

**Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. R.-I. Ernestus**

**Neuronales Differenzierungspotential muriner androgenetischer Embryonaler-  
Stammzellen in „vitro“ und in „vivo“**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Wanja Andrej Wolber  
aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2016**



**Referentin:**

Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

**Koreferent/Koreferentin:**

Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Dekan:**

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

18.07.2018

**Der Promovend ist Arzt**

*Diese Dissertation ist meinen lieben Eltern gewidmet, die mich in jeder Hinsicht im Studium und während der Dissertation unterstützt und motiviert haben.*

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
1.2	Frühe Embryonalentwicklung.....	2
1.3	Stammzellen.....	3
1.3.1	Uniparentale Stammzellen.....	7
1.4	Imprinting.....	8
1.5	Neurogenese.....	11
1.5.1	Embryonale Neurogenese.....	11
1.5.2	Adulte Neurogenese.....	15
1.6	Cerebrale Zelltransplantation.....	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	24
2.	Material und Methoden.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Zelllinien.....	25
2.1.2	Versuchstiere.....	25
2.1.3	Kulturmedium, Lösungen, Puffer.....	27
2.1.4	Sonstiges.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	In Vitro.....	28
2.2.2	In Vivo.....	38
3.	Ergebnisse.....	42
3.1	In Vitro.....	42
3.1.1	pNPC-Differenzierung.....	42
3.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der neuronalen Differenzierung <i>in vitro</i> .....	42
3.1.3	Elektrophysiologische Charakterisierung von d7NLCs.....	49
3.1.4	Reverse-Transkriptase-PCR.....	54
3.2	In Vivo.....	55
3.2.1	Neuronale Differenzierung der Donorzellen nach Transplantation.....	55
3.2.2	Teratombildung der Donorzellen nach Transplantation.....	58
4.	Diskussion.....	60
5.	Zusammenfassung.....	64
6.	Literatur- und Abbildungsverzeichnis.....	65

# 1. Einleitung

## 1.1 Abkürzungsverzeichnis

AG	Androgenetisch
aIP	Apikale Intermediärprogenitorzellen
aRG	Apikale Radialgliazellen
bIP	Basale Intermediärprogenitorzellen
BrdU	Bromdesoxyuridin
bRG	Basale Radialgliazellen
CC-Modus	Current-Clamp-Modus (Stromklemme)
CpG-Insel	Genabschnitt mit regelmäßig bestehenden Phosphodiesterbindungen zwischen Cytosin und Guanosin
DG	Gyrus dentatus
EB	Embryoid bodies (Embryonalkörperchen = Zellstruktur während Differenzierung)
EC	Ependymzellen
ES-Zellen	Embryonale Stammzelle
GFAP	Saures gliales Faserprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
eGFP	Verstärkt (=enhanced) grün fluoreszierendes Protein
GG	Gynogenetisch
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
Igf-2	Insulin-like growth factor 2 (Insulinähnlicher Wachstumsrezeptor 2)
Igf-2R	Insulin-like growth factor 2 receptor (Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsrezeptors 2)
MAP2	Mikrotubulus assoziiertes Protein 2
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NEC	Neuroepitheliale Zellen
NeuN	Neurales nukleäres Antigen
NLC	Neuronenähnliche Zellen

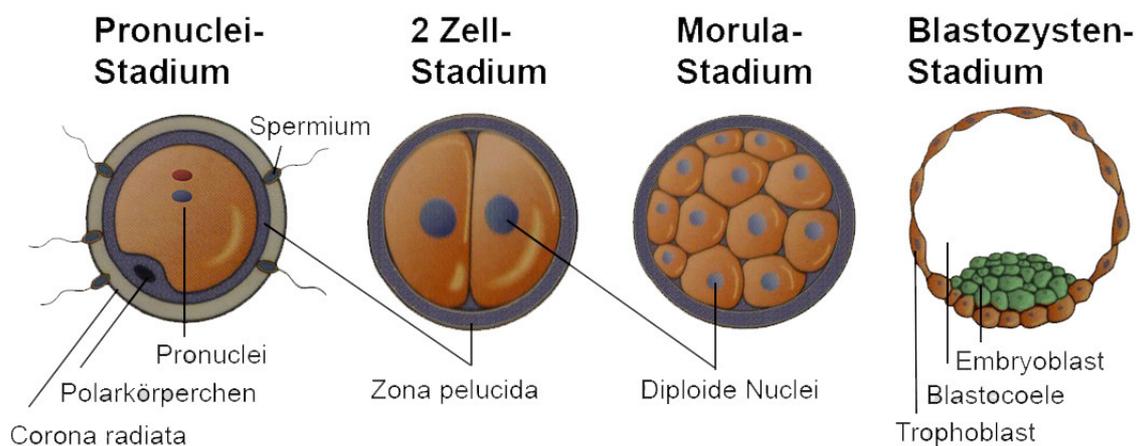
NPC	Neuronale Progenitorzellen
pNPC	Panneuronale Progenitorzellen
NSC	Neuronale Stammzellen
NSPC	Proliferierende neuronale Progenitorzellen (Adulte Neurogenese)
OB	Bulbus olfactorius
Pax6	Neuraler Transkriptionsfaktor (paired box gene 6)
PG	Parthenogenetisch
RMS	Rostrales Migrationssystem (rostral migratory stream)
SCNT	Somatischer Zellkerntransfer (somatic-cell nuclear-transfer)
SVZ	Subventrikuläre Zone
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
TX	Transplantation
VC-Modus	Voltage-Clamp-Modus (Spannungsklemme)
VZ	Ventrikuläre Zone
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1.2 Frühe Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der gerade befruchteten Oozyte im **Pronucleistadium**. Ein Spermium hat die Zona pelucida durchbrochen, die sich daraufhin gegen weitere Spermien verschließt. Das maternale und paternale Genom liegt noch in haploiden Pronuclei vor, die nun während der Pronuclei-Migration aufeinander zuwandern. Nach der Verschmelzung derselben bildet sich die Zygote, welche nach juristischer Definition die früheste Form des Lebens darstellt. Die Zygote fängt an sich durch Furchungsteilungen ohne Zellwachstum in Blastomere aufzuteilen, bis das **Morula-Stadium** erreicht wird. In der aus 16-32 Zellen bestehenden Morula verlieren die Zellen ihre Totipotenz. Über die selektive Ausbildung von „tight junctions“ grenzt sich eine innere von einer äußeren Zellmasse ab. Ist dieser Schritt vollzogen, spricht man von einer **Blastozyste**. Hier ist nun histomorphologisch eine innere Zellmasse (=Embryoblast) von einer äußeren Zellmasse (=Trophoblast) abzugrenzen. Die

umgebende Zona pelucida löst sich auf und die Größenzunahme des Embryos wird möglich. Der Embryoblast bildet Hypo- und Epiblast, aus denen sich Dottersack bzw. Amnionhöhle entwickeln. Außerdem bilden sich aus dem Embryoblast nach der Gastrulation die drei Keimblätter des Embryos. Der Trophoblast hingegen sorgt für die Verankerung im Uterus und bildet nach invasivem Wachstum in die Gebärmutterschleimhaut zusammen mit dem maternalen Gewebe die Plazenta aus [1].

**Abbildung 1.2-1: Frühe Embryonalentwicklung**



**Abbildung 1.2-1: Frühe Embryonalentwicklung:** Dargestellt sind die wesentlichen Entwicklungsstadien der frühen Embryonalentwicklung. **Pronuclei-Stadium:** Befruchtete Oozyte mit maternalem und paternalem Pronucleus und aktivierter Zona pelucida. **2 Zell-Stadium:** Die Zygote beginnt sich symmetrisch in Blastomere zu teilen, wobei die Zellgröße immer weiter abnimmt. **Morula-Stadium:** 16-32-Zellstadium in dem die Zellen mit der Differenzierung beginnen und die Totipotenz verlieren. **Blastozysten-Stadium:** Größenzunahme nach Auflösen der Zona pelucida; Räumliche Auftrennung in umgebendes Trophoblastepithel (=äußere Zellmasse) und Ausbildung eines Embryonapols mit Embryoblast (=innere Zellmasse). (Entnommen und modifiziert aus: Keith L. Moore et al., *Embryologie Entwicklungsstadien-Frühentwicklung-Organogenese-Klinik*, S.3)

### 1.3 Stammzellen

Stammzellen sind spezialisierte Zellen, die in der Lage sind sich einerseits durch asymmetrische Teilung selbst zu erneuern und andererseits ausdifferenzierende Tochterzellen zu bilden. Die verschiedenen existierenden Stammzellen werden nach ihrer Fähigkeit unterschieden, möglichst viele Gewebetypen eines

Organismus zu bilden. Es folgt nun eine kurze Einteilung mit exemplarischer Darstellung wichtiger Methoden.

#### Totipotente Stammzellen:

Die Definitionskriterien für die höchste Stufe der Differenzierungsfähigkeit, der sogenannten **Totipotenz** einer Zelle, unterscheiden sich in der Literatur. Nach strenger Definition ist eine totipotente Zelle nach Implantation in den Uterus alleine in der Lage einen reproduktionsfähigen adulten Organismus zu bilden [2, 3]. Die befruchtete Oozyte ist demnach das typische Beispiel für eine totipotente Zelle. Die aus der Oozyte durch Teilung entstehenden Blastomeren sind im 2- bis 8-Zellstadium noch in der Lage nach artifizierlicher Trennung einen adulten Organismus zu bilden. Experimentell konnte dies in verschiedenen Nutz- und Modellsäugetieren gezeigt werden [3-6].

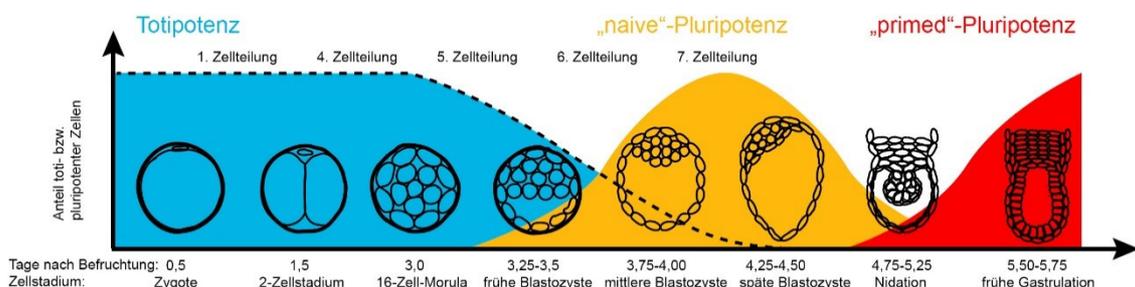
Mit dem Verfahren des somatischen Zellkerntransfers (SCNT) ist es möglich, totipotente Zellen in vitro zu generieren, die nach Verpflanzung in einen Uterus und erfolgreicher Embryonalentwicklung lebensfähige Organismen bilden. Bei dieser Methode wird ein ausdifferenzierter Zellkern in eine, nach der Befruchtung entkernte Eizelle eingebracht und durch das umgebende Milieu und artifizierlicher Stimulation in einen Oozytenuklear-ähnlichen Zustand versetzt. Für die Erforschung dieser epigenetischen Reprogrammierung ausdifferenzierter somatischer Zellkerne [7] wurde 2012 der Nobelpreis für Medizin an Sir J. Gurdon verliehen. Mittels SCNT wurde 1997 der erste lebensfähige, genetisch identische Nachkomme eines Säugetieres, das „Klonschaf Dolly“ erzeugt [8].

Die weniger strenge Definition besagt, dass eine totipotente Zelle in der Lage sein muss, sich in alle Zelltypen eines Organismus differenzieren zu können [3, 9]. Dies schließt neben der oben genannten Oozyte und den frühen Blastomeren auch Zellen ein, die nicht in der Lage sind einen gesamten Organismus zu bilden, jedoch in artifizierlich erzeugten Chimären-Blastozysten in allen embryonalen- (innere Zellmasse) und extraembryonalen (Trophoectoderm) Gewebeanteilen nachgewiesen werden können.

## Pluripotente Stammzellen:

Zellen, die unter geeigneten Bedingungen in Gewebetypen aus allen drei Keimblättern differenzieren können, jedoch nicht in der Lage sind extraembryonale Gewebeanteile (Trophoectoderm) zu bilden, nennt man **pluripotent** [10]. Bei der Pluripotenz unterscheidet man zwei Entwicklungsstadien: die frühe „**naive**“ und die spätere „**primed**“ Pluripotenz [11]. Die aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste der Maus gewonnenen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und die aus ihnen generierten embryonalen Stammzelllinien sind „**naiv**“. Sie können Gewebetypen aller Keimblätter bilden. Auch humane embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste sind ursprünglich im naiven Pluripotenz-Zustand. Die meisten verfügbaren humanen ES-Zelllinien, aber auch die hier verwendeten murinen Postimplantations-Epiblastzellen, sind jedoch bereits „**primed**“. Sie weisen Einschränkungen in ihrer regenerativen Kapazität auf, vor allem hinsichtlich der endodermalen Differenzierung [11, 12].

### **Abbildung 1.3-1: Differenzierungspotential während der frühen Embryogenese**



**Abbildung 1.3-1: Differenzierungspotential während der frühen Embryogenese:** Auf der Y-Achse ist der Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der embryonalen Zellmasse dargestellt. Die X-Achse stellt einen Zeitstrahl der frühen Embryonalentwicklung dar. Das **totipotent** (blau) Zellstadium beginnt mit der Zygote nach Verschmelzung der Pronuclei und bleibt bis zum Morulastadium erhalten. Die Embryoblastzellen des Blastozystenstadiums besitzen eine „**naive**“-Pluripotenz (gelb) und können Gewebe aller drei Keimblätter bilden. Mit der Nidation und der beginnenden Gastrulation verliert der Embryoblast diese Fähigkeit und es beginnt das Stadium der „**primed**“-Pluripotenz (rot) mit deutlich herabgesetzter endodermaler Differenzierungskapazität. (Entnommen und modifiziert aus Boroviak T et al., *The birth of embryonic pluripotency*. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2014. 369(1657))

Die Induzierten-Pluripotenten-Stammzellen (IPS-Zellen) wurden erstmals durch Überexpression von 29 Kandidatenstammzellgenen, die letztendlich auf 4 Gene reduziert werden konnten (cMYC, Sox-2, Oct-4 und Klf-4), in ausdifferenzierten murinen Bindegewebszellen erzeugt. Auch sie sind in der Lage sich selbst in Zellkultur über Embryonalkörperchen zu erneuern und sich in Gewebeanteile der drei Keimblätter zu differenzieren [13]. Die Technik konnte rasch auch auf menschliche Zellen übertragen werden. Im Jahr 2012 wurden die Wissenschaftler Sir John Gurdon und Shinya Yamanaka dafür mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

Nach der Entdeckung der induzierten Pluripotenz bestand die große Hoffnung, dass aus IPS-Zellen in naher Zukunft patientenspezifisches Zellmaterial für regenerative Medizin und Forschung gewonnen werden könnte. Gleichzeitig hoffte man mit dieser vergleichsweise einfacher anzuwendenden Technik, die ethischen Probleme des somatischen Zellkerntransfers (SCNT) zu umgehen. Die Euphorie legte sich jedoch angesichts der noch zu meisternden Probleme. Mittels IPS-Technologie erzeugte Zelllinien unterliegen einem erhöhten Risiko der malignen Entartung, da zum einen durch die Verwendung von retroviralen Vektoren Insertionsmutationen entstehen können, zum anderen die überexprimierten Stammzellgene teilweise selbst Onkogene sind [14]. Doch auch wenn man diesen Sicherheitsbedenken durch weitere Reduktion der benötigten überexprimierten Pluripotenzgene, durch Verwendung von nicht in das Wirtsgenom integrierender Plasmidtransfektion oder sogar über DNA-freie Zell-Reprogrammierung Abhilfe geschaffen hat, stehen einer erfolgreichen Anwendung der IPS-Technik noch andere substantielle Probleme im Wege [15]. Epigenetische Analysen mittels Bi-Sulfitsequenzierung zum Anzeigen des Methylierungsstatus der einzelnen DNA-Abschnitte haben gezeigt, dass die erzeugten IPS-Stammzelllinien sich zum einen untereinander, zum anderen deutlich von wildtypischen ES-Zellen unterscheiden. Dies wird besonders deutlich an der verbleibenden X-Inaktivierung in den meisten humanen weiblichen IPS-Zelllinien [16].

### Multipotente Stammzellen:

Gewebespezifische Stammzellen, welche unter physiologischen Bedingungen zur Selbsterneuerung und typischerweise zur Bildung von Gewebetypen nur noch eines Keimblatts befähigt sind, nennt man **multipotent**. Typische Vertreter sind die neuronalen adulten Stammzellen des ZNS und die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks [10].

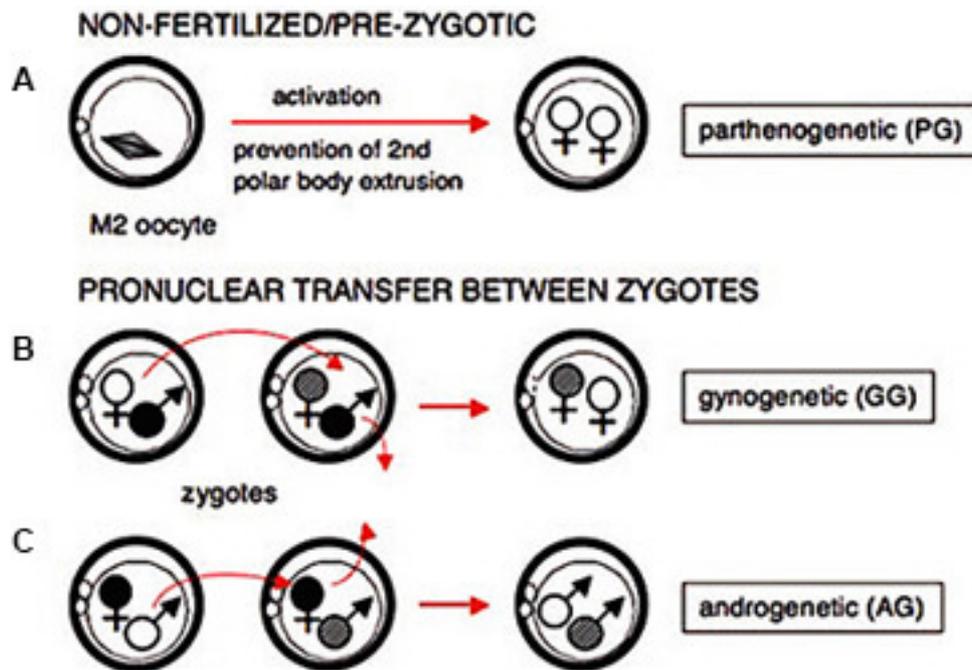
#### **1.3.1 Uniparentale Stammzellen**

Die uniparentalen Stammzelllinien, insbesondere die in dieser Arbeit genauer beleuchteten androgenetischen (AG-ES-Zellen), gehören zur Gruppe der pluripotenten Stammzellen. Uniparentale Zellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz, der jedoch im Gegensatz zu biparentalen Zellen nur von einem Geschlecht stammt. Eine uniparentale Zygote kann bis zum Blastozystenstadium heranreifen. Aufgrund von genomischer Prägung (s. u. 1.4 Imprinting) ist eine weitere Embryogenese jedoch nicht möglich.

Für die Erzeugung der beiden in dieser Arbeit verwendeten, uniparentalen Zelllinien, wurde aus einer befruchteten Eizelle vor Eintreten der Karyogamie der maternale Pronucleus entfernt und durch einen eGFP-markierten, paternalen Pronucleus ersetzt. Die biparentale Kontrollzelllinie wtB1 wurde mit der gleichen Methode erzeugt, hier wurde jedoch ein maternaler Pronucleus durch einem eGFP-markierten, maternalen Pronucleus ausgetauscht. Die verschiedenen Zellen wurden dann intrauterin platziert und reiften bis zum Blastozystenstadium heran. Aus deren innerer Zellmasse wurden dann Zellen entnommen und in vitro weiter kultiviert. Sie bilden die Grundlage für die verwendeten Zelllinien [17].

Eine früher verwendete Möglichkeit zur Erzeugung von uniparentalen gynogenetischen Zygoten „in vitro“ besteht, indem im Meiosestadium II ein Ausschluss des Polkörperchens durch Aktinpolymerisationsinhibition verhindert und die Eizelle für die weitere Entwicklung chemisch aktiviert wird. Dies führt zur Verschmelzung der beiden verbleibenden Zellkerne. Die so gewonnene Oozyte ist in der Lage sich zu teilen und bis zum Blastozystenstadium heranzureifen [18].

## Abbildung 1.3-2: Erzeugung uniparentaler Zygoten



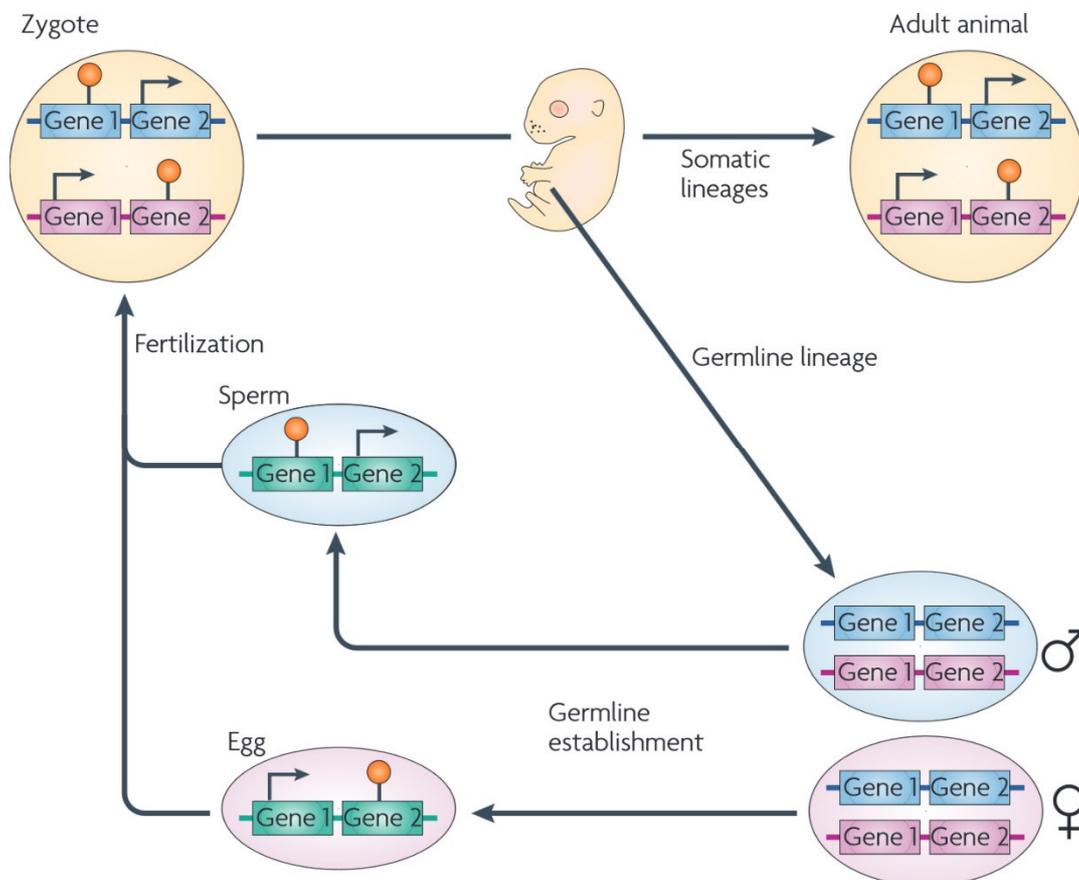
**Abbildung 1.3-2: Erzeugung uniparentaler Zygoten:** (A) Beispielhafte Darstellung der Erzeugung einer parthenogenetischen Zygote nach Aktivierung im M2-Stadium und Fusion des Polkörperchens mit dem verbleibenden Zellkern. (B, C) Darstellung der Erzeugung gynogenetischer und androgenetischer Zygoten durch Pronucleustransfer in befruchteten Eizellen. (Entnommen aus Eckardt, S., et al., *In vivo and in vitro differentiation of uniparental embryonic stem cells into hematopoietic and neural cell types. Organogenesis*, 2008. 4(1): p. 33-41)

## 1.4 Imprinting

„Imprinting“ oder genomische Prägung beschreibt einen epigenetischen Genregulationseffekt der auf ca. 1 % aller Gene zutrifft. In einer Zygote liegt von den autosomalen Genen je ein von den Eltern vererbtes Allel vor. Die Expression desselben hängt bei den „imprinted“-Genen jedoch davon ab, ob sie maternal über die Oozyte oder paternal über das Spermium weitergegeben wurden. Durch elternabhängige Methylierung und/oder Histonmodifikationen der weiterzugebenden Allele in der Keimbahn, wird die Transkription derselben in der F1-Generation herabgesetzt. In der Folge wird das unmethyliert vererbte Allel des anderen Geschlechts - relativ gesehen - stärker exprimiert.

