

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Westermann

In Kooperation mit dem Zentrum für Integrative Psychiatrie Kiel
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Direktor: Prof. Dr. Aldenhoff

**Isolierung und *in vitro*-Kultivierung von undifferenzierten humanen
Vorläuferzellen aus Nasenmuschelbiopsien: Methodenetablierung und
Charakterisierung im Vergleich zu standardisierten ZNS-Zelllinien**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Andreas Jeske
aus Greifswald
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Lübeck

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.08.2013

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund	1
1.2 Die Riechschleimhaut	3
1.3 Ethmoidektomien vs. Riechepithelbiopsie	6
1.4 Einstellung neuronaler Bedingungen	7
1.5 Untersuchung der Zelldifferenzierung	8
1.6 Stimulationsbedingungen der <i>in vitro</i> -Zellkultur	9
1.7 Ziel der Doktorarbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Probanden	13
2.2 Materialien	14
2.3 Primärzellkultur	17
2.4 Mikroglia-Zelllinien-Kulturen	23
2.5 Inkubationen der Zelllinien und Primärzellen mit Antipsychotika	24
2.6 Immunhistochemische Nachweismethoden	25
2.7 Mikroskopie	29
2.8 Zellzählungen	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Etablierung reproduzierbarer Kulturbedingungen	30
3.2 Identische Immunfluoreszenznachweise	33
3.3 Unterschiedliche psychotrope Effekte	37
4 Diskussion	47
5 Zusammenfassung	68
6 Abkürzungsverzeichnis	69
7 Literaturverzeichnis	70
8 Anhang	87

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Psychiatrische Erkrankungen sind im Hinblick auf ihre pathologischen Erscheinungsformen im Wesentlichen mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) in Verbindung zu bringen. Diese sind mittlerweile beim lebenden Menschen auf der Basis von Bildgebungsuntersuchungen einsehbar. Als großes Problem in der Praxis der neuropsychiatrischen Forschung offenbart sich die Tatsache, dass aus ethischen Gründen nicht ausreichend Hirnzellen *in vivo* aus Menschen gewonnen werden können. In der jüngsten Vergangenheit wurden allerdings verschiedene Wege beschritten, um auf entsprechendes Zellmaterial zurückzugreifen und dieses unter Aspekten eines direkten Bezugs zu psychiatrischen Erkrankungen untersuchen zu können.

Häufig wurden Zellen aus Vollblut verwendet, welches klinisch leicht von psychiatrischen Patienten gewonnen werden kann. Die Vergleichbarkeit von Blutzellen mit Hirnmaterial wird aber in vielen fachwissenschaftlichen Beiträgen in Frage gestellt, und trotz vieler Übereinstimmungen sind Blutzellen keine neuronalen Zellen (Banati, Hoppe et al. 1991; Banati, Rothe et al. 1991; Andersson, Perry et al. 1992; Avellino, Hart et al. 1995). Dennoch haben mehrere Arbeitsgruppen interessante Befunde an Blutzellen von psychiatrischen Patienten erheben können (Hinze-Selch, Becker et al. 1998; Hinze-Selch and Pollmacher 2001; Koch, Kell et al. 2002; Koch, Kell et al. 2003). Außerdem existieren Parallelen zwischen den myelo-monozytären Zellen im Blut und den residenten Makrophagen des ZNS: Mikroglia-Zellen stammen vom selben Keimblatt, dem Mesoderm, ab und weisen - wie auch alle anderen phagozytierenden Zellen des Körpers - viele funktionelle Ähnlichkeiten mit diesen auf (Leone, Le Pavec et al. 2006). Neben dem Ento- und Ektoderm gilt das Mesoderm als sogenanntes mittleres Keimblatt des Embryoblasten. Keimblätter beschreiben in der Entwicklungsbiologie die erste Differenzierung eines Embryos in verschiedene Zellschichten (Fioroni 1992; Greven 2004). Die zellgebundene Forschung an peripheren Zellen aus dem Blut ist in vielen Belangen zwar hilfreich, kann jedoch die Untersuchung zentralnervöser Zellen nicht ersetzen.

Eine weitere Quelle psychiatrisch relevanter Zellen stellt post-mortem Hirnmaterial dar. In der Praxis ist es jedoch aus rechtlichen, ethischen und

prozeduralen Gründen nahezu unmöglich, zeitnah an geeignetes menschliches Hirngewebe von psychiatrischen Patienten zu gelangen, um noch lebende Zellen zu isolieren. Außerdem gibt es Hirnbanken, von denen die international akkreditierte „Stanley Brain Collection“ über sehr gut charakterisiertes Material verfügt, auf das von Forschern weltweit zurückgegriffen werden kann (Minambres, Ballesteros et al. 2008). Diese Banken bedeuten einen großen Fortschritt für die neuropsychiatrische Forschung, dennoch beschränken sich diese aus logistischen Gründen auf fixierte oder tief gefrorene Hirne, aus denen ebenfalls keine lebenden Zellen mehr gewonnen werden können.

Zelllinien aus Mensch und Maus bieten eine weitere, jedoch limitierte Möglichkeit für die Erforschung von Hirnzellen. In dieser Arbeit verwenden und argumentieren wir mit den standardisierten ZNS generierten Zelllinien CHME3 und BV2. Leider waren in unserem Labor keine neuronalen Zelllinien etabliert und verlässlich benutzbar. Die humane fötale Mikroglia-Zelllinie CHME3 ist durch Immortalisierung embryonaler Mikroglia-Zellen mit dem „SV40 large T-Antigen“ erzeugt worden (Janabi, Peudenier et al. 1995). Die murine Zelllinie BV2 wurde durch Infektion einer mikroglialen Primärkultur mit dem Onkogen raf/v-myc, welches den J2 Retrovirus trägt, generiert (Blasi, Barluzzi et al. 1990). Des Weiteren wäre die Untersuchung von Zelllinien mit psychiatrischer Indikation sinnvoll gewesen. Forscher an unserem Haus haben in Zusammenarbeit mit der neurochirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Eppendorf neurale Vorläuferzellen aus Resektaten, welche bei therapeutischer Amygdalo-Hippocampektomie entstehen, isoliert (Muller, Laurent et al. 2008). Bei den 24 operierten Patienten mit Temporallappenepilepsie lag jedoch in keinem Fall zusätzlich eine psychiatrische Störung vor (F.J. Müller, persönliche Kommunikation).

Aus diesen bestehenden Möglichkeiten zur Untersuchung von Hirnzellen wird seit über einem Jahrzehnt wesentlich daran gearbeitet, zentralneuronale Zellen aus der Nasenschleimhaut zu isolieren und mittels *in vitro*-Zellkultur weitergehend zu charakterisieren (Feron, Perry et al. 1998). Dabei macht man sich die anatomische Besonderheit zu Nutze, dass in der Nasenschleimhaut vereinzelt über das Riechepithel im engeren Sinne hinaus zentralnervöse Zellen mit abnehmender Häufigkeit von oberer zu unterer Nasenmuschel vorhanden sind (Buck 2004; Witt and Wozniak 2006). Aus humanem Nasenmuschelmateriale

konnten bereits neuronale Vorläuferzellkulturen etabliert werden (Feron, Perry et al. 1998; Zhang, Klueber et al. 2004). Gerade im Hinblick auf Befunde an Menschen mit Schizophrenie, Depression, bipolarer Störung oder Demenz wurden unter Nutzung von Hochdurchsatzverfahren in post-mortem Hirngewebe und peripherem Blut eine Vielzahl von biologischen Auffälligkeiten beschrieben, die von Veränderungen in Neurotransmittersystemen über Veränderungen in metabolischen und Zytokinsystemen bis hin zu intrazellulären Signalstörungen reichen (Prabakaran, Swatton et al. 2004; Tkachev, Mimmack et al. 2007). Diese Aspekte in tatsächlich zentralneuronalen oder entsprechend aus Vorläufern differenzierten Zellen von lebenden Patienten zu untersuchen, könnte einen Meilenstein in der psychiatrischen Forschung darstellen, der weitere wesentliche Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Therapie dieser Erkrankungen liefern könnte.

1.2 Die Riechschleimhaut

Die Bedeutung der Riechschleimhaut als ein spezialisiertes Neuroepithel liegt in der Anbindung an das ZNS des Menschen (Asan 2004). In der Vergangenheit wurde wissenschaftlich abgeleitet, dass unter dem Dach der Nasenhöhle innerhalb eines etwa 5 cm² großen flimmer- und becherzellenfreien Schleimhautbezirks 5 - 7 Millionen kleinste Geruchsrezeptoren lokalisiert sind. Diese Geruchsrezeptoren nehmen im Nasendach eine fein differenzierte Prüfung der Luftzusammensetzung vor (Tittel 1994). Der Bereich der Riechschleimhaut, wissenschaftlich Regio olfactoria bezeichnet, beherbergt die meisten olfaktorischen Rezeptorneurone (Asan 2004).

1.2.1 Aufbau, Funktionsweise, Regeneration

Die humane Riechschleimhaut ist ein mehrreihiges Flimmerepithel, welches durch die Lamina basalis von der Lamina propria, einer Bindegewebsschicht, getrennt ist. Im mehrreihigen Flimmerepithel befinden sich Millionen primärer olfaktorischer Rezeptorneurone, Basalzellen und Stützzellen. Duftstoffe können sich an Rezeptoren der Plasmamembran der Zilien anheften. Eine Schleimschicht, von den Bowman-Drüsen produziert, bedeckt die Zilien. Die Bowman-Drüsen

entspringen der Lamina propria, die außerdem zahlreiche Blutgefäße und Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone führt. In der knöchernen Frontobasis des Schädels befindet sich eine zarte Knochenlamelle, die Lamina cribrosa. Die Lamina cribrosa besitzt im Bereich der Fossae olfactoriae auf jeder Seite etwa 40 kleine Perforationen, durch die die Fila olfactoria das Schädelinnere erreichen und zum Bulbus olfactorius ziehen (Weismann, Yousry et al. 2001). Zur Veranschaulichung dieser Ausführungen sei auf die Abbildung 1 verwiesen.

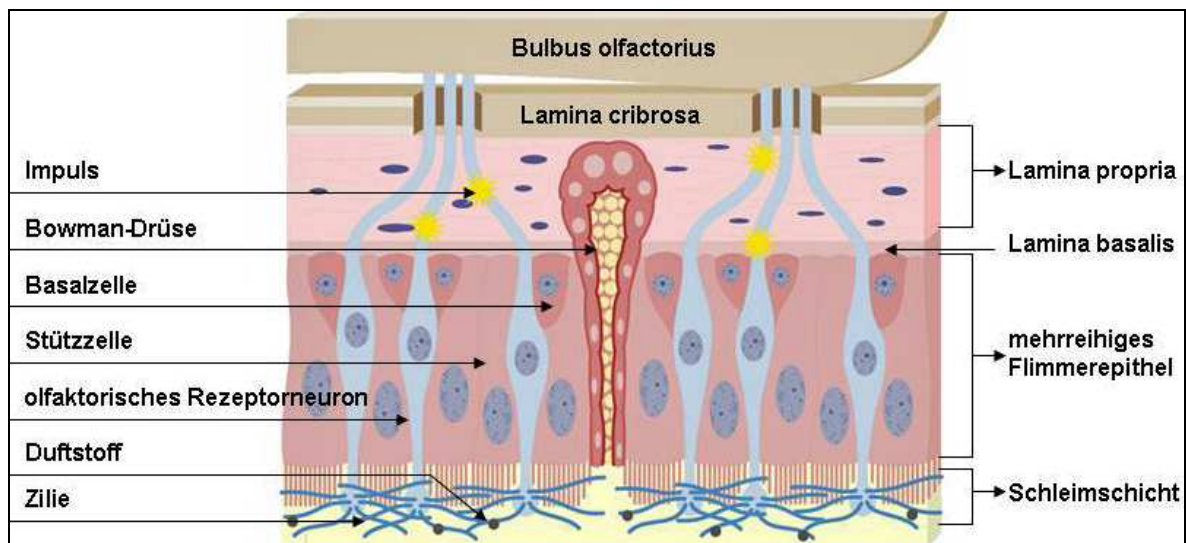


Abbildung 1: Darstellung der humanen Riechschleimhaut nach modifizierter Quelle (<http://emptynosesyndrome.org/nose.html>)

Die olfaktorischen Rezeptorneurone sind bipolare Nervenzellen mit apikalem Fortsatz und einer Auftreibung zahlreicher feiner Zilien (Asan 2004). Diese Neurone stellen den Anfang der Riechbahn des Menschen dar, die aus insgesamt drei verschalteten Neuronen besteht (Hick 2006). Binden nun Geruchsstoffe spezifisch an die Plasmamembran der Zilien und die dort lokalisierten Rezeptorproteine, breitet sich der durch den Duftstoff ausgelöste Nervenimpuls über den Zellkörper auf das Axon des olfaktorischen Rezeptorneurons aus, welches basal aus dem Zellkörper hervorgeht. Stützzellen des mehrreihigen Flimmerepithels umgeben die Dendriten der olfaktorischen Rezeptorneurone und sorgen so für eine elektrische Isolierung. Die Stützzellen schützen die olfaktorischen Rezeptorneurone außerdem vor äußeren Einwirkungen, deaktivieren Duftstoffe und beseitigen Zellreste untergegangener Neurone. Zwischen den Stützzellen befinden sich verschiedene Arten mikrovillärer Zellen, wie sie auch im gesamten Nasen-, Rachenraum und Magen-Darm-Trakt

vorkommen. Auch diese besitzen möglicherweise chemorezeptive Funktionen (Asan 2004).

Die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone sammeln sich zu Bündeln, die Fila olfactoria bezeichnet werden. Diese Fila olfactoria sind von spezialisierten Gliazellen, den olfaktorischen Hüllzellen, umgeben, welche zur elektrischen Abschirmung beitragen. Für das Auswachsen der Axone sind wahrscheinlich die olfaktorischen Hüllzellen von Bedeutung, indem sie Stoffe bilden, die das Wachstum fördern (Asan 2004). In der Vergangenheit wurden olfaktorische Hüllzellen aus dem Bulbus olfactorius verschiedener Tierspezies gewonnen. Diese Zellart unterstützt die Axon-Regeneration, die erneute Myelinisierung und die funktionelle Erneuerung von Rückenmarksverletzungen bei Tieren (Perry, Mackay-Sim et al. 2002).

Der durch den Geruch ausgelöste Impuls gelangt weiter über die Fila olfactoria, deren Gesamtheit Nervus olfactorius genannt wird, zum Nervengewebe des Bulbus olfactorius. Damit gehören die olfaktorischen Rezeptorneurone zumindest teilweise zum Gehirn (Perry, Mackay-Sim et al. 2002). Gelangt der Nervenimpuls zum Bulbus olfactorius, wird die Grenze von peripherem zu zentralem olfaktorischen System überschritten (Stern and McClintock 1998). Im Bulbus olfactorius erfolgt die erste neuronale Umschaltung der Riechbahn auf die Mitralzellen, deren Axone über den Tractus olfactorius zur Stria olfactoria medialis und lateralis ziehen. Von der Stria olfactoria medialis verläuft das zweite Neuron zum Riechhügel und von dort zu den Nuclei septales und zum Gyrus hippocampalis und erreicht somit das limbische System. Hier erfolgt die unbewusste Riechwahrnehmung. Von der Stria olfactoria lateralis zieht das dritte Neuron zur Area periamygdalaris/praepiriformis und zum Frontallappen. Auf diesem Wege erfolgt die bewusste Geruchswahrnehmung (Hick 2006).

Die durchschnittliche Lebensdauer olfaktorischer Rezeptorneurone beträgt einige Monate. Danach sterben sie ab und werden durch Ausdifferenzierung von neuronalen Stammzellen, in diesem Fall Basalzellen, ersetzt, welche der Basalmembran aufliegen und auch im Erwachsenenalter noch zu regelmäßiger mitotischer Teilung fähig sind (Beites, Kawauchi et al. 2005). Es werden zwei Typen von Basalzellen unterschieden: die horizontalen und die kugelförmigen Basalzellen. Mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die kugelförmigen Basalzellen proliferieren und ihrerseits die Entwicklung von Neuronen im

Neuroepithel einleiten (Schwob, Farber et al. 1986; Calof and Chikaraishi 1989; Schwartz Levey, Chikaraishi et al. 1991). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass die Riechschleimhaut in ihrer Größe und Dicke expandiert (Hinds and McNelly 1981). Somit muss es eine Balance zwischen der Entstehung und dem Absterben von Zellen in der Riechschleimhaut geben (Hinds, Hinds et al. 1984; Carr and Farbman 1992).

1.2.2 Interindividuell vermischte Epithelzonen

In Föten ist der Aufbau der Riechschleimhaut als uniform zu bezeichnen, doch mit zunehmendem Alter ändern sich die Grenzen, Dimensionen und die präzise Lokalisation der Riechschleimhaut. Außerdem unterliegt die Riechschleimhaut auch der Degeneration sowie morphologischen Änderungen in der Aufteilung von unterstützenden sensorischen Elementen und Basalzellen. Im Erwachsenen vermischen sich auf diese Weise verschiedenste Anteile der Riechschleimhaut mit der respiratorischen Schleimhaut, die im Wesentlichen gleich aufgebaut ist. Die respiratorische Schleimhaut verfügt über keine olfaktorischen Rezeptorneurone, besitzt aber Becherzellen im mehrreihigen Flimmerepithel. Die bei der Vermischung der Schleimhäute entstehenden Grenzen sind unscharf und weisen eine hohe individuelle Ausprägung auf (Paik, Lehman et al. 1992). Allerdings konnten bereits olfaktorische Zonen in den mittleren Nasenmuscheln und den lateralen Wänden der Nase nachgewiesen werden (Perry, Mackay-Sim et al. 2002).

1.3 Ethmoidektomien vs. Riechepithelbiopsie

Eine potente Quelle zentralnervösen Zellmaterials stellt nach den Ausführungen im vorhergehenden Abschnitt 1.2 die Riechschleimhaut dar. Eine Biopsie der Riechschleimhaut ist heutzutage zwar eine Routinemethode, aber sie ist nicht ungefährlich (Moran, Jafek et al. 1992). Das gründet darin, dass die Riechschleimhaut weit oben im Nasendach in der Nähe der Siebplatte, der Lamina cribrosa, lokalisiert ist. Die Hirnhaut ist hier an der Schädelbasis sehr dünn und mit der Siebplatte verwachsen (Moran, Rowley et al. 1982; Lang, Bressel et al. 1988). Somit ist auch bei sorgfältiger Durchführung der Biopsie das Risiko gegeben, die

Hirnhaut ggf. an der Schädelbasis zu verletzen, was wiederum eine Meningitis-Erkrankung auslösen kann. In diesem Zusammenhang stellen Ethmoidektomien eine weitaus geringer riskante und problematische Quelle dar, um olfaktorisch durchsetztes Gewebematerial zu erhalten. Dieses Zellmaterial ist typischerweise Operationsabfall. Eine Ethmoidektomie wird routinemäßig zum Beispiel bei obstruktiver Nasenatmung durchgeführt (Bolger, Keyes et al. 1999; Orlandi, Lanza et al. 1999; Har-El and Swanson 2001). In Abschnitt 1.2.2 wurde erklärt, dass in den mittleren Nasenmuscheln neben respiratorischer auch olfaktorische Schleimhaut mit interindividueller Ausprägung vorhanden ist.

1.4 Einstellung neuronaler Kulturbedingungen

Frühere Kultivierungsversuche mit humaner, post-mortem gewonnener Riechschleimhaut und Zellmaterial mittlerer Nasenmuscheln führten zu heterogenen Zellpopulationen, die fraktionsweise negativ für neurale Marker und nicht zwangsläufig nahezu ganzheitlich positiv oder negativ für ein Protein waren (Murrell, Bushell et al. 1996; Roisen, Klueber et al. 2001; Hahn, Han et al. 2005). Mit Hilfe der Erkenntnisse aus der Stammzellforschung ist es aber möglich, die undifferenzierte Selbsterneuerung, die selektive Isolierung und Vermehrung zentralnervöser Progenitoren aus heterogenem Gewebe zu fördern (Wachs, Couillard-Despres et al. 2003). Nasenmuscheln enthalten beispielsweise auch Bindegewebszellen und Nasenschleimhautepithelzellen, welche in eine neuronale Progenitorkultur „kontaminieren“ können (Walton, Sutter et al. 2006; Belzunegui, Izal-Azcarate et al. 2008; Xue, Qiao et al. 2008; Xue, Wei et al. 2009). Dazu dienen komplex zusammengesetzte Medien wie zum Beispiel Neurobasal-A mit einem Mediensupplement wie B27. Diese Kombination stellt eine serumfreie Modifikation dar, die der idealen Kultivierung neuronaler Zellen des ZNS dient (Brewer, Torricelli et al. 1993; Brewer 1997).

Zusätzlich sind aber Wachstumsfaktoren unabdingbar, da mit zunehmender Kultivierungsdauer die Gefahr der Zelldifferenzierung besteht. Die rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF, FGF und LIF sind in eine Vielzahl von Funktionen der Zelle involviert, insbesondere aber in die Signaltransduktion und adulte Neuro- und Gliogenese (Tureyen, Vemuganti et al. 2005). Für neurale Stamm- und Progenitorzellen ist bekannt, dass EGF die Regulierung der Proliferation, die

Differenzierung und das Überleben von adulten Zellen der subventrikulären Zone unterstützt (Herbst 2004; Grimm, Messemer et al. 2009; Lee, Hsu et al. 2009). Darüber hinaus konnte an Mäusen gezeigt werden, dass die Identität neuraler Progenitorzellen in Anwesenheit von EGF erhalten bleibt (Hulspas, Tiarks et al. 1997; Winkler, Fricker et al. 1998). Auch FGF reguliert an zentralnervösen neuronalen Progenitor- und Stammzellen - ähnlich wie EGF - während der embryonalen Entwicklung die Proliferation, die Migration und die Differenzierung der Zelle (Ornitz and Itoh 2001). Es ist bekannt, dass hohe Konzentrationen von FGF die fortschreitende Neurogenese von Zellen blockieren (Nelson and Svendsen 2006). LIF, ein Lymphoid-Faktor, unterbindet die spontane Zelldifferenzierung und fördert zudem die Pluripotenz zur Langzeitkultivierung von embryonalen Stammzellen (Pitman, Emery et al. 2004; Emery, Merson et al. 2006; Oshima, Teo et al. 2007; Weible and Chan-Ling 2007).

1.5 Untersuchung der Zelldifferenzierung

Es gibt viele Proteinmarker, die den Differenzierungsstatus von Primärzellen, gewonnen aus „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, anzeigen könnten. Unsere Entscheidung fiel auf sieben Neuralmarker, die zum Teil sehr aktuell diskutiert werden. Dazu zählen zunächst die Proteine Nestin und GFAP. Nestin tritt im ZNS auf und wird dort vor allen Dingen in multipotenten Stammzellen exprimiert. Nestin gilt in der Literatur als wichtiger Marker für neurale Progenitor- und Stammzellen (Tohyama, Lee et al. 1992; Quinones-Hinojosa, Sanai et al. 2006; Gilg, Tye et al. 2008; Johansson, Price et al. 2008; Smith, Vallier et al. 2008). Das Protein GFAP wird generell als Marker für astrozytäre Zellen angesehen. Im menschlichen adulten Nervensystem konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch neurale Stammzellen GFAP enthalten (Liem, Yen et al. 1978; Quinones-Hinojosa, Sanai et al. 2006; Brillaud, Piotrowski et al. 2007; Johnston, Su et al. 2008).

Zur weiteren Bestimmung der Identität der Zelle können Beta-III-Tubulin, Musashi, A2B5, Map2 und NeuN verwendet werden. Beta-III-Tubulin wird in großer Menge während der fötalen und postnatalen Entwicklung im zentralen und peripheren Nervensystem gebildet. In adultem Gewebe gilt die Expression von Beta-III-Tubulin als Neuron-spezifisch (Erceg, Lainez et al. 2008; Johansson, Price et al. 2008; Penalva, Tilburn et al. 2008). In Säugetieren spielt die Musashi-Familie

eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Stammzellstadiums und der Differenzierungskapazität von Zellen. Das Vorkommen von Musashi konnte bereits in neuronalen Progenitor- und Stammzellen beobachtet werden (Glass, Synowitz et al. 2005; Shin, Mitalipova et al. 2006). A2B5 ist ein Gangliosid, welches typischerweise in der äußeren Zellmembran von oligodendrozytären Progenitoren gefunden werden kann. Forschergruppen verwendeten A2B5 zur selektiven Aufreinigung dieser Zellpopulationen (Silberberg, Poder et al. 1989; Roy, Wang et al. 1999). Map2 ist ein mikrotubulus-assoziiertes Protein, welches überwiegend im ZNS vorhanden ist. Map2 wird in Neuronen stärker als in anderen Zellen gebildet, deswegen wird es häufig als neuronaler Marker für *in vitro*-Studien eingesetzt. Es interagiert ebenfalls mit Neurofilamenten (Farah, Liazoghli et al. 2005; O'Hare, Kushwaha et al. 2005). Das Neuron-spezifische Kernprotein NeuN kommt im peripheren und zentralen Nervensystem aller Wirbeltiere vor. NeuN ist überwiegend in neuronalen Zellkernen exprimiert, weswegen es häufig zum immunhistochemischen Nachweis von Nervenzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wird (Mullen, Buck et al. 1992; Benraiss, Chmielnicki et al. 2001).

1.6 Stimulationsbedingungen der *in vitro*-Zellkultur

Ausgehend von Untersuchungen an Blutzellen als Ersatz für Hirnzellen setzte sich ein internationales Versuchsparadigma durch, das darauf abzielte, Effekte von Lipopolysaccharid (LPS) und Antipsychotika auf Zellproliferation und Apoptose mittels *in vitro*-Zellkultur darzustellen (Hinze-Selch, Becker et al. 1998; Hinze-Selch and Pollmacher 2001; Koch, Kell et al. 2002; Koch, Kell et al. 2003). LPS ist im Menschen in natürlicher Weise nicht vorhanden und induziert als Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien eine starke Immunantwort in Tier- und Humanzellen. Passiert LPS die Blut-Hirn-Schranke, kann es an den Membranrezeptor CD14 binden, was die Zytokinproduktion anregt, die wiederum Fieber verursachen kann (Rivest, Lacroix et al. 2000). CD14 Rezeptoren sind in Mikroglia-Zellen und auch in den mikroglialen ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 vorhanden (Lacroix, Feinstein et al. 1998). Ebenfalls sind CD14 Rezeptoren in Zellen der Nasenschleimhäute (Jahnsen, Gran et al. 2004) und in Monozyten und Makrophagen der Säugetiere existent (Lacroix, Feinstein et al. 1998). Daher stammt auch der gemeinsame experimentelle Ansatz in Zusammenhang mit LPS.

In endothelialen Zellen besitzt CD14 zudem eine regulierende Funktion für das Zellüberleben. Das Herausrufen des CD14 Rezeptors durch Makrophagen führt zur Apoptose (Rivest, Lacroix et al. 2000).

