 (1987).
 19. Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg LU. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cell. *Exp Neurol* 158:265-278 (1999).
 20. Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CW, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 171:98-108 (2001).
 21. Chaudhary LR, Avioli LV. Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel re-naturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238:134-139 (1997).
 22. Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 39:711-716 (2000).

23. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: transplant with bone marrow stromal cell transplantation. *11:3001-3005* (2000).
24. Clarke SR, Shetty AK, Bradley JK, Turner DA. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport 5: 1885-1888* (1994).
25. Cohnheim J. Über Entzündung und Eiterung. *Arch Path Anat Physiol Klin Med 40:1* (1867).
26. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA 97:3213-3218* (2000).
27. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RDG, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci 103:589-597* (1992).
28. Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature 372:263-266* (1994).
29. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum 44:1928-1942* (2001).
30. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun 282:148-152* (2001).
31. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Europ J of Neurosci 14:1771-1776* (2001).
32. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell 97:703-716* (1999).
33. Drenkhahn D. Herz-Kreislauf-System. In: Benninghoff Anatomie Band I, Drenkhahn D und Zenker W. Urban& Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, Seite 606-616 (1994).

34. Eglitis MA and Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4080-4085 (1997).
35. Eng LF, Vanderheagen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28:351-354 (1971).
36. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317 (1998).
37. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13:43-60 (1990).
38. Fine EG, Valentini RF, Aebischer P. Nerve regeneration. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, eds., *Principles of Tissue Engineering*. San Diego, CA, Academic Press:785-798 (1997).
39. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simoni C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nature Biotech* 16:1033-1039 (1998).
40. Frederikson K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 8:1144-1151 (1988).
41. Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates C, Gates MA, Bjorklund A. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19:5990-6005 (1999).
42. Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-274 (1976).
43. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438 (2000).
44. Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Stem cells, neurotrophins and transplantation: a new era in brain repair. *Brain Res Bull* 57:735-736 (2002).
45. Gimble JM, Hudson J, Henthorn J, Hua XX, Burstein SA. Regulation of interleukin 6 expression in murine bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 19:1055-1060 (1991).

46. Haynesworth SE, Goshiba J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from bone marrow. *Bone* 13:81 (1992).
47. Hazari A, Wiberg M, Johansson-Ruden G, Green C, Terenghi G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *Br J Plast Surg* 52:653 (1999).
48. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5:3310-3328 (1985).
49. Ishii K, Katayama M, Hori K, Yodoi J, Nakanishi T. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci Lett* 164:159-162 (1993).
50. Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy* 9: 642-647 (2002).
51. Jessen KR and Mirsky R. Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 2:575-581 (1992).
52. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blachstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low AC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49 (2002a).
53. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896-904 (2002b).
54. Johnson JE, Zimmerman K, Saito T, Anderson DJ. Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114:75-87 (1992).
55. Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport* 13:1185-1188 (2002).
56. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10711-10716 (1999).

57. Kuhn G, Lie A, Wilms S, Müller HW. Coexpression of PMP 22 gene with MBP and Po during de novo myelination and nerve repair. *Glia* 8:256-264 (1993).
58. Kukekov V, Laywell E, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brian TF, Kusakabe M, Steindler DA. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of the adult human brain. *Exp Neurol* 156:333-344 (1999).
59. Kutznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey P. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biology* 5:1133-1140 (2001).
60. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260:920-926 (1993).
61. Laywell ED, Kukekov VG, Steindler DA. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol* 156:430-433 (1999).
62. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13883-13888 (2000).
63. Lemke G, Chao M. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development* 102:499-504 (1988).
64. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595 (1990).
65. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59:514-523 (2002).
66. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 316:67-70 (2001).
67. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principle features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14:49-124 (1971).
68. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778 (1998).