Für die phänotypische Expression der Gene, die vom Imprinting betroffen sind bedeutet dies, dass der klassische Mendelsche Erbgang hier umgangen wird und bestimmte Phänotypen geschlechtsspezifisch weitergegeben, oder erst wieder in der F2-Generation ausgebildet werden. Die evolutionsbiologischen Vorteile der diploiden Vererbung werden durch das Imprinting aufgehoben. Es ist jedoch noch ungeklärt, worin der Vorteil dieses intragenomischen Geschlechtskonflikts liegt [19].

**Abbildung 1.4-1 Imprinting**

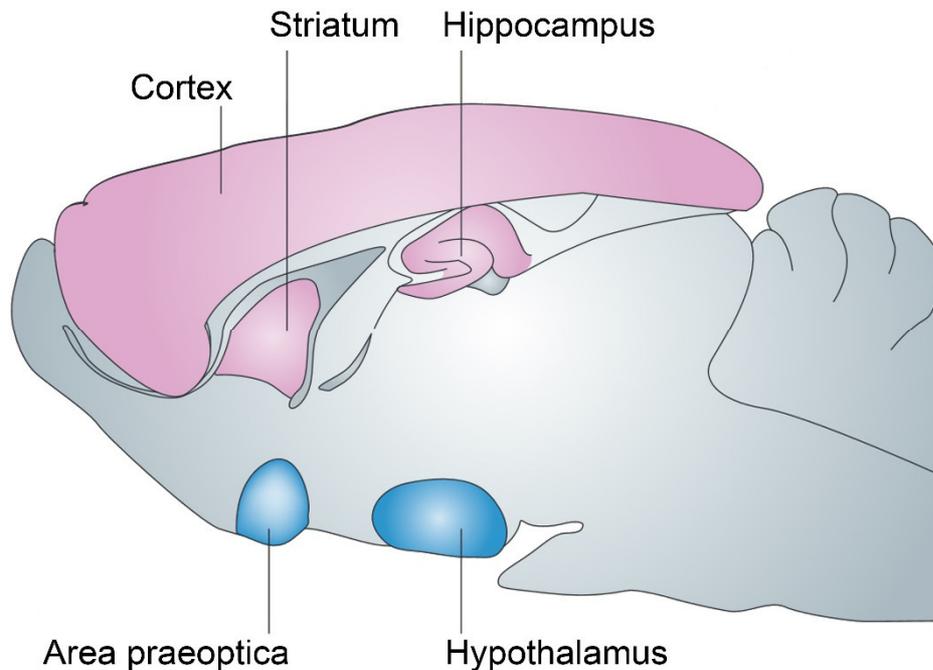


**Abbildung 1.4-1: Imprinting:** In den Gameten der Keimbahn (**unten rechts**) werden zunächst alle Methylierungen der DNA entfernt. Je nach Geschlecht werden dann im Rahmen der Spermato- bzw. Oogenese (**unten links**) die geschlechtsspezifischen Methylierungen etabliert (**orange** Kugeln). Nach der Befruchtung entsteht nun eine Zygote (**oben links**), in der, im sich entwickelnden Embryo und später adultem Tier (**oben rechts**), die Beispielgene geschlechtsspezifisch exprimiert werden. Gen1 wird maternal, Gen 2 paternal exprimiert. (Entnommen aus Wilkinson, L. S., W. Davies, and A. R. Isles, *Genomic imprinting effects on brain development and function*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(11): p. 832-843)

In ersten Arbeiten stellte man fest, dass die uniparentalen Zygoten (PG, AG, GG) zwar bis zum Blastozystenstadium heranreiften, eine weitere Embryogenese jedoch nicht stattfand. Daraus schloss man, dass sich das maternale und paternale Genom funktionell unterscheiden müsse und postulierte die Theorie der Genregulation über genomische Prägung, das sogenannte „Imprinting“ [20]. Die ersten Gene, bei denen Imprinting nachgewiesen werden konnte, waren die Gene für den paternal exprimierten Wachstumsfaktor Igf-2 (insuline like growth factor II) und dem dazugehörigen maternal exprimierten Rezeptor Igf-2r (insuline like growth factor II-Rezeptor) [21, 22]. Es konnte eine signifikante Häufung von CpG-Inseln im Promotorbereich dieser Gene gefunden werden. Diese führen typischerweise durch Methylierung zu einer herabgesetzten Genexpression, sodass man vermutete, dass Methylierung ein wesentlicher Imprinting-Mechanismus sein muss. In späteren Methylierungsanalysen mittels Bi-Sulfit-Sequenzierung bestätigte sich die Vermutung [23]. Doch nicht nur bei dem Wachstumsfaktor Igf-2 und seinem Rezeptor konnte diese epigenetische Genregulation nachgewiesen werden. Mittlerweile kennt man über 1300 Genprodukte im zentralen Nervensystem, die dem Imprinting unterliegen [24-26]. Den Anfang machten jedoch auch hier nicht hochauflösende Sequenzierungsverfahren sondern ein elegantes Chimärenexperiment, in welchem maternale und paternale GFP-markierte, uniparentale Zellen in eine murine, wildtypische Blastozyste injiziert wurden. In der Embryonalentwicklung des Nervensystems dieser Chimären konnten die uniparentalen Zellen in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden. Sie zeigten jedoch eine unterschiedliche räumliche Verteilungshäufigkeit: maternale PG-Zellen fanden sich signifikant häufiger in neokortikalen Strukturen und im Striatum, während die paternalen AG-Zellen eine signifikante Häufung im Hypothalamus aufwiesen. Doch nicht nur die Verteilung der Zellen, sondern auch der makroskopische Phänotyp der Chimären zeigte Unterschiede. Die signifikant größeren AG-Chimären fielen im Vergleich zu wildtypischen „Kontrollchimären“ mit einem verminderten Gehirnvolumen, bei absolut betrachtet erhöhtem Körpergewicht, auf. Die PG-Chimären wiederum zeigten umgekehrt ein erhöhtes Gehirnvolumen bei vermindertem Absolutgewicht im Vergleich zum Wildtyp. Die hierfür

ursächliche epigenetische Prägung weist somit auf ein möglicherweise unterschiedliches „Interesse“ der maternalen und paternalen Prägung bei der Ressourcenverteilung während der Embryonalentwicklung hin [19, 27, 28].

**Abbildung 1.4-2: Verteilung uniparentaler Zellen im Chimärenexperiment**



**Abbildung 1.4-2: Verteilung uniparentaler Zellen im Chimärenexperiment:** Abgebildet ist die Skizze eines sagittal angeschnittenen Maushirns. Anreicherung von PG-Zellen (rosa) in neokortikalen Hirnabschnitten. Anreicherung von AG-Zellen in basalen Hirnregionen (blau). (Entnommen und modifiziert aus Wilkinson, L. S., W. Davies, and A. R. Isles, *Genomic imprinting effects on brain development and function*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(11): p. 832-843)

## 1.5 Neurogenese

### 1.5.1 Embryonale Neurogenese

Die embryonale Neurogenese beginnt mit der Ausbildung einer Neuralplatte aus Ektodermanteilen und der nachfolgenden Einfaltung (Neurulation). Das sich so bildende Neuralrohr schließt sich apikal und kaudal und bildet die zelluläre Grundlage für das zentrale Nervensystem. Der umschlossene Hohlraum bildet

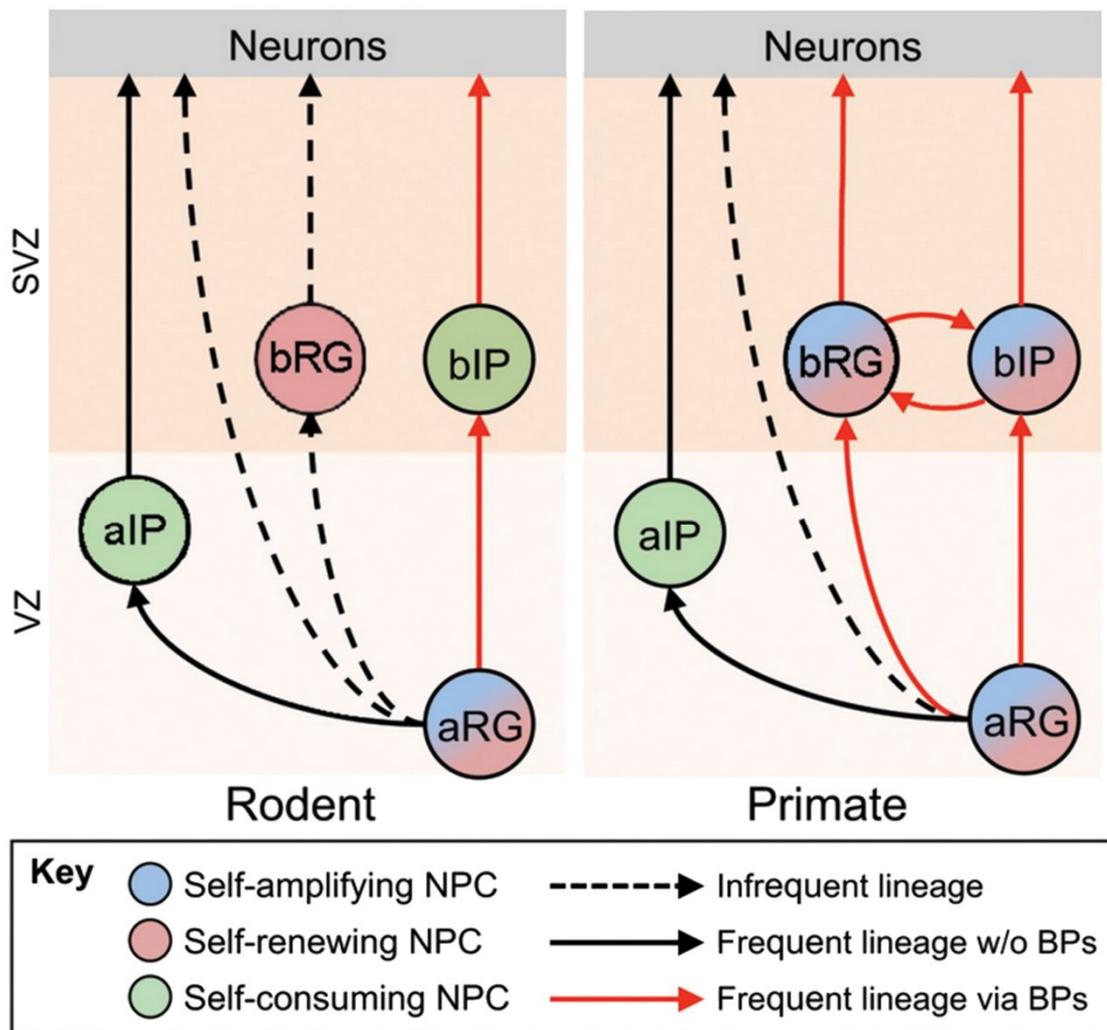
im späteren Organismus im apikalen Anteil das Ventrikelsystem, im kaudalen Anteil den Zentralkanal. Das Neuralrohr besteht histomorphologisch zunächst aus einem einschichtigen Epithel von neuroepithelialen Zellen (NECs), welche die ersten neuronalen Progenitorzellen darstellen. Diese sind basal mit der, das Neuralrohr umgebenden Basallamina verankert und grenzen, untereinander durch eine apikale Zonula adhaerens verbunden, das Neuralrohr lumen ab. Durch symmetrische Zellteilung der NECs kommt es zur exponentiellen Zellvermehrung sowie zur lateralen und radialen Vergrößerung des Neuroepithels. Typischerweise exprimieren proliferierende Progenitorzellen den Transkriptionsfaktor Pax6. Die Mitose der meisten Progenitorzellen findet in der ventrikulären Zone (VZ) knapp unter der ventrikulären Oberfläche statt. In Abhängigkeit des Zellzyklus bewegt sich der Zellkern entlang einer apikal-basalen Achse und befindet sich nur zwischen G2- und M-Phase in der ventrikulären Zone. Dieses Phänomen wird auch als interkinetische Kernmigration bezeichnet. Mit einem Umschalten der Zellteilung von symmetrischer zu asymmetrischer Teilung, beginnt die Bildung von ausdifferenzierten neuronalen Progenitorzellen. Diese bilden nach weiteren Teilungs- und Differenzierungsschritten postmitotische Neurone, die nach Ablösung aus der apikalen Zonula adhaerens entlang der radialen Fortsätze der apikalen Radialgliazellen (aRGs) zum basalen Pol wandern, sich hier in der kortikalen Platte sammeln und die zelluläre Grundlage für die graue Substanz des späteren Kortex bilden.

Die aRGs gleichen den NECs mit ihrer radialen Orientierung im histomorphologischen Aufbau, Einbindung in die apikale Zonula adhaerens und der Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung. Vergleichbar zu den NECs exprimieren sie den neuronalen Transkriptionsfaktor Pax6, exprimieren sie jedoch zusätzlich auch astrogliale Proteine wie beispielsweise GFAP. In der Neurogenese beginnt mit ihrem Erscheinen ein wichtiger Differenzierungszwischenschritt. Sie bilden mit ihren Fortsätzen, welche das gesamte Neuroepithel durchqueren, eine wichtige Leitstruktur für migrierende Zellen.

Auch in der subventrikulären Zone (SVZ) finden sich Radialgliazellen mit oben genannten Eigenschaften. Sie werden als basale Radialgliazellen (bRG) bezeichnet, weisen jedoch keine apikal verankerten Fortsätze mehr auf. Im Zusammenspiel mit den später beschriebenen basalen Intermediärprogenitorzellen (bIPs) bilden sie eine Quelle für neuronale Progenitorzellen außerhalb der VZ, die vor allem in höher entwickelten, gyrencephalen Säugetieren für die längere Aufrechterhaltung der Neurogenese wichtig sind.

Direkt aus den aRGs abgeleitet werden die apikalen und basalen Intermediärprogenitorzellen (aIP, bIP). Die IPs machen nach Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Pax6 typischerweise einen symmetrischen, neurogenen Zellteilungsschritt in der VZ (aIPs) oder der SVZ (bIPs) und bilden zwei postmitotische Neurone. Neben dieser Endstrecke der Neurogenese sind die bIPs der höher entwickelten, gyrencephalen Säugetiere zusammen mit bRGs zur Proliferation befähigt. Die Expression von Pax6 bleibt hier konstant, die SVZ nimmt im Vergleich zu lissenzephalen Säugetieren deutlich zu und leistet mit ihren proliferierenden Progenitorzellen einen wesentlichen quantitativen und modulierenden Beitrag zur Neurogenese [29].

Abbildung 1.5-1: Abstammung der Kortikalneurone

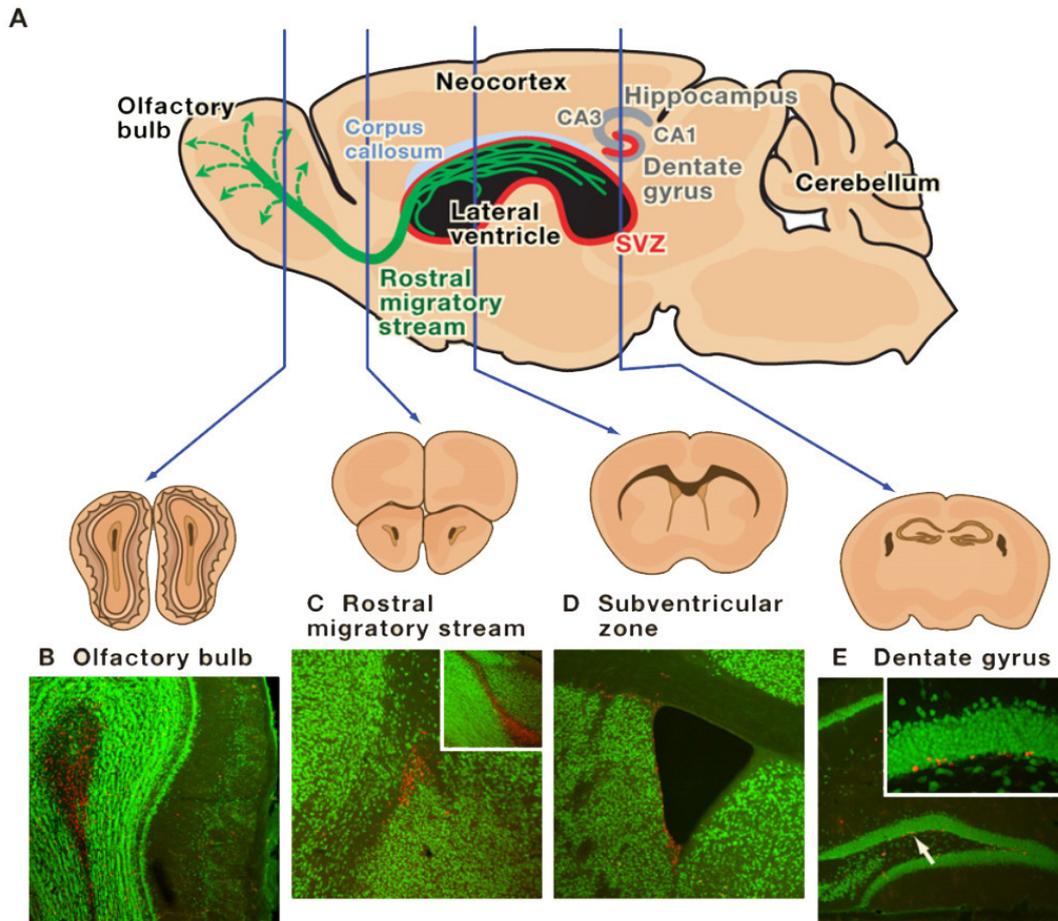


**Abbildung 1.5-1: Abstammung der Kortikalneurone:** Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen in einem skizzenhaft dargestellten Querschnitt des embryonalen Neuraepithels eines lissenzephalen (Rodent) und gyrenzephalen (Primate) Organismus. Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der in vivo vorkommenden Neuronalen-Progenitorzellen (NPC). Ausgehend von direkt am Ventrikel gelegenen apikalen Radialgliazellen (aRG) werden basale Radialgliazellen (bRG) und basale Intermediärprogenitorzellen (bIP) gebildet. In Nagetieren bilden die bIPs durch symmetrische Zellteilung den Hauptanteil der Kortexneurone. In Primaten dagegen tragen bRG und bIP durch asymmetrische Zellteilung zu einer weiteren Potenzierung der zu bildenden Kortexneurone bei. Apikale Intermediärprogenitorzellen (aIP) dagegen bilden bei Nagetieren wie auch bei Primaten durch symmetrische Zellteilung Kortexneurone. (Entnommen aus Florio, M., et al., *Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex*, *Development* 2014. 141(11): p. 2182-2194)

### 1.5.2 Adulte Neurogenese

Die während der Embryonalentwicklung generierten und ausdifferenzierten Kortexneurone verlassen den Zellzyklus und befinden sich in einem, unter physiologischen Umständen unumkehrbaren, postmitotischen Zustand. In zwei Nischen überdauern neuronale Stammzellen (NSCs) auch in adulten Säugetieren, behalten ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können über neuronale Progenitorzellen *in vitro* in alle drei neuronalen Zelltypen differenziert werden. Eine dieser Nischen ist die Subgranulärzone (SGZ) des hippocampalen Gyrus dentatus, in der Körnerzellneurone gebildet werden. Die andere Nische ist die direkt an der lateralen Ventrikelwand anliegende Subventrikulärzone (SVZ). Hier werden neuronale Vorläuferzellen gebildet, die über das rostrale Migrationssystem in den Bulbus olfactorius migrieren und zu Interneuronen heranreifen. Experimentell wurden diese Zellen durch Präparation dieser Nischen aus murinen Gehirnen gewonnen, in Neurosphärenkultur vermehrt und dann durch unterschiedliche Differenzierungsprotokolle in Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten umgewandelt [30]. *In vivo* konnten diese Nischen, sowie die Migration und Ausdifferenzierung von neugebildeten Neuronen mittels Doppelfärbungen mit Bromdesoxyuridin (BrdU) und Proliferations- bzw. Differenzierungsmarkern in Nagetieren dargestellt werden [31]. BrdU ist ein Analogon des Nucleosids Thymidin und wird in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Mit Antikörpern gegen BrdU können mitotisch aktive Zellen dargestellt werden (Siehe Abb. 1.4-2).

## Abbildung 1.5-2: Adulte Neurogenese



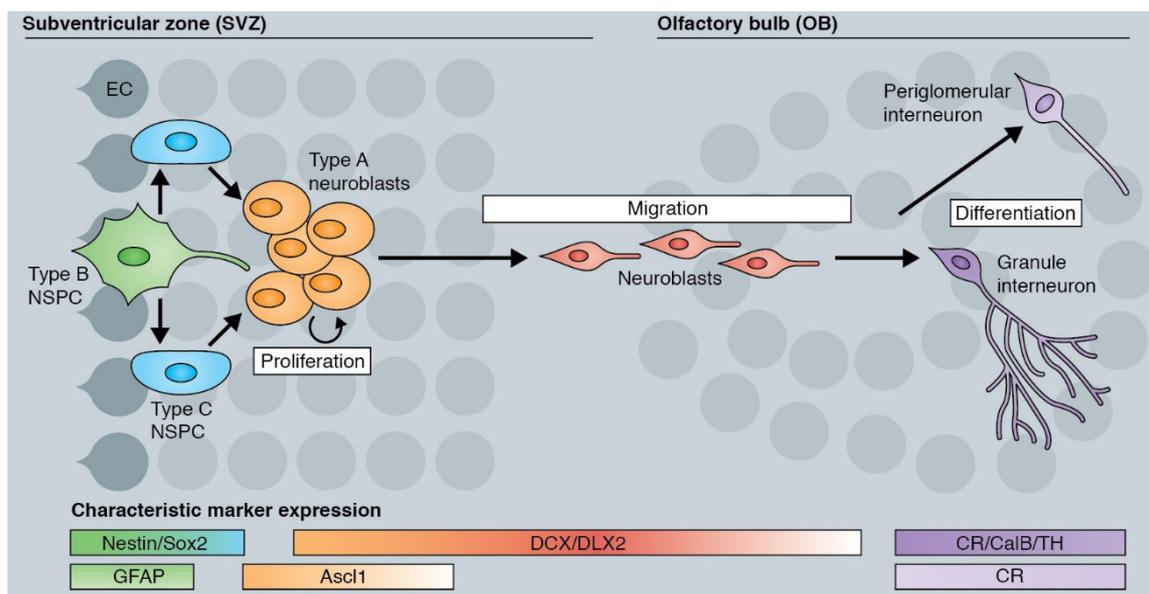
**Abbildung 1.5-2: Adulte Neurogenese:** (A) Skizze eines sagittal angeschnittenen Maushirns. Die zwei NSC-Nischen mit der periventrikulären Subventrikulärzone (SVZ) und der rotmarkierten Subgranulärzone (SGZ) die den hippocampalen Gyrus dentatus umgibt. (B)-(E) Koronarschnitte durch NSC-Nischen und Migrationswege; Grün = NeuN (ein postmitotischer nukleärer neuronaler Marker); Rot = BrdU (Bromdesoxyuridin – ein Zellproliferationsmarker). (B) Bulbus olfactorius (C) Rostrales Migrationssystem (RMS) (D) Subventrikulärzone (SVZ) (E) Gyrus dentatus mit umgebender Subgranulärzone (SGZ). (Entnommen aus Chunmei Zhao et al., *Mechanisms and Functional Implications of adult Neurogenesis. Cell* 132, 2008. 132(4): p. 645-660)

### Subventrikuläre Zone (SVZ)

In der murinen subventrikulären Zone befinden sich, in direkter Nachbarschaft zu den Ependymzellen des Ventrikelsystems, proliferierende Neuronale-Progenitorzellen (NSPCs). Diese generieren Neuroblasten, die über das rostrale

Migrationssystem in den Bulbus olfactorius wandern und hier zu Interneuronen ausdifferenzieren. Diese Stammzellnische gibt es auch in der humanen subventrikulären Zone, hier werden jedoch nur sehr vereinzelt neue Neurone gebildet und dementsprechend fehlt ein morphologisches Korrelat zum murinen RMS. Möglicherweise entspricht die adulte Neurogenese der SVZ beim Mensch einem evolutionsbiologischen Rudiment ohne funktionelle Relevanz [32, 33].