Solch eine durch LPS ausgelöste artifizielle Entzündung der genannten Zelltypen erlaubt die Simulation einer Therapie mit zum Beispiel einem Antipsychotikum. Zwei Antipsychotika, die in der psychiatrischen *in vitro*-Zellkulturforschung, ausgehend vom klinischen Alltag der medikamentösen Behandlung von Patienten, immer wieder auf deren psychotropen Effekt *in vitro* untersucht wurden, sind Clozapin und Haloperidol (Szuster-Ciesielska, Slotwinska et al. 2004; Hou, Wu et al. 2006; Sugino, Futamura et al. 2009). Hier konnten auf der Grundlage des atypischen Antipsychotikums Clozapin vielfältige Wirkungen nachgewiesen werden (Hinze-Selch, Becker et al. 1998; Hinze-Selch and Pollmacher 2001), die sich von den Effekten unterscheiden, die das typische und weit verbreitete Antipsychotikum Haloperidol auslöst. Für *in vitro*-Zellkulturexperimente mit Haloperidol existieren schon länger Befunde an primären hippocampalen Neuronen, C6-Glioma und NCB20 Zellen, die eine erhöhte Zytotoxizität auf diese psychotrope Substanz zeigen (Behl, Rupprecht et al. 1995). Clozapin wird zwar in der *in vitro*-Zellkultur an PC12-, SH-SY5Y- und U937-Zellen auch als toxisch beschrieben (Dwyer, Lu et al. 2003; Heiser, Enning et al. 2007), aber im Vergleich mit Haloperidol ist es als geringer toxisch einzuschätzen (Dwyer, Lu et al. 2003). Häufig wird in der Literatur diesbezüglich vermutet, dass typische und atypische Antipsychotika andere zellbiologische Effekte zur Folge haben, da sie an unterschiedliche Dopamin-Rezeptoren binden. Somit kommt es in verschiedenen Zellmodellen konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Auswirkungen, auch und insbesondere bezüglich Nekrose und Apoptose (Behl, Rupprecht et al. 1995; Gardner, Zahid et al. 1998; Galili, Mosberg et al. 2000). Gerade zur Überprüfung der Apoptoserate wird häufig aktivierte Kaspase 3 nachgewiesen. Dieses Protein spielt eine Schlüsselrolle in der Erkennung früher Apoptose und bei Entzündungsreaktionen von Zellen (Dai and Krantz 1999). In Verbindung mit Zytotoxizität und Apoptose, hervorgerufen durch LPS und Psychopharmaka, wurde an Zellen aber nur selten die Zellproliferation untersucht. Durch den Nachweis der Marker Ki-S2, MCM6 und Ki-Mit können Zellen allerdings in verschiedenen Phasen des Zellzyklus' detektiert werden. Der Antikörper gegen MCM6 ermöglicht die Detektion von Zellen in der G1-, S-, G2-

und M-Phase des Zellzyklus' (Heidebrecht, Buck et al. 2001). Im Gegensatz dazu erkennt der Antikörper Ki-S2 alle Zellen in der S-, G2- und M-Phase (Rudolph, Alm et al. 1999) und Ki-Mit ausschließlich die M-Phase (Pollmann, Parwaresch et al. 2006).

Es gibt auch myelo-monozytäre Zellen in der Nasenschleimhaut mit phänotypischen und funktionellen Ähnlichkeiten mit zentralnervösen Mikroglia-Zellen. Darüber hinaus scheint Mikroglia eine spezifische Rolle bei neuropsychiatrischen Erkrankungen zu spielen (Ramon-Cueto, Perez et al. 1993; McCann, O'Callaghan et al. 1996; Chang, Chien et al. 2003). Diese Arbeit konzentriert sich auf den Vergleich von hirnnahen Zellen „oberer“ mittlerer Nasenmuscheln mit den Zelllinien CHME3 und BV2. Die beiden Letztgenannten sind zwar mikroglialer Herkunft, finden ihren Ursprung aber im ZNS des Menschen. Die *in vitro*-Zellkultur mit LPS und Antipsychotikum zielt dabei auf dieselbe Grundaktivierung dieser Zelltypen über den CD14 Rezeptor-Komplex ab.

1.7 Ziel der Doktorarbeit

Es gibt nur wenige Möglichkeiten, Hirnzellen oder hirnahe Zellen vom lebenden Menschen zu untersuchen, dennoch liefern routinemäßig durchgeführte Ethmoidektomien Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, denen bereits zentralnervöse Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Die vorgelegte Pilotstudie setzte sich zur Aufgabe, diese heterogenen Gewebeproben in eine reproduzierbare, neuronal-selektive Vorläuferzellkultur zu überführen. Von höchster Bedeutung war die interindividuelle Vergleichbarkeit, die durch die Wahl eines neural-spezifischen Markersets überprüft werden sollte.

Mit den aus Nasenmuscheln gewonnenen Zellen und den standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 führten wir ein erstes psychiatrisch relevantes Experiment durch. Ziel war es, psychotrope Effekte, die durch Clozapin und Haloperidol mit artifizieller Entzündungsreaktion durch LPS induziert werden, darzustellen. Die Auswertung der psychotropen Effekte sollte im Hinblick auf die Proliferations- und Apoptoseaktivität in diesen drei Zellsystemen erfolgen.

Zusammenfassend verfolgte diese Arbeit zwei wesentliche Ziele:

- 1) Ist es möglich, mit Zellmaterial der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln eine neuronal-selektive *in vitro*-Vorläuferzellkultur stabil und reproduzierbar zu etablieren? Sind die individuell entnommenen Zellen verschiedener Patienten in Bezug auf die Zelldifferenzierung vergleichbar?
- 2) Welche *in vitro*-Effekte lösen LPS/Clozapin und LPS/Haloperidol auf Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln im Hinblick auf Zellproliferation und Apoptose im Vergleich mit den standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 aus?

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Ethikvotum

Die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft. Die Kommission stimmte darin überein, dass gegen die Durchführung der Studie mit dem Aktenzeichen A 169/07 keine Bedenken bestehen. Am 18.03.08 erfolgte das positive Votum.

2.1.2 Aufklärung und Einwilligung

Bezüglich der Verwendung des bei der Ethmoidektomie anfallenden Operationsabfallmaterials für die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung klärt der behandelnde Arzt, Herr Dr. med. Harald Wilms, über die Risiken der Ektomie und die Verwendung des Zellmaterials zu Forschungszwecken auf. Außerdem holt er bei Zustimmung das schriftliche Einverständnis der Patienten ein und informiert über die mögliche erweiterte Studienteilnahme, die in der vorliegenden Dissertation keine Rolle spielte.

2.1.3 Ethmoidektomien

Die Ethmoidektomien werden durch Dr. med. Harald Wilms, Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ostseeklinik Kiel, durchgeführt. Dabei wird das Zellmaterial aus der mittleren bzw. die mittlere Nasenmuschel entfernt, wovon der „obere“ Teil der mittleren Nasenmuschel zur Etablierung einer Zellkultur verwendet werden soll. Bei Zustimmung der Patienten erhalten wir nach Abschluss aller klinisch notwendigen Maßnahmen das anfallende Zellmaterial, welches sonst im Regelfall entsorgt wird. Sämtliche Belange um den Eingriff der Ethmoidektomie, wie z.B. Diagnostik, Indikationsstellung, Terminplanung, Operationsdurchführung, folgen allein der HNO-ärztlich festgestellten medizinischen Notwendigkeit und sind nicht Teil der vorliegenden wissenschaftlichen Studie.

2.2 Materialien

2.2.1 Bezugsquellen der Chemikalien

Bezugsquelle	Bezeichnung
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	PBS
Chemicon, Hamburg, Deutschland	Akkutase LIF
Dako, Hamburg, Deutschland	Antibody Diluent Fluorescent Mounting Medium
Drogerie, Kiel, Deutschland	Nagellack
Gibco, Karlsruhe, Deutschland	B27 DMEM FCS Glutamax, L-Glutamin MEM Neurobasal-A PBS Penicillin/Streptomycin
Invivogen, Toulouse, Frankreich	Primocin
Merck, Darmstadt, Deutschland	Aquatex Ethanol Mayers Hämalaunlösung
MP Biomedicals, Dillenburg, Deutschland	Haloperidol PBS Tabletten
Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland	DAPI
PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland	HBSS
Peprotech, Hamburg, Deutschland	EGF FGF
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Ethanol (96%)
Sandoz Pharmaceuticals GmbH, Ismaning, Deutschland	Clozapin
Sigma-Aldrich, München, Deutschland	DMSO Fibronectin Glucose Goat-Serum Heparin LPS Poly-L-Lysin Rabbit Serum
Thermo Scientific, Fremont, USA	UltraVision LPValue-System

2.2.2 Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien

Bezugsquelle	Bezeichnung
Aesculab, Melsungen, Deutschland	Skalpell
BD, Heidelberg, Deutschland	Cellstrainer 50 ml Falcon's
Braun, Melsungen, Deutschland	Spritzen 10 ml
FineScienceTools, Heidelberg, Deutschland	Pinzette
Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	6er, 24er Lochplatten Kryoröhrchen Zellkulturflaschen
Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland	Deckgläser Objektträger
Nunc, Wiesbaden, Deutschland	Well Chamber 96
Peha-Soft, Heidenheim, Deutschland	Handschuhe
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Einweg-Pipetten 5, 10, 25 ml Pipettenspitzen 10,100,1000 µl Spitzröhrchen 15, 50 ml
Sartorius, Göttingen, Deutschland	Sterilfilter 0,2 µm

2.2.3 Bezugsquellen der Geräte

Bezugsquelle	Gerät	Bezeichnung
Canon, Krefeld, Deutschland	Kamera	Powershot A95
Chyo, Albstadt, Deutschland	Waage	JL-180
Chartbiomed, Ohio, USA	Stickstofftank	XC20
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Zentrifuge	Centrifuge5417R
Faster, Deutschland	Bench	BH48
Heraeus, Hanau, Deutschland	HeraCell Megafuge	HeraCell 150 Megafuge 1.0
Karl Hecht, Sondheim, Deutschland	Cell Counter	AC-8 Counter
Hirschmann, Eberstadt, Deutschland	Pipettor	Pipetus Akku
Julabo, Seelbach, Deutschland	Wasserbad	Julabo 90 A
Leica, Wetzlar, Deutschland	Konfokales Laser- Scanning-Mikroskop	TCS SP
Nalgene, Neerijse, Belgien	Freezing Container	Mr. Frosti
Zeiss, Hamburg, Deutschland	Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 40CFL

2.2.4 Bezugsquellen der Antikörper

Bezugsquelle	Bezeichnung
Abcam, Cambridge, UK	GFAP MAP2 NeuN
BD, Heidelberg, Deutschland	Aktivierte Kaspase 3
Chemicon, Hamburg Deutschland	Beta-III-Tubulin Musashi Nestin
CAU Hämatopathologie, Kiel, Deutschland	Ki-S2 Ki-Mit
Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland	Alexa Flour 488 Alexa Flour 594
R&D, Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland	A2B5
Serotec, Düsseldorf, Deutschland	MCM6

2.2.5 Probandendaten der Ethmoidektomien

PZ-ID	Alter	Geschlecht	Bemerkungen
PZ Pat 1	29	weiblich	Raucherin, häufige Baldrian-Einnahme
PZ Pat 2	30	männlich	keine weiteren Angaben
PZ Pat 3	46	männlich	Leistungssportler

2.3 Primärzellkultur

2.3.1 Vorbereitungen der Kulturflaschen

Für die Kultivierung von Primärzellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln werden 75 cm² Kulturflaschen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Um die Zelladhäsion an den Kulturflaschenboden zu verbessern, ist es nötig, die Flaschen mit Poly-L-Lysin und Fibronectin (beide Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zu benetzen bzw. zu „coaten“ (Iwanaga, Suzuki et al. 1978; Merck 1989).

Durchführung des „Coatings“:

- Zugabe von 2 ml Poly-L-Lysin (c = 0,1 mg/ml verdünnt in PBS)
- Kulturflaschenboden durch Schwenken gleichmäßig benetzen
- Inkubationsphase für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Abpipettieren von Poly-L-Lysin und 3-maliges Nachspülen mit PBS
- ▶ Zugabe von 2 ml Fibronectin (c = 0,01 mg/ml verdünnt in PBS)
- ▶ Kulturflaschenboden durch Schwenken gleichmäßig benetzen
- ▶ Inkubationsphase für 45 Minuten bei Raumtemperatur
- ▶ Abpipettieren von Fibronectin und dreimaliges Nachspülen mit PBS
- ▶ Kulturflaschen für mehrere Stunden trocknen lassen, bis sämtliche Restfeuchtigkeit verdunstet ist

2.3.2 Neurobasal-A Komplett-Medium

Neurobasal-A (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) ist ein etabliertes serumfreies Basalmedium für die selektive Kultivierung von Neuronen des ZNS. Wir haben entsprechend den Empfehlungen aus der internationalen Literatur (Brewer, Torricelli et al. 1993; Brewer 1997) die folgenden Supplemente zugegeben: B27 ohne Vitamin-A 2% (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 1% Glutamax (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und Heparin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland).

2.3.3 Medienbedingungen in den ersten 24 Stunden

Das Gesamtvolumen des Kulturmediums einer 75 cm² Kulturflasche liegt bei maximal 12 ml. Es besteht zu 10% aus nicht-hitzeinaktiviertem FCS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), zu 45% aus Neurobasal-A Komplett-Medium und zu 45% aus konditioniertem Medium früherer Kultivierungen.

2.3.4 Starten der Kultivierung

Nach der Ethmoidektomie eines Patienten wird das Operationsmaterial unverzüglich in einen sterilen 50 ml Falcon mit Drehverschluss (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) überführt. Als Transportmedium ist in dem Falcon sterilfiltrierte „Hanks Balanced Salt Solution“ (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) mit 5% Glucose (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) vorgelegt. Der Transport erfolgt auf Eis. Unter der sterilen Arbeitsbank (BH48, Faster, Deutschland) kann der Großteil des Transportmediums abpipettiert und das Operationsmaterial in eine Glaspetrischale (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Akkutase (Chemicon, Hamburg, Deutschland) überführt werden, welche die enzymatische Digestion einleitet. Dabei lösen sich Zellen und Zellverbände voneinander ab. Während das Operationsmaterial für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 3 ml Akkutase dissoziiert, erfolgt die zusätzliche leichte mechanische Zerkleinerung mittels Skalpell. Nach Beendigung der Inkubationsphase wird das gelöste Material in Akkutase aufgezogen und über einen Zellfilter („Cellstrainer“, 40 µm; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben, der große Materialstücke zurückhält. Mit 3 ml Neurobasal-A Komplett-Medium erfolgt das Nachspülen des Filters. Der Durchlauf kann ohne Inhibierung der Akkutase in die Kulturflaschen pipettiert werden, da deren Aktivität durch die Verdünnung des zugegebenen Mediums endet.

2.3.5 Separate Zugaben von Wachstumsfaktoren

Für die Kultivierung von Primärzellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln werden drei Wachstumsfaktoren eingesetzt: Es handelt sich dabei um EGF (Epidermal Growth Factor; Peprotech, Hamburg, Deutschland), FGF (Fibroblast Growth Factor; Peprotech, Hamburg, Deutschland) und LIF (Leucemia Inhibiting Factor; Chemicon, Hamburg, Deutschland), die den Kulturflaschen separat beigefügt werden können.

Zugabe der Wachstumsfaktoren:

- 50 µl EGF (Aliquot mit $c = 10 \mu\text{g/ml}$)
- 50 µl FGF (Aliquot mit $c = 10 \mu\text{g/ml}$)
- 50 µl LIF (Aliquot mit $c = 2,5 \mu\text{g/ml}$)

2.3.6 Separate Zugaben des Antibiotikums Primocin

Innerhalb einer Stunde nach Entnahme der Nasenmuschelproben erfolgten die sofortigen Inkulturnahmen derselbigen im Labor. Bereits initial erwies sich der Einsatz der üblichen Kombination von Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B als Zellkulturantibiose als nicht ausreichend, da damit alle primären Kulturen vor allem mit Pilzen kontaminiert waren und eine weitere Passage unmöglich war. Deswegen wurde in den folgenden Experimenten Primocin verwendet. Bereits zwei Wochen nach Inkulturnahme mit Primocin als Antibiose konnte schließlich auf alle Antibiotika in den Medien verzichtet werden. Primocin gilt als nicht toxisch für sensible Primärzellen und verhindert Kontaminationen durch gram-positive oder -negative Bakterien, Mykoplasmen und Pilze (Wachs, Couillard-Despres et al. 2003; Weikert, Eppenberger-Eberhardt et al. 2003; Golaz, Vonlaufen et al. 2007). Diese Zusammensetzung erwies sich als sinnvoll für unsere Zwecke, da das entnommene Nasenmuschelmateriale nicht steril ist bzw. steril entnommen werden kann.

Zugabe von Primocin:

- 100 µg/ml Primocin (gebrauchsfertig)

2.3.7 Nach den ersten 24 Stunden Kultivierung

Nach Ablauf der ersten 24 Stunden erfolgt die Entnahme des gesamten Mediums aus den Kulturflaschen. Die Überführung in ein 15 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) erlaubt im Anschluss eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1.200 rpm. Das Zellpellet wird in frischem Neurobasal-A Komplett-Medium resuspendiert. Die Zellen wachsen nach 24 h in einem Medium, das zu 50% aus konditioniertem Medium und zu 50% aus Neurobasal-A Komplett-Medium besteht. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren und Primocin erfolgt separat.

2.3.8 Medienwechsel ohne Sphären

Zweimal pro Woche erfolgt der Austausch des Mediums. Dazu werden die Kulturflaschen für zwei bis drei Minuten unter der Bench stehen gelassen, so dass die Zellen sedimentieren. Nach Abpipettieren des Mediums und der Überführung in ein 15 ml Röhrchen wird für 10 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand kann als konditioniertes Medium weitere Verwendung finden und wird bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. In einer kleinen Menge frischem Neurobasal-A Komplett-Medium wird das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und der ursprünglichen Kulturflasche zugeführt. Das Gesamtvolumen sollte auf maximal 12 ml Kulturmedium eingestellt werden.

2.3.9 Medienwechsel und „Splitten“ von Sphären

Sind in der Kulturflasche nicht adhärente Sphären der Größe von 8 - 10 Zellen im maximalen Querdurchmesser vorhanden, so wird „gesplittet“. Für das „Splitten“ der nicht adhärenen Sphären nimmt man einen Teil des Mediums aus der Kulturflasche ab und überführt diesen in ein 15 ml Falcon. Das 15 ml Falcon wird bei 1.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand kann als konditioniertes Medium bei -20°C eingefroren werden. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Pipette erfolgt die Resuspension der Zellpellets in Akkutase. Nach zwei Minuten haben sich die noch nicht getrennten schwereren Sphären wieder am Röhrchenboden abgesetzt, so dass jetzt oberflächlich 100-300 µl des Zellsuspensats abpipettiert und erneut der ursprünglichen Kulturflasche

zugegeben werden kann. Dies wiederholt man, bis das Suspensat vollständig überführt wurde. In der Kultur beginnt dann erneut die Sphärenbildung.

2.3.10 Passagieren

Sind die Zellen in einer Kulturflasche bodendeckend gewachsen, ist es notwendig zu passagieren. Dazu kann für die nicht adhärenen Sphären so verfahren werden, wie zuvor bereits dargestellt. Die resuspendierten Zellen werden in eine neue, beschichtete Kulturflasche gegeben. Für die verbleibenden adhärenen Zellen in der Kulturflasche wird für sieben Minuten bei 37°C 0,65 ml/ 25 cm² Akkutase hinzugefügt, welches die Zellen schonend ablöst. Nach dieser Inkubationsphase können unter leichtem Schwenken der Kulturflasche 3-4 ml frisches Neurobasal-A Komplett-Medium zugegeben werden. Dieses zieht man umgehend mit den Zellen wieder ab und überführt es in die neue Kultur.

2.3.11 Vorbereitungen von Deckgläsern

Die Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) werden mittels 99%igen Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter der sterilen Arbeitsbank entfettet, desinfiziert, getrocknet und je nach benötigter Menge in 24-Lochplatten (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) gelegt. Das „Coaten“ erfolgt wie zuvor beschrieben, nur beträgt die nötige Volumenzugabe pro Loch von Poly-L-Lysin und Fibronectin jeweils 300 µl, so dass die Deckgläser vollständig benetzt sind. Die Aussaat von Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln wird mit 20.000 Zellen/ml durchgeführt. Das maximale Mediengesamtvolumen pro Loch beträgt 500 µl. Die separaten Zugaben von EGF, FGF, LIF und Primocin erfolgen mit entsprechender Verhältnismäßigkeit zwischen 2-3 µl pro Faktor. Die auf diese Weise in 24er Lochplatten präparierten Deckgläser dienen der Kultivierung, bis eine Zelldichte von rund 70-80% erreicht ist. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von Clozapin/LPS und Haloperidol/LPS. Für die Zellfärbungen wurden Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln verwendet, die zunächst nach Anreicherung in der nullten Passage - das entspricht 5 - 7 Wochen Kultivierung - eingefroren wurden. Die Aussaat erfolgte immer als einseitige neuronale Expansion in der ersten Passage, um interindividuell ähnlich lange Kultivierungszeiten zu testen.

2.3.12 Konservierung von Primärzellen der Nasenschleimhaut

Für die Primärzellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln richteten wir spezielle Einfrier- und Auftauprozedere ein, um möglichst viele Zellen gleicher Kultivierungsdauer konservieren zu können. Dabei orientierten wir uns an Protokollen, die für neurale Vorläuferzellen aus adultem humanen Hirngewebe etabliert wurden (J. F. Loring 2007). Weniger aufwändige Verfahren verminderten die Anzahl der kultivierbaren nasalen Zellen derart drastisch, dass keine Zellkultur mehr möglich war.

2.3.12.1 Einfrieren

Die Zellen werden aus der Kulturflasche abpipettiert. Zusätzlich können sich adhärenente Zellen durch leichtes Nachspülen und eine 10 minütige Inkubationsphase mit Akkutase ablösen. Alle abgetrennten Zellen werden in ein 15 ml Spitzröhrchen überführt, welches bei 1.100 rpm für 10 Minuten zentrifugiert wird. Der Überstand kann als konditioniertes Medium Verwendung finden. Das Pellet wird in 1 ml Einfriermedium, siehe weiter unten, resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Damit die Zellen langsam und schonend gefrieren können, erfolgt eine Zwischenlagerung der Proben für 24 Stunden in der -80°C Gefriertruhe. Wir verwendeten hierzu das Behältnis „Mr. Frosti“ (Nalgene, Neerijse, Belgien), welches bis zur Markierung mit Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) befüllt wird. Am nächsten Tag kann die Umlagerung der Kryoröhrchen in den Stickstofftank (Chartbiomed, Ohio, USA) erfolgen.

Zusammensetzung des Einfriermediums:

60% konditioniertes Medium

30% FCS

10 % DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.3.12.2 Auftauen

Vor dem eigentlichen Auftauprozess erwärmt man ein 15 ml Spitzröhrchen mit 9 ml Neurobasal-A Komplett-Medium inklusive EGF, FGF, LIF und Primocin in einem 37°C Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland). Das erwärmte Medium wird tropfenweise in die Kryoröhrchen gegeben. Bereits aufgetaute und gelöste Zellen überführt man aus dem Kryoröhrchen zurück in das mit Medium erwärmte Spitzröhrchen. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis alle Zellen des Kryoröhrchens in das Spitzröhrchen übertragen sind, welches im Anschluss direkt für 45 Minuten in den 37°C Inkubator gestellt wird. In dieser Ruhephase sinken die Zellen im Spitzröhrchen ab. Nach Ablauf der Inkubationsphase kann bis auf einen Milliliter das gesamte Medium abgenommen werden. Der verbleibende Milliliter wird in eine mit Proteinen beschichtete Kulturflasche gegeben, wie in Punkt 2.3.1 beschrieben. Dann erfolgen die Kultivierung mit Neurobasal-A und auch die Zugabe von Wachstumsfaktoren und Primocin.

2.4 Mikroglia-Zelllinien-Kulturen

2.4.1 Medienbedingungen für BV2 und CHME3

BV2 und CHME3 sind standardisierte ZNS generierte Mikroglia-Zelllinien, wobei BV2 aus der Maus und CHME3 aus dem Menschen stammt. Diese Zelllinien werden in unserem Labor routinemäßig kultiviert. Bei entsprechendem Bedarf kann das Zellmaterial problemlos für die Kultivierung auf Deckgläsern genutzt werden. Nachfolgend sind dafür die Medienbedingungen aufgeführt:

BV2 Medium → DMEM + 1% Penicillin/Streptomycin + 8% FCS

CHME3 Medium → MEM + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS

(alle Produkte von Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

2.4.2 Kultivierung auf Deckgläsern

Die ZNS generierten Zelllinien BV2 und CHME3 wachsen problemlos adhärent auf Glas und PVC, was das „Coating“ von Kulturflaschen und Deckgläsern überflüssig macht. Die Zellen können mit 20.000 Zellen/ml direkt in die mit Deckgläsern ausgestatteten 24 Lochplatten gegeben werden, in denen je nach Zelllinie die zuvor aufgeführten Kulturbedingungen gelten.

2.5 Inkubationen der Zelllinien und Primärzellen mit Antipsychotika

Die Stimulationskonzentrationen von Clozapin und Haloperidol mit jeweils LPS für die standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 wurden in unabhängigen Vorversuchen im Hause der ZIP gGmbH Kiel als besonders günstig getestet und im Labor etabliert. Die Evaluierung des Konzentrationsbereichs für Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln sollte simultan erfolgen. Dies war aber nicht möglich, da die Konzentrationen von LPS und Antipsychotika, angesetzt für die Zelllinien, die nasal gewonnenen Zellen so stark schädigten, dass eine Färbung und Zellzählung nach 48 h nicht mehr möglich war. Wir mussten uns daher entscheiden, die LPS-Konzentration an den nasalen Zellen um eine Dekade zu senken, um zumindest identische Antipsychotika-Konzentrationen beizubehalten.

LPS (Lipopolysaccharid; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und Haloperidol (MP Biomedicals, Dillenburg, Deutschland) werden in destilliertem Wasser gelöst, während Clozapin (Sandoz, Ismaning, Deutschland) in DMSO angesetzt werden muss. Die Inkubation der Primärzellen und der Zelllinien BV2 und CHME3 mit LPS/Clozapin und LPS/Haloperidol erfolgt in 24 Lochplatten, die mit Deckgläsern ausgestattet sind. Zur Kultivierung der Primärzellen auf Deckgläsern ist ein „Coating“ unabdingbar. Ein „Coating“ für die Zelllinien ist nicht notwendig. Sowohl die Zelllinien BV2 und CHME3 als auch die nasalen Primärzellen werden mit jeweils zwei Konzentrationen von LPS/Clozapin und LPS/Haloperidol nach zwei Inkubationszeiten von je 24 h und 48 h immunhistochemisch gefärbt. Die genauen Konzentrationsbereiche von LPS, Clozapin und Haloperidol sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Bei Clozapin enthalten die Kontrollen nur die äquivalente Menge an destilliertem Wasser und DMSO

inklusive LPS. Die Kontrollen für Haloperidol enthalten anstelle des Haloperidols die äquivalente Menge an destilliertem Wasser inklusive LPS.

Tabelle 1:

Übersicht der eingestellten Konzentrationen von LPS und Clozapin/DMSO bzw. LPS und Haloperidol/destilliertes Wasser für die ZNS-Zelllinien BV2, CHME3 und die nasalen Primärzellen des Individuums PZ Pat 1

Inkubation mit:	BV2	CHME3	nasale Primärzellen PZ Pat 1
LPS [$\mu\text{g/ml}$]	0,2	0,2	0,02 *
Clozapin/DMSO [$\mu\text{g/ml}$]	0,1 1	0,1 1	0,1 1
Haloperidol/destilliertes Wasser [$\mu\text{g/ml}$]	0,02 0,2	0,02 0,2	0,02 0,2

* Lediglich die LPS-Konzentration der nasalen Primärzellen unterscheidet sich. Die Messdaten für diese Konzentrationsbereiche entstanden nach 24 bzw. 48 h Inkubationszeit. Die Zellanfärbung erfolgte mittels des Ultravision LPValue-Nachweissystems. Die Auswertung wurde durch anschließende Zellzählungen gewährleistet.

2.6 Immunhistochemische Nachweismethoden

2.6.1 Indirekte, sekundär markierte Fluoreszenzfärbung

Die Spezifität der Primärantikörper wurde laborintern vor den eigentlichen Fluoreszenzfärbungen an den Primärzellen der Nasenmuscheln untersucht. Dazu waren Tests an weiteren Zellarten nötig, die diese Marker entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit exprimieren oder nicht. Die humane, fötale und mikrogliale Zelllinie CHME3 erwies sich negativ für die Marker Nestin und Musashi. Mit Saos2, einer humanen Osteosarkom-Zelllinie, wurde die Spezifität des GFAP Antikörpers überprüft, die in diesem Fall keine Anfärbung herbeiführte. Die Spezifität des Beta-III-Tubulin Markers konnte mittels Peptid-Block-Inkubation an den Primärzellen der Nasenmuscheln negativ getestet werden. Die Spezifität von Map2 wurde an der Hela-Zelllinie getestet, die diesen Marker exprimiert. Am Hippocampus adulter Mäuse konnte der Marker NeuN positiv nachgewiesen werden. Ein positiver Nachweis von A2B5 erfolgte an der humanen Teratokarzinom-Zelllinie 2102EP. Für alle Fluoreszenzfärbungen wurden die Einsatzkonzentrationen der Primärantikörper in Tabelle 2 verwendet. Methodisch sind alle in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzfärbungen mit einer Technik

etabliert worden, die dieselben wesentlichen Schritte beinhaltet, vgl. hierzu Tabelle 3.