69. Lobsinger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJM, Suter U, Taylor V. SpL201: conditionally immortalized Schwann cell precursor line that generates myelin. *GLIA* 36:31-47 (2001).
70. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 8:739-751 (2002).
71. Louis C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148 (1994).
72. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12:559-563 (2001).
73. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artefact? *J Neurosci* 24:174-191 (2004).
74. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189 (1993).
75. Majeska RJ. Culture of osteoblastic cells. In: Bilezikian, JP, Raisz, LG, and Rodan GA, eds., *Principles of Bone Biology*. San Diego, CA, Academic Press:1229-1238 (1996).
76. Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving IGF, NT-3 and PDGF-BB. *J Neurosci* 19:3847-3859 (1999).
77. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1364-1369 (2003).
78. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D. Schwann cells regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 96:17-24 (2002).
79. Monuki ES, Weinmaster G, Kuhn R, Lemke G. SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron* 3:783-793 (1989).

80. Moore KD, Dillon-Carter O, Conejero C, Poltorak M, Chedid M, Tornatore C, Freed WJ. In vitro properties of a newly established medulloblastoma cell line, MCD-1. *Mol Chem Neuropathol* 29:107-126 (1996).
81. Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cell derived from adult nerve. *J Neurosci* 11:2433-2442 (1991).
82. Mosahebi A, Simon M, Wiberg M, Terenghi G. A novel use of alginate hydrogel as Schwann cell matrix. *Tissue Eng* 7:525-534 (2001).
83. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, Caplan AI. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by sub-cultured cells derived from periosteum. *Bone* 11:181-188 (1990).
84. Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shmazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H. The bHLH gene *Hes1* as a repressor of neuronal commitment of the CNS stem cell. *J Neurosci* 20:283-293 (2000).
85. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci* 24:192-204 (2004).
86. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20:1060-1069 (2002a).
87. Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8:131-143 (2002b).
88. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsyji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 279:500-504 (2000).
89. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69:698-707 (2002).
90. Osyczka AM, Nöth U, O'Connor J, Caterson EJ, Yoom K, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage differentiation of adult human bone marrow progenitor cells

- transduced with human papilloma virus type 16 E6/E7 genes. *Calcif Tissue Int* 71:447-458 (2002a).
91. Osyczka AM, Nöth U, Danielson KG, Tuan RS. Different osteochondral potential of clonal cell lines derived from adult human trabecular bone. *Ann N Y Acad Sci* 961:73-77 (2002b).
 92. Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18:295-300 (2000).
 93. Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486 (1995).
 94. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture: progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411:42-43 (2001).
 95. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147 (1999).
 96. Poock K und Hacke W. *Neurologie*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (2001).
 97. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74 (1997).
 98. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci MN. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344:385-386 (2001).
 99. Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop* 346:95-103 (1998).
 100. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710 (1992).
 101. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37:453-460 (1985).

102. Robey PG. Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif Tissue Int* 56 (Suppl 1):S11-S12 (1995).
103. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 161:571-584 (2000).
104. Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shield CB, Maguire S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res* 890:11-22 (2001).
105. Roy NS, Benraiss A, Wang S, Fraser RA, Goodman R, Couldwell WT, Nedergaard M, Kawaguchi A, Okano H, Goldman SA. Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J Neurosci Res* 59:321-331 (2000).
106. Rutkowski GE, Heath CA. Development of a bioartificial nerve graft. II: Nerve regeneration in vitro. *Biotechnol Prog* 18:373-379 (2002).
107. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256 (2000).
108. Schiebler TH, Junqueira LC, Carneiro J, Histologie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, Nervengewebe, Seite 242-282 (1996).
109. Sejersen T and Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106:1291-1300 (1993).
110. Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of adult rat. *J Neurosci* 13:2351-2358 (1993).
111. Seki T. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69:772-783 (2002).
112. Shen ZL, Berger A, Hierner R, Allmeling C, Ungewickell E, Walter GF. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft. *Microsurgery* 21:6-11 (2001).

113. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 148:577-586 (1997).
114. Shuto T, Horie H, Hikawa N, Sango K, Tokashiki A, Murata H, Yamato I, Ishikawa Y. IL-6 up-regulates CNTF mRNA expression and enhances neurite regeneration. *Neuroreport* 12:1081-1085 (2001).
115. Sinha GK, Morris F, Shah SA, Tuan RS. Surface protein composition of orthopaedic metal regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop* 305:258-272 (1994).
116. Sohonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627 (1996).
117. Song HJ, Ming GL, Poo MM. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388:275-279 (1997).
118. Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1(4):290-295 (1998).
119. Suon S, Jin H, Donaldson AE, Caterson EJ, Tuan RS, Deschennes G, Marshall C, Iacovitti L. Transient differentiation of adult bone marrow cells into neuron-like cells in culture: development of morphological and biochemical traits is mediated by different molecular mechanism. *Stem Cells Dev* 13:625-635 (2004).
120. Svendson C, Cardwell M, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmiol S, Dunnett SB. Long term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148:135-146 (1997).
121. Svendson CN, Bhattacharyya A, Tai YT. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nature Rev Neurosci* 2:831-834 (2001).
122. Svendson CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137:367-388 (1996).

123. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38:65-81 (1999).
124. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaki T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427-435 (2002).
125. Taupin O, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749 (2002).
126. Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem* 270:28824-28833 (1995).
127. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:135-141 (1999).
128. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz D, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Peterson BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545 (2002).
129. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett* 362:200-203 (2004).
130. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319-326 (2004).
131. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney D. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 19:408-418 (2001).
132. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14720-14725 (2000).

133. Villa A, Snyder EY, Vescovi A, Martinez-Serrano A. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from human CNS. *Exp Neurol* 161:67-84 (2000).
134. Vogel G. Cell biology. Ready or not? Human ES cells head towards the clinic. *Science* 308:1534-1538 (2005).
135. Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88:126-133 (2003).
136. von Holst A, Rodriguez-Tabar A, Michaille JJ, Dhouailly D, Backstrom A, Ebendal T, Rohrer H. Retinoic acid-mediated increase in TrkA expression is sufficient to elicit NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 6:185-198 (1995).
137. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599-7609 (1996a).
138. Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19:387-393 (1996b).
139. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23: 392-402 (2005).
140. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 96:908-917 (2002).
141. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370 (2000).
142. Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32:1890-1896 (2001).

143. Yamato S, Yamato N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuka M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 172:115-127 (2001).
144. Ying QY, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545-548 (2002).
145. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record* 264:51-62 (2001).
146. Yuang PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Cheng G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem* 276:31674-31683 (2001).
147. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174:11-20 (2002).
148. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2426-2431 (2003).
149. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228 (2001).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die hilfreiche sehr gute fachliche Unterstützung und konstruktive Kritik während des praktischen Teils der Arbeit sowie das schnelle Korrektur lesen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ulrich Nöth für die fortwährende engagierte Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Bei Problemen und Rückschlägen jeder Art stand er mir mit tatkräftiger Unterstützung und wertvollen fachlichen Ratschlägen zur Seite und mit seinem unermüdlichen Optimismus gelang es ihm, mich stets neu zu motivieren und zu begeistern. Ein weiteres Dankeschön möchte ich ihm für die zahlreichen Möglichkeiten zur Weiterbildung, die er mir während meiner Zeit als Doktorandin geboten hat, zukommen lassen.

Für die Bereitstellung von Zellen aus dem N. thoracicus longus danke ich Frau Dr. med. S. Kall, Klinik für Plastische-, Hand- und Wiederherstellende Chirurgie der medizinischen Hochschule Hannover.

Weiterhin sei allen Mitarbeitern des Osteologiezentrums, König-Ludwig-Haus, Würzburg, insbesondere Frau Jutta Schneiderei, Frau Sabine Balling und Frau Doris Jaschinski, für die Einführung in die Geräte und Techniken sowie die Hilfestellung bei auftretenden Problemen herzlich gedankt.

Lebenslauf

Name: Christine Beck
Geburtsdatum: 16. Januar 1979
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig
Schulen: 1985-1989 Grundschule Eibelstadt
1989-1998 Mozart-Gymnasium Würzburg
Abitur: 26. Juni 1998
Studium der Humanmedizin: 1998-2005 Universität Würzburg
3. Staatsexamen: 29. April 2005

A handwritten signature in black ink, reading "Christine Beck". The signature is written in a cursive style with a large, flowing initial 'C'.

Würzburg, im Juni 2005