### Abbildung 1.5-3: Adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ)



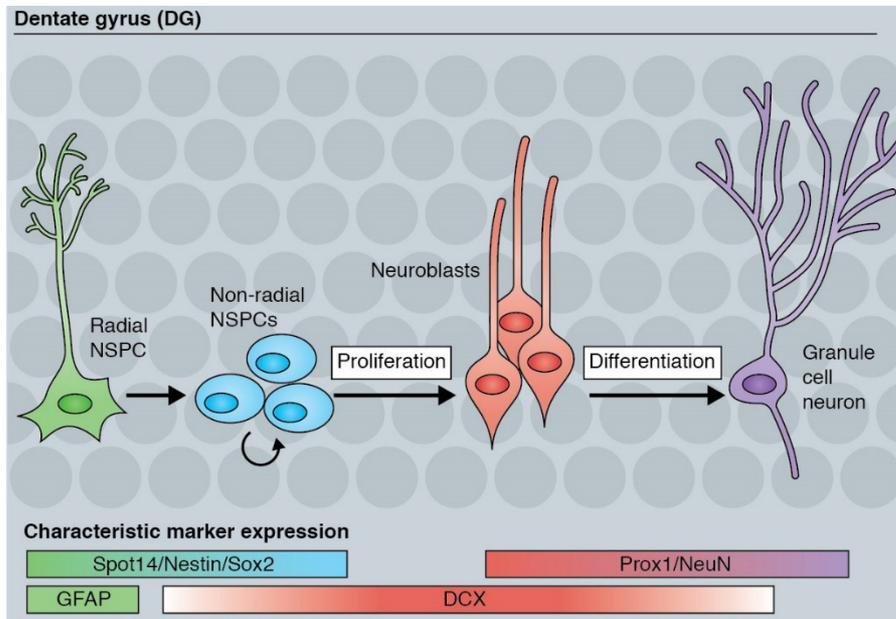
**Abbildung 1.5-3: Adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ):** In der subventrikulären Zone (SVZ) befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den Ependymzellen (EC) der Ventrikelwand neuronale Typ B Stammzellen (NSPC), die GFAP und Nestin exprimieren. Diese differenzieren zu Neuroblasten, welche über das Rostrale Migrationssystem (RMS) in den Bulbus olfactorius (OB) migrieren. Hier differenzieren sie in verschiedene Interneurone, die sich im Laufe von mehreren Wochen in das bestehende Netzwerk integrieren und an der lateralen Inhibition beteiligt sind. (Entnommen aus Simon M. G. Brown et al., *Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. Development*, 2014, 141(10): p.1983-1986)

### Hippocampale Subgranularzone (SGZ)

Die Subgranularzone schließt sich basal an den Gyrus dentatus an. Die hier existierenden neuronalen Stammzellen sind radiale Gliazellen, die der heterogenen Gruppe der Astrozyten zugeordnet werden. Aus diesen können durch asymmetrische Teilung transient amplifizierende Progenitorzellen entstehen, welche nach symmetrischer Teilung ausdifferenzieren und nun

Neuroblasten genannt werden. Diese wandern in den Gyrus dentatus ein und bilden hier im Laufe von ca. 4 Wochen postmitotische, sich in das bestehende Netzwerk integrierende, Körnerzellneurone [34].

#### Abbildung 1.5-4: Adulte Neurogenese im Hippocampus



**Abbildung 1.5-4: Adulte Neurogenese im Hippocampus:** (Grün) Radiale GFAP und Nestin exprimierende Gliazellen bilden durch asymmetrische Teilung (Blau) neuronale Progenitorzellen, die über transiente Proliferation (Orange) Neuroblasten bildet. Diese wandern in den Gyrus dentatus ein und bilden postmitotische (Lila) Körnerzellneurone. (Entnommen aus Simon M. G. Brown et al., *Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. Development* 2014, 141(10): p.1983-1986)

Der Gyrus dentatus ist eine wichtige Station in der hippocampalen Verschaltung, welche exklusiv in Säugetieren zu finden ist. Die hier vorkommenden Körnerzellen erhalten über einen weit verzweigten Dendritenbaum Informationseingänge aus dem Tractus perforans des entorhinalen Kortex und projizieren über Moosfasersynapsen in die CA3-Region (dritte Region des Cornu ammonis) [32]. Der murine Hippocampus spielt für die räumliche Orientierung und Gegenstandserkennung eine wichtige Rolle. Durch hippocampusabhängige Lerntests (bsp. „Morris water maze“) oder durch Bereicherung der definierten Lebensumwelt der Labortiere, konnte eine quantitative Zunahme der Neurogenese gezeigt werden [34].

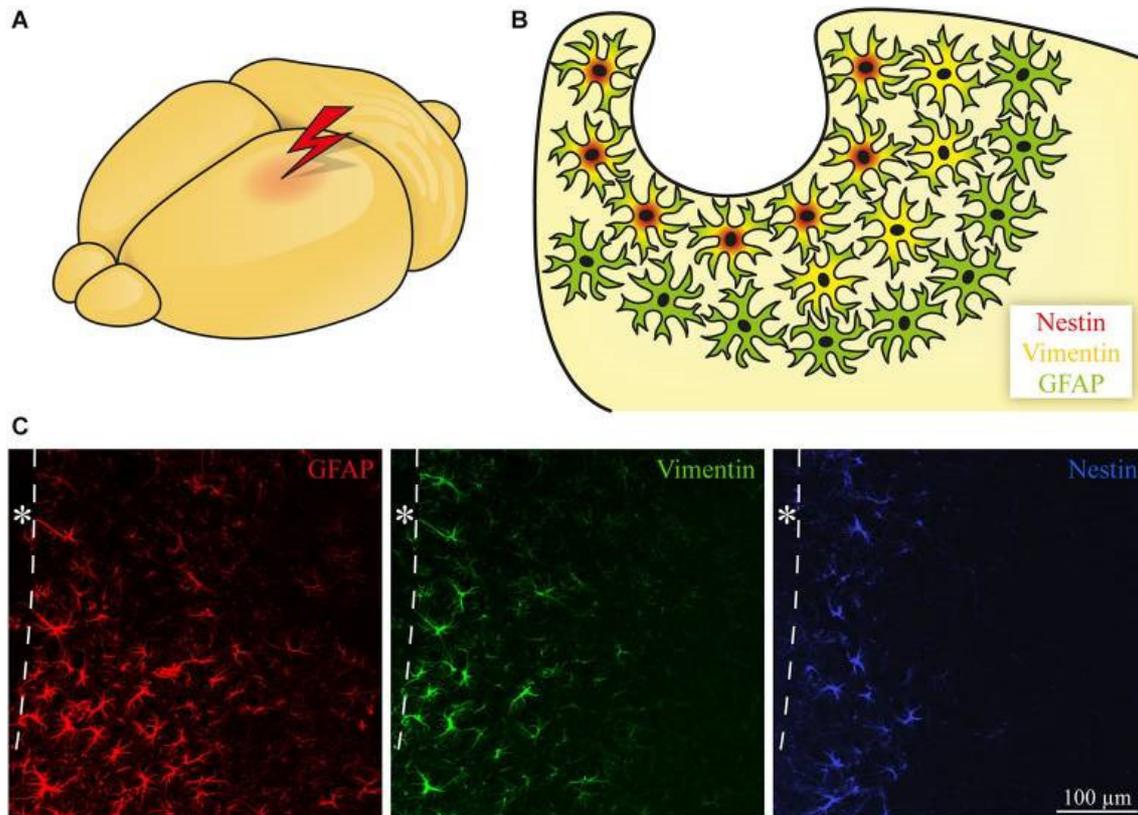
Im Gegensatz zur SVZ konnte im humanen Hippocampus eine quantitativ und funktionell signifikante adulte Neurogenese nachgewiesen werden. Die sicheren tierexperimentellen Nachweismethoden (beispielsweise BrdU-Markierung) konnten aus ethischen Gründen nicht auf den Mensch übertragen werden. Mit der  $^{14}\text{C}$ -Radiokarbonbestimmung konnte das Zellalter einzelner Zellen jedoch auf ca. 1,5 Jahre genau abgeschätzt werden [35]. Zunutze macht man sich den, seit Ende der überirdischen Atomtests abfallenden, atmosphärischen  $^{14}\text{C}$ -Gehalt. Dieser korreliert mit dem  $^{14}\text{C}$ -Gehalt in der zu diesem Zeitpunkt synthetisierten DNA und erlaubt so Rückschlüsse auf das Zellalter. Mit mathematischen Modellen konnte die humane, hippocampale Neurogenese mit nur minimalem Abfall im höheren Lebensalter auf ca. 700 Zellen pro Tag errechnet werden. Man schätzt, dass bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung im Laufe des Lebens ca. ein Drittel der hippocampalen Körnerzellneurone durch diese Zellerneuerung ausgetauscht werden [36].

## **1.6 Cerebrale Zelltransplantation**

Aufgrund des postmitotischen Zustandes ausdifferenzierter Nervenzellen und der oben genannten eingeschränkten adulten Neurogenese, ist die regenerative Kapazität eines adulten Gehirnes nach größerem Substanzdefekt wie einem Trauma, einer Ischämie oder einer neurodegenerativen Erkrankung stark eingeschränkt. Einen möglichen therapeutischen Ausweg stellt die cerebrale Transplantation von neuronalen Progenitorzellen dar. Experimentell konnte im murinen Gehirn nach Ischämie und Transplantation von neuronalen Progenitorzellen in das betroffene Areal, ein positiver Effekt auf das neurologische „Outcome“ der motorischen Funktion gezeigt werden. Dass dieser Effekt nicht nur auf Zellersatz basiert, zeigte, dass auch nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSC), die selbst nicht in die neuronale Differenzierung übergehen können, ein positiver Effekt erreicht wurde.

Man geht davon aus, dass MSCs über die Interaktion mit Endothelzellen und dem Ausschütten von neurotrophen Wachstumsfaktoren die Angiogenese und Neurogenese stimulieren [37].

## Abbildung 1.6-1: Aktivierung von Astroglia nach Trauma



**Abbildung 1.6-1 Aktivierung von Astroglia nach Trauma:** (A, B) Schematische Darstellung der perifokalen Gliose nach Neurotrauma. Reaktive Astrozyten exprimieren GFAP, einige auch die neuralen Progenitormarker Vimentin und Nestin. (C) Fluoreszenzmikroskopische Schnitte durch murinen visuellen Kortex nach fokalem Trauma durch Laser (mit \* markiert). Färbungen für GFAP, Vimentin und Nestin. (Entnommen aus Lars Roll et al., *Influence of the extracellular matrix on endogenous and transplanted stem cells after brain damage. Cellular Neuroscience* 8, 2014 Article 291 p.1-21).

Die erfolgreiche Zelltransplantation im ZNS ist stark vom umgebenden Milieu abhängig. In eigenen Vorversuchen zeigte sich eine Zellansiedelung in vitalem Gewebe, ohne adäquates Trauma, als ineffektiv. Auch direkt nach Trauma kann bedingt durch die Gewebnekrose und die damit einhergehende Immunreaktion keine erfolgreiche Transplantation durchgeführt werden. Die nun einsetzende Gliose, mit der Aktivierung und teilweise De-Differenzierung von Astrozyten (siehe Abbildung 1.6-1) schafft ein Milieu, in dem die Regeneration beginnen kann. Durch die Proliferation von Neuroblasten, vor allem aber durch die Bildung einer glialen Narbe reagiert das ZNS auf das Trauma. In diesem Milieu können 14 Tage nach Trauma eingebrachte neuronale Progenitorzellen überleben und differenzieren. Diese Milieuänderungen werden mutmaßlich durch gliabedingte Änderungen der Extrazellulärmatrix (EZM) verursacht [38]. In der spezialisierten EZM binden beispielsweise in den Stammzellnischen spezifische Wachstumsfaktoren und interagieren mit den Integrinen der Neuroblasten, wodurch eine räumliche Abgrenzung zum umliegenden Gewebe entsteht [39]. Die nun einsetzende Ausdifferenzierung der endogenen und transplantierten neuronalen Progenitorzellen, die in vitro - bedingt durch die hohe Konzentrationen an Wachstumsfaktoren - innerhalb von 14 Tagen erreicht wird, dauert in vivo mehrere Monate (Siehe Abbildung 1.6-2).



Ein wesentlicher Aspekt bei der Transplantation von Progenitorzellen aus der Stammzellendifferenzierung ist die zu erwartende Tumorfrequenz. Nach Transplantation von undifferenzierten embryonalen Stammzellen bilden diese Teratome. Bei der Gewinnung von Progenitorzellen lässt sich - methodisch bedingt - nicht immer ausschließen, dass noch potentiell pluripotente, undifferenzierte Zellen in der zu transplantierenden Zellmasse vorhanden sind. Ein anderer wesentlicher Risikofaktor ist die Selektion von schneller proliferierenden Zellen in der Zellkultur, die möglicherweise Onkogenmutationen aufweisen. Die Gefahren, die bei der überstürzten klinischen Anwendung am Mensch drohen, werden immer wieder in traurigen Einzelfalldokumentationen belegt. So entwickelte beispielsweise ein Junge, dem aufgrund einer schweren neurodegenerativen Erkrankung (Louis-Bar-Syndrom) intracerebelläre und intraventrikuläre neurale Stammzellinjektionen verabreicht worden waren vier Jahre nach Transplantation einen malignen multifokalen Hirntumor. In der histopathologischen Aufarbeitung des Tumorgewebes konnte eine Abstammung von den transplantierten Donorzellen nachgewiesen werden [40]. Trotz des nach wie vor nicht sicher kontrollierbaren Risikos, werden noch immer in ethisch zweifelhaften Studien, humane Zelltransplantationen an Patienten mit schweren neurologischen Schäden, als letzte Therapieoption durchgeführt [41].

## **1.7 Voruntersuchungen**

Das neuronale Differenzierungspotential der hier verwendeten uniparentalen Zelllinien wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Albrecht Müller zunächst von Dr. Timo C. Dinger und Dr. Soon Won Choi im Rahmen ihrer Dissertations-Arbeiten untersucht [17]. Nach Etablierung der Differenzierungsschritte von embryonalen Stammzellen hin zu neuronalen Progenitorzellen in vitro, führten sie deskriptive RNA-Expressionsstudien, Methylierungsanalysen und Blastozysteninjektionen zur Generierung von Chimären durch. Zusammen mit Frau Prof. A.-L. Sirén's Arbeitsgruppe und ihrer neurowissenschaftlichen Expertise auf dem Gebiet der Regeneration und Neurogenese wurden darauf aufbauende, funktionelle Untersuchungen der bisher vor allem in vitro untersuchten Zelllinien geplant.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Fragestellung der Arbeit zielt auf die Schnittstelle der in vivo- bzw. in vitro-Neurogenese aus uniparentalen embryonalen Stammzellen. Histomorphologisch konnte in vitro eine, im Vergleich zu wildtypischen Zellen, unverändert verlaufende Differenzierung hin zu neuronähnlichen Zellen gezeigt werden [17]. In Chimärenexperimenten sah man dagegen in vivo im ZNS keine homogene Verteilung der Neurone mit uniparentaler Herkunft, sondern isolierte neuronale Subpopulationen beispielsweise der AG-Zellen im Hypothalamus [19, 27, 28]. Dieser Widerspruch sollte im Hinblick auf den Einfluss und die Relevanz des Imprintings auf die Neurogenese, sowie auf die Möglichkeit einer uniparentalen neuronalen Zellersatztherapie untersucht werden. Mit einer histologischen Analyse durch Auswertung von immunhistochemischen Färbungen am hochauflösenden Konfokalmikroskop, sowie funktionellen elektrophysiologischen Analysen, sollte zunächst die in vitro-Neurogenese genauer beleuchtet werden. In einem nächsten Schritt sollte dann die mögliche Integration uniparentaler neuronaler Progenitorzellen in vivo nach Trauma gezeigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten uniparentalen und wildtypischen pan-neuralen murinen Vorläuferzellen (pNPCs) und ausdifferenzierte, humane neuronähnliche Zellen (NLCs) wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Müller aus dem Zentrum für experimentelle Medizin zur Verfügung gestellt. Diese wiederum bezieht die über Pronucleustransfer erzeugten Zelllinien aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. John McLaughlin (Nationwide Children's Hospital, Columbus, USA). Die Zelllinie V6.5 ist eine gekaufte Zelllinie (Open Biosystems, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland)

Tabelle 1: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>AGA2</b>	Murin	Pronucleustransfer, uniparental, paternal, eGFP positiv
<b>AGB6</b>	Murin	Pronucleustransfer, uniparental, paternal, eGFP positiv
<b>wtB1</b>	Murin	Pronucleustransfer, biparental, eGFP positiv
<b>V6.5</b>	Murin	Wildtypisch, biparental, eGFP negativ
<b>LLC9P</b>	Human	Parthenogenese, uniparental, maternal, eGFP negativ

#### 2.1.2 Versuchstiere

Für die Transplantationen, sowie die Etablierung der elektrophysiologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Versuche wurden Mäuse der Linie C57/BL6 verwendet.

Tabelle 2: verwendete Versuchstiere

<b>Mauslinie</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Zeitpunkt</b>	<b>Herkunft</b>
<b>C57BL/6</b>	Transplantation	4 Wochen postnatal	Harlan Winkelmann, Deutschland
<b>C57BL/6</b>	Hippocampale Zellkultur	Tag 14 der Embryonalentwicklung	

## 2.1.2.1 Reagenzien und Materialien

Tabelle 3: Zellkultur

Produkt	Hersteller
24-well Kulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Glas-Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Tabelle 4: Molekularbiologie

Produkt	Hersteller
TRizol® RNA Isolation Reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
DNase I	Thermoscientific, Schwerte, Germany
Maxima Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
Tag DNA Polymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany

Tabelle 5: Primersequenzen

Gen	Sequenz fw	Sequenz rv	Hybridisierungstemp. in [°C]	Produktgröße in [bp]
β-actin	GATATCGCTGC GCTGGTCGTC	ACGCAGCTCATTG TAGAAGGTGTGG	60	276
AMPA1	CAAGTTTTCCCG TTGACACATC	CGGCTGTATCCAA GACTCTCTG	60	165
CaV 1.2	ATGAAAACACGA GGATGTACGTT	ACTGACGGTAGAG ATGGTTGC	60	224
GabaA α1	GTCACCAGTTTC GGACCAGT	TCACGGTCAACCT CATGGTG	60	268

Tabelle 6: Elektrophysiologie

Produkt	Hersteller
Borosilikat-Glaspipetten 2mm/1,16mm	Science ProductsGmbH, Best.-Nr. GB200F-10
Tetrodotoxin (TTX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Tabelle 7: Immunfluoreszenzmikroskopie

Produkt	Hersteller
Normales Pferdeserum	Science ProductsGmbH, Best.-Nr. GB200F-10
TritonX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Tabelle 8: Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunftspezies	Verdünnung	Hersteller
anti- Caspase 3	Kaninchen, polyklonal	1:200	ABCAM, Best.-Nr. ab13847
anti-PCNA	Maus, monoklonal	1:1000	BD Pharmingen, Best.-Nr. 555566
anti-SSEA-1	Maus, monoklonal	1:200	BioLegend, Best.-Nr. 125602
anti-Oct-3/4	Maus, monoklonal	1:500	Santa Cruz Biotech., Best.-Nr. sc-5279
anti-Map2	Maus, monoklonal	1:200	Millipore, Best.-Nr. MAB3418
anti-Nestin	Maus, monoklonal	1:500	BD Pharmingen, Best.-Nr. 556309
anti-synapsin	Kaninchen, polyklonal	1.500	SynapticSystems, Best.-Nr. 106 002
anti-Tau	Meerschw., polyklonal	1:500	SynapticSystems, Best.-Nr. 314 004
anti-GFP	Chicken, polyklonal	1:500	Abcam, Best.-Nr. ab13970

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verd.	Hersteller
DyLight 488 anti-Maus IGG	Ziege, polyklonal	1:500	Dianova GmbH, #205-545-108
DyLight 488 anti-Kaninchen IGG	Ziege, polyklonal	1:500	Dianova GmbH, #111-485-144
Cy3 anti-Maus IGG	Ziege, polyklonal	1:500	Dianova GmbH, #115165146
Cy3 anti-Kaninchen IGG	Ziege, polyklonal	1:500	Dianova GmbH, #111-165-003
DyLight 649 anti-Maus	Ziege, polyklonal	1:500	Dianova GmbH, #115-495-062

### 2.1.3 Kulturmedium, Lösungen, Puffer

Tabelle 10: Neurobasalmedium

Zusammensetzung	Volumen	Anteil	Hersteller
Neurobasal®-Medium	87 ml	87%	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
B-27® Supplement	2 ml	2%	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
NeuroCult™ Differentiation Supplement	10 ml	10%	Stemcell Technologies, Grenoble, France
Penicillin/Streptomycin	1 ml	1%	PAA Lab. GmbH

Tabelle 11: Lösungen für Elektrophysiologie

Intrazellulärlösung	[g/mol]	[g/dl]	Extrazellulärlösung	[g/mol]	[g/l]
140mM KCl	74,55	1,0437	125mM NaCl	58,44	7,3050
10mM Hepes	238,31	10	25mM NaHCO <sub>3</sub>	84,01	2,1003
10mM EGTA	380,35	10	25mM Glucose (Monohydrat)	198,17	4,9543
2mM Na <sub>2</sub> ATP	551,3	2	2.5mM KCl	74,55	0,1864
2mM MgCl <sub>2</sub> (Hexahydrat)	203,3	2	1.25mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Dihydrat)	156,01	0,1950
			2mM CaCl <sub>2</sub> (Dihydrat.)	147,02	0,2940
			2mM MgCl <sub>2</sub> (Hexahydrat)	203.31	0,2033

Tabelle 12: Puffer für Molekularbiologie, Fluoreszenzmikroskopie

10x PBS	g/l	5x TBE	Menge/l
NaCl	80	C4H11NO3	54g
Na2HPO <sub>4</sub>	11	H3BO3	27,5g
Kh2PO4	2	0,5M EDTA	20ml
KCl	2		
In 1l ddH <sub>2</sub> O, vor Gebrauch 1:10 verdünnt		In 1l ddH <sub>2</sub> O, vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt	

### 2.1.4 Sonstiges

Tabelle 13: Geräte und Programme

Gerät/Programm	Modell	Hersteller
Bildverarbeitungsprogramm	ImageJ	
Fluoreszenzmikroskop	SP-5 Konfokalmikroskop	Leika Mikroskopie
PC-Mikromanipulator	25-ZR	Luigs & Neumann
PC-Mikromanipulatorsteuerung	SM-5	Luigs & Neumann
PC -Mikroskop	Axioskop 2 FS+	Zeiss Mikroskopie
PC- Programm	Pulse	Heka Elektronik
Patch-Clamp-Verstärker	HEKA EP10	Heka Elektronik