Tabelle 2:

Einsatzkonzentration der verwendeten Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Markierung	Spezies	Konzentration	Verdünnung
A2B5	Zelloberfläche	Maus	500 µg/ml	1/50
Beta-III-Tubulin	Zytoplasma	Maus	1 mg/ml	1/500
GFAP	Zytoplasma	Kaninchen	0,1 mg/ml	1/100
MAP2	Zytoplasma	Maus	2 mg/ml	1/1000
Musashi	Zytoplasma und Zellkern	Kaninchen	1 mg/ml	1/200
Nestin	Zytoplasma	Kaninchen	1 mg/ml	1/200
NeuN	Zellkern	Maus	1 mg/ml	1/1000

Tabelle 3:

Generelles Fluoreszenzfärbeprotokoll; Die Aufgabevolumen für jeden Schritt betragen 100 - 200 µl pro Deckglas

Schritte	Zelloberflächenmarker	Kern und Zytoplasmamarker
1. Fixierung und Permeabilisierung	nur Fixierung nötig, 4% Paraformaldehyd	Aceton 10 Minuten
2. Primärantikörper	- Verdünnungen werden in PBS mit 1% BSA angesetzt - Inkubation über Nacht in feuchter Kammer	
3. Sekundärantikörper	- Alexa Flour 594 und 488 werden 1:100 in PBS angesetzt - Inkubationsdauer 60 Minuten, im Dunkeln	
4. Kerngegenfärbung	- DAPI wird 1:500 in PBS angesetzt - Inkubationsdauer 30 Sekunden	
5. Deckelung	- 1 Tropfen Fluorescent Mounting Medium auf Objektträger - Deckgläser vorsichtig auf Objektträger legen - Trocknung im Dunkeln - Deckgläser mit Nagellack umranden	
Waschgänge	- nach Schritt 1 bis 5 wird 3x mit PBS gespült bzw. gewaschen	
Lagerung	- bei 4°C im Kühlschrank, dunkel	

2.6.2 UltraVision LPValue-Nachweissystem

UltraVision LPValue (Medac, Wedel, Deutschland) stellt eine moderne Technologie in der Polymermarkierung dar. Die Polymermarkierung ermöglicht eine erhöhte Sensitivität bei gleichzeitig vereinfachter Durchführung des Nachweises. Alle verwendeten Primärantikörper und deren Einsatzkonzentrationen sind in der Tabelle 4 vermerkt. Der spezifische Primärantikörper wird durch einen universellen sekundären Antikörper lokalisiert, der an ein enzymmarkiertes Polymer konjugiert ist, welches Immunglobuline aus Maus und Kaninchen erkennt. Somit ist die Signalkopplungskaskade nach dem Auftragen des Primärantikörpers identisch und stellt eine gut funktionierende Zellfärbemethode dar. Die genaue Durchführung und die Inkubationszeiten sind in Tabelle 5 erfasst. Die Auswertung der Zellfärbungen erfolgte mittels Zellzählungen, die in Punkt 2.8 beschrieben sind.

Tabelle 4:

Einsatzkonzentration der verwendeten Primärantikörper für das UltraVision LPValue-System

Antikörper	Markierung	Spezies	Konzentration	Verdünnung
Ki-S2	Zellkern	Maus	unverdünnt	keine
Ki-Mit	Zellkern	Maus	unverdünnt	keine
MCM6	Zellkern	Kaninchen	1 mg/ml	1/500
Aktivierte Kaspase 3	Zellkern	Kaninchen	0,1 mg/ml	1/100

Tabelle 5:

Generelles UltraVision Färbeprotokoll; die Aufgabevolumen in den Einsatzkonzentrationen betragen 100 - 200 µl pro Deckglas

Schritte	Kernmarker
1. Fixierung und Permeabilisierung	- eiskaltes Aceton für 10 Minuten
2. Blocken unspezifischer Hintergrundfärbung	- Auftragen des Ultra-V-Blocks für 5 Minuten bei Raumtemperatur
3. Primärantikörper	- alle Konzentrationen sind in der Tabelle 4 gelistet - Verdünnungen werden in PBS angesetzt - Inkubation über Nacht in feuchter Kammer
4. Signalverstärkung	- Auftragen des Value Primary Antibody Enhancer für 20 Minuten bei Raumtemperatur
5. Sekundärantikörper	- Auftragen von Value AP Polymer-Anti-Maus/Kaninchen IgG für 30 Minuten bei Raumtemperatur
6. Substrat/Chromogen	- 1 Fast Red Tablette zu 5 ml Naphtholsubstrat geben - unter Schütteln die Tablette lösen lassen - Lösung für 10 Minuten auf Deckgläser auftragen
7. Kerngegenfärbung	- Inkubation mit Hämalaun für 2-3 Minuten - Spülen mit Leitungswasser - 15 Minuten zum Nachbläuen in Leitungswasser stehen lassen
8. Deckelung	- Deckelung erfolgt mit dem Eindeckmittel Aquatex
Waschgänge	- nach Schritt 1 bis 6 wird 3x mit PBS gespült bzw. gewaschen
Lagerung	- bei 4°C im Kühlschrank

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Phasenkontrastmikroskopie

Das Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 40CFL; Zeiss, Hamburg, Deutschland) kann Zellen auf Deckgläsern, die mit der UltraVision-Methode gefärbt wurden, darstellen. Ebenfalls können lebende Zellen in Zellkulturflaschen mikroskopiert werden.

2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40CFL; Zeiss, Hamburg, Deutschland) erlaubt es, die Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar zu machen. In dieser Arbeit ist das Fluoreszenzsignal immer an einen Sekundärantikörper gekoppelt (Alexa 488 und Alexa 594; Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland).

2.8 Zellzählungen

2.8.1 Unterscheidung von positiven und negativen Zellfärbungen

Zellen, die mittels der Ultravision LP-Value-Methode gefärbt und mit den im Kern bindenden Primärantikörpern Ki-S2, MCM6, Ki-Mit oder aktivierter Kaspase 3 inkubiert wurden, sind bei positivem Ereignis im Zellkern rot. Durch die Zellkerngegenfärbung mittels Hämalaun wird gesichert, dass bei nicht ausreichender Durchsetzung des Zellkerns mit dem entsprechenden Protein derselbige blau bleibt.

2.8.2 Durchführung der Zellzählungen

Grundsätzlich werden bei den Zelllinien und den nasalen Primärzellen mindestens $5 \cdot 100$ Zellen pro Deckglas gezählt. Liegen dabei einzelne Zählungen um mehr als 10% in der Anzahl positiver Zellen auseinander, so erfolgen weitere Zählungen. Dementsprechend werden die Ausreißer aus der Gesamtzählung herausgenommen. Die Zellzählungen wurden systematisch von oben nach unten an mehreren Stellen des Deckglases durchgeführt. Damit sollte die doppelte Zählung einzelner Areale umgangen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung reproduzierbarer Kulturbedingungen

Die mittleren Nasenmuscheln enthalten nur wenig Riechepithel mit unterschiedlich starker individueller Ausprägung. In Zusammenarbeit mit Dr. Harald Wilms, Ostseeklinik Kiel, wurde deswegen vereinbart, Material der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln für die Zellkultur dieser Pilotstudie zu erhalten und zu verwenden. Routinemäßig durchgeführte Ethmoidektomien liefern dieses Zellmaterial, welches sonst Operationsabfall wäre. Für diese Pilotstudie fanden Zellen dreier individuell entnommener Nasenmuscheln Verwendung, die aufgrund obstruktiver Nasenatmung entfernt wurden. Bereits zu Beginn der Kultivierung dieser nasal gewonnenen Zellen stellten wir über das Medium Neurobasal-A, das Supplement B27 und die Wachstumsfaktoren EGF, FGF, LIF Bedingungen ein, die aus dem im Ursprung heterogenen Nasenmuschelmateriale die Selektion zentralnervöser neuronaler Progenitoren in adultem Gewebe fördern. Andere Zelltypen wurden in den Medien-Ressourcen nicht ausreichend berücksichtigt und starben mit zunehmender Kultivierung ab.

Außerdem war es ein wichtiges Ziel, die Primärzellen der Nasenmuscheln möglichst früh in den Passagen zu untersuchen, da diese mit jeder weiteren Passage vom nativen Urzustand entfernt zu betrachten sind. In diesem Sinne erwies es sich als zweckmäßig, die Primärzellen der Nasenmuscheln der Individuen nach Anreicherung in der 0. Passage zunächst einzufrieren, um ausreichend Zellmaterial vergleichbarer Kultivierungsdauer zu konservieren. Alle Zellfärbungen erfolgten dann mit nasalen Zellen, die in der 1. Passage nach dem Auftauen weiterkultiviert wurden. Wir führten insofern vor jeder angestrebten Zellfärbung dieser Studie eine einseitige neuronale Expansion dieser Zellen durch. Die dafür etablierten Einfrier- und AuftauprozEDURE orientierten sich dabei stark an Methoden für neurale Progenitor- und Stammzellen. Die zu Grunde liegende Methodik kann auf den Seiten 22 und 23 nachgelesen werden. Zwei herkömmliche Protokolle, die wir testeten und die lediglich prozentuale Variationen des standardisierten Einfriermediums in Anteilen von konditioniertem Medium, FCS und DMSO vorsahen, wie für die robusten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 angewendet, führten nicht zum Erfolg. Als Ergänzung sei erwähnt, dass die verwendeten Zellen der Individuen PZ Pat 1, 2 und 3 bis mindestens Ende der 3.

Passage kultiviert wurden, um alle Untersuchungen durchführen zu können. Dabei zeigten die drei individuell gewonnenen nasalen Zellkulturen, unter dem Mikroskop - über die Passagen betrachtet - ein ähnliches morphologisches Erscheinungsbild.

Im nachfolgenden Punkt 3.2 berichten wir darüber, dass die nasalen Primärzellen der Individuen als neuronale Progenitoren identifiziert werden konnten. Entsprechend ist die nachfolgende Benennung der so gewonnenen Zellen aus Nasenmuscheln als Synonym zu den neuronalen Progenitorzellen bereits angepasst. Direkt nach den Inkulturnahmen von Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln zeichnete sich die Kultur durch Millionen von Erythrozyten aus, welche aber durch Medienwechsel, Waschen und Auflösung innerhalb der ersten zwei Wochen eliminiert wurden. Die anfängliche Kultivierung erfolgte mit wenigen isolierten Zellen der Nasenmuscheln. Daher war es notwendig, die nullte Passage nasal gewonnener Zellen für mindestens 5 bis 7 Wochen zu kultivieren, um große Zellmengen zu produzieren. In der zweiten Woche sind erstmalig runde neben adhärent wachsenden neuronalen Progenitorzellen vorzufinden. Die erste Passage wird überwiegend vom Wachstum der adhären und konfluenten runden neuronalen Progenitorzellen dominiert. Die Dauer der ersten Kulturpassage mit nasal gewonnenen Progenitorzellen dreier Individuen lag zwischen zwei und drei Wochen. Ab der zweiten Passage entstehen durch Migration vieler konfluenter runder Progenitorzellen so genannte Zellsphären, die sich im Verlauf dieser Passage vermehren. Die Zellsphären wurden in dieser Studie keiner weiteren Untersuchung unterzogen, da sie für die Argumentation unserer Ergebnisse keine Rolle spielten. Ebenfalls liegen sehr viele adhären wachsende Progenitorzellen in zweiter Passage vor. Die dritte Passage zeichnet sich fast ausschließlich durch konfluente runde Progenitorzellen und Zellsphären aus. Die adhären wachsenden Progenitorzellen sind ab dieser Passage mit fortlaufender Kultivierung nur noch selten vorzufinden. Die zweiten und dritten Kulturpassagen von nasalen Zellen dreier Individuen dauerten rund zwei Wochen. Die zuvor genannten Aspekte sind in Abbildung 2 am Beispiel von PZ Pat 1 dargestellt.

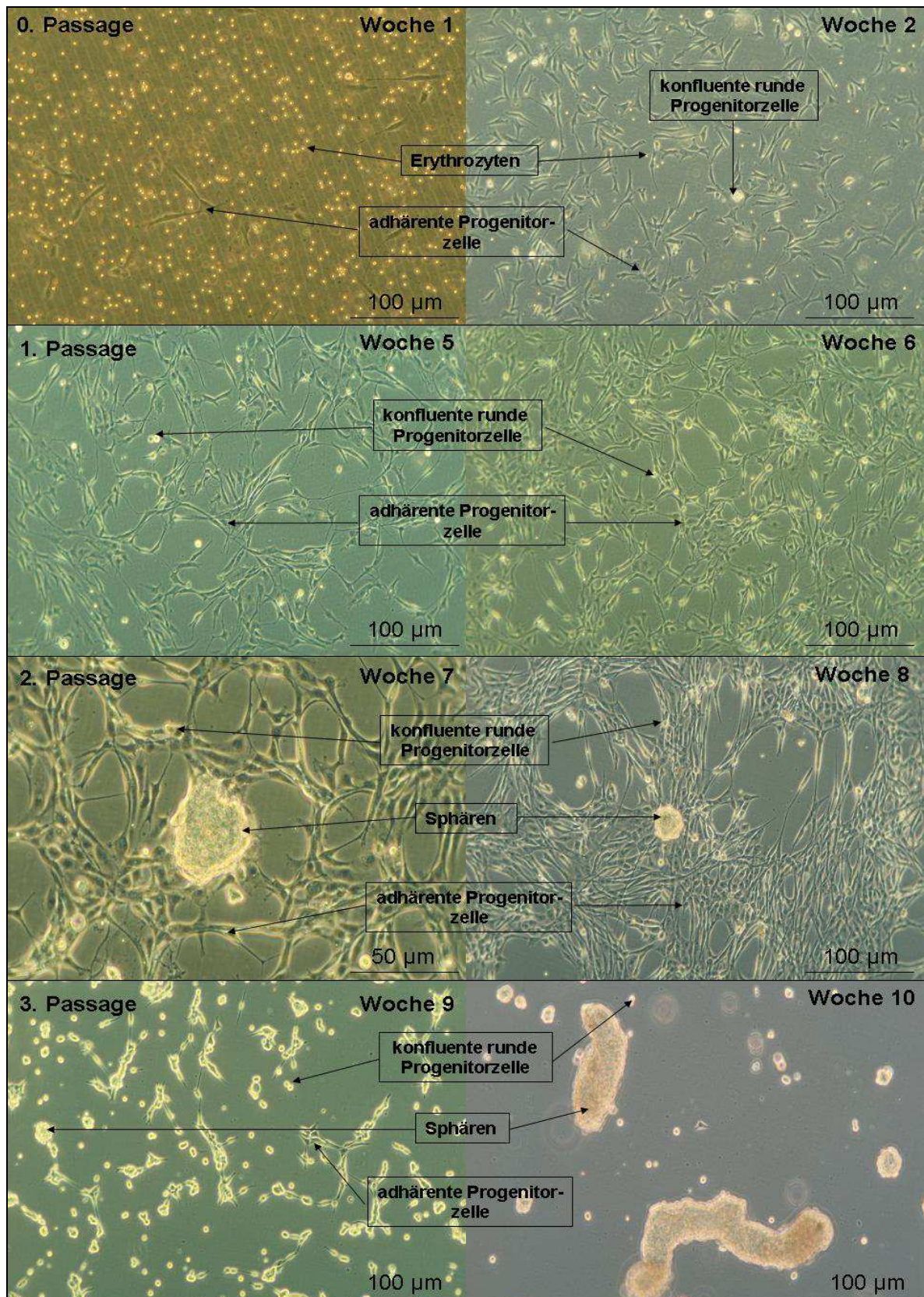


Abbildung 2: Verlauf der selektiven Kultivierung von Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln am Beispiel PZ Pat 1, die zwischen drei individuell nasal gewonnenen Zellpopulationen, mikroskopisch betrachtet, eine ähnliche Zellmorphologie ergab. Ausgehend von heterogenem Nasenmuschelmaterial „kontaminiert“ die Zellkultur beständig zu überwiegend neuronalen Progenitorzellen und Sphären. Die Sphären wurden keiner weiteren Untersuchung unterzogen.

Bis sich allerdings zeigte, welche Kulturbedingungen routinemäßig zur Anwendung kommen konnten, waren sechs individuelle Kultivierungsanläufe nötig, die das Augenmerk auf weitere essentielle Faktoren richteten. Ein Faktor stellte diesbezüglich das Transportmedium nach der Entnahme der Zellen dar. Nur die sofortige Überführung der Resektate in HBSS, versetzt mit 5% Glucose, erlaubte die anschließende längerfristige Kultivierung im Labor. Versuche mit zunächst Neurobasal-A und B27-Supplement als verwendetes Transportmedium erhöhten den pH-Wert auf über 8, was keine vermehrungsfähigen Zellen zwecks weiterer Kultivierung überleben ließ (Ergebnisse nicht dargestellt). Unausweichlich erwies sich ebenfalls die Verwendung von Akkutase zur enzymatischen Digestion, die den herkömmlichen Einsatz von Trypsin ersetzte. Trypsin schädigte in den Versuchen die Zellen so stark, so dass auch hier eine Fortführung der Kultivierung der sensiblen Primärzellen nicht möglich war (Ergebnisse nicht dargestellt). Des Weiteren war die Kombination zur Beschichtung der Zellkulturplastik in der Reihenfolge mit zunächst Poly-L-Lysin und dann Fibronektin essentiell. Ansonsten war nur eine unzureichende Anhaftung von Primärzellen aus Nasenmuscheln an den Boden der Kulturflaschen zu beobachten, was keine weiteren Passagen ermöglichte (Ergebnisse nicht dargestellt). Anfängliche Probleme mit Kontaminationen des Nasenmuschelmaterials bei Verwendung von Streptomycin/Penicillin erwiesen sich als vermeidbar durch die dauerhafte Umstellung auf Primocin (siehe Seite 19).

3.2 Identische Immunfluoreszenznachweise

Unter dem Mikroskop beobachteten wir während der Kulturpassagen von Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln dreier Individuen ein morphologisch ähnliches Erscheinungsbild, worüber in Punkt 3.1 bereits berichtet wurde. Ebenfalls interessierte uns der Zelldifferenzierungsstatus dieser nasal gewonnenen Zellen. In diesem Sinne testeten wir mittels Immunfluoreszenzfärbungen ein spezifisches neurales Markerset. Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach drei Tagen Kultivierung in erster Passage durchgeführt, um eine mindestens 70-80%ige optische Dichte der nasalen Zellen zu erreichen. Sämtliche Färbungen sind mit derselben Methodik entstanden, welche auf den Seiten 25 und 26 nachgelesen werden kann. Zu

unterscheiden sind die nachzuweisenden Proteine, wobei Nestin, GFAP, Map2 und Beta-III-Tubulin im Zytoplasma, Musashi im Kern und Zytoplasma, NeuN lediglich im Kern und A2B5 lediglich auf der Zelloberfläche vorzufinden sind. Für den Nachweis von A2B5 wurde eine Paraformaldehyd- und bei allen anderen Markern eine Aceton-Fixierung verwendet. Alle Negativkontrollen entstanden durch die identische Färbeprozedur ohne die Inkubation der Primärantikörper. Je nach Herkunft des Primärantikörpers verwendeten wir Alexa 488 oder Alexa 594 als Sekundärantikörper zur Anbindung der Fluoreszenz. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde in weiteren Färbungen vorab geprüft. Ausführungen hierzu sind auf Seite 25 zu Papier gebracht.

In unseren Ergebnissen zeigen sich die neuronalen nasalen Progenitoren der Individuen als vollauf vergleichbar, denn für PZ Pat 1, 2 und 3 ermittelten wir ein identisches Färbemuster mit positivem Nachweis für Nestin, GFAP, Musashi und Beta-III-Tubulin und negativem Nachweis für NeuN, Map2 und A2B5. Weiterhin zeigten unsere Ergebnisse keine Fraktionen von Zellen, so dass eine augenscheinlich gesamtheitlich positive oder negative Anfärbung auftrat. In der Diskussion wollen wir diese Tatsache aufgreifen und erläutern. Mit diesem Ergebnis wird der Erfolg der selektiven Kultivierung auf die von uns untersuchten Marker bestätigt. Am Beispiel des Individuums PZ Pat 1 sind die Abbildungen 3 bis 5 zusammengestellt. Auch der Einsatz von 0,02 µg/ml LPS als Stimulans an PZ Pat 1 veränderte die Markerexpression nicht. An dieser Stelle hätten wir uns genauso für das Individuum PZ Pat 2 oder 3 entscheiden können. Die Veränderung des neuralen Markersets, induziert durch LPS, hätte die Grundlage für die Vergleichbarkeit der untersuchten Zyklusmarker Ki-S2, Ki-Mit, MCM6 und des Apoptosemarkers aktivierte Kaspase 3 entzogen, worüber im folgenden Kapitel 3.3 berichtet wird. Die Bilder der Immunfluoreszenznachweise von PZ Pat 1 inklusive LPS-Stimulierung, PZ Pat 2 und 3 sind im Anhang ab Seite 87 zu finden.

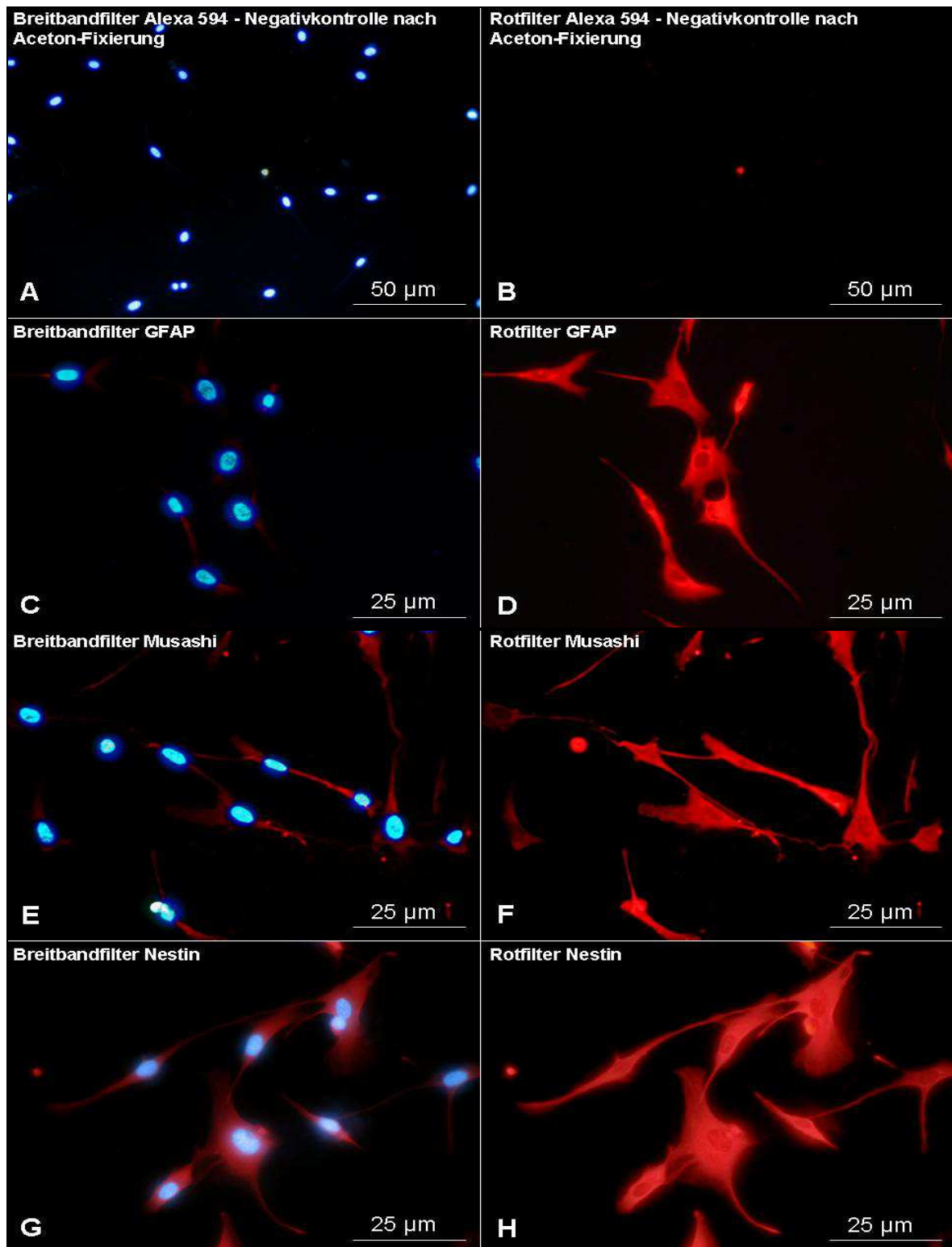


Abbildung 3: IF-Färbungen an den neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die nachfolgenden Bilder weisen deutlich positive Zytoplasmafärbungen im Gesichtsfeld auf, wobei C) und D) für GFAP, E) und F) für Musashi, der vereinzelt auch im Zellkern nachzuweisen war, und G) und H) für Nestin stehen. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 594 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Rotfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

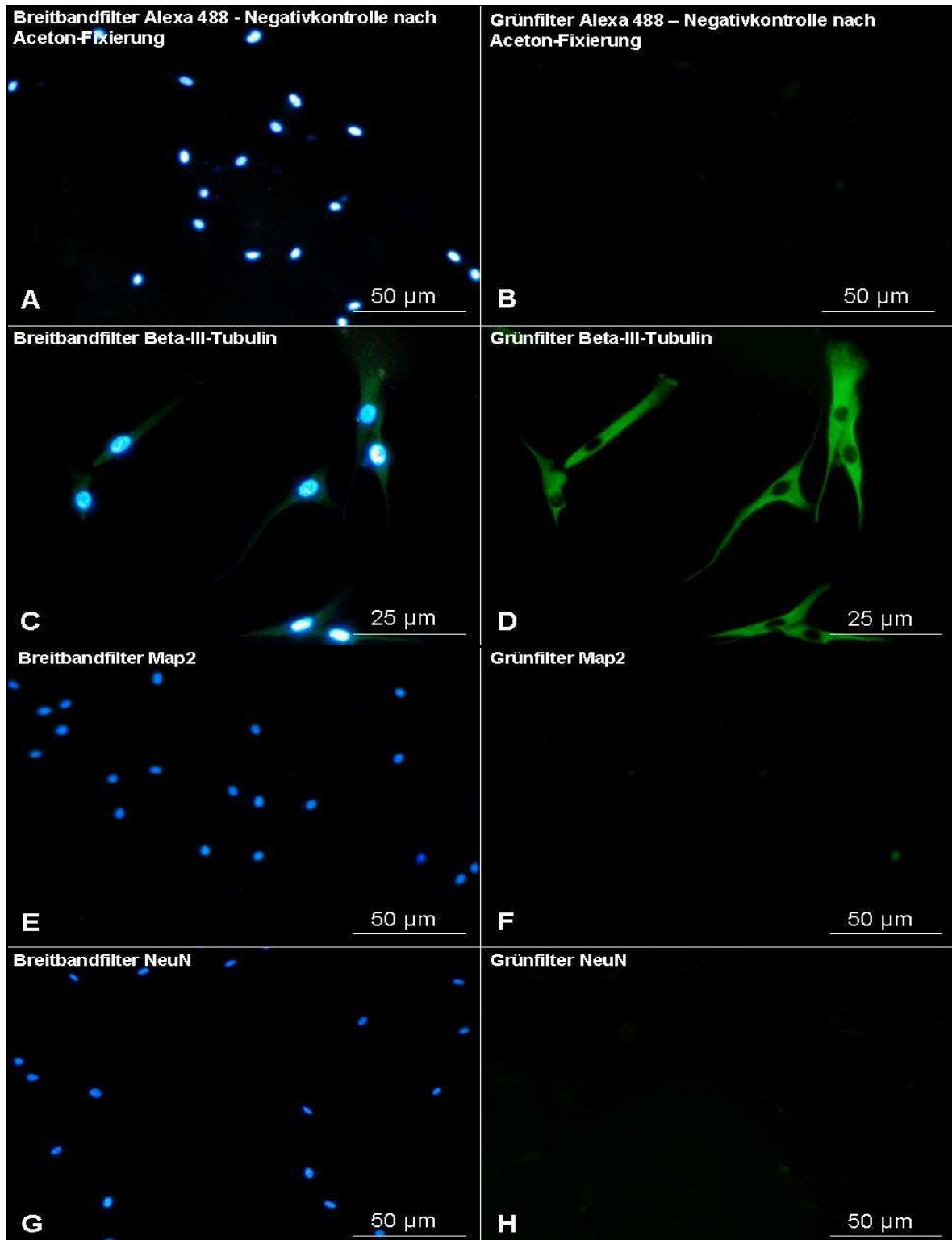


Abbildung 4: IF-Färbungen an den neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) zeigen deutlich positive Zytosmafärbungen für Beta-III-Tubulin, E) und F) negative Zytosmafärbungen für MAP2 und G) und H) NeuN negative Kernfärbungen im Gesichtsfeld. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um Zytosma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

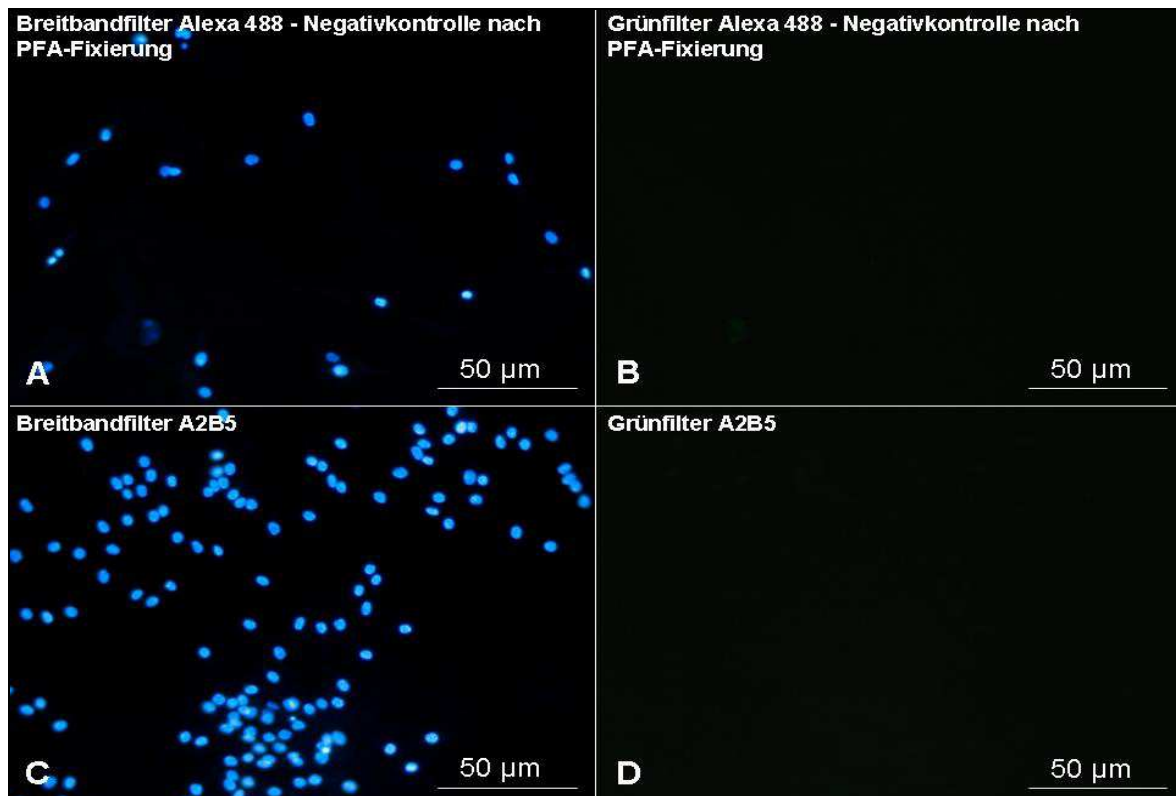


Abbildung 5: IF-Färbungen an den neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) weisen deutlich negative Oberflächenfärbungen für A2B5 nach. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um eine Oberflächenfärbung anzuzeigen.