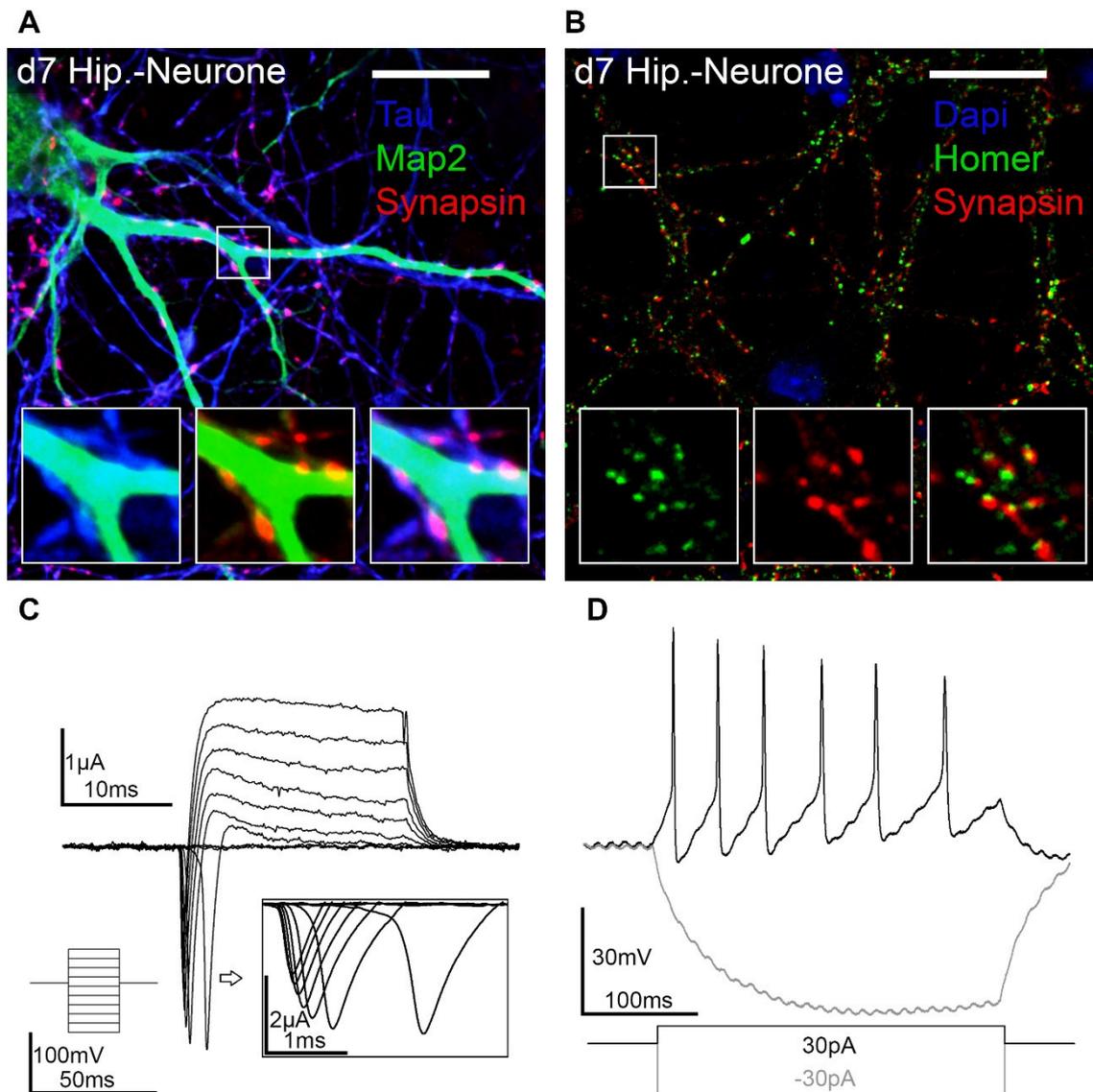
## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 In Vitro**

#### **2.2.1.1 Hippocampale Zellkultur**

Um die elektrophysiologischen Messungen und die Immunfluoreszenzfärbungen zu etablieren, wurden neuronale Zellkulturen aus C57BL/6-Mausembryonen an Tag 18 der Embryonalentwicklung nach Protokoll angelegt [42]. Hierfür wurde ein trächtiges Muttertier am 18. Tag nach Befruchtung durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen wurde mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und mit sterilen Instrumenten eröffnet. Der perlschnurartige Uterus mit den Embryonen wurde anschließend mit Pinzette und Schere aus dem Abdomen gelöst und in eine, mit PBS-Puffer gefüllte Petrischale überführt. Mit sterilen Pinzetten wurden die Embryonen nun aus dem Uterus gelöst und der Schädel mit einem Skalpell abgetrennt. Dieser wurde anschließend unter 3-facher stereomikroskopischer Vergrößerung auf der Unterlage fixiert. Mit einer zweiten Pinzette wurde nun stumpf die Kopfhaut und der Knorpel über dem Gehirn abpräpariert und dieses vorsichtig aus der Schädelbasis herausluxiert. Danach wurden die Hemisphären mit einem Skalpell abgetrennt, die umgebende Hirnhaut wurde mit zwei feinen Pinzetten entfernt. Der von der Ventralseite sichtbare Hippocampus wurde mit einem Skalpell herausgelöst und in ein Falconröhrchen mit PBS-Puffer überführt. Die gesammelten Hippocampi wurden zunächst für 5 Minuten mit Trypsin-EDTA enzymatisch gelöst und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Für die folgende mechanische Zerkleinerung der Hippocampi wurden zwei Pasteurpipetten über einer Bunsenbrennerflamme feuerpoliert und die Öffnungen damit auf ca. 0,8 mm und 0,2 mm verkleinert. Nachfolgend wurde mit der großen und dann mit der kleinen Pipette durch vorsichtiges Trituieren eine Einzelzellsuspension hergestellt und diese in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Aus einer Präparation mit vier bis sechs Embryonen wurden so 1-1,5 Millionen Zellen gewonnen. Diese wurden auf, über Nacht mit Poly-D-Lysin beschichteten, 12-mm-Deckgläser aus Glas in einer Dichte von 22000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Zellen reiften ohne Mediumwechsel für 12 Tage im Inkubator.

## Abbildung 2.2-1: Methodenetablierung in der hippocampalen Zellkultur



**Abbildung 2.2-1: Methodenetablierung in der hippocampalen Zellkultur: A:** Fluoreszenzfarbung mit axonalem Tau (blau), dendritischem Map2 (grün) und präsynaptischem Synapsin (rot). Der Skalierbalken misst 25  $\mu$ m, Ausschnittsvergrößerung 3-fach. **B:** Fluoreszenzfarbung mit präsynaptischem Synapsin (rot) und postsynaptischem Homer (grün). Der Skalierbalken misst 25  $\mu$ m, Ausschnittsvergrößerung 3-fach. **C:** Repräsentative Messung des Membranpotentials beim Auslösen repetitiver Aktionspotentiale, nach Depolarisation durch Anlegen eines 500 ms dauernden, schrittweise erhöhten, positiven Einwärtsstroms (Stimulationsstrom: -50 pA bis 130 pA,  $\Delta I = 20$  pA) an d7 hippocampalen Neuronen im CC-Modus. Depolarisation +30 pA = schwarze Linie, Hyperpolarisation -30 pA = graue Linie **D:** Repräsentative Messung der Membranleitfähigkeit beim Auslösen eines Aktionspotentials durch 15 ms dauernde, schrittweise Erhöhung des Membranpotentials (-80 mV bis +55 mV,  $\Delta U = 15$  mV unten links) an d7 hippocampalen Neuronen im VC-Modus.

### 2.2.1.2 ES-Zellkultur

Die hier beschriebenen, wildtypisch biparentalen (N) und androgenetisch uniparentalen (AG) ES-Zelllinien wurden im Labor unseres Kooperationspartners Prof. Dr. A. Müller kultiviert und in neuronale Progenitorzellen (pNPCs) differenziert. Der Vollständigkeit halber sollen hier die Schritte bis zur Weiterdifferenzierung und Durchführung der einzelnen Experimente kurz dargestellt werden [17, 43].

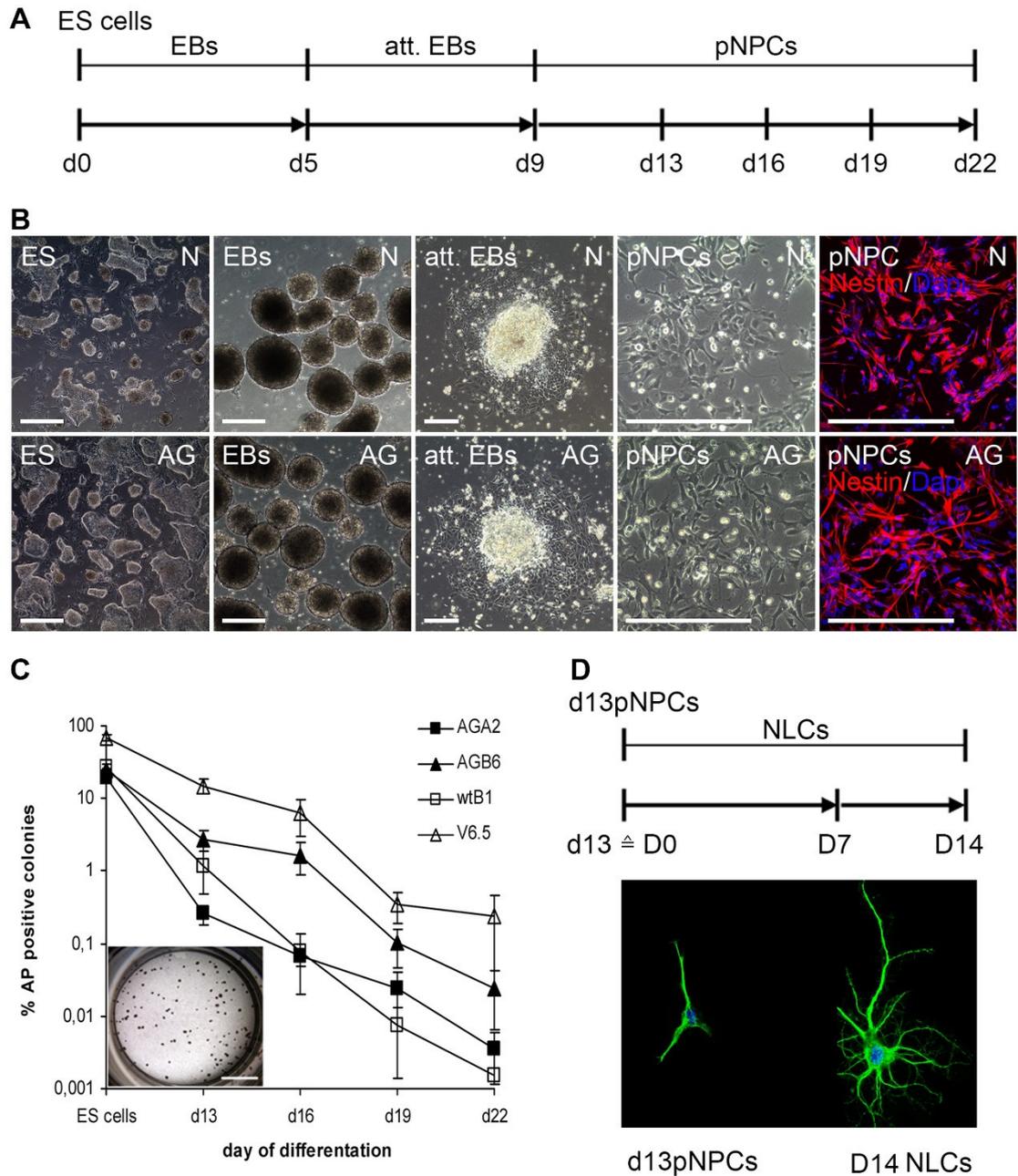
Die Kultivierung und Expansion (siehe Abbildung 2.2-2 A,B) erfolgte auf einer konfluenten Zellschicht aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Um eine ungerichtete Differenzierung zu vermeiden, erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit einem Expansionsmedium und am dritten Tag das Passagieren der ES-Zellen. In einem Zwischenschritt wurden nun die MEF-Zellen durch erhöhte Adhäsion an eine, mit Gelatine beschichtete Zellkulturschale, von den nicht adhärennten pluripotenten ES-Zellen getrennt. Die weitere neurale Differenzierung erfolgte über sogenannte „embroid bodies“ (EBs). In Differenzierungsmedium in Suspensionskultur gebracht, bilden die noch immer stark proliferierenden ES-Zellen kugelartige, ca. 0,5 mm große Zellverbände (EBs). Diese wurden nach 5 Tagen resuspendiert und in eine adhärennte Zellkultur gebracht, in der sich kleinere EBs mit 0,25 mm im Durchmesser bildeten. Von diesen ausgehend entstand ein zunehmend konfluenter Zellrasen aus proliferierenden, neuronalen Progenitorzellen (pNPCs), welche nach 4 Tagen resuspendiert und nun alle 3 Tage passagiert wurden (hin zu Tag 16-, 19-, bzw. Tag 21-pNPCs).

Um die neuronale Differenzierung für weitere Experimente zugänglich zu machen, wurden zunächst 12-mm Deckgläser aus Glas in 4-well Platten über Nacht bei Raumtemperatur mit Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet. Darauf wurden AG- und N-d16pNPCs in einer Dichte von 44,000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 500 µl Neurobasalmedium ausplattiert. Die Hälfte des Differenzierungsmediums wurde alle 48 Stunden ausgewechselt. Für die molekularbiologischen und elektrophysiologischen Versuche wurden die Zellen 7 Tage, für immunhistochemische Färbungen 14 Tage kultiviert. Um diese Zellen zum einen

von der pNPC-Differenzierung und zum anderen von den verwendeten hippocampalen Primärneuronen zu unterscheiden, wird dieses Differenzierungsstadium im weiteren Text mit d7-NLC und d14-NLC (NLC: neuron like cells) bezeichnet.

Für ein weiteres Projekt in dem die neurale Differenzierung aus humanen, wildtypischen und parthenogenetische Stammzellen verglichen wurde, wurden Zellen am 28. Tag nach Differenzierung aus ES-Zellen elektrophysiologisch untersucht [44]. Sie werden im weiteren Text als d28hNLCs bezeichnet.

**Abbildung 2.2-2: Neurale Differenzierung aus murinen N- und AG-Zellen.**



**Abbildung 2.2-2: Neurale Differenzierung aus murinen N- und AG-Zellen:**  
**(A)** Zeitlinie der neuralen Differenzierung, ausgehend von embryonalen Stammzellen (ES) über Embryonalkörperchen (EBs) und adhärenente Embryonalkörperchen (att. EBs) zu neuronalen Progenitorzellen (pNPCs) **(B)** Phasenkontrastbilder der Differenzierungsschritte und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von d13pNPCs mit einer Nestin-Färbung, Skalierbalken: ES = 0,5 mm, EBs, att. EBs, pNPCs = 0,25 mm **(C)** Markierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in ES-zellen und pNPCs. Dauer der Differenzierung korreliert negativ mit der verbleibenden Menge an ES-Zellen. Schwarze Punkte im Beispielbild kennzeichnen ES-Zell-Kolonien. Skalierbalken: 0,5 mm. **(D)** Zeitlinie der neuronalen Differenzierung für immunhistochemische

Färbungen Kapitel 3.1.2 und elektrophysiologische Versuche 3.1.3, Exemplarische Darstellung der mit GFP (grün) markierten Zellfortsätze von d13pNPCs (Progenitorzellen) und D14NLCs (Neuronenähnliche Zellen). (Entnommen und modifiziert aus Wolber et al., *Phenotype and Stability of Neural Differentiation of Androgenetic Murine ES Cell-Derived Neural Progenitor Cells. Cell Med.*, 2013. 5(1): 29–42 )

### 2.2.1.3 Molekularbiologie

Die Genexpression während der neuronalen Reifung wurde durch semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion von verschiedenen Ionenkanal-Genen gezeigt. Die Zeitpunkte für die Probenentnahme waren: ES-Zellen, d16 pNPCs und d7 NLCs.

RNA-Extraktion: Zur Materialgewinnung von ES-Zellen und d16 pNPCs wurde nach dem Passagieren jeweils ein Zellpellet mit ca. 3 Millionen Zellen verwendet. Dieses wurde zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und in ein „1,5ml-Eppendorf-Röhrchen“ überführt. Für die d7NLCs mussten Adhäsionskulturen angelegt werden. Es wurden 1,5 Millionen Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät und nach 7 Tagen, nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer, diese mit 1 ml Trizol mit einem sterilen Plastikschaaber aus der Petrischale geschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. In diesem Stadium wurden die Proben bis zur weiteren gemeinsamen Verwendung bei -80° C eingefroren. Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Trizol-Protokoll von Life Technologies GmbH über eine Chloroform-Phasentrennung und anschließender Ausfällung der RNA mit Isopropanol aus der verbleibenden wässrigen Phase und Lösung der RNA in 30 µl destilliertem, sterilem H<sub>2</sub>O. Der RNA-Gehalt bei dieser Methode lag bei ca. 1000 ng/µl.

DNASE-Verdau: Mit 1500 ng RNA wurde ein DNASE-Verdau mit DNASE-I für 30 Minuten bei 37° C durchgeführt, dann die DNASE mit 50 mM EDTA gestoppt und bei 75°C für 10 Minuten denaturiert.

cDNA-Umschrieb: Aus der DNASE-Behandlung wurden 10 µl weiterverwendet, mit OligodT-Primern versetzt und bei 65° C für 5 Minuten ein „Annealing“

durchgeführt. Der Ansatz wurde dann mit Nukleinsäuren (dNTPs), und Reverser-Transkriptase versetzt und bei 50° C für eine Stunde inkubiert.

PCR: Die oben genannten Primer wurden aus der Primerbank entnommen oder mit Primer-Blast selbst erstellt [45, 46]. Auswahlkriterium war eine Produktgröße von über 150 Basenpaaren und eine „Annealing-Temperatur“ von ca. 60° C. Nach Zugabe von dNTPs, Taq-Polymerase, MgCl, Primer, und 1 µl aus dem cDNA-Ansatz erfolgte die PCR wie in Tabelle X aufgeführt. Vom PCR-Produkt wurden nun 10 µl mit 2 µl Ladepuffer versetzt, auf ein 0,5% Agarosegel mit Cybergreen aufgetragen, bei 100 V und 70 mA für 30 Minuten aufgetrennt und mit einem Geldokumentationsgerät fotografiert.

Tabelle 14: Ansätze und Reaktionstemperaturen

DNASE-Verdau und OligodT-Annealing		cDNA-Umschrieb		PCR	
1 µl	10x DNASE-Puffer	10 µl	aus DNASE-Verdau	40 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	DNASE I	10 µl	H <sub>2</sub> O	5 µl	10x Taq-Puffer
1,5 µg	Probe-RNA	8 µl	5x RT-Puffer	1,5 µl	MgCl (50mM)
0-7,5 µl	H <sub>2</sub> O	1 µl	dNTPs (10 mM)	1+1 µl	fw/rv-Primer (100 pmol/µl)
		1 µl	Reverse Transkriptase	1 µl	aus cDNA-Umschrieb
- 37°C für 40 Minuten				0,2 µl	Taq-Polymerase
- Zugabe 1 µl EDTA 50mM		- 50° C für 60 Minuten			
- 75°C für 10 Minuten		- 85° C für 5 Minuten, dann 4°C		- 94°C für 5 Minuten	
- Zugabe 8,5 µl H <sub>2</sub> O				- 94°C für 30 Sekunden	
- Zugabe 0,5 µl Oligo dT (100 µM)				- 60°C für 40 Sekunden	35x
- 65°C für 5 Minuten, dann 4°C				- 72°C für 30 Sekunden	
				- 72°C für 7 Minuten, dann 4° C	

### 2.2.1.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

An Zellkulturen aller Differenzierungsstadien, besonders jedoch der ausdifferenzierten d14NLCs und der hippocampalen Neuronen an Tag 12 nach Präparation, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Im weiteren Text werden verschiedene Lösungen genannt die eine bestimmte Substanz in „%“ enthalten, die Trägerlösung ist PBS-Puffer.

Färbung: Die Zellkulturen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, dann mit 4%-Formaldehydlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit 0,2%-Triton-X-Lösung für 20 Minuten permeabilisiert und mit 10%-Pferdeserum für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Protein-Bindungsstellen zu blockieren.

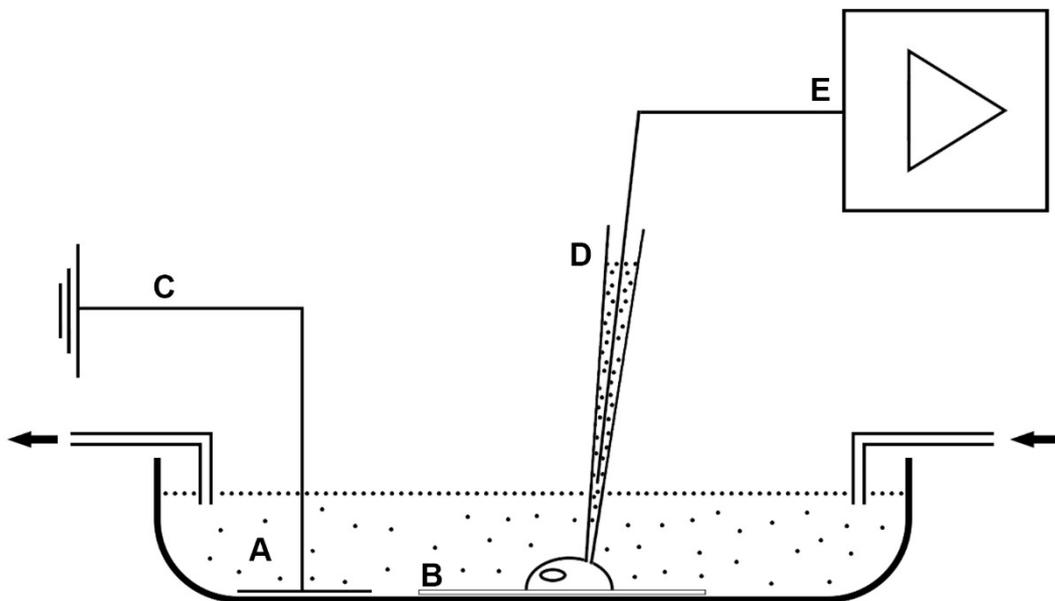
Die Primärantikörper wurden (in passender Verdünnung) in 1%-Pferdeserum für eine Stunde bei Raumtemperatur oder für 24 Stunden bei 4° C auf den zu färbenden Zellkulturen belassen. Danach erfolgten drei Waschschriffe mit PBS-Puffer, die erneute Inkubation mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:500 in 1%-Pferdeserum für eine Stunde bei Raumtemperatur und wieder drei Waschschriffe in PBS-Puffer. Zuletzt erfolgte eine DAPI-Färbung mit 5 µg/ml in PBS für 10 Minuten und abschließend die Einbettung der Deckgläser im Einbettmedium auf Objektträgern.

Mikroskopie: An einem LSM-TCS-SP5-Konfokalmikroskop wurden die Färbungen mit einem 63-fach vergrößerndem Objektiv untersucht. Wegen der dreidimensionalen Ausprossung neuraler Fortsätze, mussten über die Z-Stack-Funktion des Mikroskops zwischen 6-10 Schichtaufnahmen pro ausgewähltem Feld mit einem Abstand von 0,1 µm durchgeführt werden. Diese wurden dann mit der „Z-Stack-Project“-Funktion von ImageJ zu einem Bild zusammengefasst. Die einzelnen Farbkanäle wurden mit der „Merge Channel“-Funktion zusammengeführt.

### **2.2.1.5 Elektrophysiologie**

An murinen wildtypischen und androgenetischen d7NLCs, an humanen wildtypischen und parthenogenetischen d28-NLCs, sowie vergleichsweise an hippocampalen Zellkulturen an Tag 12 nach Präparation wurden elektrophysiologische Experimente an einem Patch-Clamp-Messstand der Arbeitsgruppe von Prof. C. Geis (Abteilung für Neurologie) durchgeführt.

**Abbildung 2.2-3: Schemazeichnung des Messstandes**



**Abbildung 2.2-3: Schemazeichnung des Messstandes:** (A) Perfusionskammer mit Zu- und Ablauf, gefüllt mit Extrazellulärlösung. (B) Neuronale Zellkultur auf Deckglas. (C) Nullelektrode (D) Patchpipette gefüllt mit Intrazellulärlösung. (E) Patchclamp-Verstärker (HEKA EP10)

Lösungen: Die Salze für die Lösungen aus Tabelle 12 wurden auf einer Feinwaage auf die 4. Nachkommastelle genau in [g] abgewogen.

Intrazellulärlösung: Nach Ansetzen der Lösung wurde der pH mit CsOH auf 7,2 eingestellt und die Osmolalität kontrolliert (Zielosmolalität 330 mosm). Die Lösung wurde auf 2 ml-Spritzen verteilt und bei -20° C für maximal 6 Wochen gelagert.

Extrazellulärlösung: Die Lösung wurde an jedem Versuchstag neu angesetzt, mit 95%O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> begast und mit einer Peristaltikpumpe in die Perfusionskammer geleitet. Für Experimente mit Kanalblockern wurde das Schlauch- und Begasungssystem ausgetauscht, die Blocksubstanz in der gewünschten Konzentration in 25 ml gelöst und über ein 50 ml Kunststoffröhrchen als Reservoir in einem Kreislaufsystem in die Perfusionskammer hinein- und wieder herausgeleitet.

Pipetten: Die Patchpipetten mit geeignetem Öffnungsdurchmesser für Einzelzelleableitungen wurden aus Borosilikatglas an einem P-97 Puller nach dem

zugehörigen Handbuch hergestellt [47]. Der vom Öffnungsdurchmesser der Pipette abhängige, gewünschte Pipettenwiderstand lag nach Eintauchen in die Extrazellulärlösung im Bereich 3-4,5 M $\Omega$ . Um eine Verschmutzung an der Pipettenspitze zu vermeiden, wurde eine positive Spannung angelegt und ein positiver Druck von 0,05 bar in der Pipette erzeugt. Außerdem wurde das Aussehen der Pipettenspitze unter dem Mikroskop kontrolliert.

Patchen: Mit dem Mikromanipulator wurde die Pipettenspitze unter Sicht von schräg oben an die gewünschte Zelle herangeführt. Der positive Pipettendruck führte dazu, dass die Membran der Zielzelle eingedellt wurde und die Spitze mit dem Mikromanipulator bis in Höhe des Zellniveaus vorgeschoben werden konnte. Der Druck wurde abgelassen, das Pipettenpotential auf -70 mV eingestellt und im Laufe von ca. 10-40 Sekunden ein „Seal“ mit auf ca. -10 pA stabil eingestelltem Kompensationsstrom mit der Zielzelle hergestellt. Die Pipettenkapazität wurde kompensiert. Durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette wurde die Zellmembran aufgerissen und eine „whole-cell“-Konfiguration hergestellt.

Messung: Als erstes wurden Zellkapazität, Serienwiderstand und Membranpotential gemessen. War der Serienwiderstand zu Beginn der Messung größer als 25 M $\Omega$  oder stieg im Rahmen der weiteren Messungen um mehr als 10 M $\Omega$  an, wurde die Messung verworfen. Im „Current-Clamp-Modus“ wurde das Membranpotential in 20 pA-Schritten von -50 pA auf +130 pA für jeweils 500 ms angehoben, mit dem Ziel eine Serie von Aktionspotentialen auszulösen. Im „Voltage-Clamp-Modus“ wurde in einem weiteren Versuch das Membranpotential in 15 mV-Schritten von -80 mV auf +50 mV für jeweils 15 ms angehoben, mit dem Ziel die Öffnung von spannungsgesteuerten Kanälen bei Auslösen eines Aktionspotentials über Zu- bzw. Abnahme der Membranleitfähigkeit zu messen. Zuletzt wurde im „Voltage-Clamp-Modus“ eine Aufnahme bei -80 mV für 30 Sekunden durchgeführt, um eventuell vorhandene synaptische Eingänge zu erfassen. Abschließend wurde noch einmal der Serienwiderstand gemessen.

Auswertung: Im HEKA-Programm „Pulse“ wurden die Messprotokolle danach geöffnet und für die IV-Kurven die Maxima und Minima bestimmt, sowie für die

gezeigten Abbildungen die Messwerte von repräsentativen Kurven exportiert und mit „SigmaPlot“ dargestellt.

## **2.2.2 In Vivo**

Alle Tierexperimente wurden von der zuständigen Abteilung der Regierung von Unterfranken genehmigt und in Anwesenheit einer Person mit einschlägiger Fachkenntnis durchgeführt.

### **2.2.2.1 Traumamodell**

Um ein Anwachsen der zu transplantierenden Zellen in relevanter Zahl zu gewährleisten, musste zuvor durch Kälteläsion am geplanten Transplantationsort ein reproduzierbares, lokales Trauma erzeugt werden [48]. Dafür wurden 4 Wochen alte männliche C57BL6-Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 0,1 mg Ketamin/g Körpergewicht und 0,005 mg Xylazin/g Körpergewicht narkotisiert. Die Applikation des Hirnschadens erfolgte mit Hilfe eines mit flüssigem Stickstoff (Temp. ca. -196° Celsius) gekühltem Aluminiumstempels. Der Stempel besteht aus einem Stickstoffbehälter und einer Läsionsspitze mit einem Durchmesser von 2,5 mm. Nach Rasur wurde die Kopfhaut unter aseptischen Bedingungen in der Mittellinie eröffnet und die Schädelkalotte dargestellt. Zum gezielten Aufsuchen der Läsionsstelle wurde der ungekühlte Stempel mit einem Stereotaxiegerät mittig über dem Bregma platziert und dann -1,5 mm in anterior-posteriorer und 1,5 mm lateral über der rechten Schädelhälfte justiert. Erst an der gewünschten Position wurde der gekühlte Aluminiumstempel 60 Sekunden über dem frontoparietalen Kortex aufgebracht. Die Knochenläsion und die Wundränder wurden mit Lidocainsalbe versorgt. Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethilon 3.0). Nach Abschluss des Eingriffs wurden die Tiere wieder in ihren Käfig zurückgesetzt.

### 2.2.2.2 Transplantation

Eine Woche nach Setzen der Kälteläsion erfolgte die erneute Freilegung der rechten parietalen Schädelkalotte in Ketamin/Xylazin-Narkose. Nun wurden die zu transplantierenden Zellen nach Bohrlochtrepanation stereotaktisch um die Kryoläsionsstelle herum (1 mm, 2 mm oder 3 mm posterior und 1,5 mm lateral vom Bregma in 1,5 mm Tiefe ab Dura) implantiert. Injiziert wurden ES-Zellen (1000/Injektion) und pNP-Zellen (100000/Injektion) jeweils in 1 µl HBSS-Puffer mit einer 5 µl Hamilton Mikrospritze. Die Knochenläsion und die Wundränder wurden mit Lidocainsalbe versorgt. Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethilon 3.0). Nach Abschluss des Eingriffs wurden die Tiere wieder in ihren Käfig zurückgesetzt.

Histologie: Die Tiere wurden nach der Operation weiter im Tierstall gehalten und täglich untersucht. Bei neurologischen Auffälligkeiten oder Auffälligkeiten im Bereich des OP-Gebiets wurden die Mäuse getötet. Die Mäuse nach Transplantation von ES-Zellen, d13- und d16pNP-Zellen wurden nach einem Monat, die Empfänger der d22pNP-Zellen nach drei Monaten getötet. Hierfür wurden die Tiere in tiefe Ketamin/Xylazin Narkose versetzt und durch linksventrikuläre Injektion von 20 ml PBS, bei eröffnetem rechten Vorhof die Blutgefäße gespült und das Gewebe mit 20 ml 4%-Formaldehydlösung fixiert. Das Gehirn wurde herauspräpariert und nochmals für 24 Stunden in 4%-Formaldehydlösung fixiert, danach in 16%-Glukoselösung für 48 Stunden entwässert, in TissueTek eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -80° C gelagert. Am Kryomikrotom wurden 10 µm dicke sagittale Schnitte des Maushirns auf Kryofrost-Objektträger aufgezogen und die Schnitte bei -20° C gelagert.

HE-Färbung: Zur Lokalisierung der Donorzellen und zur histologischen Charakterisierung möglicher entstehender Teratome, wurde von jedem 10. Schnitt eine HE-Färbung angefertigt. Die Klassifizierung der gefundenen Teratome erfolgte in Anlehnung an die Richtlinie aus „Nature Biotechnology“ [49]. Zur weiteren Unterteilung der gefundenen Strukturen wurden bei Nachweis von Zellproliferation drei Gruppen von Tumoren unterschieden. Die voll ausdifferenzierten Teratome mit Nachweis von allen drei Keimblättern wurden als

3GL-Tumore bezeichnet. Eine zweite Gruppe gefundener Tumore zeigte ein deutlich langsames Wachstum und bestand nur aus mesodermalen und ektodermalen Anteilen. Diese wurden entsprechend als 2GL-Tumore bezeichnet. Eine dritte Gruppe bestand nur aus sehr kleinen neuroektodermalen Strukturen und wurde als Neuroektoderm bezeichnet.

Fluoreszenzfärbung: Die Fluoreszenzfärbung der Hirnschnitte erfolgte im Wesentlichen nach dem unter 2.2.1.4 genannten Protokoll für die Zellkulturfärbungen, weshalb hier nur auf die Unterschiede hingewiesen werden soll. Die Kryoschnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, mit 10 mM Natriumdihydrogencitrat ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ ) bei pH6 in der Mikrowelle aufgekocht, um das Gewebe der Antikörperfärbung zugänglich zu machen und nach dem Abkühlen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. In einem Schritt erfolgten die Permeabilisierung des Gewebes und die Blockung mit 5%-Ziegen Serum und 0,1%-Triton-X für zwei Stunden. Die weitere Färbung erfolgte nach o.g. Protokoll. Es erfolgten Doppelfärbungen, wobei immer ein antiGFP-Antikörper mitverwendet wurde, um die GFP-Markierung der Donorzellen zu verstärken.

### **2.3 Aufteilung der Arbeit**

Da diese Arbeit Teil eines Gemeinschaftsprojekts ist, soll hier nochmal die Arbeit der Kollaborationspartner aus der Gruppe von Prof. Dr. A. Müller, insbesondere von Dr. Soon Won Choi und Dr. Ruhel Amadah, dargelegt werden. Die Zellkulturarbeit und Differenzierung der uniparentalen ES-Zelllinien hin zu d13-d22 pNPCs (Abbildung 2.2-2 A,B) wurde von den Doktoranden Dr. Soon Won Choi und Dr. Ruhel Amadah geleistet, weshalb diese im Methodenteil der Arbeit eingeordnet wurde. Von ihnen wurden auch „in vitro-Untersuchungen“ hinsichtlich der Tumorigenität mittels „Alkalische-Phosphatase-Versuch“ gemacht (Abbildung 2.2-2 C)

Die weiterführende Differenzierung hin zu neuronähnlichen Zellen, die Durchführung von immunhistochemischen Färbungen und Auswertung am Konfokalmikroskop (Abbildungen 3.1-2, 3.1-3, 3.1-4, 3.1-5, 3.1-6, 3.1-7), sowie

RT-PCR Untersuchungen (3.1-11) wurden im Labor von Prof. Dr. med. A.-L. Sirén durch mich durchgeführt. Die elektrophysiologischen Ableitungen (Abbildungen 3.1-8, 3.1-9, 3.1-10) wurden im Labor von Prof. Dr. med. Ch. Geis unter dessen Aufsicht von mir erhoben.

Maßgeblich von Frau Prof. Dr. med. A.-L. Sirén betreut wurde die Durchführung der Kryoläsionen, die stereotaktische Transplantation der pNPCs in vivo und die Nachsorge der operierten Tiere. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Hirnschnitte, die statistische Auswertung und Korrelation der Tumorigenität im Vergleich zu den invitro durchgeführten Studien erfolgte durch mich unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. A.-L. Sirén (Abbildungen 3.2- 1-7).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 In Vitro**

#### **3.1.1 pNPC-Differenzierung**

Die pNPC-Differenzierung aus ES-Zellen wurde von Mitarbeitern des Kooperationspartners durchgeführt. Der Vollständigkeit halber sollen jedoch die wesentlichen Entwicklungsschritte exemplarisch gezeigt werden. Sowohl aus ES-Zellen der uniparentalen, als auch der biparentalen Zelllinien konnten *in vitro* nach 13 Tagen pNPC-Kulturen generiert werden. (Siehe Abbildung 3.1-1)

#### **3.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der neuronalen Differenzierung *in vitro***

Proteine, die im Laufe der neuronalen Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen zu funktionsfähigen Nervenzellen synthetisiert werden, konnten mit spezifischen Antikörperfärbungen sichtbar gemacht werden. Unterschiede zwischen AG- und N-Zellkulturen zum gleichen Differenzierungsstadium konnten nicht festgestellt werden.

Über 95% der eGFP-markierten Zellen bildeten eGFP in fluoreszenzmikroskopisch detektierbarer Menge (Siehe exemplarisch Abb. 3.1-2). Die Expression blieb auch in der weiteren neuronalen Differenzierung stabil, sodass die im *in-vivo*-Teil der Arbeit transplantierten Zellen schnell lokalisiert werden konnten.

In *d13pNPC-Kulturen* (Abb. 3.1-1) waren über 95% der Zellen für Nestin positiv. Spätere neurale Marker konnten in diesen Zellen noch nicht dargestellt werden.

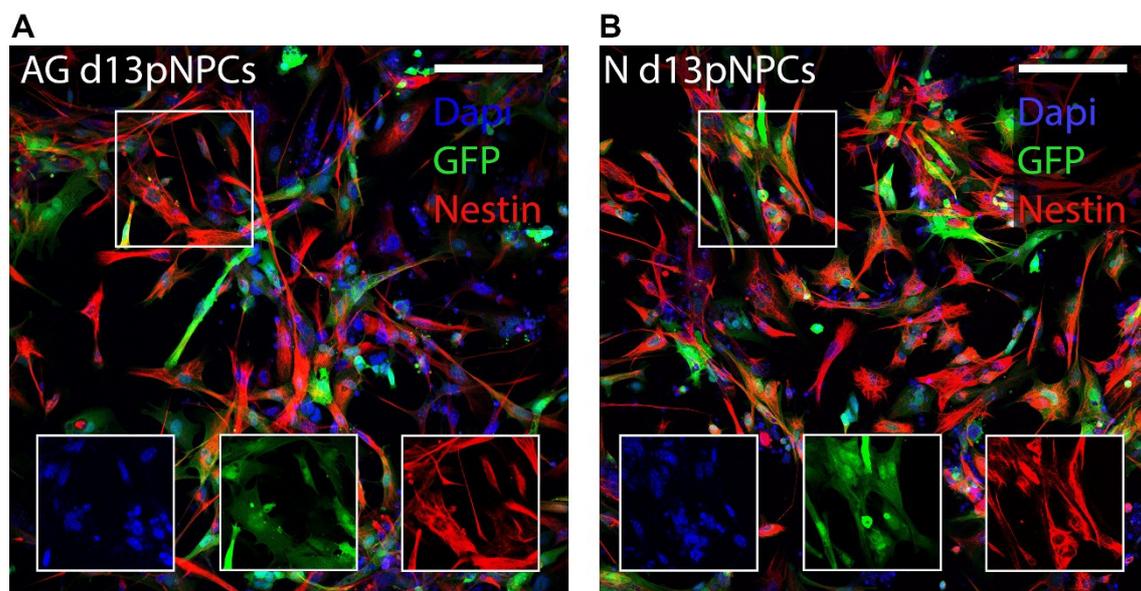
In *d7NLC-Kulturen* (Abb. 3.1-2 & -3) zeigten sich erstmals Zellen mit typischer neuronaler Morphologie. Im Zellsoma bzw. in neuronalen Fortsätzen konnten die Proteine Beta-III-Tubulin, Map2, Tau, Calretin und Synapsin mit spezifischen Färbungen dargestellt werden. Die Fortsätze waren sowohl für den axonalen Marker Tau, als auch für den dendritischen Marker Map2 positiv. Die mutmaßlich

jungen Neurone und Astrozyten sind umgeben von Nestin exprimierenden, morphologisch unreifen pNPCs entsprechenden Zellen.

In *d14NLC-Kulturen* (Abb. 3.1-4 & -5) konnte erstmals eine morphologische Auftrennung in axonale (Tau) und dendritische (Map2) Fortsätze gezeigt werden. Der präsynaptische Marker Synapsin ist nicht mehr im Zellsoma lokalisiert und bildet punktförmige Verdichtungen auf Fortsätzen, die für den dendritischen Marker Map2 positiv sind. Der präsynaptische Marker Synapsin und der postsynaptische Marker Homer können gelegentlich auf Tau-positiven Zellfortsätzen kolokalisiert werden. Zellen mit pNPC-Morphologie und einer positiven Nestin-Färbung traten nur noch in vereinzelt Gruppen auf.

Auch die dopaminerge Reifung (Abb.3.1-6) konnte mit einem gesonderten Differenzierungsprotokoll durchgeführt werden [50]. Nach 14 Tagen Differenzierung aus ES-Zellen konnten in immunhistochemischen Färbungen das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), welches für die Levodopa-Synthese in dopaminergen Neuronen benötigt wird, nachgewiesen werden. Es konnte eine Kolokalisation von TH mit den neuronalen Proteinen Map2 und Synapsin gefunden werden.

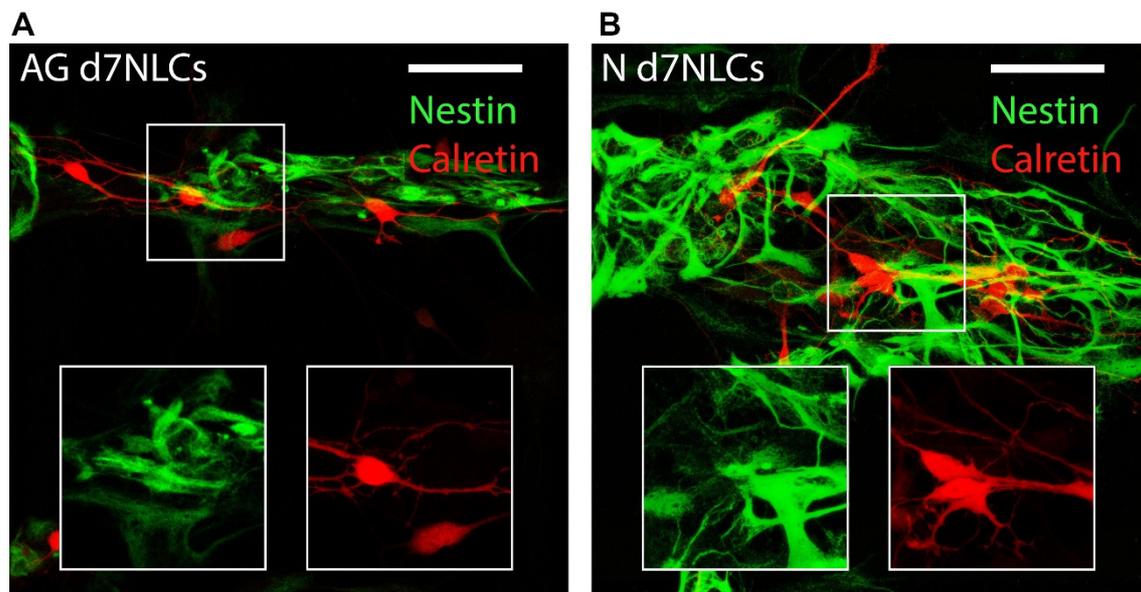
#### Abbildung 3.1-1: d13pNPCs



**Abbildung 3.1-1: d13pNPCs:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte einer Dreifachfärbung, mit einer Nestinexpression (> 95% der Zellen) in d13pNPCs. Der Skalierbalken misst 100  $\mu\text{m}$ . **(A)** AG-Zellen und **(B)** N-Zellen. Zur

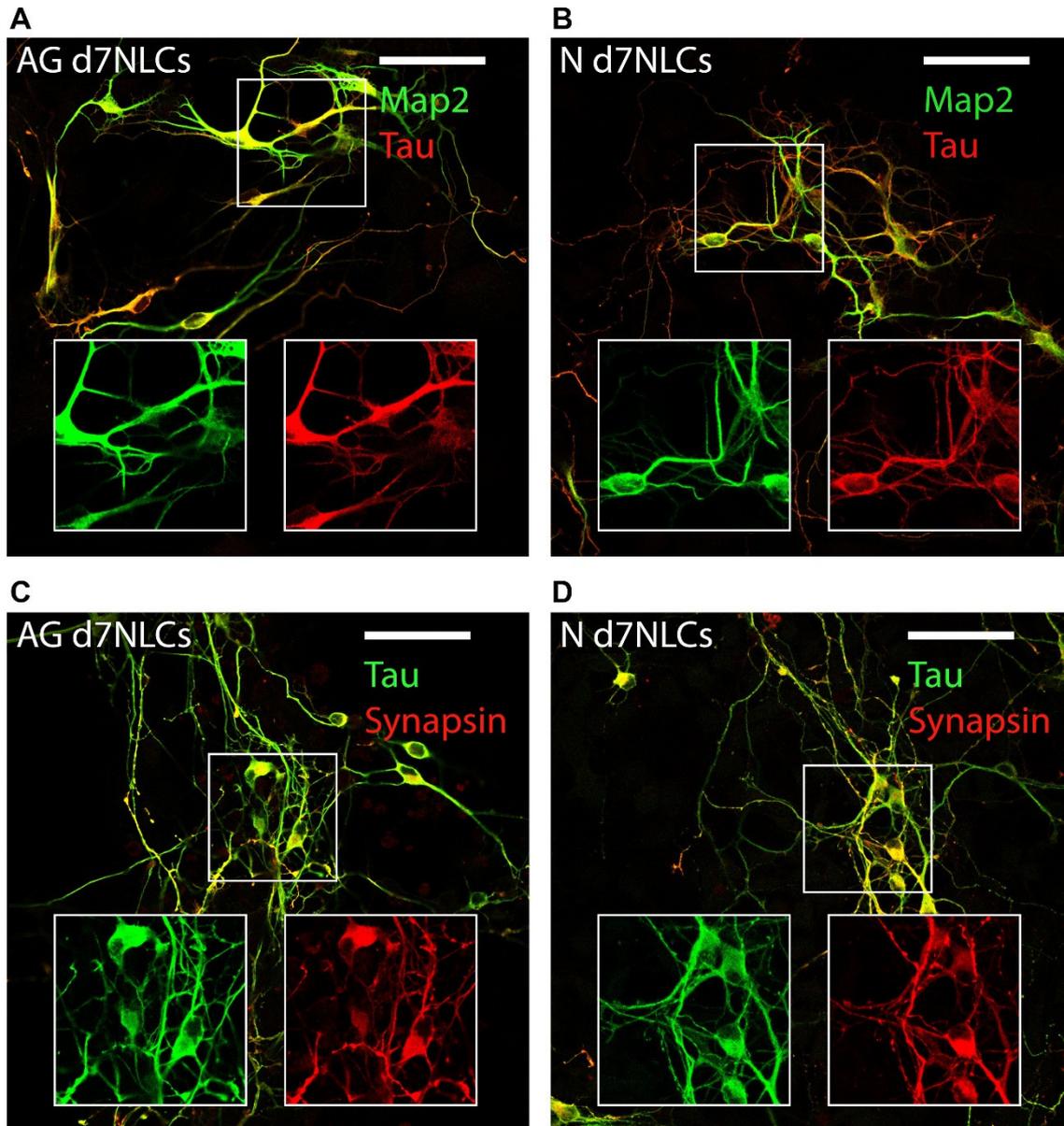
Quantifizierung wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Exemplarisch wird die GFP-Expression der Zelllinien gezeigt. Repräsentative Bildausschnitte ohne Vergrößerung zeigen exemplarisch die einzelnen Farbkanäle: DAPI (blau), GFP-Markierung (grün), Nestin (rot).