3.3 Unterschiedliche psychotrope Effekte

Nachdem nun erfolgreiche selektive Kulturbedingungen (siehe 3.1) für neuronale Progenitoren aus den „oberen“ mittleren Nasenmuscheln mit interindividuell identischer Expression der Neuralmarker (siehe 3.2) eingestellt werden konnten, interessierte sich diese Pilotstudie für psychotrope Effekte. Diese können durch Clozapin und Haloperidol mit jeweiliger LPS-Stimulierung an Zellen, die den CD14 Oberflächen-Rezeptor aufweisen, hervorgerufen werden. Leider erwiesen sich die Zeitbedingungen als limitierender Faktor dieser Dissertation. Aufgrund der erheblichen Methodenvorarbeiten war es uns nicht möglich, die Ergebnisse zu replizieren. Dennoch ist durch das Testen von zwei Konzentrationen für Clozapin bzw. Haloperidol mit LPS-Stimulation zu jeweils zwei Zeitpunkten eine Kinetik darstellbar. LPS und Antipsychotika entfalten ihre Wirkungen über Rezeptoren, auf die alle in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen ansprechen und die sich in

Zellproliferation und Apoptose niederschlagen. In diesem Zusammenhang sollte ein Vergleich der hirnnahen neuronalen nasalen Progenitoren mit den ZNS generierten Zelllinien CHME3 und BV2 erfolgen. Wir entschieden uns für die neuronalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1, weil diese ebenfalls unter LPS-Stimulation eine homogene neurale Markerexpression aufwiesen. Die von uns gewählten Konzentrationsbereiche der Zelllinien CHME3 und BV2 beruhten auf unabhängigen Vorarbeiten im Hause der ZIP gGmbH Kiel. Diese wurden als günstigste Konditionen für diese Zelllinien erachtet. Die identische Anwendung dieser Konzentrationen war für die neuronalen nasalen Progenitoren nicht möglich, denn die Zellschädigung, verursacht durch die Kombination aus Antipsychotikum und LPS, war so groß, so dass keine Anfärbung und Zellzählung nach Ablauf der Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden mehr möglich waren. Wir entschieden uns auf Grund dessen dafür, die LPS-Konzentration an den neuronalen Progenitoren um eine Dekade von 0,2 auf 0,02 µg/ml zu senken, um zumindest identische Antipsychotika-Konzentrationen beibehalten zu können. Die neuronalen Progenitorzellen und die Zelllinien CHME3 und BV2 wurden mit jeweils zwei Konzentrationen Clozapin, 0,1 und 1 µg/ml, und Haloperidol, 0,2 und 0,02 µg/ml, für 24 und 48 Stunden mit LPS-Stimulierung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten untersuchten wir die drei Zellarten auf deren Apoptoserate mittels aktivierter Kaspase 3. Zur Beurteilung der Zellzyklusaktivität setzten wir die Marker Ki-S2, MCM6 und Ki-Mit ein. Bei Verwendung des Ultravision LPValue-Nachweissystems und einer Hämalaun-Kerngegenfärbung unterscheidet man die positiven Zellen für Ki-S2, Ki-Mit, MCM6 oder aktivierte Kaspase 3 durch eine rote Kernfärbung von negativen Zellen mit blauer Kernfärbung. Für die murine Zelllinie BV2 konnten Ki-S2 und Ki-Mit nicht ermittelt werden, da diese Antikörper aus der Maus stammen. Nach der Färbung erfolgten Zellzählungen (siehe Anhang ab Seite 96) von Verum- und Kontrollpräparaten, die im Verhältnis zueinander dargestellt sind. Die Methodik ist auf der Seite 27 bis 29 beschrieben. Da insbesondere bei Experimenten mit nativen Zellen die Streuung sehr hoch ist, wird nachfolgend konsequenterweise nur innerhalb eines Versuchsansatzes mit internen Kontrollen argumentiert.

3.3.1 Ki-S2

Für den Marker Ki-S2, der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus' detektiert, lassen sich an den neuronalen nasalen Progenitoren und der Zelllinie CHME3 unterschiedliche Effekte, verursacht durch Clozapin und Haloperidol, feststellen, die nicht miteinander vergleichbar sind. Für die nachfolgenden Ausführungen sei auf die Abbildung 6 verwiesen.

An den neuronalen Progenitoren aus Nasenmuscheln induzierte Clozapin für beide getesteten Konzentrationen eine Zellzyklushemmung. So bewirkten 0,1 µg/ml eine 40%ige und 1 µg/ml eine 80%ige Verringerung der Ki-S2 Expression nach 24 h unter das Kontrollniveau. Im Zeitfenster von 24 weiteren Stunden konnte zwar eine Erholung der Ki-S2 Expression beobachtet werden, die aber das Kontrollniveau nicht mehr zu überschreiten vermag. Für Haloperidol zeigte sich an den neuronalen nasalen Progenitoren nach 24 h für beide Konzentrationen eine leichte Stimulierung der Zellzyklusaktivität, die dann aber in 24 weiteren Stunden bis zur Hemmung mit 10-30% unter das Kontrollniveau fiel. Tendenziell kann gesagt werden, dass 0,2 µg/ml im Gegensatz zu 0,02 µg/ml Haloperidol mit zunehmender Zeit auch leicht hemmend auf den Zellzyklus wirkten.

An der ZNS-Zelllinie CHME3 stellten sich mit Clozapin widersprüchliche Effekte ein. So wirkten 0,1 µg/ml im Zeitfenster von 24 h Zellzyklus hemmend, während 1 µg/ml Clozapin eine 220%ige Steigerung, ausgehend vom Kontrollniveau, hervorrief. Für Haloperidol konnten an der Zelllinie CHME3 die stärksten Schwankungen dieser Arbeit nachgewiesen werden. 0,02 µg/ml Haloperidol führten zu einer sehr geringen Ki-S2 Detektion für beide Zeitpunkte. Im Gegensatz dazu führten 0,2 µg/ml zu einer 1300%igen Überexpression von Ki-S2, die sich dann aber ebenfalls in 24 weiteren Stunden auf 80% unter das Kontrollniveau verringerte.

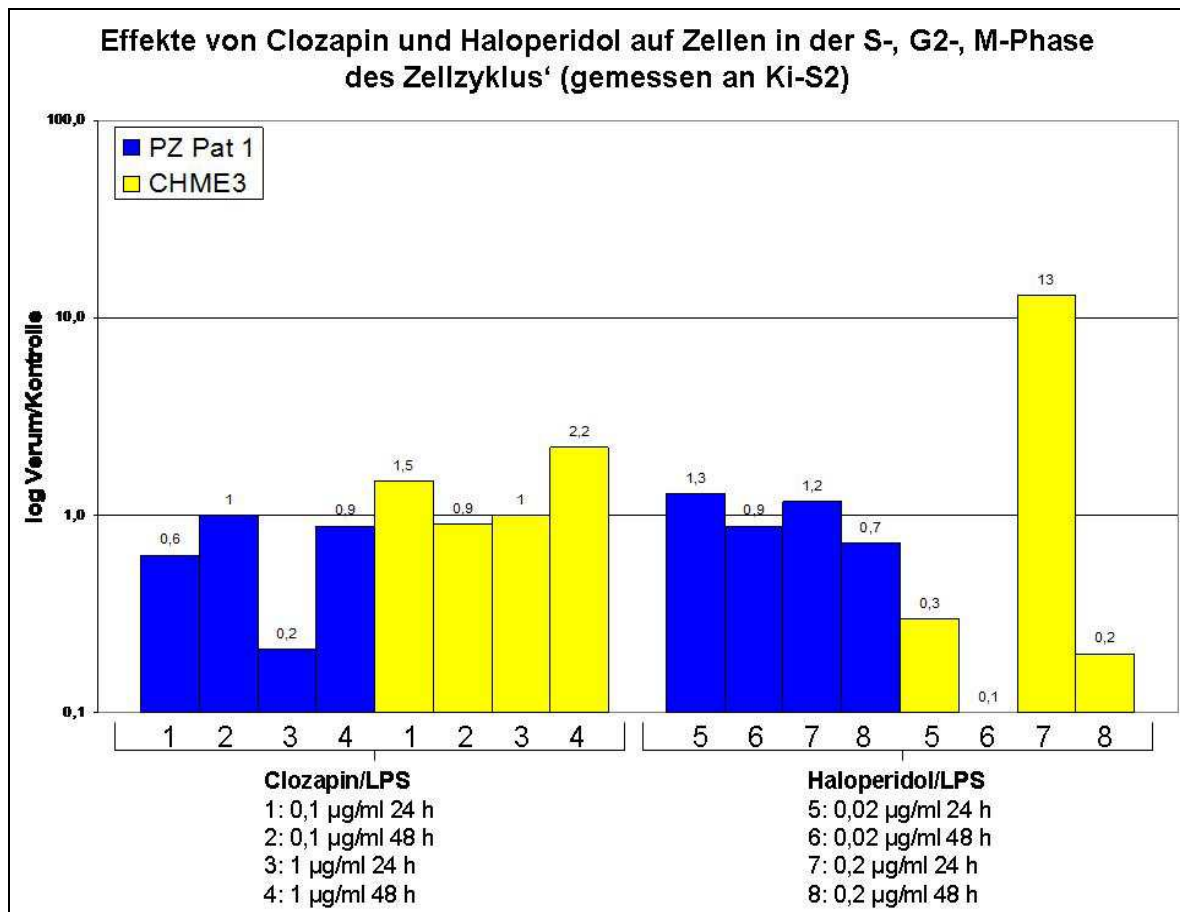


Abbildung 6: Dargestellt sind die Effekte von Clozapin und Haloperidol nach zwei Konzentrationen und Zeitpunkten auf neuronale Progenitoren, gewonnen aus den „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, PZ Pat 1, und die ZNS generierte humane Zelllinie CHME3. Ki-S2 ist ein Marker zur Erkennung der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus'. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Skalierung als Verhältnis von Verum zu Kontrolle. Resultierend aus den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ergeben sich für Werte = 1 eine unveränderte, für Werte < 1 eine Verringerung und für Werte > 1 eine Erhöhung der Anzahl von Zellen in der S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus'.

3.3.2 Ki-Mit

Für den Marker Ki-Mit, der Zellen in der Mitosephase detektiert, lassen sich ebenfalls an den neuronalen nasalen Progenitorzellen und der Zelllinie CHME3 unterschiedliche Effekte, verursacht durch Clozapin und Haloperidol, feststellen, die nicht miteinander vergleichbar sind. In diesem Zusammenhang sei auf die Abbildung 7 verwiesen.

Bei Betrachtung der Effekte von Clozapin für beide Konzentrationen und Zeitpunkte an den neuronalen Progenitorzellen aus Nasenmuscheln fällt eine relativ homogene Markerexpression mit 40 bis 60% unter dem Kontrollniveau von Ki-Mit auf, die weitere Schlüsse zwar nicht zulässt, aber eine grundsätzliche Hemmung von Mitosen nahe legt. Bei Haloperidol ist diesbezüglich tendenziell eine stimulierende Wirkung mit Zunahme von Mitosen um 40 bis 60% bei steigender Konzentration und zunehmender Zeiteinheit an den neuronalen Progenitoren, gewonnen aus Nasenmuscheln, zu beobachten.

An CHME3 wiesen wir nach, dass 0,1 µg/ml Clozapin zunächst eine Erhöhung der Mitosen einleitet, die aber innerhalb von 24 weiteren Stunden um 70% unter das Kontrollniveau kippt. 1 µg/ml Clozapin hemmten für beide Zeitpunkte nahezu vollständig die Mitose an der CHME3 Zelllinie. Für 0,02 µg/ml Haloperidol konnten wir eine starke Stimulierung mit 450% über Kontrollniveau nach 48 h an CHME3 feststellen. Für 0,2 µg/ml Haloperidol stellt sich ein anderes Bild dar, denn ausgehend von einer großen Zahl mitotischer Zellen, 700% über Kontrollniveau, verringert sich innerhalb der folgenden 24 h die Expression von Ki-Mit um 80% unter das Kontrollniveau.

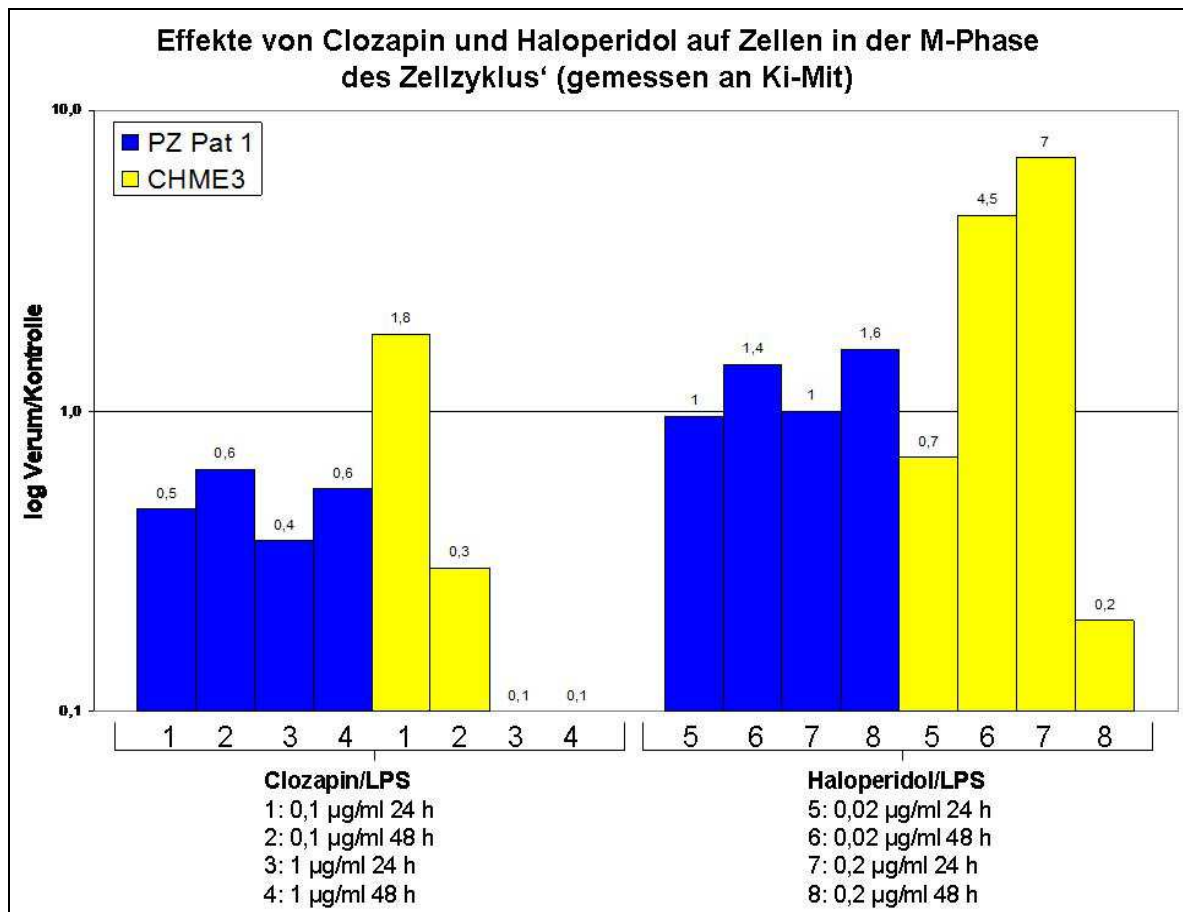


Abbildung 7: Dargestellt sind die Effekte von Clozapin und Haloperidol nach zwei Konzentrationen und Zeitpunkten auf neuronale Progenitoren, gewonnen aus den „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, PZ Pat 1, und die ZNS generierte humane Zelllinie CHME3. Ki-Mit ist ein Marker zur Erkennung von Zellen in der Mitosephase. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Skalierung als Verhältnis von Verum zu Kontrolle. Resultierend aus den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ergeben sich für Werte = 1 eine unveränderte, für Werte < 1 eine Verringerung und für Werte > 1 eine Erhöhung der Anzahl von Zellen in der Mitosephase des Zellzyklus'.

3.3.3 MCM6

Auch für die Detektion von MCM6, der alle Phasen des Zellzyklus' nachweist, konnten wir keine Analogien in den neuronalen Progenitoren, gewonnen aus Nasenmuscheln, und den ZNS generierten Zelllinien bei Inkubation mit Clozapin oder Haloperidol feststellen. Auch die Zelllinien CHME3 und BV2 unterscheiden sich in der MCM6 Expression deutlich. Lediglich die Höhe der Ausprägung der Effekte ist in den neuronalen Progenitoren und der murinen Zelllinie BV2 vergleichbar. Für die nachfolgenden Ausführungen sei auf die Abbildung 8 verwiesen.

Für 0,1 µg/ml Clozapin konstatierten wir an den neuronalen Progenitoren, gewonnen aus Nasenmuscheln, dass, ausgehend vom Kontrollniveau, eine 40%ige Steigerung der Zellanzahl in Phasen des Zellzyklus' erfolgte. 1 µg/ml Clozapin induziert, ausgehend von 30%iger Hemmung im Verhältnis zum Kontrollniveau, innerhalb von 24 h eine 50%ige Steigerung der Zellzahl, die MCM6 als Protein aufweist. Für Haloperidol sind über die Konzentrationen und Zeitpunkte sehr ausgeglichene MCM6 Expressionen an den neuronalen nasalen Progenitoren zu beobachten. Dennoch ist tendenziell erkennbar, dass die höhere Haloperidol-Konzentration die Gesamtzahl von Zellen im Zellzyklus mit zunehmender Zeiteinheit geringfügig verringert.

Für CHME3 haben wir ermittelt, dass 0,1 und 1 µg/ml Clozapin nach den ersten 24 h eine konzentrationsabhängige Erhöhung der MCM6 Expression bewirken, die zwar nach 24 weiteren Stunden wieder sinkt, aber im Gegensatz zu BV2 und den neuronalen Progenitoren aus Nasenmuscheln immer noch als stark stimuliert einzuschätzen ist. Für Haloperidol hingegen bemerkten wir widersprüchliche Effekte an CHME3. So verdrängten bereits 0,02 µg/ml Haloperidol nach 24 h fast alle Zellen aus dem Zyklus. Dieser Zustand regeneriert sich zwar wieder, bleibt aber im Zeitfenster von 24 h trotzdem 20% unter dem Kontrollniveau und ist damit offensichtlich stark gehemmt. 0,2 µg/ml führten zu einer steten Überexpression von MCM6 in einer Größenordnung von 450-470%.

An BV2 beobachteten wir unterschiedliche psychotrope Effekte, die durch Clozapin und Haloperidol induziert wurden: Während 0,1 µg/ml Clozapin mit zunehmender Zeit hemmend wirkte, führte 1 µg/ml zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl im Zyklus. Bei Inkubation mit 0,02 und 0,2 µg/ml Haloperidol ist in

dem getesteten Zeitfenster tendenziell eine zunehmende Hemmung der MCM6 Expression festzustellen, die bei der höheren Konzentration aber aus einem leicht stimulierten Zustand heraus erfolgte.

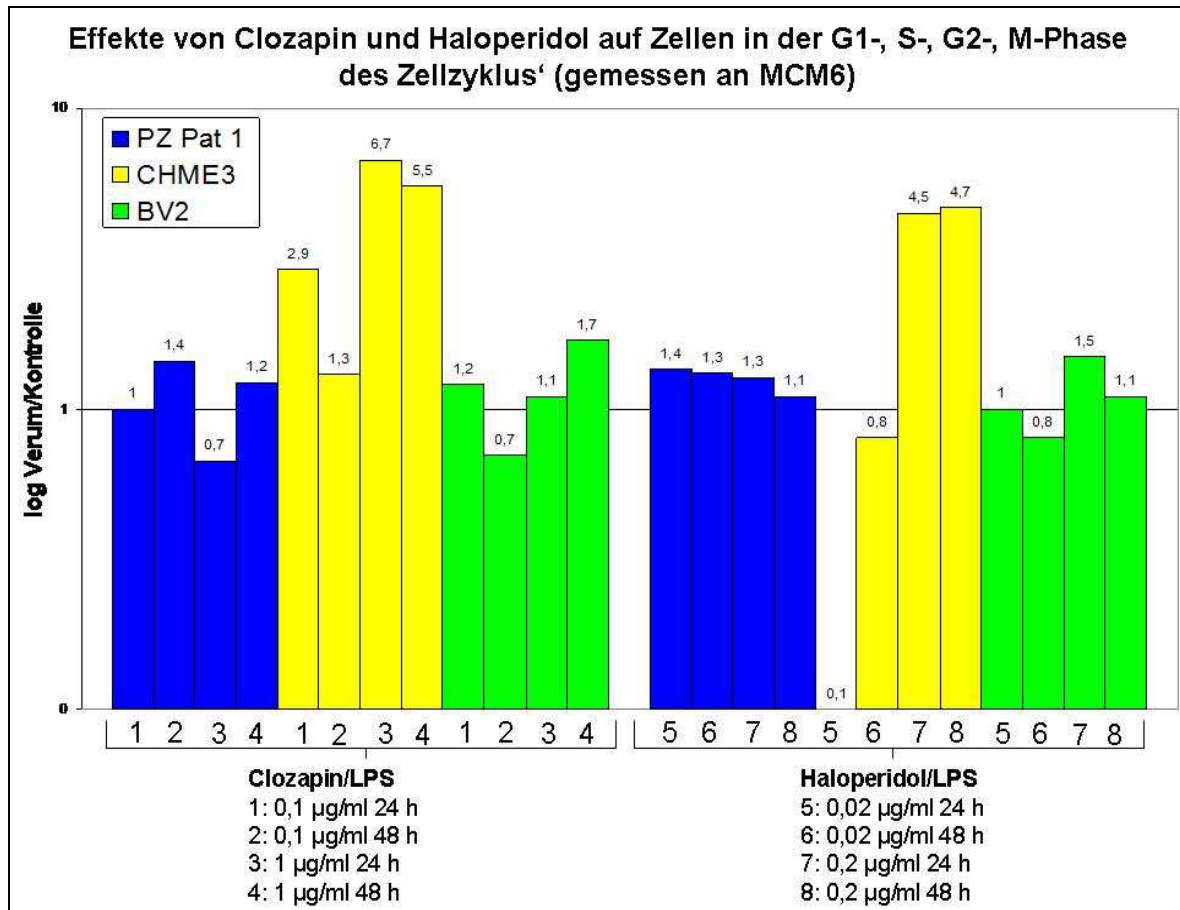


Abbildung 8: Dargestellt sind die Effekte von Clozapin und Haloperidol nach zwei Konzentrationen und Zeitpunkten auf neuronale Progenitoren, gewonnen aus „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, PZ Pat 1, und die ZNS generierte humane Zelllinie CHME3 bzw. die murine Zelllinie BV2. MCM6 erkennt G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus'. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Skalierung als Verhältnis von Verum zu Kontrolle. Resultierend aus den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ergeben sich für Werte = 1 eine unveränderte, für Werte < 1 eine Verringerung und für Werte > 1 eine Erhöhung der Anzahl der Zellen in der G1-, S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus'.

3.3.4 Aktivierte Kaspase 3

Bei der durch Haloperidol beeinflussten Untersuchung der Apoptose wiesen lediglich die murine Zelllinie BV2 und die neuronalen Progenitoren aus Nasenmuscheln Ähnlichkeiten auf, was für Clozapin nicht der Fall ist. Die Zelllinie CHME3 unterscheidet sich deutlich von den neuronalen nasalen Progenitoren und der Zelllinie BV2. Für die folgenden Ausführungen sei auf die Abbildung 9 verwiesen.

An den neuronalen Progenitoren der Nasenmuscheln kann Clozapin mit zunehmender Zeit und Konzentration eine deutliche antiapoptotische Wirkung entfalten. Dies trifft tendenziell auch für Haloperidol zu, nur sind die Expressionsunterschiede von aktivierter Kaspase 3 nicht so deutlich, wie das bei Clozapin der Fall ist.