### Abbildung 3.1-2: d7NLCs I



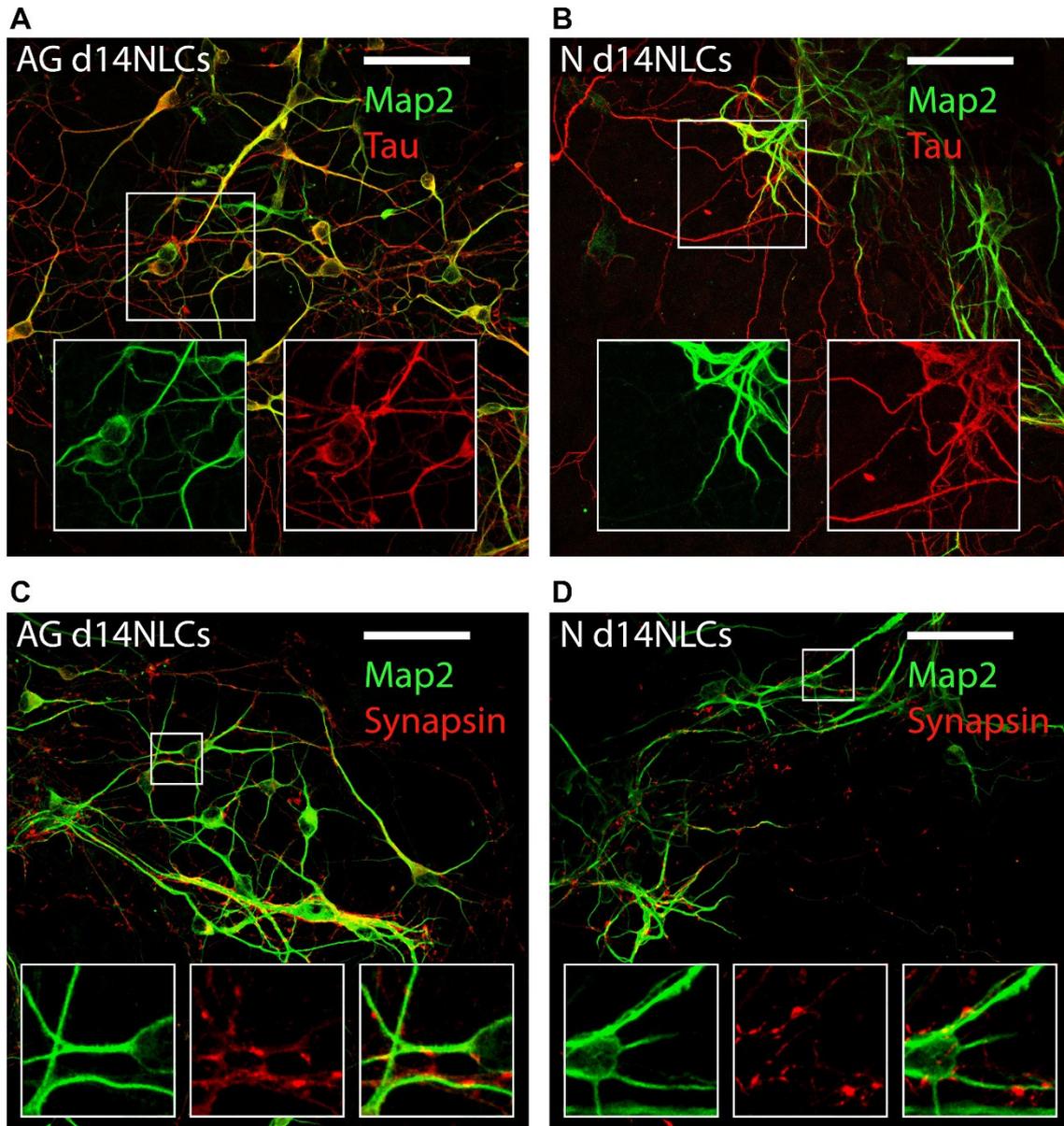
**Abbildung 3.1-2: d7NLCs I:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von Doppelfärbungen in d7NLCs. Der Skalierbalken misst 50 µm, Ausschnittsvergrößerung 1,5-fach. **(A)** AG-Zellen und **(B)** N-Zellen. Neuronale Zellen die Calretin (rot) exprimieren überwiegend in direkter Nachbarschaft mit Nestin (grün) positiven neuronalen Progenitorzellen.

### Abbildung 3.1-3: d7NLCs II



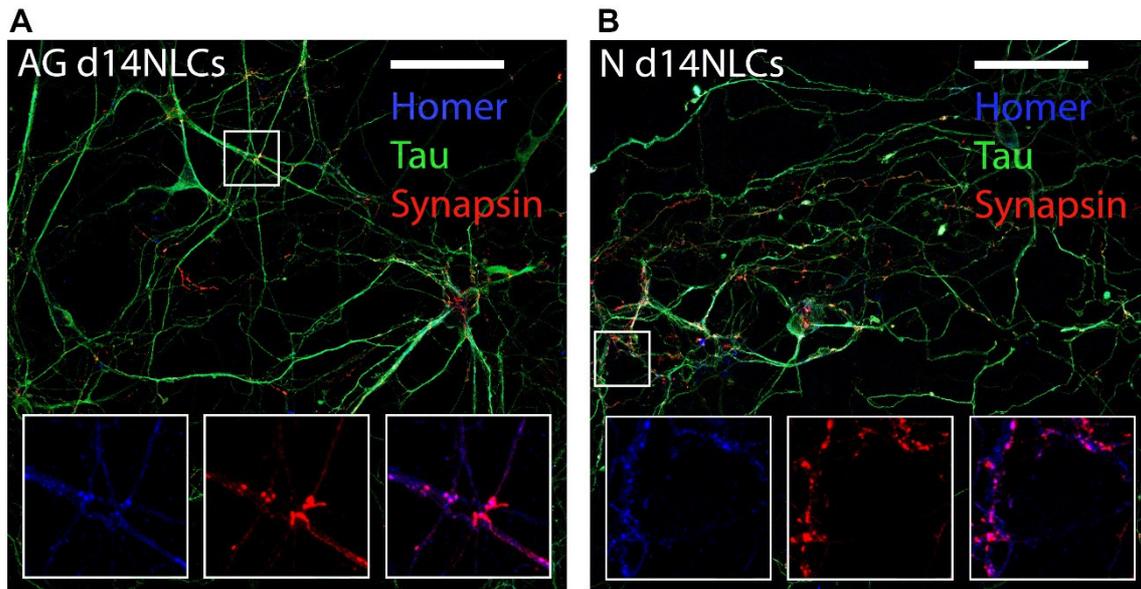
**Abbildung 3.1-3: d7NLCs II:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von Doppelfärbungen in d7NLCs. Der Skalierbalken misst 50  $\mu\text{m}$ , Ausschnittsvergrößerung 1,5-fach. **(A & B)** Lokalisation des vorwiegend dendritischen Proteins Map2 und des vorwiegend axonalen Proteins Tau zeigt eine vollständige Überlagerung. **(C & D)** Das erst in reifen Neuronen präsynaptisch lokalisierte, synaptische Vesikelprotein Synapsin ist hier noch im Soma und in sämtlichen Fortsätzen darstellbar.

### Abbildung 3.1-4: d14NLCs I



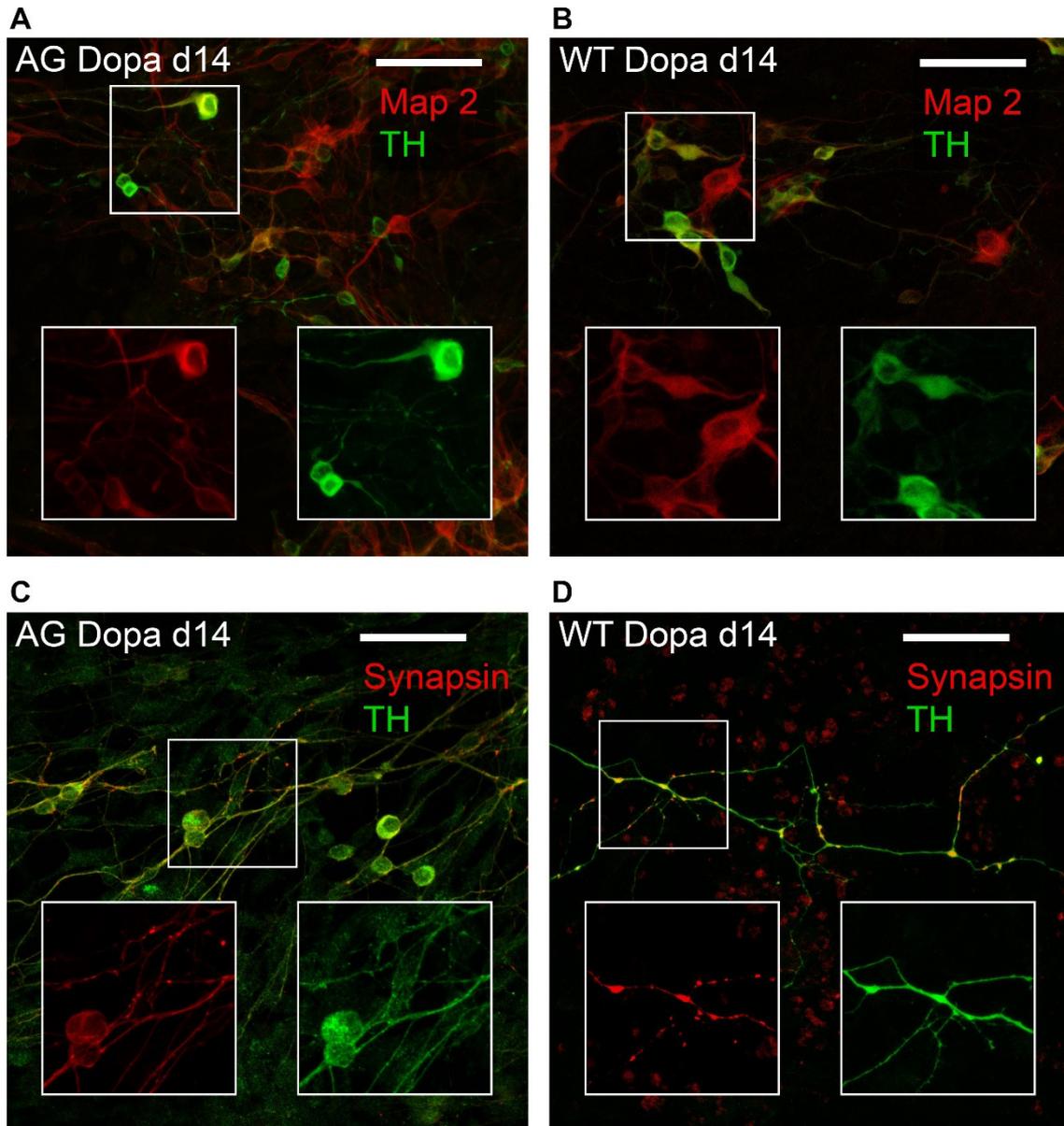
**Abbildung 3.1-4: d14NLCs I:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von Doppel- und Dreifachfärbungen in d14NLCs. Der Skalierbalken misst 50 µm. **(A & B)** Lokalisation des vorwiegend dendritischen Proteins Map2 (grün) und des vorwiegend axonalen Proteins Tau (rot) zeigt eine zunehmende Bildung axonaler bzw. dendritischer Fortsätze. Die Ausschnittsvergrößerung beträgt 1,5-fach. **(C & D)** Punktförmige Kolo-kalisation des präsynaptischen Markers Synapsin (rot) auf dendritischen, Map2-positiven (grün) Fortsätzen. Im Zellsoma und den Zellfortsätzen ist, abgesehen von den punktförmigen Häufungen, fast keine spezifische Synapsin-Färbung zu sehen. Die Ausschnittsvergrößerung beträgt 3-fach.

### Abbildung 3.1-5: d14NLCs II



**Abbildung 3.1-5: d14NLCs II:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von Dreifachfärbungen in d14NLCs. Der Skalierbalken misst 50  $\mu\text{m}$ , Ausschnittsvergrößerung 3-fach. **(A)** AG-Zellen und **(B)** N-Zellen. Kolokalisation des präsynaptischen Markers Synapsin (rot), mit dem postsynaptischen Protein Homer (blau) auf Tau-positiven (grün) Fortsätzen.

### Abbildung 3.1-6: Dopaminerge Differenzierung



**Abbildung 3.1-6: Dopaminerge Differenzierung:** Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte von Doppelfärbungen nach 14-tägiger dopaminergere Differenzierung. Der Skalierbalken misst 50  $\mu\text{m}$ , Ausschnittsvergrößerung 1,5-fach. **(A & B)** Koexpression des neuronalen Proteins Map2 (rot) mit der Tyrosinhydroxylase (grün) der dopaminergen Neuronen. **(C & D)** Koexpression des präsynaptischen Proteins Synapsin (rot) und Tyrosinhydroxylase (grün).

### 3.1.3 Elektrophysiologische Charakterisierung von d7NLCs

Neuronenähnliche Zellen (NLCs) wurden an Tag 7 der Differenzierung aus N und AG-Progenitorzellen mittels Einzelzell-„Patch-Clamping“ untersucht. Hierfür wurden jeweils Zellen mit neuronähnlicher Morphologie für die Messungen ausgewählt.

Im „Current-Clamp“-CC-Modus (Abbildung 3.1-7 A) wurden die Zellen über einen positiven Einwärtsstrom schrittweise für je 500 ms stärker depolarisiert (-50 pA bis 130 pA,  $\Delta I=20$  pA). Hierdurch konnte in allen Messungen mindestens ein Aktionspotential ausgelöst werden N (n=10) und AG (n=8). In einigen neuronähnlichen Zellen biparentaler, aber auch uniparentaler Herkunft, konnten mehrere Aktionspotentiale mit einer Frequenz bis zu 20Hz generiert werden (Abbildung 3.1-7 D).

Im „Voltage-Clamp“-VC-Modus (Abbildung 3.1-7 B) wurde über eine schrittweise Anhebung des Membranpotentials für 15ms ein Aktionspotential ausgelöst (-80 mV bis +55 mV,  $\Delta U=15$  mV) und der korrespondierende Na<sup>+</sup>-Ein- und K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom gemessen. Der maximale Ein- und Auswärtsstrom bei jedem Depolarisationsschritt wurde zur Vergleichbarkeit der Messungen durch die Zellkapazität geteilt und pro Kondition ein Mittelwert (N (n=10), AG (n=8) gegen das verwendete Stimulationspotential in einer Strom/Spannungskurve (I/V-Kurve) aufgetragen (Abbildung 3.1-7 A). In der statistischen Auswertung der N- und AG-I/V-Kurven konnte kein signifikanter Unterschied zwischen denselben gefunden werden (zweiseitiger *t*-Test für unabhängige Messwerte, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Die aus N- und AG-Zellen gewonnenen D7NLCs zeigten ab einem Membranpotential von -35 mV und darüber, ein typisches Aktionspotential mit einem schnellen Öffnen spannungsgesteuerter Natriumkanäle und einer Repolarisation durch einen Kaliumausstrom. Diese Kanäle konnten durch selektive pharmakologische Inhibition mit dem Na<sup>+</sup>-Kanalblocker Tetrodotoxin (TTX) und dem K<sup>+</sup>-Kanalblocker Tetraethylammonium (TEA) dargestellt werden. Die Leitfähigkeit der Zellmembran für Na<sup>+</sup>-Ionen wurde durch TTX vollständig aufgehoben, die

Leitfähigkeit für K<sup>+</sup>-Ionen durch TEA um den Faktor 6 reduziert (Abbildung 3.1-7 C).

Das Ruhemembranpotential der D7NLCs bewegte sich zwischen -35 und -70 mV. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien ( $p=0,047$ )

N-D7NLCs MW: -48,0 mV SD: 9,5 n=11

AG-D7NLCs MW: -40,6 mV SD: 5,4 n=8

Analyseverfahren: zweiseitiger *t*-Test für unabhängige Messwerte, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

Die Zellkapazität die als Maß für die Zellgröße miterhoben wurde, bewegte sich im Bereich 7,5 mV - 17,5 mV. Es zeigte sich ein marginal signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien ( $p=0,07$ ).

N-D7NLCs MW: 12,8 pF SD: 3,6 n= 11

AG-D7NLCs MW: 10 pF SD: 2,7 n= 8

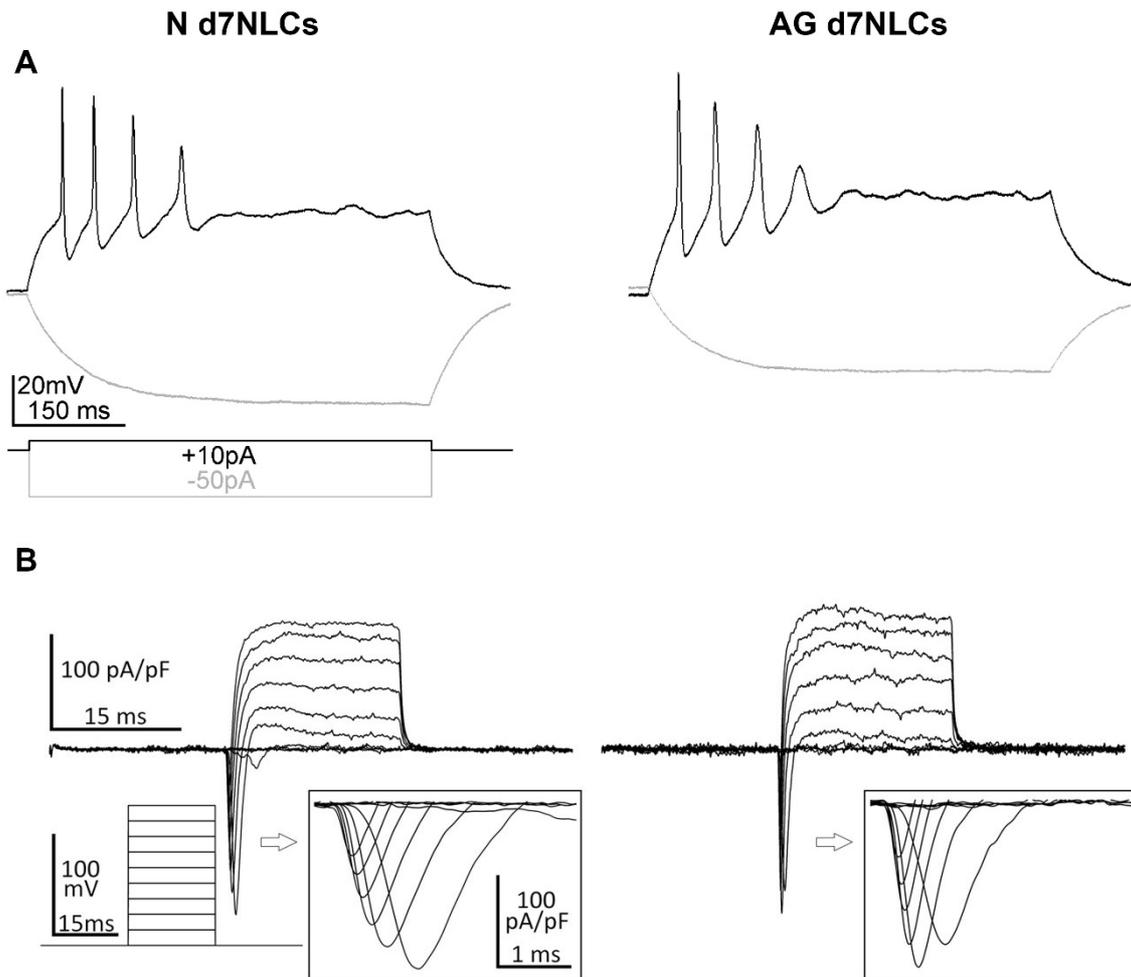
Analyseverfahren: Zweiseitiger *t*-Test für unabhängige Messwerte, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

Am Ende der Messung wurde im VC-Modus noch für 30 Sekunden passiv abgeleitet. Hier konnten in beiden Zelllinien gelegentlich sogenannte „Minis“ (kleine exzitatorische postsynaptische Potentiale, mEPSC) aufgezeichnet werden. Insgesamt waren diese jedoch zu selten, um weitergehend statistisch und pharmakologisch aufgearbeitet zu werden.

Zusammengefasst zeigen sich in der elektrophysiologischen D7NLC-Analyse der AG- und N-Zellen, bis auf die Zellgröße, keine signifikanten funktionellen Unterschiede.

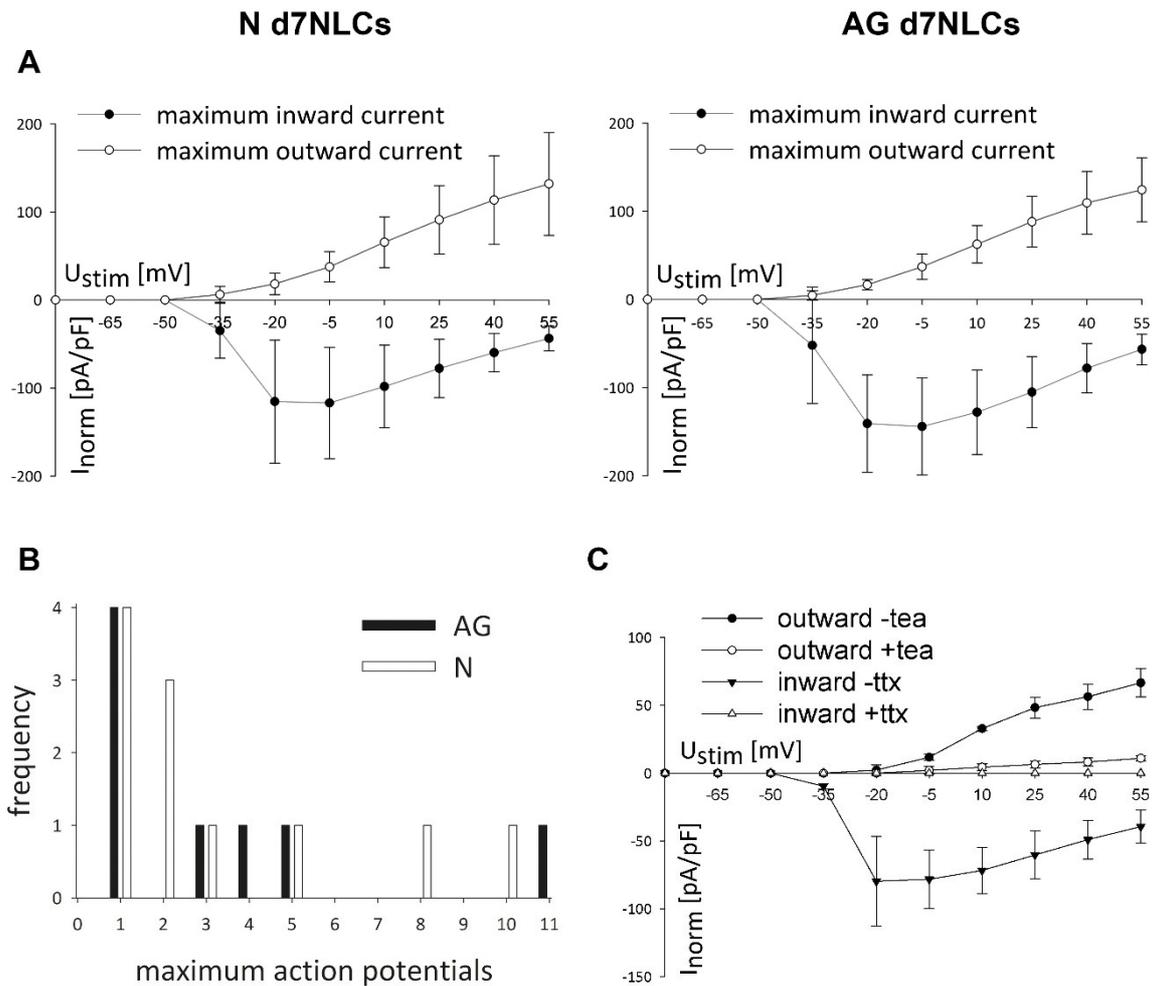
Für eine weitere Kooperation wurden mit den etablierten Methoden auch Messungen an NLCs durchgeführt, welche aus einer humanen PG-Zelllinie gewonnen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1-9 zusammengefasst.