An CHME3 konnte 0,1 µg/ml Clozapin auch zu einer Verringerung der Apoptose um 30% führen, aber 1 µg/ml verstärkte diese um 50 bis 120% über das Kontrollniveau. Haloperidol rief an CHME3 die höchsten Apoptoseraten dieser Untersuchungsreihe hervor. 0,02 µg/ml Haloperidol erhöhen die Apoptose im Zeitfenster von 24 Stunden auf 470%. 0,2 µg/ml weisen dagegen eine nahezu gleich bleibende Überexpression von aktivierter Kaspase 3 um 700 bis 800% über Kontrollniveau auf.

Die Apoptoseraten, die wir an BV2 dokumentieren konnten, sind sowohl für Clozapin als auch für Haloperidol unauffällig und lassen keine weiteren Schlüsse zu. Tendenziell scheint aber unter Einfluss von Clozapin eine gesamtheitlich leichte Unterdrückung der Apoptose zu erfolgen. Die Haloperidol induzierte Apoptose an BV2 ist in etwa vergleichbar mit den neuronalen Progenitoren aus Nasenmuscheln.

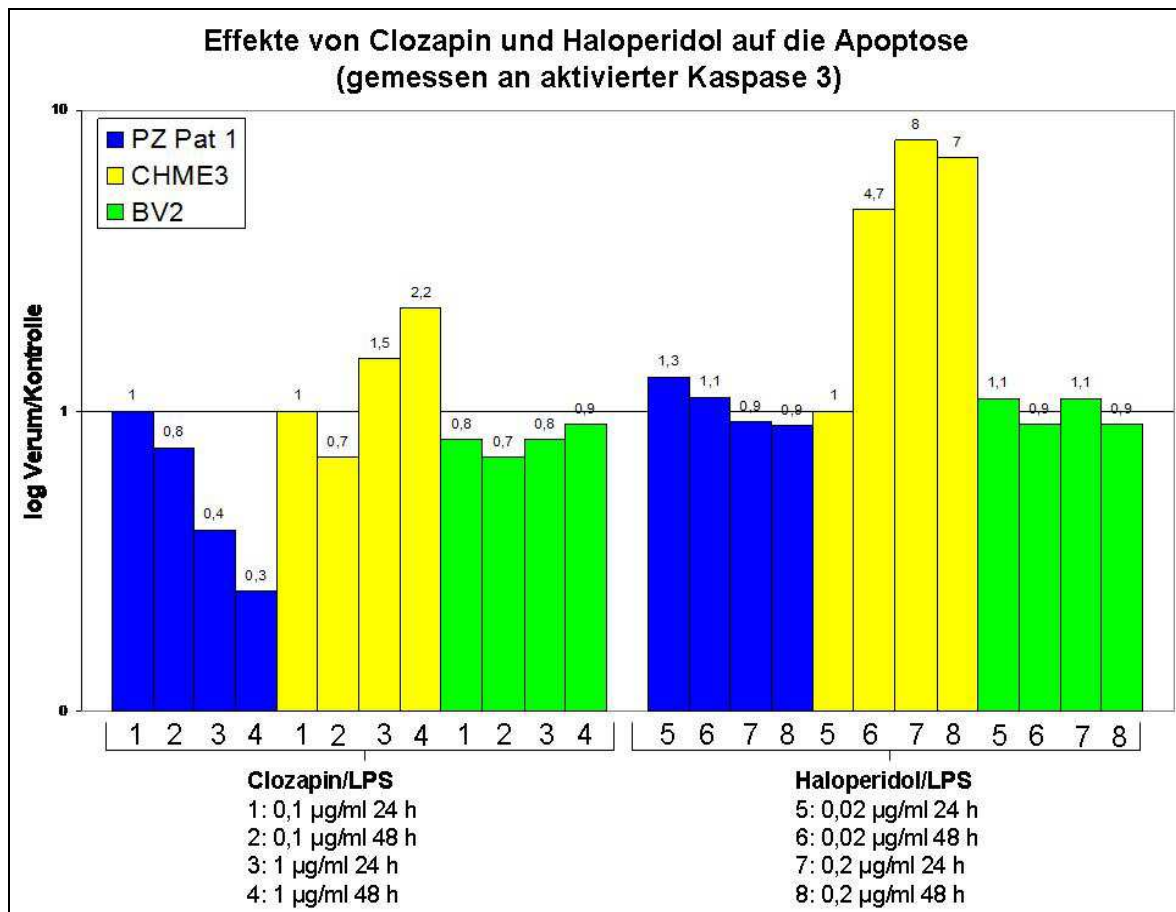


Abbildung 9: Dargestellt sind die Effekte von Clozapin und Haloperidol nach zwei Konzentrationen und Zeitpunkten auf neuronale Progenitoren, gewonnen aus „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, PZ Pat 1, und auf die ZNS generierte humane Zelllinie CHME3 bzw. die murine Zelllinie BV2. Aktivierte Kaspase 3 erkennt frühe Apoptose und wurde in logarithmischer Skalierung als Verhältnis von Verum zu Kontrolle abgebildet. Resultierend aus den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ergeben sich für Werte = 1 eine unveränderte, für Werte < 1 eine Verringerung und für Werte > 1 eine Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen.

4 Diskussion

Die für diese Pilotstudie verwendeten Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln wurden im Rahmen routinemäßig durchgeführter Ethmoidektomien zur Abwendung obstruktiver Nasenatmung gewonnen und gelten typischerweise als Operationsabfall. Dabei besteht die besondere Bedeutung der entnommenen Zellen aus Nasenmuscheln darin, sich an das ZNS über den Bulbus olfaktorius anzubinden. Nach wie vor ist die Untersuchung humaner Hirnzellen - insbesondere von lebenden Menschen - nur eingeschränkt möglich. Die humane Riechschleimhaut ist mit Millionen von olfaktorischen Rezeptorneuronen durchzogen, die nach einigen Monaten Lebensdauer absterben und durch Ausdifferenzierung von neuronalen Progenitor- und Stammzellen ersetzt werden (Beites, Kawachi et al. 2005). Diese olfaktorischen Rezeptorneurone sind direkt verknüpft mit dem zentralnervösen Bulbus olfaktorius. Mit zunehmendem Alter eines Menschen verändern sich die Grenzen, Dimensionen und die präzise Lokalisation der Riechschleimhaut, und eine Vermischung mit den Schleimhäuten der Nasenmuscheln erfolgt (Paik, Lehman et al. 1992). Die Häufigkeit dieser Verteilung nimmt von oberer zu mittlerer und unterer Nasenmuschel ab und ist stark individuell geprägt (Buck 2004; Witt and Wozniak 2006). Demnach würden die oberen Nasenmuscheln am häufigsten olfaktorische Zonen aufweisen, eine Entnahme mittels invasiver Chirurgie wäre aber sehr risikoreich und ethisch bedenklich. Ethisch vertretbar ist dagegen die Entnahme der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln mittels routinemäßiger Ethmoidektomie. Einen besonderen Stellenwert sollten dabei zukünftig Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln erlangen, wenn diese von Patienten mit psychiatrischer Erkrankung stammen. Der Vergleich von individuell gewonnenen Zellen der Nasenmuscheln mit und ohne psychiatrische Indikation könnte dabei wesentliche neue Erkenntnisse zur Therapie von Nervenkrankheiten erbringen. Olfaktorische Zonen sind bereits in den mittleren Nasenmuscheln und tiefer an den lateralen Wänden der Nase nachgewiesen worden (Perry, Mackay-Sim et al. 2002). Diese Pilotstudie stützt sich dabei insbesondere auf die Tatsache, dass mehrere frühere *in vitro*-Zellkulturuntersuchungen an humanen Resektaten der Nasenmuscheln Hinweise für die Existenz neuronaler Progenitorzellen in den Schleimhäuten der Nase erbringen konnten (Graziadei and Graziadei 1979;

Mackay-Sim and Kittel 1991; Caggiano, Kauer et al. 1994; Mumm, Shou et al. 1996; Feron, Perry et al. 1998; Carter, MacDonald et al. 2004; Zhang, Klueber et al. 2004; Witt and Wozniak 2006; Leung, Coulombe et al. 2007).

Diese Pilotstudie etablierte eine selektive *in vitro*-Zellkulturmethode zur reproduzierbaren Gewinnung neuronaler Progenitoren aus Resektaten der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln.

Da Zelllinien und insbesondere Primärzellen bei langwieriger Kultivierungsroutine trotz unveränderter Zellkulturbedingungen ihre individuellen nativen Eigenschaften stetig verlieren können, entschieden wir uns, die isolierten Zellen der Nasenmuscheln in möglichst frühen Passagen zu untersuchen. In diesem Sinne etablierte diese Pilotstudie sowohl Einfrier- als auch Auftauprozedere zur Konservierung der neuronalen nasalen Progenitoren mit ähnlicher Kulturdauer. Herkömmliche Einfrier- und Auftauprozedere, wie für die robusten standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 vorgesehen, ermöglichten allerdings keine Fortführung einer Primärzellkultur aus Nasenmuscheln. Erst die Etablierung der Auftau- und Einfrierprozedere in Anlehnung an Vorgehensweisen mit Progenitor- und Stammzellen erlaubten dies. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich auch bei den nasal gewonnenen Zellen um neuronal-selektierte Zellen handelt. Außerdem führten wir vor jeder Färbung dieser Pilotstudie eine einseitige neuronale Expansion nasaler Progenitoren von der nullten zur ersten Kulturpassage durch. Das bedeutet, wir setzten nasale Zellen ein, die zunächst am Ende der nullten Kulturpassage eingefroren und für die Färbungen bzw. Versuche in der ersten Passage wieder ausgesät und verwendet wurden.

Zur reproduzierbaren und effizienten Selektierung neuronaler Progenitoren aus Nasenmuschelproben waren das Kulturmedium und die Wachstumsfaktoren im Laufe der Kultivierung von größter Bedeutung. Dabei legten wir besonderen Wert darauf, eine Kulturmethode ohne Serum zu benutzen, da das Medium sonst zu viele variable Bestandteile enthält. Daher stellte sich der Einsatz der serumfreien Modifikation Neurobasal-A Medium mit B27-Supplement als besonders geeignet heraus. Dieses komplex zusammengesetzte Medium ist ideal zur Kultivierung neuronaler Zellen des ZNS (Brewer, Torricelli et al. 1993; Brewer 1997) und stellt eine klassische Methode dar, die die undifferenzierte

Selbsterneuerung zentralnervöser Progenitoren fördert und die selektive Isolierung und Vermehrung in heterogenem Gewebe ermöglicht (Wachs, Couillard-Despres et al. 2003). Nasenmuscheln enthalten beispielsweise auch Bindegewebs- und Nasenschleimhautepithelzellen, die aber bei Einstellung selektiver Bedingungen in eine neuronale Progenitorkultur „kontaminieren“ können (Walton, Sutter et al. 2006; Belzunegui, Izal-Azcarate et al. 2008; Xue, Qiao et al. 2008; Xue, Wei et al. 2009). Die von uns gewählten Medienbedingungen und Wachstumsfaktoren erlaubten also keine Vermehrung der Bindegewebs- oder Nasenschleimhautepithelzellen. Die spezifischen Bedürfnisse dieser Zelltypen wurden nicht berücksichtigt, was sie mit zunehmender Kulturdauer aussterben ließ.

Wir nahmen an, dass die neuronalen Progenitoren aus Nasenmuschelmateriale zumindest zu Beginn der Kultur den entsprechenden Zellen *in vivo* ähneln und die physiologischen Fähigkeiten *in vitro* nachahmen können. In diesem Zusammenhang fanden wir heraus, dass die aus Nasenmuscheln gewonnenen neuronalen Progenitoren nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit aufwiesen und die Kultivierung zudem nur über Tage bis Wochen möglich war. Des Weiteren bestand mit zunehmender Kultivierung die Gefahr der Zelldifferenzierung, was wir durch verschiedene Morphologien mikroskopisch beobachten konnten. Wir setzten die rekombinanten Wachstumsfaktoren EGF, FGF und LIF ein, um das Wachstum der neuronalen nasalen Progenitoren zu fördern und eine Differenzierung zu verhindern. Diese Wachstumsfaktoren sind in eine Vielzahl von Funktionen der Zelle involviert, insbesondere aber in die Signaltransduktion und adulte Neuro- und Gliogenese (Tureyen, Vemuganti et al. 2005). Für neurale Progenitor- und Stammzellen wurde bereits beschrieben, dass EGF die Regulierung der Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von adulten Zellen der subventrikulären Zone unterstützt (Herbst 2004; Grimm, Messemer et al. 2009; Lee, Hsu et al. 2009). Außerdem konnte an Mäusen gezeigt werden, dass die Identität neuraler Progenitorzellen in Anwesenheit von EGF erhalten bleibt (Hulspas, Tiarks et al. 1997; Winkler, Fricker et al. 1998). Auch FGF reguliert - ähnlich wie EGF - an zentralnervösen neuralen Progenitor- und Stammzellen während der embryonalen Entwicklung die Proliferation, die Migration und die Differenzierung der Zelle (Ornitz and Itoh 2001). Es ist beschrieben, dass hohe Konzentrationen von FGF

die fortschreitende Neurogenese von Zellen blockieren, was wir uns auch für die neuronalen Progenitoren aus Nasenmuschelmateriale erhofften (Nelson and Svendsen 2006). Der Einsatz von EGF in Kombination mit FGF konnte schon erfolgreich zur *in vitro*-Kultivierung an neuralen Progenitor- und Stammzellen des ZNS mit anschließender Generierung von Neurosphären etabliert werden (Reynolds and Weiss 1992). Dennoch entschieden wir uns dafür, die Kultivierung noch um den rekombinanten Wachstumsfaktor LIF, einen Lymphoid-Faktor, zu ergänzen, der die spontane Zelldifferenzierung unterbindet. Zudem ist bekannt, dass LIF die Pluripotenz zur Langzeitkultivierung von embryonalen Stammzellen fördert (Pitman, Emery et al. 2004; Emery, Merson et al. 2006; Oshima, Teo et al. 2007; Weible and Chan-Ling 2007).

Bevor sich jedoch feste Arbeitsabläufe für die Kultivierung von neuronalen Progenitoren aus Nasenmuscheln einstellen konnten, spielten weitere Einflussvariablen eine wichtige Rolle, insbesondere bei Entnahme-, Lagerungs- und Transportbedingungen, der enzymatischen Digestion und der Beschichtung der Zellkulturplastik. Jeder der zuvor genannten drei Schritte hätte bei Verzicht ein Scheitern der Zellkultur bedeutet, wie uns das auch häufig widerfahren ist. Die entnommenen Ethmoidgewebestückchen bedürfen einer sofortigen Zwischenlagerung in Umgebungsbedingungen, die den osmotischen und CO₂-Veränderungen entgegenwirken, die Zellen versorgen und ihre Abfallprodukte neutralisieren. Zunächst versuchten wir den Transport der Resektate in dem Wachstumsmedium, bestehend aus Neurobasal-A mit B27-Supplement, durchzuführen, was sich als nicht erfolgreich erwies: Es war keine Kultivierung von lebens- und vermehrungsfähigen neuronalen Progenitorzellen möglich. Wir schlossen daraus, dass Neurobasal-A zwar ein aufwendiges, mit vielen Komponenten und einem geringen Anteil Glucose ausgestattetes Kulturmedium ist, das sich aber nicht eignet, die Reduzierung von CO₂ abzufangen. Die Folge war ein basischer pH-Wert von bis zu 8,1 im Medium, der Neurone zum raschen Zelltod führt (Brewer and Price 1996). Abhilfe hätte an dieser Stelle eine CO₂ unabhängige Modifikation von Neurobasal-A geschaffen, das so genannte Hibernate-A, welches aber nicht erhältlich war (Brewer and Price 1996). Wir konnten hier zeigen, dass der Einsatz von Hibernate-A nicht zwingend erforderlich ist, denn wir fanden heraus, dass die sofortige Lagerung der Nasenschleimhautproben nach der Operation und der Transport in HBSS mit 5%

Glucose die spätere Isolierung von Kulturen aus den Resektaten reproduzierbar ermöglichen. HBSS ist bekannt dafür, dass es den pH-Wert stabilisiert, CO₂ unabhängig ist (Derelanko 2001) und es möglich macht, die Proben für wenige Stunden bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung zu lagern (Brewer and Price 1996; Derelanko 2001). Laut Hersteller besteht HBSS aus anorganischen Salzen, das mit weiterer Glucose angereichert wurde. Insofern denken wir, dass der wesentliche Vorteil die erhöhte Glucosekonzentration ist. Dies erscheint auch plausibel angesichts der hohen Radikalempfindlichkeit und Glucoseabhängigkeit neuronaler Zellen (Walker, Donovan et al. 1988; Goldberg and Choi 1993; Shostak, Wajsbrot et al. 2000; Plesnila, Zinkel et al. 2001; Ardizzone, Lu et al. 2002; Gromada, Bark et al. 2005; Serra-Perez, Verdaguer et al. 2008), so dass hier bereits vom ersten Zeitpunkt an die Berücksichtigung der spezifischen Bedingungen wichtig ist.

Ebenfalls war es von Bedeutung, für eine erfolgreiche Kultivierung die enzymatische Digestion der Nasenschleimhautproben mit Akkutase durchzuführen. Trypsin, häufig für die enzymatische Digestion angewandt, lieferte keine ausreichende Anzahl lebensfähiger Einzelzellen für die Kultivierung. Laut Hersteller ist Akkutase ein Gemisch von Enzymen mit proteolytischer-, kollagenolytischer- und DNase-Aktivität, welches aus einer Insektenzelllinie gewonnen wird. Über die genaue Zusammensetzung gibt es keine Auskunft, so dass Akkutase als undefiniertes Reagenz angesehen werden muss. Dennoch war Akkutase in unseren Händen vollständig definierten, rekombinanten Trypsin-Präparationen, z.B. TrpLE Select von Invitrogen, in der Zellisolierung weit überlegen. Andere Forschergruppen publizierten bereits ähnliche Befunde (Wachs, Couillard-Despres et al. 2003; Bajpai, Lesperance et al. 2008). Der Vorteil von Akkutase gegenüber Trypsin liegt für unseren Verwendungszweck in der zusätzlichen kollagenolytischen Aktivität, denn Nasenmuschelmateriale besteht auch aus Bindegewebe, dessen Hauptbestandteil Kollagen ist. Somit ist es von grundlegender Bedeutung, dass in der anatomisch komplex aufgebauten Nasenschleimhaut eine schonende Isolierung der neuronalen Zellen aus dem Kollagen erfolgt (Bajpai, Lesperance et al. 2008).

Weiterhin fanden wir heraus, dass nur die Beschichtung der Zellkulturplastik mit Poly-L-Lysin und anschließend Fibronectin die Adhäsion und Proliferation von neuronalen Progenitoren zu Beginn der Kultur einleiteten. Zellen, die sich nicht

anheften konnten, schienen nicht zu proliferieren und ließen sich auch nicht erfolgreich passagieren. Laut Hersteller fördert Poly-L-Lysin die elektrostatische Interaktion zwischen den negativ geladenen Ionen von Zellmembranen und den positiv geladenen Oberflächen-Ionen des Bodens der Kulturflasche. Bindet Poly-L-Lysin an den Boden der Kulturflasche, erhöht sich die Anzahl der positiven Ladungen, die für die Zellbindung erforderlich sind. Poly-L-Lysin ersetzt die sonst zur Anhaftung nötigen Serumproteine. Auf Grund dessen konnten wir uns entscheiden, die Kultivierungseffizienz zu erhöhen und ab Tag 2 der Kultivierung auf Serum zu verzichten, da es zu viele variable Bestandteile enthält. Poly-L-Lysin fördert das Anhaften verschiedenster Zelltypen, aber eben auch neuronaler Zelllinien, primärer Neurone und Gliazellen an Böden von Zellkulturflaschen (Brewer, Espinosa et al. 2001; Brewer, Espinosa et al. 2003; Walton, Sutter et al. 2006; Murrell, Wetzig et al. 2008). Fibronectin ist ein Glykoprotein, das im Blutplasma und in der extrazellulären Matrix vorkommt. Für die Optimierung der Kultivierung von Neuronen, Progenitor- und Epithelzellen *in vitro* wird das Vorhandensein Fibronectin-spezifischer Zelloberflächen-Moleküle, den Integrin-Rezeptoren, genutzt. Den Zellen dient Fibronectin als eine dünne Substratschicht auf der Kultivierungsfläche zur Adhäsionsausbildung. Außerdem unterstützt es die Ausbreitung und das Wachstum von Zellen (Guller, Allen et al. 1992; Yoneda, Sasaki et al. 1997; Shaw, McClatchey et al. 1998; Lavoie, Champagne et al. 2000; Brewer, Espinosa et al. 2003; Schwartz, Bryant et al. 2003). Poly-L-Lysin oder Fibronectin alleine erwiesen sich als nicht ausreichende Proteinbeschichtung zur Anhaftung von neuronalen nasalen Progenitoren an den Zellkulturflaschenboden.

Diese Pilotstudie identifizierte die selektiv isolierten neuronalen Progenitorzellen aus den „oberen“ mittleren Nasenmuscheln und stellte eine interindividuelle Vergleichbarkeit für 3 Individuen in Bezug auf 7 Neuralmarker fest. Die nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren erwiesen sich als positiv für die Proteine Nestin, GFAP, Musashi und Beta-III-Tubulin, die Proteine A2B5, NeuN und Map2 konnten wir nicht nachweisen.

In den Ausführungen zuvor haben wir beschrieben, dass die Etablierung einer Routine-Zellkultur für die neuronalen nasalen Progenitoren mit einem enormen Zeit- und Arbeitskraftaufwand verbunden ist. In diesem Zusammenhang können

die von uns eingerichteten Einfrier- und Auftauprozedere verwendet werden, um neuronale nasale Progenitoren, die nach ca. 5 - 7 Wochen ausreichende Zellmengen in der nullten Kulturpassage erreichen, zu konservieren. Der Zellkulturaufwand für die folgenden Hauptuntersuchungen verringert sich dadurch, und es sind immer Zellen zur Reproduktion von Ergebnissen in eingefrorenem Zustand vorhanden. Des Weiteren führten wir damit eine einseitige neuronale Expansion durch. Für alle Zellfärbungen verwendeten wir neuronale Progenitoren aus Nasenmuscheln, die in der nullten Passage vermehrt und schonend eingefroren wurden. Die erneut ausgesäte erste Kulturpassage stand dann den Hauptuntersuchungen zur Verfügung. Die selektive Zellkultur zur Produktion und Erhaltung von neuronalen Progenitoren aus den „oberen“ mittleren Nasenmuscheln vermittelte uns unter dem Mikroskop einen sehr homogenen morphologischen Eindruck. Zur Untersuchung dieses Eindrucks auf Proteinebene etablierten wir Immunfluoreszenzfärbungen für 7 Neuralmarker. Diese Pilotstudie wies drei unabhängig bearbeiteten Zellproben „oberer“ mittlerer Nasenmuscheln zu Beginn der ersten Kulturpassage ein identisches Expressionsmuster nach, das positiv für die Proteine Nestin, GFAP, Beta-III-Tubulin und Musashi war, während MAP2, NeuN und A2B5 nicht vorgefunden wurden. Daraus folgerten wir, dass unsere Kulturmethode an psychiatrisch gesundem Probandenmaterial über die Zeit stabil war und zudem homogene Zellpopulationen fördert. Da wir nur visuelle Beobachtungen unter dem Mikroskop wiedergeben können, ist eine konkrete Angabe zur tatsächlichen Prozentzahl positiver Zellen nicht möglich. Wir nehmen aber an, dass es über 95% der Zellen betrifft. An dieser Stelle müssten zukünftig Methoden greifen, die im Hinblick auf prozentuale Angaben genaueren Aufschluss geben könnten, wie das beim „Fluorescence Activated Cell Sorting“ der Fall ist. Typischerweise ist nämlich die hundertprozentige Durchsetzung einer Zellkultur mit einem Protein sehr unwahrscheinlich.

Vielfach sind in der Vergangenheit Zellproben aus mittleren und oberen Nasenmuscheln und auch olfaktorisches Neuroepithel Verstorbener in der *in vitro*-Zellkultur untersucht worden. Diese Studien mehrten die Erkenntnisse über die mögliche zelluläre Komposition unter verschiedensten *in vitro*-Kulturbedingungen. Eine Untersuchung bezieht sich auf *in vitro*-Experimente mit olfaktorischer Schleimhaut Verstorbener und beschreibt dabei heterogene Zellpopulationen, die

aus Neuronen, Glia- und Epithelzellen bestehen. Im Gegensatz zu unserem Ansatz mit Neurobasal-A ohne Serum und Wachstumsfaktoren erfolgte die Kultivierung aber auch in DMEM/F12-Medium mit 10% Serum. Zudem wurde der Transport des entnommenen Gewebes nur in HBSS ohne den Zusatz von Glucose durchgeführt. Darüber hinaus wurde - abweichend zu unserer Methodik - Trypsin anstelle von Akkutase zur enzymatischen Digestion eingesetzt (Roisen, Klueber et al. 2001). Ergänzend sei angemerkt, dass bei der Verwendung von Flüssigmedien wie DMEM und MEM mit Serum häufig eine Differenzierung von isolierten Zellen in der Kultur vorangetrieben wird, was einen Vergleich dieser Studien erschwert. Schon der Einsatz von Serum stellt eine variable Konstante dar, die starken Einfluss auf die Genese von Zellpopulationen haben kann (Murrell, Bushell et al. 1996; Zhang, Klueber et al. 2004; Hahn, Han et al. 2005; Zhang, Cai et al. 2005). Erst die neueren Erkenntnisse der Stammzellforschung erlaubten die Umsetzung mit den etablierten Zellkulturbedingungen in dieser Pilotstudie. Dabei bietet die Produktion homogener gegenüber heterogenen Zellpopulationen den Vorteil, dass keine weitere selektive Aufreinigung nötig ist.

Die Einschätzung, dass es sich in dieser Pilotstudie bei den selektierten Zellen „oberer“ mittlerer Nasenmuscheln um neuronale Progenitoren handelt, gründet nun auf die von uns nachgewiesene homogene Markerexpression, was im Folgenden erläutert werden soll: Besonderen Stellenwert zur Deutung wiesen wir dabei den Markern Nestin und GFAP zu. Nestin kommt transient während der pränatalen Entwicklung von Zellen im ZNS vor. Es wurde bereits gezeigt, dass embryonale Stammzellen der Maus, adulte Progenitoren der subventrikulären Zone im Gehirn und multipotente Stammzellen aus adultem olfaktorischen Neuroepithel Nestin enthalten (Doyle, Khan et al. 2001). Häufig gilt Nestin in der Literatur als sicherer neuraler Marker für Progenitor- und Stammzellen (Tohyama, Lee et al. 1992; Quinones-Hinojosa, Sanai et al. 2006; Gilg, Tye et al. 2008; Johansson, Price et al. 2008; Smith, Vallier et al. 2008). GFAP wurde zunächst als spezifischer Marker für Astrozyten und Astroglia des ZNS angesehen (Fuchs and Weber 1994). Außerdem konnte GFAP bereits in unreifen Gliazellen sowie Glioma-Zelllinien, aber nicht in reifen Astrozyten nachgewiesen werden (Reeves, Helman et al. 1989). Besonders interessant erschien uns aber die jüngst publizierte starke Expression von GFAP in neuralen Stammzellen des adulten ZNS (Chen, Muckersie et al. 2008; Jiang, Yurke et al. 2008; Paintlia, Paintlia et al.