### Abbildung 3.1-7: Elektrophysiologische Charakterisierung I



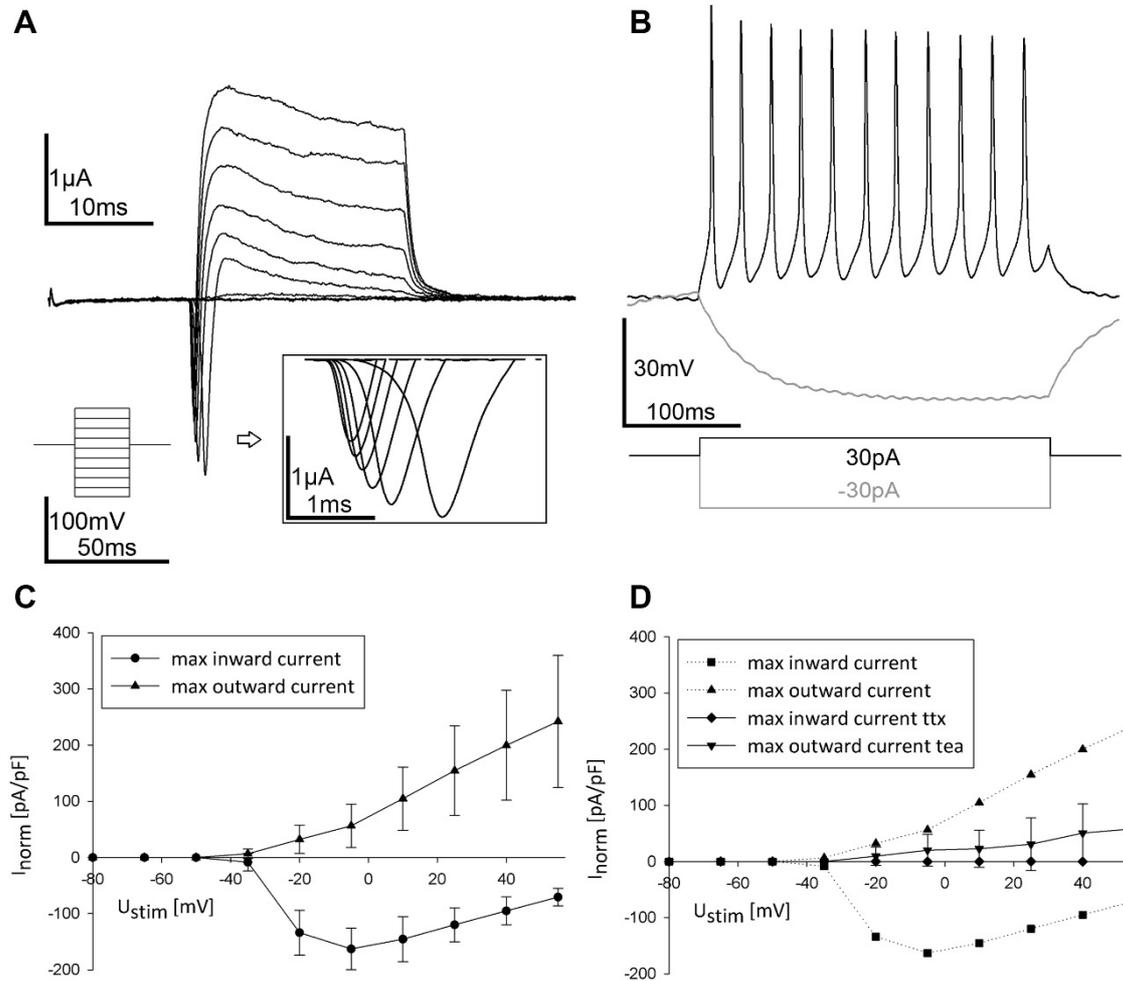
**Abbildung 3.1-7: Elektrophysiologische Charakterisierung von D7NLCs I:**  
**(A)** Repräsentative Messung des Membranpotentials beim Auslösen repetitiver Aktionspotentiale nach schrittweiser Depolarisation durch Anlegen eines 500 ms dauernden, schrittweise erhöhten, positiven Einwärtsstroms (Stimulationsstrom: -50 pA bis 130 pA,  $\Delta I=20$  pA) an N- und AG-D7NLCs im CC-Modus. Depolarisation +10 pA = schwarze Linie, Hyperpolarisation -50 pA = graue Linie.  
**(B)** Repräsentative Messung der Membranleitfähigkeit beim Auslösen eines Aktionspotentials durch 15 ms dauernde, schrittweise Erhöhung des Membranpotentials (-80 mV bis +55 mV,  $\Delta U=15$  mV unten links) an N- und AG-D7NLCs im VC-Modus.

**Abbildung 3.1-8: Elektrophysiologische Charakterisierung II:**



**Abbildung 3.1-8: Elektrophysiologische Charakterisierung von D7NLCs II:** (A) Strom(I)/Spannung(V) - Kurven nach VC - Stimulation, Stimulationspotential [mV] ist gegen die Mittelwerte der größten Ein- und Auswärtsströme aufgezeichnet, Strom-Maxima sind auf die jeweilige Zellgröße/Zellkapazität normiert [pA/pF], Daten sind Mittelwerte, Fehlerbalken: +/- eine Standardabweichung, Stichprobe: AG n=8, WT n=11 (B) Häufigkeit der pro Messung maximal induzierten Aktionspotentiale in AG- und N-Zellen. (C) Strom[I]/ Spannung[U]-Kurven in AG-Zellen nach VC-Stimulation vor und nach TEA- (Tetraethylamonium) und TTX (Tetrodotoxin)-Behandlung. Stimulationspotential [mV] ist gegen die Mittelwerte der größten Ein- und Auswärtsströme aufgezeichnet, Strom-Maxima sind auf die jeweilige Zellgröße/Zellkapazität normiert [pA/ pF], Daten sind Mittelwerte, Fehlerbalken: +/- eine Standardabweichung, Stichprobe: n=3.

**Abbildung 3.1-9: Charakterisierung humaner D28NLCs aus pHESC-Zelllinie**

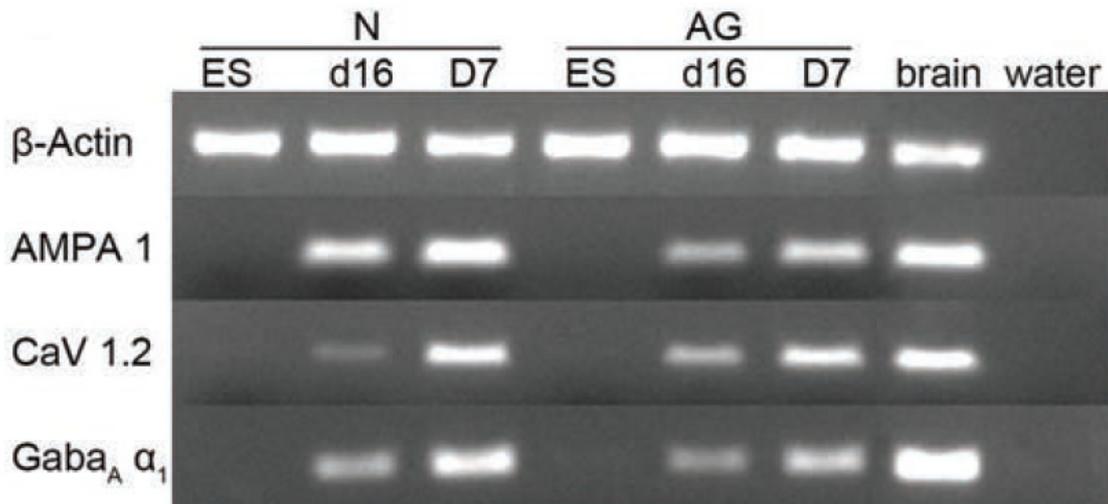


**Abbildung 3.1-9: Charakterisierung humaner D28NLCs aus pHESC-Zelllinie:** **(A)** Membranleitfähigkeit beim Auslösen eines Aktionspotentials bei 15 ms dauernder, schrittweiser Erhöhung des Membranpotentials ( $-80$  mV bis  $+55$  mV,  $\Delta U=15$  mV unten links) im VC-Modus. **(B)** Repräsentative Messung des Membranpotentials beim Auslösen repetitiver Aktionspotentiale, nach schrittweiser Depolarisation durch Anlegen eines 500 ms dauernden, schrittweise erhöhten, positiven Einwärtsstroms (Stimulationsstrom:  $-50$  pA bis  $130$  pA,  $\Delta I=20$  pA) im CC-Modus. Depolarisation  $+10$  pA = schwarze Linie, Hyperpolarisation  $-50$  pA = graue Linie. **(C)** Strom(I)/ Spannungs(V)-Kurve nach VC - Stimulation, Stimulationspotential [mV] ist gegen die Mittelwerte der größten Ein- und Auswärtsströme aufgezeichnet, Strom-Maxima sind auf die jeweilige Zellgröße/Zellkapazität normiert [pA/pF], Daten sind Mittelwerte, Fehlerbalken:  $\pm$  eine Standardabweichung,  $n=8$ . **(D)** Strom[I]/ Spannung[U]-Kurven nach VC-Stimulation vor und nach TEA- (Tetraethylamonium) und TTX (Tetrodotoxin)-Behandlung. Stimulationspotential [mV] ist gegen die Mittelwerte der größten Ein- und Auswärtsströme aufgezeichnet, Strom-Maxima sind auf die jeweilige Zellgröße/Zellkapazität normiert [pA/pF] Daten sind Mittelwerte, Fehlerbalken:  $\pm$  eine Standardabweichung,  $n=3$ .

### 3.1.4 Reverse-Transkriptase-PCR

Die Genexpression der ligandengesteuerten, exzitatorischen (Ampa1) bzw. inhibitorischen Rezeptoren (Gaba $\alpha$ 1) und des spannungsabhängigen I-Typ Calcium-Kanals (CaV 1.2 Untereinheit) zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung, wurde mittels semiquantitativer Reverse-Transkriptase-PCR dargestellt. Es wurde gezeigt, dass in AG- und N-ES-Zellen die Genexpression der genannten Rezeptorproteine mit dieser Methode nicht nachweisbar ist, jedoch im Laufe der neuronalen Differenzierung beginnt. Die Positivkontrolle „brain“ ist aus dem Kortex von Mausembryonen an Tag 16 der Embryonalentwicklung gewonnen.

**Abbildung 3.1-10: RT-PCR neuronaler Rezeptorproteine in N- und AG-Zellen**



**Abbildung 3.1-10: RT-PCR neuronaler Rezeptorprotein in N- und AG-Zellen:** Genexpressionsanalyse von liganden- und spannungsabhängigen Rezeptorproteinen in N- und AG-Zellen im Laufe der neuronalen Differenzierung mittels semiquantitativer RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion), ES: undifferenzierte embryonale Stammzellen; d16: neuronale Progenitorzellen an Tag 16 nach Differenzierung aus ES-Zellen; D7: neuronenähnliche Zellen an Tag 7 nach Differenzierung aus neuronalen Progenitorzellen (n= 6); brain: Positivkontrolle; water: Negativkontrolle; AMPA1: ionotroper ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) Glutamat-Rezeptor 1; CaV1.2: Spannungsabhängiger Calciumkanal Typ L, Untereinheit  $\alpha$ 1C; Gaba $\alpha$ 1: Gamma-Amino-Buttersäure Rezeptor A, Untereinheit  $\alpha$ 1.

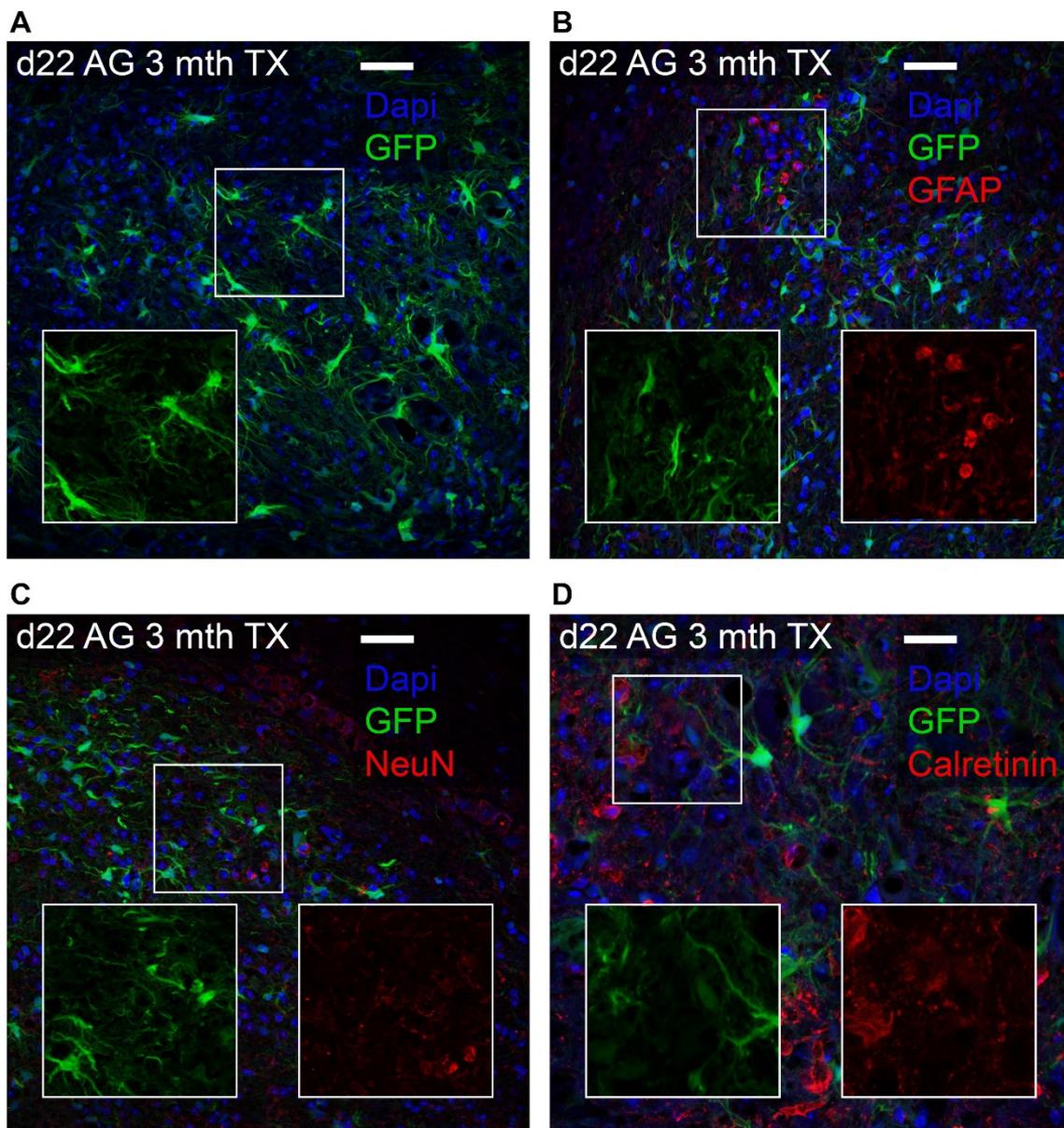
## 3.2 In Vivo

### 3.2.1 Neuronale Differenzierung der Donorzellen nach Transplantation

In den mit d22pNPCs transplantierten, tumorfreien Tieren (AG: 7/14; N: 10/15) wurde 3 Monate nach Transplantation das Anwachsen derselben fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Neben der Injektionsstelle wurden GFP+-Donorzellen mit neuraler Morphologie gefunden, die gliale und frühe neuronale Proteine exprimierten (siehe Abb. 3.2-1 A, Abb. 3.2-2 A,B). In repräsentativen Schichten wurden im Transplantationsgebiet exemplarisch GFP+-Donorzellen gezählt. Aufgrund der niedrigen Stichprobe wurde von einer weiteren statistischen Auswertung Abstand genommen: AGA2-Zellen 57 und 91 Zellen/mm<sup>2</sup> n=2; AGB6-Zellen 124± 63 Zellen/mm<sup>2</sup> n=4; wtB1-Zellen 170±85 Zellen/mm<sup>2</sup> n=3.

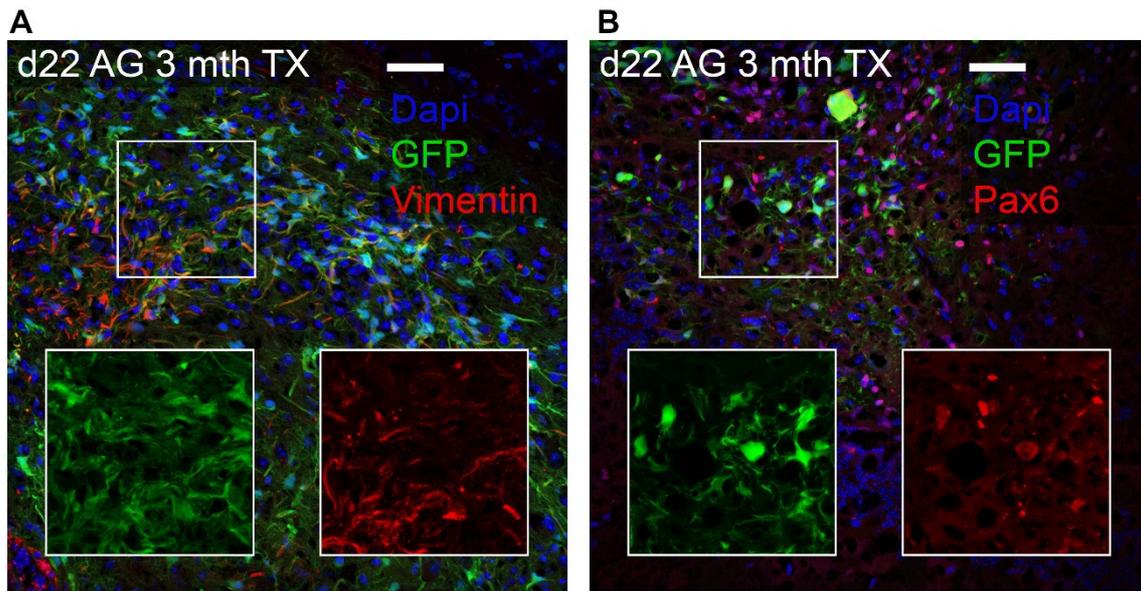
In Doppelfärbungen der GFP+-Donorzellen mit neuraler Morphologie konnten zunächst keine astrozytären oder neuronalen Reifemarker dargestellt werden. Stattdessen konnte eine Expression des frühen neuronalen Proteins Pax6 gefunden werden. In der nach Trauma auftretenden Gliosezone konnten außerdem viele GFP+-Donorzellen gefunden werden, die Vimentin exprimierten. Nach drei Monaten konnten, im Gegensatz zu den in vivo-Versuchen, in keiner Gruppe aus Donorzellen generierte reife Neurone dargestellt werden. Die späten neuronalen Marker (Calretinin, NeuN, Map2 und Synapsin-1) fanden sich ausschließlich im eigenen Nervengewebe des Empfängers (siehe Abb. 3.2-1 B-D)

**Abbildung 3.2-1: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation I**



**Abbildung 3.2-1: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation I:** Skalierbalken 50  $\mu$ m, Ausschnittsvergrößerung 1,5-fach. **(A):** GFP+-Donorzellen mit neuraler Morphologie (grün) DAPI+-Zellkerne (blau). **(B):** Fehlende Kolokalisation von GFP+-Donorzellen (grün) mit astrozytärem Marker GFAP (rot). **(C):** Fehlende Kolokalisation von GFP+-Donorzellen (grün) mit neuronalem Marker NeuN (rot). **(D):** Fehlende Kolokalisation von GFP+-Donorzellen (grün) mit neuronalem Marker Calretinin (rot).

**Abbildung 3.2-2: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation II**

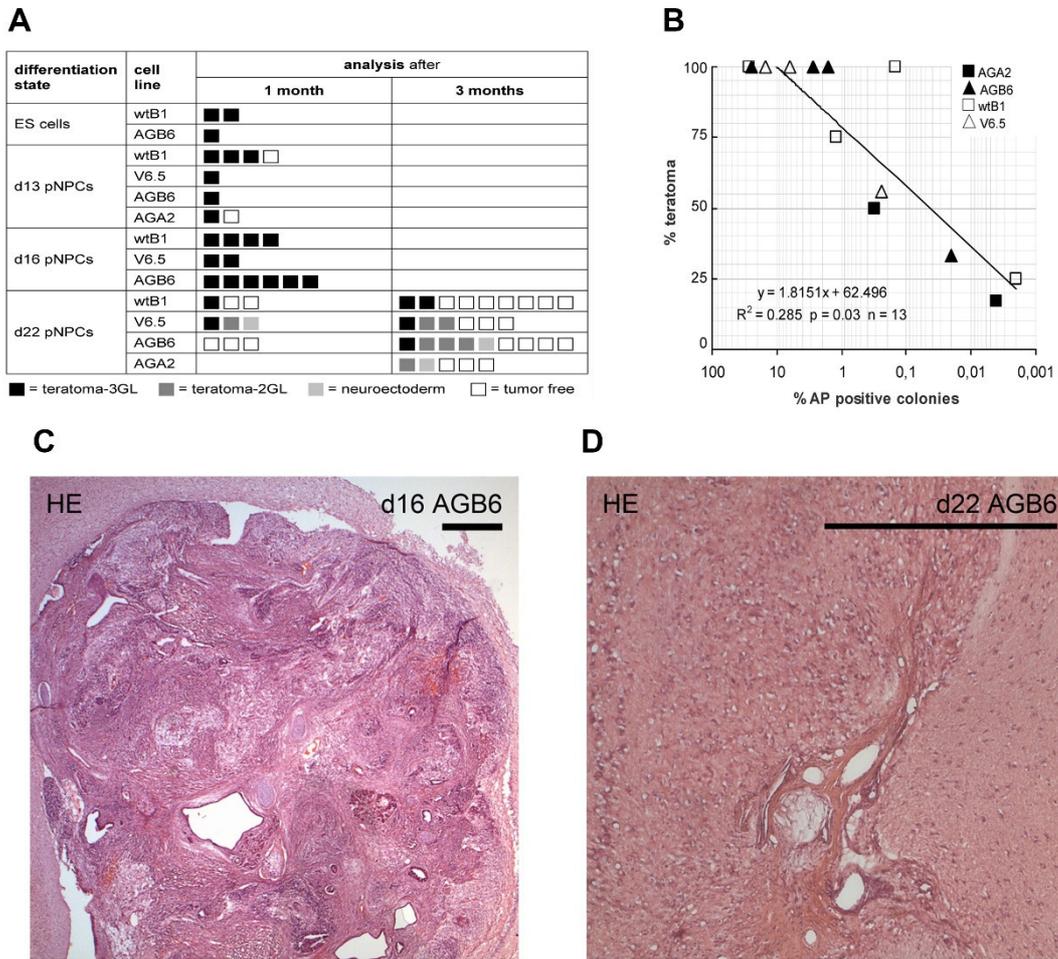


**Abbildung 3.2-2: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation II:** Skalierbalken 50  $\mu$ m, Ausschnittsvergrößerung 1,5-fach. **(A):** Kolokalisation von GFP+-Donorzellen (grün) mit frühglialem Marker Vimentin (rot) **(B):** Kolokalisation von GFP+-Donorzellen (grün) mit frühneuronalem Marker Pax6 (rot).

### 3.2.2 Teratombildung der Donorzellen nach Transplantation

Ein wiederkehrendes Problem nach Transplantation von aus ES-Zellen generierten Progenitorzellen, ist die Bildung von Teratomen im Empfängerorganismus. Um die Tumorigenität der verwendeten Zelllinien in Abhängigkeit des Differenzierungsschrittes zu überprüfen, wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der neuronalen Differenzierung transplantiert. Die Mäuse wurden nach ein, bzw. drei Monaten, oder bei neuauftretendem neurologischem Defizit durch cervikale Dislokation getötet und nach histomorphologischen Kriterien in der HE-Färbung in vier Gruppen unterteilt. Große (Durchmesser ca. 500  $\mu\text{m}$ ) exophytisch wachsende Teratome mit Ausbildung von Gewebe aus den drei Keimblättern, wurden als 3GL-Tumore bezeichnet. Kleine (Durchmesser ca. 50  $\mu\text{m}$ ) scharf begrenzte Tumore mit Ausbildung von ektodermalem und mesodermalem Gewebe und nur noch schwacher Expression des Proliferationsmarkers PCNA (<5%), wurden als 2GL-Tumore klassifiziert. In drei neurologisch unauffälligen, erfolgreich transplantierten Tieren wurden sehr kleine, rosettenförmige neuroepitheliale Strukturen gefunden. Diese wurden als rein neuroektodermale Tumore beschrieben. Ein positiver PCNA-Nachweis war hier nicht mehr möglich. In der Auswertung der Transplantation zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Differenzierungsgrad der Zellen und der Tumorigenität derselben (Abbildung 3.2-3 B). Diese Beobachtungen deckten sich auch mit den in vitro-Ergebnissen unserer Kooperationsgruppe. Die Zellen im Laufe der verschiedenen Differenzierungsschritte wurden wieder unter ES-Zell-Bedingungen kultiviert. Die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigt nach kräftiger, spezifischer Färbung ES-Zellkolonien an. Die Anzahl der ES-Zellkolonien nimmt wie zu erwarten mit zunehmender Differenzierung der Ausgangszelllösung ab (siehe Abbildung 2.2-2 C). Außerdem konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der ES-Zellkolonie-Frequenz in vitro und der prozentualen Tumorfrequenz in vivo errechnet werden (siehe Abbildung 3.2-3 B: Pearson-Korrelation:  $R^2=0,285$   $p=0,03$   $n=13$ ).

### Abbildung 3.2-3: Tumorigenität nach Transplantation



**Abbildung 3.2-3: Tumorigenität nach Transplantation: (A)** Tumorfrequenz *in vivo* in Abhängigkeit von den verwendeten Differenzierungsstadien der transplantierten Zellen. **(B)** Positive Korrelation zwischen der ES-Zellkoloniefrequenz *in vitro* und der prozentualen Tumorfrequenz *in vivo*. Exemplarische Darstellung eines 3GL-Tumors **(C)** in der linken Spalte und eines 2GL-Tumors **(D)** in der rechten Spalte, HE-Färbung Skalierbalken 200  $\mu$ m.

## 4. Diskussion

Mit dem hier vorgestellten experimentellen Aufbau konnte gezeigt werden, dass aus embryonalen N- und AG-Stammzellen generierte neurale Progenitorzellen gewonnen werden können. Diese wurden erfolgreich in histomorphologisch und funktionell neuronenähnliche Zellen differenziert, die in einem in vivo-Schädelhirntrauma-Modell erfolgreich transplantiert werden konnten.

Während der Embryonalentwicklung des Gehirns spielt die Regulation der Genexpression durch „Imprinting“ eine wichtige Rolle. In frühen AG-N bzw. PG-N-Chimären-Experimenten beobachtete man makroskopische Unterschiede, aber auch die Verteilung der uniparentalen Zellen war unterschiedlich [28]. Durch vergleichende Genexpression im embryonalen und adulten murinen Gehirn konnten letztlich 1300 loci gefunden werden, in denen die Expression maternaler bzw. paternaler Allele durch Imprinting beeinflusst wird [25]. Um die vermuteten Unterschiede der uniparentalen und biparentalen Embryonalentwicklung des Gehirns zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Zellkultursystem für eine in vitro-Neurogenese unter kontrollierten Bedingungen verwendet.

In beiden Zelllinien konnte eine immunhistochemisch nachgewiesene neuronale Reifung, hin zu Neuronen mit der Bildung eines synaptischen Netzwerks, nachgewiesen werden. Eine statistische Auswertung in den späteren Kulturen ab D7 bzw. D14 war aufgrund der Inhomogenität der Kulturen durch verbleibende proliferierende Zellpopulationen nur unzureichend möglich. Der Rückgang der frühen neuronalen Marker Nestin und Vimentin auf der einen, sowie die Zunahme der adulten Marker für Map2, Tau, Homer und Synapsin auf der anderen Seite konnten im Laufe der Differenzierung in der AG- bzw. N-Zellkultur weitestgehend gleich beobachtet werden. In beiden Gruppen konnte in vitro ein beginnendes neuronales Netzwerk mit Kollokalisierung prä- und postsynaptischer Proteine gefunden werden.

Elektrophysiologisch wurde in beiden Zelllinien eine Reifung hin zu funktionell aktiven neuronalen Zellen gezeigt. Die Strom/Spannungskurven bilden die spannungsabhängige Natrium- und Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran ab und sind somit ein indirektes Maß für die Expression der Kanalproteine

beziehungsweise den funktionellen Reifezustand der Zelle. Ein signifikanter Unterschied zwischen AG- und N-Zellen konnte nicht gefunden werden. Marginal unterschiedlich ( $p=0,07$ ) war die, über die Membrankapazität indirekt bestimmte Zellgröße, mit etwas kleineren uniparentalen Neuronen. Ein signifikanter Unterschied ( $p=0,47$ ) konnte im gemessenen Ruhemembranpotential gefunden werden, mit einem minimal positiveren Membranpotential der uniparentalen Neurone. Der Unterschied der Zellgröße könnte mit einer in den AG-Zellen herabgesetzten Expression des maternal geprägten Wachstumsfaktorrezeptorgens Igf-2 erklärt sein [19].

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die generierten pNPCs auch in einem in vivo-Modell funktionsfähige neurale Zelltypen bilden würden. Um ein geeignetes Umgebungsmilieu zu schaffen und um die regenerative Kapazität einzuschätzen, wurden die Zellen nahe einer zuvor gesetzten umschriebenen frontoparietalen Kälteläsion transplantiert. Nach drei Monaten wurden diese Zellen dann mithilfe der GFP-Markierung in postmortalen Hirschnitten aufgesucht. Sowohl uni-, als auch biparentale Zellen mit neuraler Struktur konnten nach dieser Zeit in signifikanter und ähnlicher Menge im Hirngewebe nachgewiesen werden und wurden stichpunktartig gezählt (Kapitel 3.2.1). Hierbei fiel auf, dass es zwischen den Transplantationen derselben Zellreihe große Unterschiede hinsichtlich der Effizienz gab. Eine Kollokalisierung mit den in vitro vorhandenen neuronalen Proteinen wie Map2, Calretinin, Tau oder NeuN war nicht erfolgreich (siehe Abb. 3.2-1). Trotz der neuralen Morphologie konnten nur Kollokalisierungen für frühneurale Proteine wie Pax6 oder Vimentin gefunden werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit aktuellen Studien, die zeigen, dass das Umgebungsmilieu auch nach Trauma für die Reifung und Integration hinderlich sein kann und der gewählte Zeitpunkt mit drei Monaten nach Transplantation zu früh ist. Transplantierte murine pNPCs bilden hier erst nach 9 Monaten funktionsfähige integrierte Neurone und dies auch nur in unbeschädigtem Hirngewebe, nicht jedoch nach Ischämie [51, 52].

Werden aus ES-Zellen generierte Zellen transplantiert, besteht immer die Gefahr, dass unzureichend differenzierte Zellen mit verbleibender hoher proliferativer Aktivität, ähnlich den ursprünglichen ES-Zellen, mittransplantiert werden und

Teratome im Empfängerorganismus bilden. Über die Expression von alkalischer Phosphatase kann diese Zellpopulation in differenzierenden Progenitorzellen ausfindig gemacht werden. Im Rahmen der fortlaufenden Differenzierung aus ES Zellen hin zu Progenitorzellen nahm die Häufigkeit exponentiell ab. An Tag 22 exprimieren in den vorrangig untersuchten Zelllinien wtB1 (N-Zellen) und AGA2 (AG-Zellen) weniger als 0,01% der Zellen die alkalische Phosphatase. Proportional dazu nimmt die Häufigkeit der Teratombildung, sowie deren Proliferationsrate nach Transplantation ab, weshalb dieser Test ein valides Mittel zur Einschätzung der Sicherheit der zu transplantierenden Zellen darstellen kann.

Die durch Imprinting veränderte Genexpression auf der einen Seite und der bisher fehlende Unterschied in der phänotypischen Ausprägung im Rahmen der Neurogenese auf der anderen Seite, stehen in einem Gegensatz. Eine denkbare Erklärung speziell für die hier vorgestellten in vitro-Ergebnisse wäre, dass das zur Verfügung stehende Zeitfenster für reife neuronale Zellen auf ca. 14 Tage begrenzt war und so spätere elektrophysiologische Unterschiede, wie beispielsweise die synaptische Aktivität und die neuronale Subtypdifferenzierung, nicht abgebildet werden konnten. Aber auch im in vivo-Teil der Arbeit war die Transplantation und deren statistische Auswertung durch teratombildende Zellen erschwert. Für weitere Arbeiten und die Langzeituntersuchung dieses Zellkultursystems wäre ein weiterer Aufreinigungsschritt, beispielsweise mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie denkbar.

Entgegen der Erwartungen findet sich kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Neurogenese und der regenerativen Kapazität der uni- bzw. biparentalen AG- und N-Zelllinien. Die frühe uniparentale Neurogenese ist ohne maternales Imprinting möglich und unterscheidet sich nicht von der biparentalen Neurogenese. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in den beteiligten Arbeitsgruppen durchgeführten Voruntersuchungen [17]. Das uniparentale Zellkultursystem bietet eine gute Möglichkeit, nach Überwindung der bestehenden technischen Probleme, den Genexpressionseffekt des Imprintings gewebespezifisch zu untersuchen. Uniparentale ES-Zellen stellen in Zeiten von

zunehmender Verunsicherung über die Sicherheit und regenerative Kapazität von IPS-Zellen nach wie vor eine gute Alternative dar. Es können patientenspezifische ES-Zellen ohne Überexpression von Stammzellgenen und den damit verbundenen Risiken gewonnen werden [15, 16, 53].

## 5. Zusammenfassung

*In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass aus uniparentalen, embryonalen Stammzellen mit fehlender maternal geprägter Genexpression (AG-Zellen) differenzierte neuronale Progenitorzellen (pNPCs) eine ähnliche neuronale Kapazität wie wildtypische Progenitorzellen haben. Sie bilden nach histomorphologischen Kriterien in vitro adulte Neurone mit Ausbildung eines synaptischen Netzwerks. In elektrophysiologischen PatchClamp-Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Zellen, ähnlich dem wildtypischen Pendant, spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanälen besitzen, ein negatives Membranpotential haben und bei Stimulation mit repetitiven Aktionspotentialen reagieren. Nach Transplantation in einem Schädel-Hirn-Trauma-Modell konnten nach drei Monaten in vivo Donorzellen mit neuraler Morphologie und der Expression von jungen, neuronalen und glialen Proteinen gefunden werden. Die Teratombildung ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert, eine maligne Entartung mit invasivem Wachstum oder ausgedehnter Metastasierung konnte nicht gefunden werden. Aus AG-Zellen generierte neuronale Progenitorzellen sind ein starkes Instrument, um neuronale genomische Prägung zu untersuchen. Außerdem könnte die regenerative Kapazität für eine patientenspezifische Zellersatztherapie genutzt werden.*

## 6. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

### Literaturverzeichnis:

1. Keith L. Moore, T.V.N.P., *Embryologie Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. 2007. **5**.
2. Edwards RG, B.H., *Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**: p. 863–905.
3. De Paepe, C., et al., *Totipotency and lineage segregation in the human embryo*. Mol Hum Reprod, 2014.
4. Johnson, W., et al., *Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo*. Veterinary Record, 1995. **137**(1): p. 15-16.
5. SM, W., *A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins*. Nature, 1979. **277**: p. 298–300.
6. Nicholas, J.S. and B.V. Hall, *Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs*. Journal of Experimental Zoology, 1942. **90**(3): p. 441-459.
7. Gurdon, J., *Nuclear reprogramming in eggs*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1141-4.
8. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
9. Ishiuchi T, T.-P.M., *Towards an understanding of the regulatory mechanisms of totipotency*. Curr Opin Genet Dev, 2013. **23**: p. 512–518.
10. De Miguel, M.P., S. Fuentes-Julian, and Y. Alcaina, *Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction*. Stem Cell Rev, 2010. **6**(4): p. 633-49.
11. Boroviak, T. and J. Nichols, *The birth of embryonic pluripotency*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1657).
12. Ware, C.B., et al., *Derivation of naive human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(12): p. 4484-9.
13. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
14. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-317.
15. Robinton, D.A. and G.Q. Daley, *The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 295-305.
16. Tchieu, J., et al., *Female Human iPSCs Retain an Inactive X Chromosome*. Cell Stem Cell. **7**(3): p. 329-342.
17. Dinger, T.C., et al., *Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells in vivo and in vitro*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1474-83.
18. Eckardt, S., et al., *In vivo and in vitro differentiation of uniparental embryonic stem cells into hematopoietic and neural cell types*. Organogenesis, 2008. **4**(1): p. 33-41.
19. Wilkinson, L.S., W. Davies, and A.R. Isles, *Genomic imprinting effects on brain development and function*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(11): p. 832-843.
20. Barton, S.C., M.A.H. Surani, and M.L. Norris, *Role of paternal and maternal genomes in mouse development*. Nature, 1984. **311**(5984): p. 374-376.
21. Barlow, D.P., et al., *The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus*. Nature, 1991. **349**(6304): p. 84-87.
22. DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. Cell, 1991. **64**(4): p. 849-59.
23. Wutz, A. and D.P. Barlow, *Imprinting of the mouse Igf2r gene depends on an intronic CpG island*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **140**(1-2): p. 9-14.
24. Wang, X., et al., *Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3839.
25. Gregg, C., et al., *High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain*. Science, 2010. **329**(5992): p. 643-8.
26. Babak, T., et al., *Global survey of genomic imprinting by transcriptome sequencing*. Curr Biol, 2008. **18**(22): p. 1735-41.
27. Allen, N.D., et al., *Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10782-6.
28. Keverne, E.B., et al., *Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development*. Brain Res Dev Brain Res, 1996. **92**(1): p. 91-100.
29. Florio, M. and W.B. Huttner, *Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex*. Development, 2014. **141**(11): p. 2182-94.
30. Gage, F.H., J. Ray, and L.J. Fisher, *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS*. Annu Rev Neurosci, 1995. **18**: p. 159-92.

31. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
32. Kempermann, G., *New neurons for 'survival of the fittest'*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(10): p. 727-36.
33. Arellano, J.I. and P. Rakic, *Neuroscience: Gone with the wean*. Nature, 2011. **478**(7369): p. 333-4.
34. Braun, S.M. and S. Jessberger, *Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance*. Development, 2014. **141**(10): p. 1983-6.
35. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1219-27.
36. Kempermann, G., *Neuroscience. What the bomb said about the brain*. Science, 2013. **340**(6137): p. 1180-1.
37. Chopp, M., Y. Li, and Z.G. Zhang, *Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies*. Stroke, 2009. **40**(3 Suppl): p. S143-5.
38. Roll, L. and A. Faissner, *Influence of the extracellular matrix on endogenous and transplanted stem cells after brain damage*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 219.
39. Brizzi, M.F., G. Tarone, and P. Defilippi, *Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(5): p. 645-51.
40. Amariglio, N., et al., *Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient*. PLoS Med, 2009. **6**(2): p. e1000029.
41. He, S.e.a., *Ultrasound Guided Neural Stem Cell Transplantation through the Lateral Ventricle for Treatment of Cerebral Palsy in Children*. Neural Regeneration Research, 2012.
42. Byts, N., et al., *Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 783-92.
43. Wolber, W., et al., *Phenotype and Stability of Neural Differentiation of Androgenetic Murine ES Cell-Derived Neural Progenitor Cells*. Cell Medicine, 2013. **5**(1): p. 29-42.
44. Ahmad, R., et al., *Functional neuronal cells generated by human parthenogenetic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42800.
45. Spandidos, A., et al., *PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D792-9.
46. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
47. Oesterle, A., *P-97 and P-1000 Pipette Cookbook Rev. F*. 2010.
48. Raslan, F., et al., *Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice*. Exp Transl Stroke Med, 2012. **4**: p. 6.
49. Lensch, M.W. and T.A. Ince, *The terminology of teratocarcinomas and teratomas*. Nat Biotech, 2007. **25**(11): p. 1211-1211.
50. Choi, S.W., et al., *Two paternal genomes are compatible with dopaminergic in vitro and in vivo differentiation*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(11-12): p. 1755-62.
51. Dubois-Dauphin, M. and S. Julien, *Stem cell-derived neurons grafted in the striatum are expelled out of the brain after chronic cortical stroke*. Stroke, 2010. **41**(8): p. 1807-14.
52. Kokaia, Z., et al., *Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair[quest]*. Nat Neurosci, 2012. **15**(8): p. 1078-1087.
53. Ding, C., et al., *Derivation of a homozygous human androgenetic embryonic stem cell line*. Stem Cells Dev, 2015.

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.2-1: Frühe Embryonalentwicklung .....	3
Abbildung 1.3-1: Differenzierungspotential während der frühen Embryogenese .....	5
Abbildung 1.4-1 Imprinting .....	9
Abbildung 1.4-2: Verteilung uniparentaler Zellen im Chimärenexperiment .....	11
Abbildung 1.5-1: Abstammung der Kortikalneurone .....	14
Abbildung 1.5-2: Adulte Neurogenese .....	16
Abbildung 1.5-3: Adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ).....	17
Abbildung 1.5-4: Adulte Neurogenese im Hippocampus .....	18
Abbildung 1.6-1: Aktivierung von Astroglia nach Trauma .....	20
Abbildung 1.6-2: Stammzelltransplantation nach Trauma .....	22
Abbildung 2.2-1: Methodenetablierung in der hippocampalen Zellkultur .....	29
Abbildung 2.2-2: Neurale Differenzierung aus murinen N- und AG-Zellen.....	32
Abbildung 2.2-3: Schemazeichnung des Messstandes .....	36
Abbildung 3.1-1: d13pNPCs.....	43
Abbildung 3.1-2: d7NLCs I.....	44
Abbildung 3.1-3: d7NLCs II.....	45
Abbildung 3.1-4: d14NLCs I.....	46
Abbildung 3.1-5: d14NLCs II.....	47
Abbildung 3.1-6: Dopaminerge Differenzierung.....	48
Abbildung 3.1-7: Elektrophysiologische Charakterisierung I.....	51
Abbildung 3.1-8: Elektrophysiologische Charakterisierung II:.....	52
Abbildung 3.1-9: Charakterisierung humaner D28NLCs aus phESC-Zelllinie.....	53
Abbildung 3.1-10: RT-PCR neuronaler Rezeptorproteine in N- und AG-Zellen .....	54
Abbildung 3.2-1: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation I .....	56
Abbildung 3.2-2: Repräsentative Färbungen drei Monate nach Transplantation II .....	57
Abbildung 3.2-3: Tumorigenität nach Transplantation .....	59

*Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén die mich, von den ersten eigenen Schritten im Labor über die Interpretation und kritische Auseinandersetzung mit erhobenen Daten bis hin zur Veröffentlichung wissenschaftlicher Artikel begleitet hat. Das in mich gesetzte Vertrauen und die experimentelle Freiheit, auch neue Methoden zu etablieren, weiß ich sehr zu schätzen.*

*Danken möchte ich Prof. Dr. Albrecht Müller sowie seinen Doktoranden Soon Won Choi und Ruhel Ahmad für die gelungene und zielorientierte Kooperation.*

*Ohne die theoretische und praktische Unterstützung wären die elektrophysiologischen Messungen nicht durchführbar gewesen. Hierfür möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Manfred Heckmann, Prof. Dr. med. Christian Geis und insbesondere hinsichtlich der Betreuung am Messstand bei Dr. Benedikt Grünewald bedanken.*

*Die Zusammenarbeit mit der technischen Assistentin Frau Barbara Gado war eine Bereicherung und hat wesentlich zum Gelingen der Laborarbeit beigetragen.*

*Für die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation und die kritische Korrektur derselben, möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Lebensgefährtin Alina Neureuther, sowie meinem Kollegen Dr. Thomas Dexneit herzlich bedanken.*

*Dem Dekan der medizinischen Fakultät, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Frosch danke ich für die Erteilung eines Promotions-Stipendiums.*

*Zuletzt möchte ich in dieser Danksagung Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus erwähnen, der als Klinikdirektor und Vorgesetzter meinen bisherigen neurochirurgischen Werdegang und diese Dissertation mit Geduld und Fachkunde begleitet hat.*

## **Lebenslauf:**

### **Persönliche Daten**

---

Vor- und Zuname: Wanja Andrej Wolber

Anschrift: Augustinerstr. 4  
97070 Würzburg

eMail-Adresse: wolber\_w@ukw.de

Geburtsdatum: 28.2.1985

Geburtsort: Heidelberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Familienstand: ledig

Mutter: Dr. phil. Edith Wolber

Vater: Dr. rer. nat. Stefan Dietrich

### **Ausbildungsdaten**

---

Schulbildung: 1991 - 1995 Karl-Bühler-Grundschule  
Meckesheim  
1995 - 2004 Gymnasium Neckargemünd

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,8)

Freiwilliges Soziales Jahr: 2004-2005 Arbeit beim Deutschen Roten Kreuz  
im Rettungsdienst als Rettungssanitäter

Studium: 2005 - 2006 Bachelorstudiengang Biologie an  
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
2006-2012 Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
2008-2012 Studium der experimentellen  
Medizin in Würzburg (Begleitstudiengang)  
2009 Aufnahme in die Studienstiftung des  
deutschen Volkes  
2010 Promotionsstipendium der med. Fakultät  
2012 Abschluss der Ärztliche Prüfung  
Gesamtnote: 2,16

Berufliche Tätigkeit: Ab 2013 Facharztweiterbildung in der Klinik  
und Poliklinik für Neurochirurgie der  
Universitätsklinik Würzburg

Wissenschaftliche Tätigkeit: 2009 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. B. Sinha  
Ab 2009 Beginn der Dissertation und Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universitätsklinik Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. A.-L. Siren

#### Publikationsliste:

- 2010 LAM, T. T., GIESE, B., CHIKKABALLI, D., KUHN, A., WOLBER, W., PANE-FARRE, J., SCHÄFER, D., ENGELMANN, S., FRAUNHOLZ, M. AND SINHA, B  
*„Phagolysosomal integrity is generally maintained after Staphylococcus aureus invasion of nonprofessional phagocytes but is modulated by strain 6850.“*  
Infection and immunity 78(8): 3392-3403
- 2010 CHOI, S. W., S. ECKARDT, R. AHMAD, W. WOLBER, K. J. MCLAUGHLIN, A. L. SIREN AND A. M. MÜLLER  
*„Two paternal genomes are compatible with dopaminergic in vitro and in vivo differentiation.“*  
The International journal of developmental biology 54(11-12): 1755-1762
- 2012 AHMAD, R., W. WOLBER, S. ECKARDT, P. KOCH, J. SCHMITT, R. SEMECHKIN, C. GEIS, M. HECKMANN, O. BRUSTLE, J. K. MCLAUGHLIN, A. L. SIREN AND A. M. MULLER  
*"Functional neuronal cells generated by human parthenogenetic stem cells."*  
PLoS One 7(8): e42800
- 2013 WOLBER, W., R. AHMAD, S. W. CHOI, S. ECKARDT, K. J. MCLAUGHLIN, J. SCHMITT, C. GEIS, M. HECKMANN, A.-L. SIRÉN AND A. M. MÜLLER  
*"Phenotype and Stability of Neural Differentiation of Androgenetic Murine ES Cell-Derived Neural Progenitor Cells."*  
Cell Medicine 5(1): 29-42
- 2013 OFFEN, N., J. FLEMMING, H. KAMAWAL, R. AHMAD, W. WOLBER, C. GEIS, H. ZAEHRES, H. R. SCHOLER, H. EHRENREICH, A. M. MULLER AND A. L. SIREN  
*"Effects of erythropoietin in murine-induced pluripotent cell-derived panneural progenitor cells."*  
Molecular medicine (Cambridge, Mass.) 19: 399-408.

#### Poster:

- 2011 WOLBER, W., S. W. CHOI, S. ECKARDT, K. J. MCLAUGHLIN, C. GEIS, M. HECKMANN, A.-L. SIRÉN AND A. M. MÜLLER  
*„Neurogenesis from Androgenetic and Biparental Mouse ES Cells.“*  
9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, March 23.-27.3.2011