2008). Konträr zu unseren Ergebnissen stehen Veröffentlichungen an Zelllinien, generiert aus olfaktorischem Neuroepithel Verstorbenen, die eine Nestin-positive und GFAP-negative Identität aufzeigen. Diese Gruppen verwendeten aber abweichende Kulturmedienbedingungen wie MEM mit 10% Serum und DMEM/F12 ohne Serum, aber mit B27-Supplement (Zhang, Klueber et al. 2004; Zhang, Cai et al. 2005). Ebenfalls an Zelllinien olfaktorischer Herkunft ist die Nestin-negative und GFAP-positive Identität von Zellen bekannt. Auch hier unterschied sich das Medium mit DMEM/F12 von unseren gewählten Bedingungen. Zwar wurden auch EGF und FGF zusammen und LIF einzeln zugesetzt, aber nicht in Kombination der drei genannten Wachstumsfaktoren (Pagano, Impagnatiello et al. 2000). Durch Untersuchungen an olfaktorischem Neuroepithel Verstorbenen konnte ebenfalls die Identität Nestin-negativer und GFAP-positiver Zellen ermittelt werden. Diese Kultivierung erfolgte abweichend zu unseren Bedingungen aber in DMEM/F12-Medium ohne Serum und weitere Zusätze (Roisen, Klueber et al. 2001). Wir vermuten für diese abweichenden Ergebnisse eine differenziertere Zelle, die in Abhängigkeit zu den Kultivierungsbedingungen und fortschreitender Glio- und Neurogenese stand. Interessanterweise wird bei weiterer Differenzierung die Menge an Nestin in der Zelle herunterreguliert und durch Gewebe-spezifische Neurofilamente wie z.B. GFAP ersetzt (Michalczyk and Ziman 2005). Die Tatsache, dass die nasalen Zellen sowohl Nestin als auch GFAP exprimieren, deutet an, dass wir auf der Basis der zuvor genannten Argumente neuronale Progenitoren kultivierten, die möglicherweise am Anfang ihrer Neuro- und Gliogenese stehen. Der positive Befund für Nestin und GFAP in Kombination wurde ebenfalls durch Kultivierung in DMEM/F12-Medium mit 10% Serum unterscheidend zu unserer Methodik eruiert. Diese Ergebnisse gründen auf Untersuchungen an Zellen, isoliert aus mittleren und oberen Nasenmuscheln, sowie Zelllinien, die aus olfaktorischem Neuroepithel Verstorbenen gewonnen wurden (Murrell, Feron et al. 2005; Othman, Lu et al. 2005).

Die Proteinmarker Beta-III-Tubulin und Musashi sollten für uns eine weitere Identitätsbestimmung der neuronalen Progenitoren aus Nasenmuschelmaterial erlauben. Dabei erhärteten sich die Hinweise zu Gunsten einer neuronalen Progenitorzelle, denn wir wiesen die Proteine Beta-III-Tubulin und Musashi positiv nach. Beta-III-Tubulin ist bekannt für ein reichhaltiges Vorkommen im ZNS.

Darüber hinaus ist Beta-III-Tubulin ein wichtiger Marker zur Bestimmung von Zellen neuronalen Ursprungs und wird insbesondere während der fötalen und postnatalen Entwicklung exprimiert. Außerdem ist Beta-III-Tubulin transient in der subventrikulären Zone des Gehirns vorhanden (Burgoyne, Cambray-Deakin et al. 1988). Aber gerade die jüngsten Befunde zeigen ebenfalls auf, dass Beta-III-Tubulin außerdem neuronale- und/oder gliale Progenitorzellen markieren kann (Head, Patel et al. 2008; Johansson, Price et al. 2008; Koh, Kim et al. 2008; Theodorou, Dalembert et al. 2009). In der Literatur findet man viele Publikationen, in denen auf das Vorhandensein von Beta-III-Tubulin im Septum der Nase, in mittleren Nasenmuscheln und in post-mortem gewonnenem olfaktorischen Gewebe verwiesen wurde (Mumm, Shou et al. 1996; Roisen, Klueber et al. 2001; Hahn, Han et al. 2005; Marshall, Guo et al. 2005; Murrell, Feron et al. 2005; Winstead, Marshall et al. 2005). Es gibt demgegenüber auch abweichende Ergebnisse. Diese Arbeitsgruppen bedienten sich im Gegensatz zu uns anderer Medienkompositionen mit DMEM und DMEM/F12 mit jeweils 10% Serum. Außerdem wurden diese Untersuchungen nicht nur an mittleren Nasenmuscheln, sondern auch an post-mortem Gewebe und daraus gewonnenen Zelllinien durchgeführt (Roisen, Klueber et al. 2001; Hahn, Han et al. 2005). Musashi spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Erhaltung des Stammzellstadiums, der Differenzierung und der Tumorgenese. Darüber hinaus wird Musashi selektiv in neuralen Progenitor- und Stammzellen exprimiert (Nakamura, Okano et al. 1994; Sakakibara, Imai et al. 1996; Kurihara, Nagata et al. 1997; Good, Yoda et al. 1998; Cuadrado, Garcia-Fernandez et al. 2002; Battelli, Nikopoulos et al. 2006; Strojnik, Rosland et al. 2007; Bussolati, Bruno et al. 2008). Auf der Basis unserer fachliterarischen Nachforschungen sind wir die Ersten, die das Protein Musashi in der Kultur mit Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln nachweisen konnten. Basierend auf der Tatsache, dass wir bereits Nestin- und GFAP-positive Zellen nachgewiesen haben, denken wir, dass unser Nachweis von zusätzlich Beta-III-Tubulin und Musashi den Verdacht erhärtet, dass wir neuronale Progenitorzellen kultivierten.

Die Proteine Map2 und NeuN sollten eine mögliche neuronale und A2B5 eine mögliche astrozytäre Differenzierung bzw. Identität der von uns untersuchten neuronalen nasalen Progenitorzellen überprüfen. Keiner der drei Marker konnte von uns detektiert werden. Das bestätigte unsere Annahme, dass wir neuronale

Progenitoren kultivierten, die positiv für die Proteine Nestin, GFAP, Beta-III-Tubulin und Musashi waren. Map2 wird ausschließlich in Nervenzellen gefunden und dient der Stabilisierung und dem Aufbau von Mikrotubuli, was einen bedeutenden Schritt in der Neurogenese darstellt (Lim and Halpain 2000). Map2 zeigt insbesondere eine bereits vollzogene neuronale Entwicklung und damit eine differenzierte Zellpopulation an (Sanchez, Diaz-Nido et al. 2000; Teng, Takei et al. 2001; Cristofanilli, Thanos et al. 2004; Bhat, Maddodi et al. 2006; Fifre, Spone et al. 2006; Liu, Chen et al. 2008; Gonzalez, Lopez-Costa et al. 2009). Im Gegensatz zu unseren negativen Befunden an drei Individuen gibt es Publikationen, die Map2-positive Zellen in post-mortem gewonnenem olfaktorischen Neuroepithel und daraus produzierten Zelllinien ausfindig gemacht haben (Murrell, Bushell et al. 1996; Roisen, Klueber et al. 2001; Othman, Lu et al. 2005). Es sind aber auch Map2-negative Ergebnisse an Resektaten mittlerer Nasenmuscheln bekannt (Zhang, Klueber et al. 2004). Diese Arbeitsgruppen etablierten im Gegensatz zu uns andere Kulturmedienbedingungen, basierend auf DMEM mit Monomed als Supplement und dem Wachstumsfaktor FGF, DMEM/F12 mit 10% Serum, MEM mit 10% Serum und DMEM/F12 ohne Serum, aber mit B27-Supplement (Murrell, Bushell et al. 1996; Roisen, Klueber et al. 2001; Zhang, Klueber et al. 2004; Othman, Lu et al. 2005). NeuN ist ein exzellenter Marker zur spezifischen Identifizierung von Neuronen in Primärzellkulturen. In der Maus ist NeuN in fast allen neuronalen Zelltypen vorhanden. NeuN kommt sowohl im peripheren als auch zentralen Nervensystem vor. Es wird vor allen Dingen exprimiert, wenn die zelluläre und morphologische Differenzierung einsetzt. Im Kontrast dazu ist NeuN in proliferierenden Geweben nicht nachweisbar (Sarnat, Nochlin et al. 1998; Unal-Cevik, Kilinc et al. 2004; Andres, Andre et al. 2005; Lind, Franken et al. 2005; Shuangshoti, Mujananon et al. 2005; Van Nassauw, Wu et al. 2005; Collombet, Masqueliez et al. 2006; Mensah-Brown and Garey 2006). Insgesamt betrachtet wurde NeuN an humanen Nasenschleimhaut-Resektaten nicht häufig untersucht, dennoch gibt es eine Forschergruppe, die ebenfalls NeuN-negative Zellen nachwies. Diese Gruppe verwendete ein anderes Medium, DMEM/F12 ohne Serum, aber auch das B27-Supplement, das wir ebenfalls benutzten. Der Nachweis erfolgte an post-mortem gewonnenem olfaktorischen Neuroepithel und den daraus erzeugten Zelllinien (Zhang, Cai et al. 2005). A2B5 ist ein Zelloberflächenmarker, dessen Epitop vor allen Dingen auf Astro- und

Oligodendrozyten gefunden wurde. A2B5 kommt oft zum Einsatz, wenn das Ziel der Untersuchung darin besteht, Zellen zu identifizieren, die sich in der Gliogenese befinden und eine oligodendrozytäre Differenzierung beginnen (Bottenstein, Hunter et al. 1988; Dubois-Dalcq and Armstrong 1990; Scolding, Rayner et al. 1999; Dietrich, Noble et al. 2002; Xia, Du et al. 2003; BaracsKay, Kidd et al. 2007; Ogden, Waziri et al. 2008; Tchoghandjian, Baeza et al. 2009). Im Kontrast zu unseren negativen Befunden stehen Ergebnisse von Forschergruppen, die A2B5-positive Zellen in mittleren Nasenmuscheln und olfaktorischem Neuroepithel Verstorbener nachgewiesen haben. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen erfolgte die Kultivierung zum einen in DMEM/F12-Medium mit 5% Serum und zum anderen in MEM mit 10% Serum (Zhang, Klueber et al. 2004; Winstead, Marshall et al. 2005).

Abschließend vermuten wir, dass publizierte positive Nachweise der Proteine Map2, NeuN und A2B5 in humanen Resektaten der Nasenschleimhaut damit einhergehen, dass die Kultivierung einer neuronal und astrozytär differenzierteren Zelle erfolgte. Wir gehen also davon aus, dass die selektierten neuronalen Progenitoren der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln in dieser Pilotstudie noch vermehrungsfähig sind, um sich entweder neuronal oder glial zu differenzieren.

Diese Pilotstudie führte ein erstes psychiatrisch relevantes *in vitro*-Zellkultur-Experiment mit den nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren und den standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 durch. Die Auslösung einer artifiziellen LPS-Entzündungsreaktion in diesen Zellsystemen erfolgte zur Simulation einer Hirnerkrankung, die eine Therapie mit einem Antipsychotikum, in unserem Fall Clozapin und Haloperidol, rechtfertigen könnte. Im direkten Vergleich mit den ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 stellten wir aber fest, dass die neuronalen nasalen Progenitoren eine höhere Empfindlichkeit auf LPS zeigten, so dass die Konzentration für unsere Versuche im Gegensatz zu den beiden Zelliniensystemen um eine Dekade gesenkt werden musste.

LPS ist als Bestandteil gram-negativer Bakterien befähigt, die Blut-Hirn Schranke zu passieren, um an den Membranrezeptor CD14 zu binden. Diese Bindung regt die zelluläre Zytokinproduktion in einer Zelle an, welche wiederum Fieber verursachen kann (Rivest, Lacroix et al. 2000). CD14 Rezeptoren sind allgemein in Mikroglia-Zellen und in den standardisierten mikroglialen ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 vorhanden (Lacroix, Feinstein et al. 1998). Ebenfalls sind CD14 Rezeptoren in Zellen der Nasenschleimhäute (Jahnsen, Gran et al. 2004) und in Monozyten und Makrophagen der Säugetiere existent (Lacroix, Feinstein et al. 1998). Darin gründet auch der gemeinsame experimentelle Ansatz in Zusammenhang mit LPS. Zudem besitzt CD14 in endothelialen Zellen eine regulierende Funktion für das Zellüberleben. Das Herauslösen des CD14 Rezeptors durch Makrophagen führt zur Apoptose (Rivest, Lacroix et al. 2000). Die für diese Pilotstudie gewählten *in vitro*-Konzentrationsbereiche von Clozapin (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) und Haloperidol (0,02 µg/ml und 0,2 µg/ml) mit jeweils 0,2 µg/ml LPS für die ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 beruhten auf unabhängigen Vorarbeiten im Hause der ZIP gGmbH Kiel. Diese Konditionen stellten sich als besonders günstig heraus. Eine simultane Anwendung für die neuronalen nasalen Progenitoren war aber nicht möglich. Die verursachte Zellschädigung durch LPS war so groß, dass keine Anfärbung und Zellzählung auf Deckgläsern mehr erfolgen konnte. Zum Erhalt der bestmöglichen Vergleichbarkeit entschieden wir uns, die Konzentrationen von Clozapin und Haloperidol beizubehalten und lediglich die LPS-Konzentration an den neuronalen nasalen Progenitoren um eine

Dekade von 0,2 µg/ml auf 0,02 µg/ml abzusenken. Die höhere Empfindlichkeit von Primärzellen, induziert durch LPS als Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, ist bislang in der Literatur nicht belegt. Es gibt zwar viele Studien, die primär gewonnene Zellen LPS aussetzten, aber meist nicht gezielt den Vergleich mit einer Zelllinie anstrebten (Lieb, Engels et al. 2003; Hosoi, Suzuki et al. 2005; Basta-Kaim, Budziszewska et al. 2006; Hou, Wu et al. 2006; Mayo and Stein 2007). Für unsere Versuche müssen wir aber zur Kenntnis nehmen, dass die standardisierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 in puncto LPS-Konditionierung eine höhere Toleranz aufweisen, als das bei den sensibel einzuschätzenden nasalen Primärzellen der Fall ist.

Wir fanden heraus, dass die psychotropen Substanzen Clozapin und Haloperidol in den neuronalen nasalen Progenitoren und den etablierten standardisierten ZNS-Zelllinien unterschiedliche *in vitro*-Immunantworten im Hinblick auf Zellzyklus- und Apoptoseaktivität bewirken. Auch die ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 unterscheiden sich deutlich voneinander.

Frühere *in vitro*-Zellkulturuntersuchungen hatten die Aufgabe, psychotrope Wirkungen von Clozapin und Haloperidol im Hinblick auf Neurotoxizität, insbesondere induzierte Apoptose, zu erforschen. Nur selten ist in diesem Zusammenhang die Zellzyklusaktivität untersucht worden (Hinze-Selch, Becker et al. 1998; Hinze-Selch and Pollmacher 2001; Koch, Kell et al. 2002; Koch, Kell et al. 2003). Zwangsläufig ist auch die Zellzyklusaktivität bei induzierter Apoptose in Zelllinien oder Primärzellen betroffen. Für das Testen der Zellzyklusaktivität verwendeten wir die Proteinmarker Ki-S2, Ki-Mit und MCM6. Dabei markiert Ki-S2 Zellen in der S-, G2 und M-Phase (Rudolph, Alm et al. 1999), Ki-Mit Zellen in der M-Phase, (Pollmann, Parwaresch et al. 2006) und MCM6 Zellen in allen Phasen des Zellzyklus' (Heidebrecht, Buck et al. 2001). Gerade zur Überprüfung der Apoptoserate wird häufig aktivierte Kaspase 3 verwendet. Diese Kaspase spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen und der Erkennung früher Apoptose (Dai and Krantz 1999).

In dieser Pilotstudie war es aufgrund des Zeitrahmens und der erheblichen Methodenvorarbeiten leider nicht möglich, die Ergebnisse der neuronalen nasalen Progenitoren und ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 zu replizieren. Somit können wir

nicht mit mehreren Individuen argumentieren, sondern nur mit $n = 1$. Dadurch aber, dass zwei Konzentrationen von Clozapin, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$, und Haloperidol, 0,02 $\mu\text{g/ml}$ und 0,2 $\mu\text{g/ml}$, zu zwei Zeitpunkten, nämlich nach 24 h und 48 h, untersucht wurden, deckten wir eine Kinetik auf, die Hinweise für zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet geben könnte. Darüber hinaus ist für die Interpretation unserer Experimente zu beachten, dass nicht Einzelansätze aus verschiedenen Versuchsreihen miteinander quantitativ verglichen werden dürfen, da die Streuung bei Zelllinien- und insbesondere bei Primärzellexperimenten sehr hoch sein kann. Deswegen wurde konsequenterweise nur innerhalb kompletter Ansätze mit internen Kontrollen argumentiert. Somit sind Verrechnungen von Kontroll- und Verum-Präparaten verschiedener Konzentrationsansätze nicht gerechtfertigt, und die Ergebnisse sind nicht beliebig. Aufgrund der genannten vorangegangenen Argumente sind unsere Ergebnisse aber auch als vorläufig zu betrachten. Unsere Nachweismethodik beruhte auf immunhistochemischen Färbungen, die Zellzählungen und damit ein Verhältnis von Verum- zu Kontrollpräparaten erlaubten. Die von uns angewandte Zellfärbung weist ihren einzigen methodischen Unterschied in der Inkubation des spezifischen Primärantikörpers auf. Ab dem Sekundärantikörper, der sowohl Maus- als auch Menschantigene erkennt, ist die Methode im Ablauf identisch und damit gut einsetzbar.

Ausgehend vom klinischen Alltag der medikamentösen Behandlung von Patienten stand oftmals der psychotrope Effekt bezüglich Clozapin und Haloperidol im Fokus der Diskussion (Szuster-Ciesielska, Slotwinska et al. 2004; Hou, Wu et al. 2006; Sugino, Futamura et al. 2009). Bereits für das atypische Antipsychotikum Clozapin sind vielfältige Wirkungen nachgewiesen worden (Hinze-Selch, Becker et al. 1998; Hinze-Selch and Pollmacher 2001), die sich allerdings von den Effekten unterscheiden, die das typische und weit verbreitete Antipsychotikum Haloperidol auslöste. Auch für diese Pilotstudie müssen wir unterschiedliche relative Wirkungen von Clozapin und Haloperidol in den drei von uns getesteten Zellsystemen konstatieren. Für *in vitro*-Zellkulturexperimente mit Haloperidol ist bekannt, dass es an primären hippocampalen Neuronen, C6-Glioma und NCB20-Zellen zu erhöhter Zytotoxizität kommt (Behl, Rupprecht et al. 1995). Dies können wir in dieser Pilotstudie für die humane ZNS-Zelllinie CHME3 auch erkennen, die insbesondere bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Haloperidol zu drastischen

Apoptoseraten neigte. Die neuronalen nasalen Progenitoren und die murine Zelllinie BV2 zeigten keine Erhöhung der durch Haloperidol induzierten Apoptose. Ähnlich wie Haloperidol wird aber auch Clozapin in der *in vitro*-Zellkultur an PC12-, SH-SY5Y- und U937-Zellen als toxisch beschrieben (Dwyer, Lu et al. 2003; Heiser, Enning et al. 2007). Im Kontrast dazu zeigen unsere Versuche mit Clozapin an den neuronalen nasalen Progenitoren sogar Tendenzen, antiapoptotisch zu wirken. An CHME3 konnten wir zumindest für 1 µg/ml Clozapin eine erhöhte und zunehmende Apoptose feststellen. Für die Zelllinie BV2 waren die Apoptoseraten für Clozapin unauffällig bis leicht erniedrigt. In der Literatur wird Clozapin eine geringere Zelltoxizität im Vergleich mit Haloperidol eingeräumt (Dwyer, Lu et al. 2003). Für die Zelllinie CHME3 können wir dies bestätigen. Das ist auch im Einklang mit Ergebnissen zu betrachten, die in humanen und murinen Striatumproben nach Behandlung mit Haloperidol eine signifikante Zunahme von Apoptose induzierendem Faktor feststellten, während dies bei der Behandlung mit Clozapin nicht der Fall war (Skoblenick, Castellano et al. 2006). Dennoch sind diese Ergebnisse nicht unwidersprochen (Jarskog, Gilmore et al. 2007). An peripheren neutrophilen Blutzellen wurde auch für Clozapin eine Apoptose-Induktion bei einem behandelten Patienten mit Schizophrenie festgestellt (Fehsel, Loeffler et al. 2005). An PC12-Zellen rief Clozapin über MPP keine Apoptose hervor. Haloperidol hingegen löste Apoptose aus (Qing, Xu et al. 2003). Natürlich haben typische und atypische Antipsychotika andere zellbiologische Effekte zur Folge, da sie an unterschiedliche Dopamin-Rezeptoren binden. Somit kommt es in verschiedenen Zellmodellen konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Auswirkungen, auch und insbesondere bezüglich Nekrose und Apoptose (Behl, Rupprecht et al. 1995; Gardner, Zahid et al. 1998; Galili, Mosberg et al. 2000).

Der psychotrope Effekt von Clozapin und Haloperidol mit induzierter Apoptose mittels *in vitro*-Zellkulturexperimenten ist vielfach beschrieben, aber weitestgehend unerklärt blieb in diesem Zusammenhang die Zyklusaktivität. Wir können nun erste Erkenntnisse in diesem Zusammenhang darbieten: Für alle drei von uns getesteten Zellsysteme stellen wir eine Synthesesteigerung, induziert durch Clozapin und Haloperidol, fest, deren Ausmaß sich aber deutlich voneinander unterscheidet. Die neuronalen nasalen Progenitoren zeigen ähnlich wie die murine ZNS-Zelllinie BV2 eine geringfügige Steigerung der Syntheseleistung, induziert durch Clozapin und Haloperidol, während die humane

ZNS-Zelllinie CHME3 sehr starke Veränderungen der Expressionsraten von MCM6 und Ki-S2 aufwies. Im Kontrast dazu stehen Untersuchungen, die keinen Effekt von Clozapin und Haloperidol auf die Zellproliferation nachweisen konnten. Allerdings wurde im Gegensatz zu unserer *in vitro*-Zellkultur Untersuchung keine LPS-Stimulierung angewandt. Dafür wurden aber klinisch-relevante Konzentrationen der Antipsychotika eingesetzt, deren Effekt mittels Gesamtzellzahlbestimmung nach BrdU-Injektion im Dentate Gyrus von Ratten erfolgte (Schmitt, Weber et al. 2004). Eine weitere Studie konnte ebenfalls keinen Effekt mittels BrdU-Injektion im adulten Hippocampus von Ratten, ausgelöst durch Clozapin oder Haloperidol, ermitteln (Halim, Weickert et al. 2004). Ansatzweise ist eine nicht vorhandene Wirkung von Haloperidol mit einer Konzentration von 0,02 µg/ml an der Zelllinie BV2 erkennbar. Auch die unveränderte, aber gehemmte Mitoseleistung der neuronalen nasalen Progenitoren bei Inkubation mit 0,1 µg/ml Clozapin würde dafür sprechen. In sich kontrovers kristallisieren sich Befunde für Clozapin heraus, die an schizophrenen Patienten ermittelt wurden. Hier wurden unterschiedliche *in vivo*- und *in vitro*-Effekte für Clozapin festgestellt. Während die *in vivo*-Behandlung mit Clozapin die Proliferation unterdrückte, zeigten die *in vitro*-Experimente eine verstärkte Proliferation an humanen peripheren Monozyten des Blutes. Diese Untersuchungen wurden ohne Stimulation durch LPS, aber ebenfalls mit 0,1 und 1 µg/ml Clozapin durchgeführt. Anhand eines getesteten Thymidin-Proliferationsassays zeigten die *in vitro*-Ergebnisse eine durch Clozapin induzierte Proliferation (Hinze-Selch, Becker et al. 1998). Für die Syntheseleistung unserer drei Zellsysteme bei Inkubation mit Clozapin können wir das bestätigen. Kontrovers stellen sich aber die Effekte an der Zelllinie CHME3 dar, die starke bis nahezu vollständige Limitierungen in der Mitoseaktivität aufwies. Dies ist im Einklang mit einer Studie, die ebenfalls den inhibitorischen *in vitro*-Effekt von LPS in Zusammenhang mit Clozapin und Haloperidol mittels Thymidin-Proliferationsassay testete. Hier wurde die LPS induzierte Proliferation durch Clozapin und Haloperidol an Monozyten der Maus inhibiert (Basta-Kaim, Budziszewska et al. 2006). An den neuronalen nasalen Progenitoren können wir dies weder für Clozapin noch Haloperidol in Bezug zur Mitoseleistung erkennen. Auch CHME3 zeigte unter dem Einfluss von LPS und Haloperidol eine stark erhöhte Mitoseleistung. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit oligodendrozytären Progenitorzellkulturen postnataler Ratten, um den direkten

Einfluss von Haloperidol zu untersuchen. Das Ergebnis belegte, dass Haloperidol die Proliferation förderte. Erst die chronische Verabreichung von Haloperidol führte zum umgekehrten Effekt (Niu, Mei et al. 2010). Nun verabreichten wir keine chronischen Konzentrationen von Haloperidol, aber wir können für kleinere Konzentrationen bestätigen, dass die Synthese- und Mitoseleistung in den neuronalen nasalen Progenitoren und der ZNS-Zelllinie CHME3 gesteigert ist. Auch die ZNS-Zelllinie BV2 zeigt unter Einfluss von Haloperidol leicht gesteigerte Synthesefähigkeit.

Besonders auffällig sind die zum Teil sehr drastischen Expressionsraten, die wir an der ZNS-Zelllinie CHME3 unter Einfluss von Haloperidol beobachteten: Da sind zum einen die sehr geringen Expressionsraten von Ki-S2 bei Einsatz von 0,02 µg/ml, während bereits 0,2 µg/ml Haloperidol zu einer sehr starken Überexpression führt, die nach 24 weiteren Stunden wieder stark unter das Kontrollniveau kippt. Zum anderen ist das sehr geringe Expressionsaufkommen von MCM6 bei 0,02 µg/ml Haloperidol auffällig. Für diesen Widerspruch sind wahrscheinlich konzentrationsunabhängige Ereignisse verantwortlich, die in der Literatur weder untersucht noch belegt sind. Dass aber starke Auswirkungen auf Apoptose- und Zellzyklusaktivität entstehen können, ist in dieser Arbeit belegt. Wie insgesamt auf dem Gebiet der Forschung um die zelluläre Wirkung von Antipsychotika zeigt sich auch in unserem speziellen Fall, dass es bei so vielfältigen Untersuchungsansätzen praktisch keine wirklich vergleichbaren Studien gibt. Unsere Ergebnisse belegen außerdem, dass selbst bei gleichartigen Mikroglia-Zelllinien, wie BV2 aus der Maus bzw. CHME3 aus dem Menschen, unterschiedliche Wirkungsweisen eines Antipsychotikums auftreten. Tatsächlich sind somit wahrscheinlich nur Bezüge im Vergleich innerhalb eines Versuchssystems als Frage der relativen Wirkungen von Clozapin und Haloperidol wirklich aussagekräftig. In unserem Versuchsansatz konnten wir deutlich machen, dass Clozapin und Haloperidol vielfältig in den zellulären Stoffwechsel eingreifen, wenn sie die Zellen unterschiedlich in Synthese-, Mitose- und Ruhephase bewegen und in diesem Zusammenhang auch unterschiedlich Apoptose aktivieren. Deutlich zu unterscheiden ist das Ausmaß der Wirkung von Clozapin und Haloperidol auf die ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 und die neuronalen nasalen Progenitoren. Am ähnlichsten sind sich die neuronalen Progenitoren, gewonnen aus Resektaten der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, und die murine

ZNS-Zelllinie BV2 in der Ausprägung der Effekte, gemessen an der Expression von MCM6 und aktivierter Kaspase 3. CHME3 zeigte in dieser Pilotstudie die drastischsten Reaktionen im Hinblick auf die Zellzyklusaktivität und die induzierte Apoptose.

Ausblick

Die Möglichkeiten zur Erforschung von Hirnzellen, die aus dem lebenden Menschen isoliert werden können, sind heutzutage immer noch stark limitiert. Ebenso verhält es sich natürlich bei Hirnzellen, die in Verbindung mit psychiatrischen Erkrankungen stehen. Schon seit über einem Jahrzehnt werden deshalb die oberen und mittleren Nasenmuscheln als Quelle von Progenitor- und Stammzellen avisiert. Im Hinblick auf die oberen Nasenmuscheln, die mittels invasiver Chirurgie entnommen werden müssten, sind ethische Bedenken berechtigt. Die Entnahme der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln mittels Ethmoidektomie ist im Vergleich dazu als ethisch unbedenklich einzustufen.

Diese Pilotstudie etablierte mit humanen Resektaten der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln eine selektive *in vitro*-Kulturmethode, die reproduzierbar neuronale Progenitorzellen in der ersten Passage an gesunden Individuen hervorbringt. Natürlich müsste sich unsere etablierte Kulturmethode zukünftig an weiteren gesunden Individuen beweisen. In dieser Hinsicht sind auch Patienten mit psychiatrischer Indikation von besonderer Bedeutung. Auf dem Gebiet der Zellkultur bleibt noch zu überprüfen, ob die isolierten neuronalen nasalen Progenitoren über die Plastizität verfügen, sich in neuronale, gliale oder oligodendrozytäre Zelltypen zu differenzieren. Da die Stammzellforschung stetiger Entwicklung unterliegt, wären auch andere Kulturbedingungen oder Wachstumsfaktoren interessant, die eine selektive neurale Kultivierung ermöglichen.

Unsere Schlussfolgerung, dass es sich bei den nasal gewonnenen Zellen um neuronale Progenitoren handelt, beruhte auf dem Nachweis eines Neuralmarkersets. Durch Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten wir für drei interindividuelle neuronale Progenitor-Zellkulturen positive Ergebnisse für die Proteine Nestin, GFAP, Beta-III-Tubulin und Musashi, während Map2, NeuN und A2B5 nicht nachgewiesen werden konnten. Da mikroskopische Betrachtungen

keine exakte Angabe zur tatsächlich positiven Zellzahl geben können, wäre hier eine FACS-Analyse als Folgeuntersuchung sinnvoll. Das sogenannte „Fluorescence Activated Cell Sorting“ erlaubt prozentuale Angaben zur Proteinhäufigkeit in Zellpopulationen. Selbstverständlich setzt auch hier die Stammzellforschung Akzente, denn Marker zur eindeutigen Benennung von Zellentitäten bedürfen unter Berücksichtigung aktueller und innovativer Studien einer kontinuierlichen Überprüfung. Das Hinterfragen von altbewährten Markern bleibt natürlich auch relevant. Ein Protein, welches überwiegend für die Charakterisierung neuraler Stammzellen nachgewiesen wird, ist Sox2. Dieses konnte jüngst im adulten humanen Kleinhirn gefunden werden (Alcock, Lowe et al. 2009). Ebenso wären Hochdurchsatzverfahren, wie z.B. RNA- oder DNA-Arrays, hilfreich, entnommenes Nasenmuschelmateriale von Gesunden mit dem von psychisch Kranken in großen Datensätzen zu vergleichen und vor allen Dingen zu unterscheiden.

Da die für diese Pilotstudie verwendeten drei individuellen neuronalen nasalen Progenitor-Kulturen in Bezug auf die Zelldifferenzierung miteinander vergleichbar waren, konnten wir ein erstes psychiatrisch relevantes Experiment zum induzierten psychotropen Effekt von Clozapin bzw. Haloperidol mit simulierter LPS-Entzündung an den hirnnahen Progenitoren und den etablierten ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2 durchführen. Dabei können wir sagen, dass die neuronalen Progenitoren für diese Experimente eingesetzt werden können. Diese Zellen stellen aufgrund ihres hirnnahen nativen Ursprungs eine sinnvolle Ergänzung zu ZNS-Zelllinien dar. Wir stellten fest, dass die *in vitro*-Antwort bezüglich Zellzyklus- und Apoptoseaktivität an den neuronalen nasalen Progenitoren auf Clozapin und Haloperidol differentiell anders ist als bei den ZNS-Zelllinien CHME3 und BV2, die sich ebenfalls unterscheiden. Somit sind wahrscheinlich nur Bezüge im Vergleich innerhalb eines Versuchssystems aussagekräftig, um die Frage zur relativen Wirkung von Clozapin und Haloperidol zu klären. Dennoch sind Vergleiche in anderen Zellsystemen natürlich unabdingbar. Im Interesse des Anwenders sind hier sämtliche Zellen mit ZNS-Ursprung einsetzbar. Andere Konzentrationen der eingesetzten Antipsychotika Clozapin und Haloperidol sowie weitere medizinisch relevante Substanzen, die ebenfalls stark von dem Interesse des Forschungsanwenders abhängen, sind denkbar. Außerdem könnten Inkubationen ohne LPS sowie weitere

Konzentrationen von LPS getestet werden. Weitere Auswertungsmodalitäten, wie z.B. Untersuchungen zur Proteinproduktion, zu Neurotransmittersystemen und zur Zytokinproduktion in diesen und anderen Zellsystemen, könnten helfen, Erkenntnisse zur Therapie psychiatrischer Erkrankungen zu mehren.

Die jüngsten Ereignisse zeigen zudem, wie wichtig adulte Stammzellquellen sein können, die die Nutzung ethisch umstrittener embryonaler Stammzellen ersetzen können. Der Nobelpreis für Medizin wurde im Jahr 2012 zwei Forschern, dem Japaner Shinya Yamanaka und Briten John Gurdon, verliehen. John Gurdon zeigte bereits 1962, dass die meisten Zellen des menschlichen Körpers ihre Fähigkeit behalten, in einen funktionellen Zelltyp zu differenzieren (Gurdon 1962). Erst 2006 gelang es Yamanaka, vier Transkriptionsfaktoren, nämlich Oct-3/4, Sox2, c-Myc, und KLF4, ausfindig zu machen, die eine Bindegewebszelle in eine unreife Stammzelle zurückverwandeln können. Die modifizierten Bindegewebszellen werden dann als so genannte induzierte pluripotente Stammzellen bezeichnet (Takahashi and Yamanaka 2006; Yamanaka 2007). Der Einsatz solcher Zellen offenbart zwei große Arbeitsgebiete für die Medizin: Bei degenerativen Krankheiten - wie Parkinson, Diabetes oder Herzinfarkt - sterben Zellen im betroffenen Patienten ab. Da die Gewinnung induzierter pluripotenter Stammzellen aus körpereigenen Reservoirs erfolgen kann, ist eine Abstoßung, wie bei fremdartigen Zellen der Fall, nicht möglich. Die damit verbundenen Möglichkeiten zur Gentherapie und Züchtung von Ersatzgeweben sind natürlich vielfältig, aber - realistisch gesehen - weit in der Zukunft anzusiedeln. Außerdem lassen sich induzierte pluripotente Stammzellen zum Aufbau von Testsystemen, die unterschiedliche Organe repräsentieren, nutzen, um Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten an menschlichen Zellen zu untersuchen. Inwieweit die aus einer adulten Quelle gewonnenen neuronalen nasalen Progenitoren für Forschungsgebiete mit Stammzellen hilfreich sein können, bleibt zukünftig noch zu beweisen. Die Anbindung dieser Zellen an das ZNS und die zusätzliche Möglichkeit der Untersuchung einer psychiatrischen Erkrankung steigern aber die Wichtigkeit dieses Zelltyps enorm. Für die genannten Untersuchungsmöglichkeiten konnte diese Arbeit den Grundstein an Zellen der „oberen“ mittleren Nasenmuscheln legen.

5 Zusammenfassung

Die Pathologie psychiatrischer Erkrankungen weist ihren Ursprung im ZNS des Menschen auf, weswegen die *in vitro*-Zellkulturforschung an zentralnervösen Zellen von größter Bedeutung ist. Bereits im letzten Jahrhundert wurde die Riechschleimhaut im Nasendach als Quelle für Stammzellen, neuronale Progenitoren und Rezeptorneurone avisiert. Die Gewinnung dieses Zellmaterials ist am lebenden Menschen durch invasive Chirurgie möglich, aber problematisch und ethisch bedenklich. Unbedenklich hingegen ist die Gewinnung von Zellen aus „oberen“ mittleren Nasenmuscheln, die aus Ethmoidektomien, z.B. bei obstruktiver Nasenatmung, anfallen. Auch in diesem nasalen Segment sind Stammzellen, neuronale Progenitoren und Rezeptorneurone vorhanden.

Diese Pilotstudie etablierte eine reproduzierbare Methode zur Inkulturnahme und selektiven Anzucht von neuronalen Progenitorzellen aus Ethmoidektomien für den Einsatz in der *in vitro*-Zellkultur, die international bis dato noch nicht untersucht und standardisiert einsetzbar war. Da die interindividuelle Vergleichbarkeit dieses Zellmaterials von größter Bedeutung war, testeten wir sieben neurale Proteinmarker mittels Immunfluoreszenz. Dabei ermittelten wir für drei Individuen ein homogenes neurales Protein-Expressionsmuster, das positiv für Nestin, GFAP, Beta-III-Tubulin und Musashi war, während Map2, NeuN und A2B5 nicht existent waren. Dieses Expressionsmuster legte uns die Identität einer nasal gewonnenen neuronalen Progenitorzelle nahe. Ein erstes *in vitro*-Zellkulturexperiment mit Clozapin und Haloperidol bei induzierter artifizieller Entzündungsreaktion mittels LPS zeigte, dass die nasalen Progenitoren in solchen Experimenten eingesetzt werden können. Die Ergebnisse ergaben für die gewählten *in vitro*-Bedingungen im Vergleich mit den ZNS-Zelllinien BV2 und CHME3, dass Clozapin eher antiapoptotisch und synthesefördernd, während Haloperidol eher proapoptotisch und mitosefördernd wirkte. Dies war im Trend auch für die Zelllinien der Fall, wobei sich das Ausmaß deutlich unterschied: CHME3 zeigte bei weitem die größten Ausprägungen dieser Pilotstudie.

Diese Pilotstudie muss sich zukünftig durch weitere Individuen mit und ohne psychiatrische Indikation und Zellcharakterisierungen auf Protein- und RNA-Ebene beweisen. Dabei könnten diese Vergleiche Quelle neuen Wissens sein, die mögliche Therapieformen psychiatrischer Erkrankungen aufdeckt, verbessert oder neu entwickeln hilft.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AC3	aktivierte Kaspase 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	und andere (et alies)
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HBSS	Hank's Balances Salt Solution
inkl.	inklusive
l	Liter
LIF	Leucemia Inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharid
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
MCM6	Minichromosome Maintenance Deficient 6 Gene
MEM	Minimum Essentiell Medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mmol	Millimolar
NeuN	Neuronal Nuclei
PBS	Phopshat Buffered Saline
PVC	Polyvinylchlorid
PZ	Primärzellen
RNA	Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Alcock, J., J. Lowe, et al. (2009). "Expression of Sox1, Sox2 and Sox9 is maintained in adult human cerebellar cortex." Neurosci Lett **450**(2): 114-6.
- Andersson, P. B., V. H. Perry, et al. (1992). "The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues." Neuroscience **48**(1): 169-86.
- Andres, M., V. M. Andre, et al. (2005). "Human cortical dysplasia and epilepsy: an ontogenetic hypothesis based on volumetric MRI and NeuN neuronal density and size measurements." Cereb Cortex **15**(2): 194-210.
- Ardizzone, T. D., X. H. Lu, et al. (2002). "Calcium-independent inhibition of glucose transport in PC-12 and L6 cells by calcium channel antagonists." Am J Physiol Cell Physiol **283**(2): C579-86.
- Asan, E. (2004). Geruchssystem. München, Elsevier.
- Avellino, A. M., D. Hart, et al. (1995). "Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons." Exp Neurol **136**(2): 183-98.
- Bajpai, R., J. Lesperance, et al. (2008). "Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells." Mol Reprod Dev **75**(5): 818-27.
- Banati, R. B., D. Hoppe, et al. (1991). "A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia." J Neurosci Res **30**(4): 593-600.
- Banati, R. B., G. Rothe, et al. (1991). "Respiratory burst activity in brain macrophages: a flow cytometric study on cultured rat microglia." Neuropathol Appl Neurobiol **17**(3): 223-30.
- BaracsKay, K. L., G. J. Kidd, et al. (2007). "NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells." Glia **55**(10): 1001-10.
- Basta-Kaim, A., B. Budziszewska, et al. (2006). "Inhibitory effect of antipsychotic drugs on the Con A- and LPS-induced proliferative activity of mouse splenocytes: a possible mechanism of action." J Physiol Pharmacol **57**(2): 247-64.

- Battelli, C., G. N. Nikopoulos, et al. (2006). "The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1." Mol Cell Neurosci **31**(1): 85-96.
- Behl, C., R. Rupprecht, et al. (1995). Haloperidol-induced cell death--mechanism and protection with vitamin E in vitro. Neuroreport. **7**: 360-4.
- Beites, C. L., S. Kawauchi, et al. (2005). "Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium." Exp Cell Res **306**(2): 309-16.
- Belzunegui, S., A. Izal-Azcarate, et al. (2008). "Striatal carotid body graft promotes differentiation of neural progenitor cells into neurons in the olfactory bulb of adult hemiparkinsonian rats." Brain Res **1217**: 213-20.
- Benraiss, A., E. Chmielnicki, et al. (2001). "Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain." J Neurosci **21**(17): 6718-31.
- Bhat, K. M., N. Maddodi, et al. (2006). "Transcriptional regulation of human MAP2 gene in melanoma: role of neuronal bHLH factors and Notch1 signaling." Nucleic Acids Res **34**(13): 3819-32.
- Blasi, E., R. Barluzzi, et al. (1990). "Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus." J Neuroimmunol **27**(2-3): 229-37.
- Bolger, W. E., A. S. Keyes, et al. (1999). "Use of the superior meatus and superior turbinate in the endoscopic approach to the sphenoid sinus." Otolaryngol Head Neck Surg **120**(3): 308-13.
- Bottenstein, J. E., S. F. Hunter, et al. (1988). "CNS neuronal cell line-derived factors regulate gliogenesis in neonatal rat brain cultures." J Neurosci Res **20**(3): 291-303.
- Brewer, G. J. (1997). "Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons." J Neurosci Methods **71**(2): 143-55.
- Brewer, G. J., J. Espinosa, et al. (2001). "Culture and regeneration of human neurons after brain surgery." J Neurosci Methods **107**(1-2): 15-23.
- Brewer, G. J., J. A. Espinosa, et al. (2003). "Effect of Neuregen nutrient medium on survival of cortical neurons after aspiration lesion in rats." J Neurosurg **98**(6): 1291-8.
- Brewer, G. J. and P. J. Price (1996). "Viable cultured neurons in ambient carbon dioxide and hibernation storage for a month." Neuroreport **7**(9): 1509-12.

- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-76.
- Brillaud, E., A. Piotrowski, et al. (2007). "Effect of an acute 900MHz GSM exposure on glia in the rat brain: a time-dependent study." Toxicology **238**(1): 23-33.
- Buck, L. B. (2004). "Olfactory receptors and odor coding in mammals." Nutr Rev **62**(11 Pt 2): S184-8; discussion S224-41.
- Burgoyne, R. D., M. A. Cambray-Deakin, et al. (1988). "Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum." Embo J **7**(8): 2311-9.
- Bussolati, B., S. Bruno, et al. (2008). "Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas." Faseb J **22**(10): 3696-705.
- Caggiano, M., J. S. Kauer, et al. (1994). "Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus." Neuron **13**(2): 339-52.
- Calof, A. L. and D. M. Chikaraishi (1989). "Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro." Neuron **3**(1): 115-27.
- Carr, V. M. and A. I. Farbman (1992). "Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium." Exp Neurol **115**(1): 55-9.
- Carter, L. A., J. L. MacDonald, et al. (2004). "Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype." J Neurosci **24**(25): 5670-83.
- Chang, C. Y., H. F. Chien, et al. (2003). "Microglia in the olfactory bulb of rats during postnatal development and olfactory nerve injury with zinc sulfate: a lectin labeling and ultrastructural study." Neurosci Res **45**(3): 325-33.
- Chen, M., E. Muckersie, et al. (2008). "Characterization of a spontaneous mouse retinal pigment epithelial cell line B6-RPE07." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(8): 3699-706.
- Collombet, J. M., C. Masqueliez, et al. (2006). "Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus." Neurosci Lett **398**(3): 337-42.

- Cristofanilli, M., S. Thanos, et al. (2004). "Neuronal MAP2 mRNA: species-dependent differential dendritic targeting competence." J Mol Biol **341**(4): 927-34.
- Cuadrado, A., L. F. Garcia-Fernandez, et al. (2002). "Regulation of tau RNA maturation by thyroid hormone is mediated by the neural RNA-binding protein musashi-1." Mol Cell Neurosci **20**(2): 198-210.
- Dai, C. and S. B. Krantz (1999). "Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells." Blood **93**(10): 3309-16.
- Derelanko (2001). Handbook of Toxicology Informa Healthcare.
- Dietrich, J., M. Noble, et al. (2002). "Characterization of A2B5+ glial precursor cells from cryopreserved human fetal brain progenitor cells." Glia **40**(1): 65-77.
- Doyle, K. L., M. Khan, et al. (2001). "Expression of the intermediate filament protein nestin by sustentacular cells in mature olfactory neuroepithelium." J Comp Neurol **437**(2): 186-95.
- Dubois-Dalcq, M. and R. Armstrong (1990). "The cellular and molecular events of central nervous system remyelination." Bioessays **12**(12): 569-76.
- Dwyer, D. S., X. H. Lu, et al. (2003). "Cytotoxicity of conventional and atypical antipsychotic drugs in relation to glucose metabolism." Brain Res **971**(1): 31-9.
- Emery, B., T. D. Merson, et al. (2006). "SOCS3 negatively regulates LIF signaling in neural precursor cells." Mol Cell Neurosci **31**(4): 739-47.
- Erceg, S., S. Lainez, et al. (2008). "Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium conditions." PLoS ONE **3**(5): e2122.
- Farah, C. A., D. Liazoghli, et al. (2005). "Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons." J Biol Chem **280**(10): 9439-49.
- Fehsel, K., S. Loeffler, et al. (2005). "Clozapine induces oxidative stress and proapoptotic gene expression in neutrophils of schizophrenic patients." J Clin Psychopharmacol **25**(5): 419-26.

- Feron, F., C. Perry, et al. (1998). "New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(8): 861-6.
- Fifre, A., I. Sponne, et al. (2006). "Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3." J Biol Chem **281**(1): 229-40.
- Fioroni, P. (1992). Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere Springer-Lehrbuch.
- Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-82.
- Galili, R., Mosberg, et al. (2000). "Haloperidol-induced neurotoxicity--possible implications for tardive dyskinesia." J Neural Transm **107**(4): 479-90.
- Gardner, I., N. Zahid, et al. (1998). "A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes." Mol Pharmacol **53**(6): 991-8.
- Gilg, A. G., S. L. Tye, et al. (2008). "Targeting hyaluronan interactions in malignant gliomas and their drug-resistant multipotent progenitors." Clin Cancer Res **14**(6): 1804-13.
- Glass, R., M. Synowitz, et al. (2005). "Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival." J Neurosci **25**(10): 2637-46.
- Golaz, J. L., N. Vonlaufen, et al. (2007). "Establishment and characterization of a primary canine duodenal epithelial cell culture." In Vitro Cell Dev Biol Anim **43**(5-6): 176-85.
- Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1993). "Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury." J Neurosci **13**(8): 3510-24.
- Gonzalez, S. L., J. J. Lopez-Costa, et al. (2009). "Progesterone effects on neuronal ultrastructure and expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in rats with acute spinal cord injury." Cell Mol Neurobiol **29**(1): 27-39.

- Good, P., A. Yoda, et al. (1998). "The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells." Genomics **52**(3): 382-4.
- Graziadei, P. P. and G. A. Graziadei (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons." J Neurocytol **8**(1): 1-18.
- Greven, H. (2004). Spezielle Zoologie: Fortpflanzung und Entwicklung. München, Spektrum.
- Grimm, I., N. Messemer, et al. (2009). "Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells." J Cell Sci **122**(Pt 14): 2524-33.
- Gromada, J., C. Bark, et al. (2005). "Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic beta cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase beta." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10303-8.
- Guller, S., D. L. Allen, et al. (1992). "Growth hormone and fibronectin expression in 3T3 preadipose cells." Endocrinology **130**(5): 2609-16.
- Gurdon, J. B. (1962). "Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells." Dev Biol **4**: 256-73.
- Gurdon, J. B. (1962). "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles." J Embryol Exp Morphol **10**: 622-40.
- Gurdon, J. B. (1962). "Multiple genetically identical frogs." J Hered **53**: 5-9.
- Gurdon, J. B. (1962). "The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*." Dev Biol **5**: 68-83.
- Hahn, C. G., L. Y. Han, et al. (2005). "In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium." J Comp Neurol **483**(2): 154-63.
- Halim, N. D., C. S. Weickert, et al. (2004). "Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus." Neuropsychopharmacology **29**(6): 1063-9.
- Har-El, G. and R. M. Swanson (2001). "The superior turbinectomy approach to isolated sphenoid sinus disease and to the sella turcica." Am J Rhinol **15**(2): 149-56.

- Head, B. P., H. H. Patel, et al. (2008). "Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death." Faseb J **22**(3): 828-40.
- Heidebrecht, H. J., F. Buck, et al. (2001). "Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile of Mcm6 and the Ki-67 antigen." Lab Invest **81**(8): 1163-5.
- Heiser, P., F. Enning, et al. (2007). "Effects of haloperidol, clozapine and olanzapine on the survival of human neuronal and immune cells in vitro." J Psychopharmacol **21**(8): 851-6.
- Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." Int J Radiat Oncol Biol Phys **59**(2 Suppl): 21-6.
- Hick, C. H. A. (2006). Intensivkurs Physiologie, Elsevier.
- Hinds, J. W., P. L. Hinds, et al. (1984). "An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors." Anat Rec **210**(2): 375-83.
- Hinds, J. W. and N. A. McNelly (1981). "Aging in the rat olfactory system: correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb." J Comp Neurol **203**(3): 441-53.
- Hinze-Selch, D., E. W. Becker, et al. (1998). "Effects of clozapine on in vitro immune parameters: a longitudinal study in clozapine-treated schizophrenic patients." Neuropsychopharmacology **19**(2): 114-22.
- Hinze-Selch, D. and T. Pollmacher (2001). "In vitro cytokine secretion in individuals with schizophrenia: results, confounding factors, and implications for further research." Brain Behav Immun **15**(4): 282-318.
- Hosoi, T., S. Suzuki, et al. (2005). "LPS induces stefin A3 expression in mouse primary cultured glial cells." Brain Res Mol Brain Res **140**(1-2): 138-41.
- Hou, Y., C. F. Wu, et al. (2006). "Effects of clozapine, olanzapine and haloperidol on nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated N9 cells." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **30**(8): 1523-8.
- Hulspas, R., C. Tiarks, et al. (1997). "In vitro cell density-dependent clonal growth of EGF-responsive murine neural progenitor cells under serum-free conditions." Exp Neurol **148**(1): 147-56.

- Iwanaga, S., K. Suzuki, et al. (1978). "Bovine plasma cold-insoluble globulin: gross structure and function." Ann N Y Acad Sci **312**: 56-73.
- J. F. Loring, P. H. S. u. R. L. W. (2007). Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide. Amsterdam, Elsevier.
- Jahnsen, F. L., E. Gran, et al. (2004). "Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(1): 31-7.
- Janabi, N., S. Peudenier, et al. (1995). "Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen." Neurosci Lett **195**(2): 105-8.
- Jarskog, L. F., J. H. Gilmore, et al. (2007). "Caspase-3 activation in rat frontal cortex following treatment with typical and atypical antipsychotics." Neuropsychopharmacology **32**(1): 95-102.
- Jiang, F. X., B. Yurke, et al. (2008). "Neurite outgrowth on a DNA crosslinked hydrogel with tunable stiffnesses." Ann Biomed Eng **36**(9): 1565-79.
- Johansson, S., J. Price, et al. (2008). "Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells." Stem Cells **26**(9): 2444-54.
- Johnston, L. C., X. Su, et al. (2008). "Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease." Mol Ther **16**(8): 1392-9.
- Koch, J. M., S. Kell, et al. (2003). "Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability." J Psychiatr Res **37**(1): 53-9.
- Koch, J. M., S. Kell, et al. (2002). "Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression." J Psychiatr Res **36**(6): 369-75.
- Koh, S. H., K. S. Kim, et al. (2008). "Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats." Brain Res **1229**: 233-48.
- Kurihara, Y., T. Nagata, et al. (1997). "Structural properties and RNA-binding activities of two RNA recognition motifs of a mouse neural RNA-binding protein, mouse-Musashi-1." Gene **186**(1): 21-7.
- Lacroix, S., D. Feinstein, et al. (1998). "The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations." Brain Pathol **8**(4): 625-40.

- Lang, J., S. Bressel, et al. (1988). "[The sphenoid sinus, clinical anatomy of approaches to the pituitary region]." Gegenbaurs Morphol Jahrb **134**(3): 291-307.
- Lavoie, J. N., C. Champagne, et al. (2000). "Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of Src family kinases." J Cell Biol **150**(5): 1037-56.
- Lee, D. C., Y. C. Hsu, et al. (2009). "Isolation of neural stem/progenitor cells by using EGF/FGF1 and FGF1B promoter-driven green fluorescence from embryonic and adult mouse brains." Mol Cell Neurosci **41**(3): 348-63.
- Leone, C., G. Le Pavec, et al. (2006). "Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells." Glia **54**(3): 183-92.
- Leung, C. T., P. A. Coulombe, et al. (2007). "Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration." Nat Neurosci **10**(6): 720-6.
- Lieb, K., S. Engels, et al. (2003). "Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells." Neurochem Int **42**(2): 131-7.
- Liem, R. K., S. H. Yen, et al. (1978). "Intermediate filaments in nervous tissues." J Cell Biol **79**(3): 637-45.
- Lim, R. W. and S. Halpain (2000). "Regulated association of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with Src and Grb2: evidence for MAP2 as a scaffolding protein." J Biol Chem **275**(27): 20578-87.
- Lind, D., S. Franken, et al. (2005). "Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization." J Neurosci Res **79**(3): 295-302.
- Liu, S. Y., Y. T. Chen, et al. (2008). "Involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **366**(2): 520-5.
- Mackay-Sim, A. and P. W. Kittel (1991). "On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons." Eur J Neurosci **3**(3): 209-215.
- Marshall, C. T., Z. Guo, et al. (2005). "Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity." Brain Res **1045**(1-2): 45-56.

- Mayo, L. and R. Stein (2007). "Characterization of LPS and interferon-gamma triggered activation-induced cell death in N9 and primary microglial cells: induction of the mitochondrial gateway by nitric oxide." Cell Death Differ **14**(1): 183-6.
- McCann, M. J., J. P. O'Callaghan, et al. (1996). "Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyl tin-induced neurodegeneration." Neuroscience **72**(1): 273-81.
- Mensah-Brown, E. P. and L. J. Garey (2006). "The superior colliculus of the camel: a neuronal-specific nuclear protein (NeuN) and neuropeptide study." J Anat **208**(2): 239-50.
- Merck (1989). The Merck Index.
- Michalczyk, K. and M. Ziman (2005). "Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation." Histol Histopathol **20**(2): 665-71.
- Minambres, E., M. A. Ballesteros, et al. (2008). "Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study." J Neurotrauma **25**(6): 581-91.
- Moran, D. T., B. W. Jafek, et al. (1992). "Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction." Microsc Res Tech **23**(2): 103-10.
- Moran, D. T., J. C. Rowley, 3rd, et al. (1982). "The fine structure of the olfactory mucosa in man." J Neurocytol **11**(5): 721-46.
- Mullen, R. J., C. R. Buck, et al. (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." Development **116**(1): 201-11.
- Muller, F. J., L. C. Laurent, et al. (2008). "Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines." Nature **455**(7211): 401-5.
- Mumm, J. S., J. Shou, et al. (1996). "Colony-forming progenitors from mouse olfactory epithelium: evidence for feedback regulation of neuron production." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11167-72.
- Murrell, W., G. R. Bushell, et al. (1996). "Neurogenesis in adult human." Neuroreport **7**(6): 1189-94.
- Murrell, W., F. Feron, et al. (2005). "Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa." Dev Dyn **233**(2): 496-515.
- Murrell, W., A. Wetzig, et al. (2008). "Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease." Stem Cells **26**(8): 2183-92.

- Nakamura, M., H. Okano, et al. (1994). "Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development." Neuron **13**(1): 67-81.
- Nelson, A. D. and C. N. Svendsen (2006). "Low concentrations of extracellular FGF-2 are sufficient but not essential for neurogenesis from human neural progenitor cells." Mol Cell Neurosci **33**(1): 29-35.
- Niu, J., F. Mei, et al. (2010). "Haloperidol promotes proliferation but inhibits differentiation in rat oligodendrocyte progenitor cell cultures." Biochem Cell Biol **88**(4): 611-20.
- O'Hare, M. J., N. Kushwaha, et al. (2005). "Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death." J Neurosci **25**(39): 8954-66.
- Ogden, A. T., A. E. Waziri, et al. (2008). "Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas." Neurosurgery **62**(2): 505-14; discussion 514-5.
- Orlandi, R. R., D. C. Lanza, et al. (1999). "The forgotten turbinate: the role of the superior turbinate in endoscopic sinus surgery." Am J Rhinol **13**(4): 251-9.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Oshima, K., D. T. Teo, et al. (2007). "LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells." BMC Dev Biol **7**: 112.
- Othman, M., C. Lu, et al. (2005). "Clonal analysis of adult human olfactory neurosphere forming cells." Biotech Histochem **80**(5-6): 189-200.
- Pagano, S. F., F. Impagnatiello, et al. (2000). "Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb." Stem Cells **18**(4): 295-300.
- Paik, S. I., M. N. Lehman, et al. (1992). "Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **118**(7): 731-8.
- Paintlia, M. K., A. S. Paintlia, et al. (2008). "Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures." J Neurochem **105**(3): 956-70.

- Penalva, M. A., J. Tilburn, et al. (2008). "Ambient pH gene regulation in fungi: making connections." Trends Microbiol **16**(6): 291-300.
- Perry, C., A. Mackay-Sim, et al. (2002). "Olfactory neural cells: an untapped diagnostic and therapeutic resource. The 2000 Ogura Lecture." Laryngoscope **112**(4): 603-7.
- Pitman, M., B. Emery, et al. (2004). "LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal." Mol Cell Neurosci **27**(3): 255-66.
- Plesnila, N., S. Zinkel, et al. (2001). "BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15318-23.
- Pollmann, M., R. Parwaresch, et al. (2006). "Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation." Exp Cell Res **312**(17): 3241-51.
- Prabakaran, S., J. E. Swatton, et al. (2004). "Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress." Mol Psychiatry **9**(7): 684-97, 643.
- Qing, H., H. Xu, et al. (2003). "The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP+-induced apoptosis." Eur J Neurosci **17**(8): 1563-70.
- Quinones-Hinojosa, A., N. Sanai, et al. (2006). "Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells." J Comp Neurol **494**(3): 415-34.
- Ramon-Cueto, A., J. Perez, et al. (1993). "In vitro folding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb." Eur J Neurosci **5**(9): 1172-80.
- Reeves, S. A., L. J. Helman, et al. (1989). "Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5178-82.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-10.
- Rivest, S., S. Lacroix, et al. (2000). "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli." Proc Soc Exp Biol Med **223**(1): 22-38.

- Roisen, F. J., K. M. Klueber, et al. (2001). "Adult human olfactory stem cells." Brain Res **890**(1): 11-22.
- Roy, N. S., S. Wang, et al. (1999). "Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter." J Neurosci **19**(22): 9986-95.
- Rudolph, P., P. Alm, et al. (1999). "Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer." J Natl Cancer Inst **91**(3): 271-8.
- Sakakibara, S., T. Imai, et al. (1996). "Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell." Dev Biol **176**(2): 230-42.
- Sanchez, C., J. Diaz-Nido, et al. (2000). "Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function." Prog Neurobiol **61**(2): 133-68.
- Sarnat, H. B., D. Nochlin, et al. (1998). "Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system." Brain Dev **20**(2): 88-94.
- Schmitt, A., S. Weber, et al. (2004). "Hippocampal volume and cell proliferation after acute and chronic clozapine or haloperidol treatment." J Neural Transm **111**(1): 91-100.
- Schwartz Levey, M., D. M. Chikaraishi, et al. (1991). "Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography." J Neurosci **11**(11): 3556-64.
- Schwartz, P. H., P. J. Bryant, et al. (2003). "Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex." J Neurosci Res **74**(6): 838-51.
- Schwob, J. E., N. B. Farber, et al. (1986). "Neurons of the olfactory epithelium in adult rats contain vimentin." J Neurosci **6**(1): 208-17.
- Scolding, N. J., P. J. Rayner, et al. (1999). "Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter." Neuroscience **89**(1): 1-4.
- Serra-Perez, A., E. Verdaguer, et al. (2008). "Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells." J Neurochem **106**(3): 1237-47.

- Shaw, R. J., A. I. McClatchey, et al. (1998). "Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli." J Biol Chem **273**(13): 7757-64.
- Shin, S., M. Mitalipova, et al. (2006). "Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions." Stem Cells **24**(1): 125-38.
- Shostak, A., V. Wajsbrodt, et al. (2000). "High glucose accelerates the life cycle of the in vivo exposed mesothelium." Kidney Int **58**(5): 2044-52.
- Shuangshoti, S., S. Mujananon, et al. (2005). "Expression of neuronal nuclear antigen (NeuN) in epithelial neuroendocrine carcinoma." Appl Immunohistochem Mol Morphol **13**(3): 265-7.
- Silberberg, S. D., T. C. Poder, et al. (1989). "Endothelin increases single-channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells." FEBS Lett **247**(1): 68-72.
- Skoblenick, K. J., J. M. Castellano, et al. (2006). "Translocation of AIF in the human and rat striatum following protracted haloperidol, but not clozapine treatment." Apoptosis **11**(5): 663-72.
- Smith, J. R., L. Vallier, et al. (2008). "Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm." Dev Biol **313**(1): 107-17.
- Stern, K. and M. K. McClintock (1998). "Regulation of ovulation by human pheromones." Nature **392**(6672): 177-9.
- Strojniak, T., G. V. Rosland, et al. (2007). "Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival." Surg Neurol **68**(2): 133-43; discussion 143-4.
- Sugino, H., T. Futamura, et al. (2009). "Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**(2): 303-7.
- Szuster-Ciesielska, A., M. Slotwinska, et al. (2004). "Neuroleptics modulate cytokine and reactive oxygen species production in blood leukocytes of healthy volunteers." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **52**(1): 59-67.

- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.
- Tchoghandjian, A., N. Baeza, et al. (2009). "A2B5 Cells from Human Glioblastoma have Cancer Stem Cell Properties." Brain Pathol.
- Teng, J., Y. Takei, et al. (2001). "Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization." J Cell Biol **155**(1): 65-76.
- Theodorou, E., G. Dalembert, et al. (2009). "A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as a bifunctional regulator of neuronal differentiation." Genes Dev **23**(5): 575-88.
- Tkachev, D., M. L. Mimmack, et al. (2007). "Further evidence for altered myelin biosynthesis and glutamatergic dysfunction in schizophrenia." Int J Neuropsychopharmacol **10**(4): 557-63.
- Tohyama, T., V. M. Lee, et al. (1992). "Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells." Lab Invest **66**(3): 303-13.
- Tureyen, K., R. Vemuganti, et al. (2005). "EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain." Neurosurgery **57**(6): 1254-63; discussion 1254-63.
- Unal-Cevik, I., M. Kilinc, et al. (2004). "Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note." Brain Res **1015**(1-2): 169-74.
- Van Nassauw, L., M. Wu, et al. (2005). "Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract." Histochem Cell Biol **124**(5): 369-77.
- Wachs, F. P., S. Couillard-Despres, et al. (2003). "High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells." Lab Invest **83**(7): 949-62.
- Walker, P. S., J. A. Donovan, et al. (1988). "Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells." J Biol Chem **263**(30): 15594-601.

- Walton, N. M., B. M. Sutter, et al. (2006). "Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain." Development **133**(18): 3671-81.
- Weible, M. W., 2nd and T. Chan-Ling (2007). "Phenotypic characterization of neural stem cells from human fetal spinal cord: synergistic effect of LIF and BMP4 to generate astrocytes." Glia **55**(11): 1156-68.
- Weikert, C., M. Eppenberger-Eberhardt, et al. (2003). "Cellular engineering of ventricular adult rat cardiomyocytes." Cardiovasc Res **59**(4): 874-82.
- Weismann, M., I. Yousry, et al. (2001). "Functional magnetic resonance imaging of human olfaction." Neuroimaging Clin N Am **11**(2): 237-50, viii.
- Winkler, C., R. A. Fricker, et al. (1998). "Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain." Mol Cell Neurosci **11**(3): 99-116.
- Winstead, W., C. T. Marshall, et al. (2005). "Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells." Am J Rhinol **19**(1): 83-90.
- Witt, M. and W. Wozniak (2006). "Structure and function of the vomeronasal organ." Adv Otorhinolaryngol **63**: 70-83.
- Xia, C. L., Z. W. Du, et al. (2003). "A2B5 lineages of human astrocytic tumors and their recurrence." Int J Oncol **23**(2): 353-61.
- Xue, T., L. Qiao, et al. (2008). "Proliferation, multipotency and neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from the olfactory neuroepithelium of the adult rat." Cell Biol Int **32**(8): 950-8.
- Xue, T., L. Wei, et al. (2009). "Effect of cryopreservation on proliferative features of neural progenitor cells derived from olfactory bulb of embryonic rat." Int J Pediatr Otorhinolaryngol **73**(7): 969-73.
- Yamanaka, S. (2007). "Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **1**(1): 39-49.
- Yoneda, T., A. Sasaki, et al. (1997). "Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2." J Clin Invest **99**(10): 2509-17.
- Zhang, X., J. Cai, et al. (2005). "Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors." Stem Cells **23**(3): 442-53.

Zhang, X., K. M. Klueber, et al. (2004). "Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium." Exp Neurol **186**(2): 112-23.

7 Anhang

7.1 Immunfluoreszenznachweise

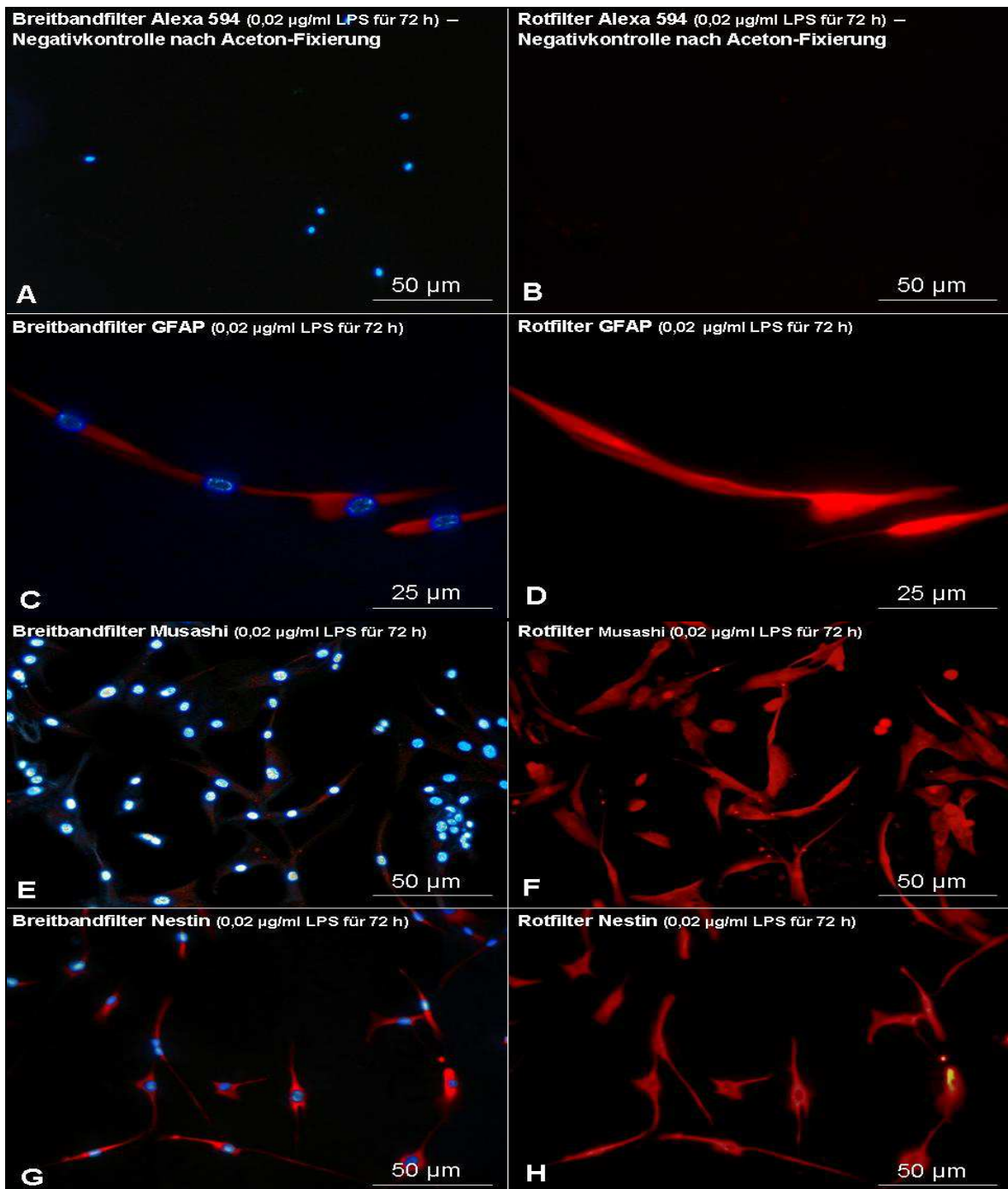


Abbildung 10: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit LPS-Stimulierung und DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die nachfolgenden Bilder weisen deutlich positive Zytoplasmafärbungen im Gesichtsfeld auf, wobei C) und D) für GFAP, E) und F) für Musashi, der vereinzelt auch im Zellkern nachzuweisen war, und G) und H) für Nestin stehen. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 594 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Rotfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können

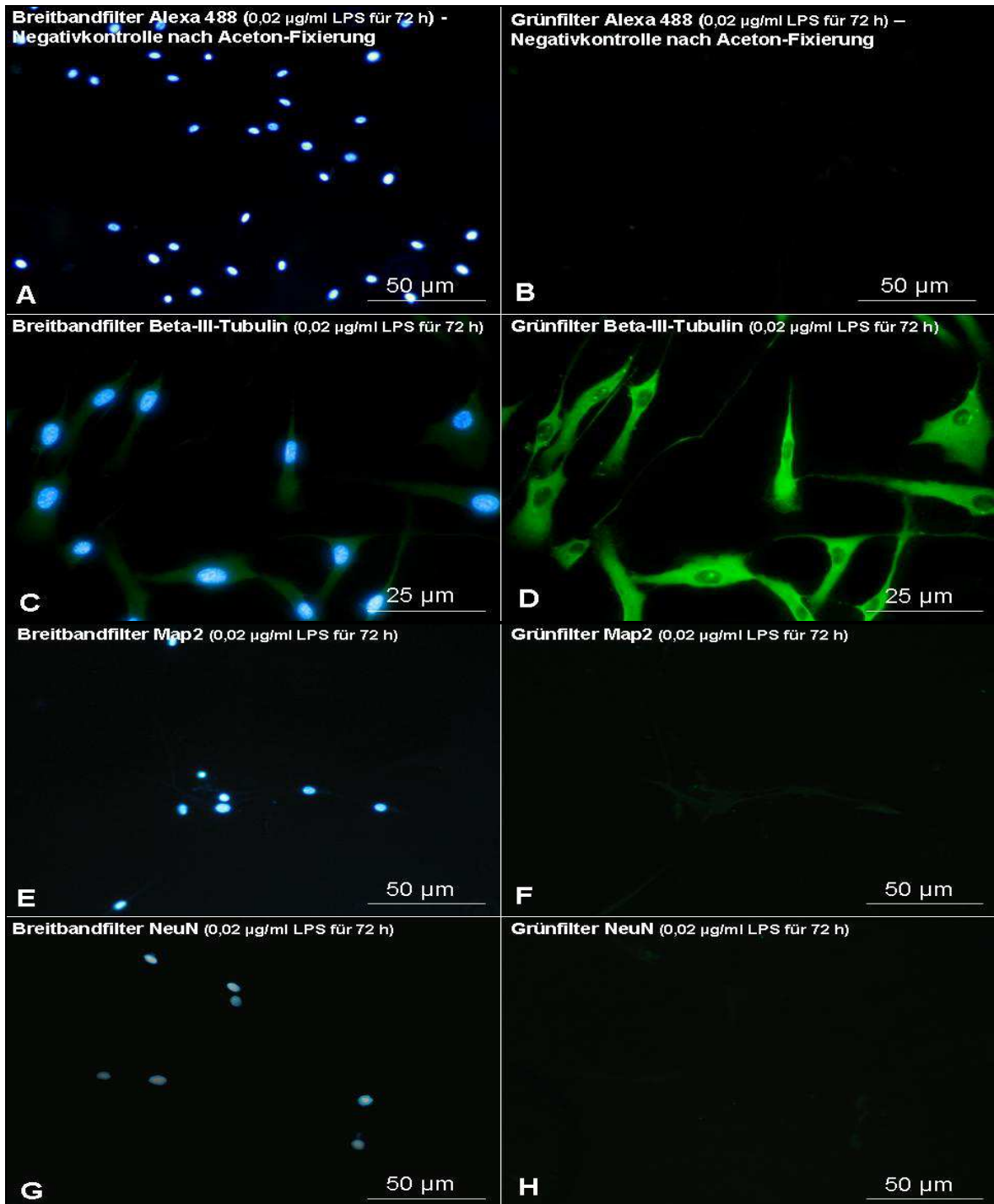


Abbildung 11: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit LPS-Stimulierung und DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) zeigen deutlich positive Zytoplasmafärbungen für Beta-III-Tubulin, E) und F) negative Zytoplasmafärbungen für MAP2 und G) und H) NeuN negative Kernfärbungen im Gesichtsfeld. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

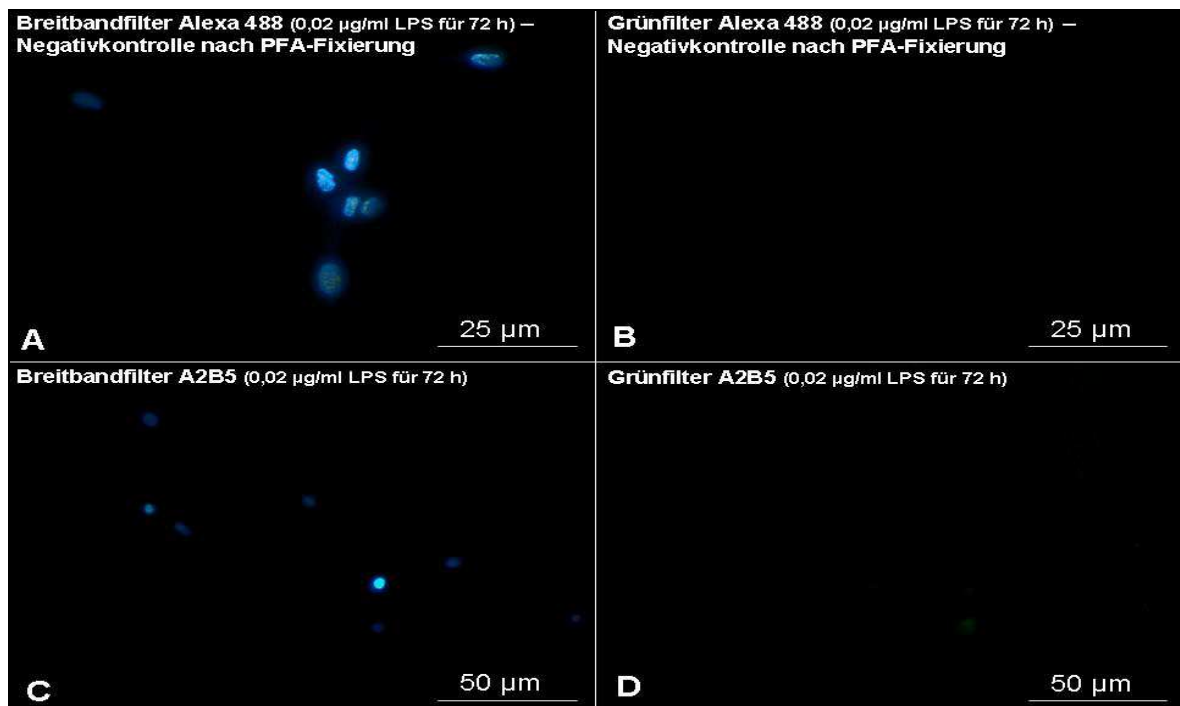


Abbildung 12: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 1 zu Beginn der ersten Kulturpassage mit LPS-Stimulierung und DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) weisen deutlich negative Oberflächenfärbungen für A2B5 nach. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um eine Oberflächenfärbung anzuzeigen.

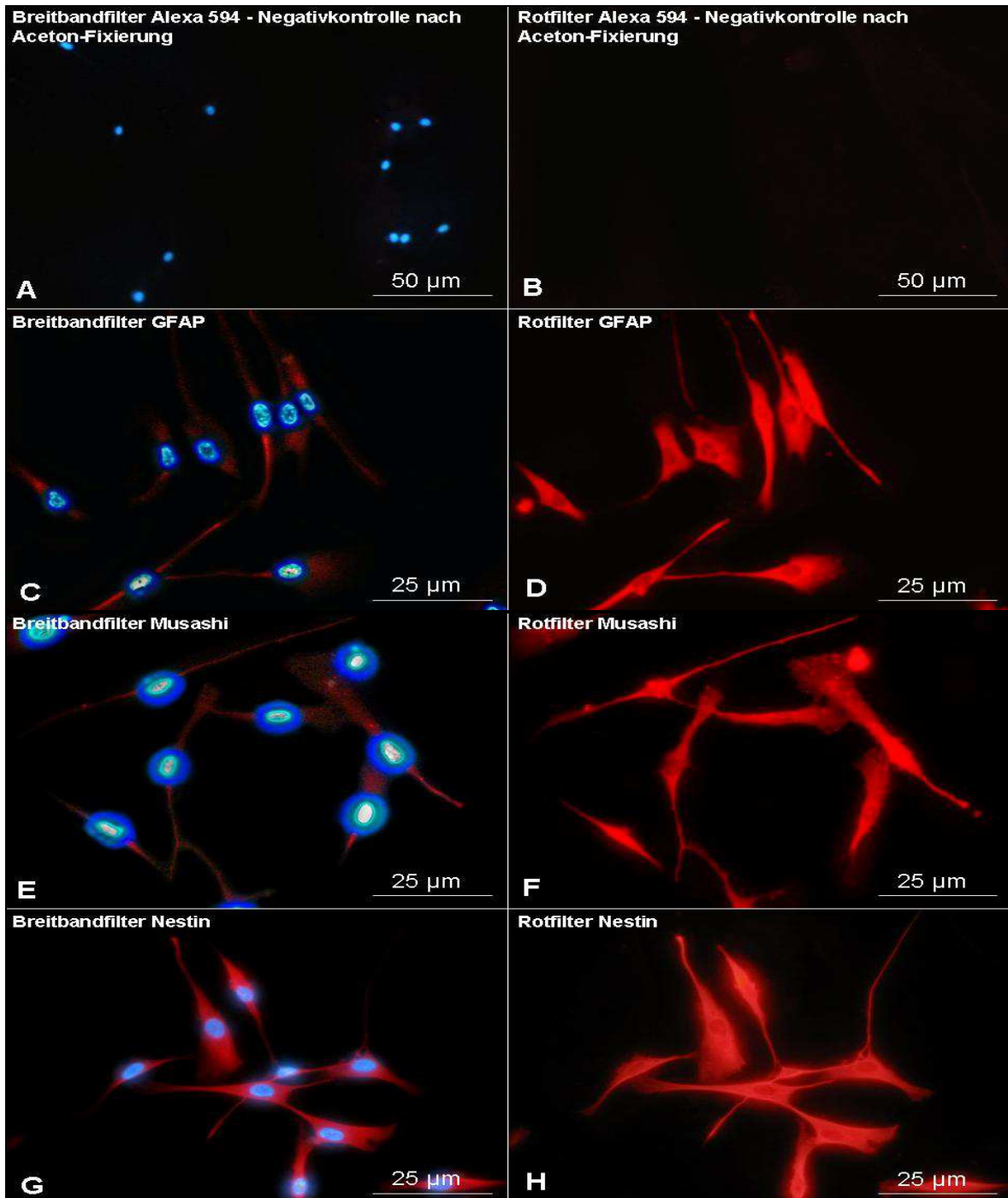


Abbildung 13: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 2 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die nachfolgenden Bilder weisen deutlich positive Zytoplasmafärbungen im Gesichtsfeld auf, wobei C) und D) für GFAP, E) und F) für Musashi, der vereinzelt auch im Zellkern nachzuweisen war, und G) und H) für Nestin stehen. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 594 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Rotfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

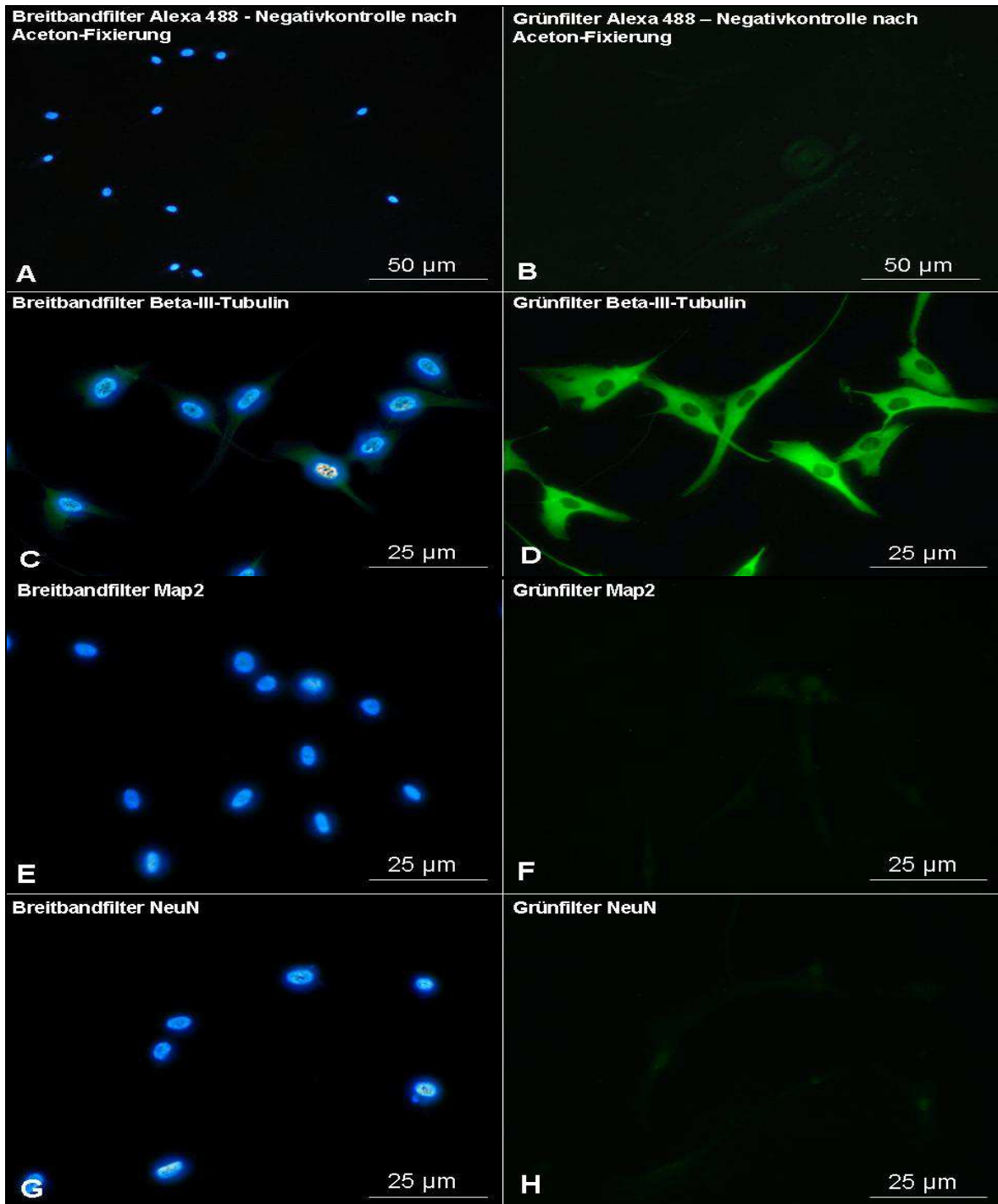


Abbildung 14: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 2 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) zeigen deutlich positive Zytoplasmafärbungen für Beta-III-Tubulin, E) und F) negative Zytoplasmafärbungen für MAP2 und G) und H) NeuN negative Kernfärbungen im Gesichtsfeld. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

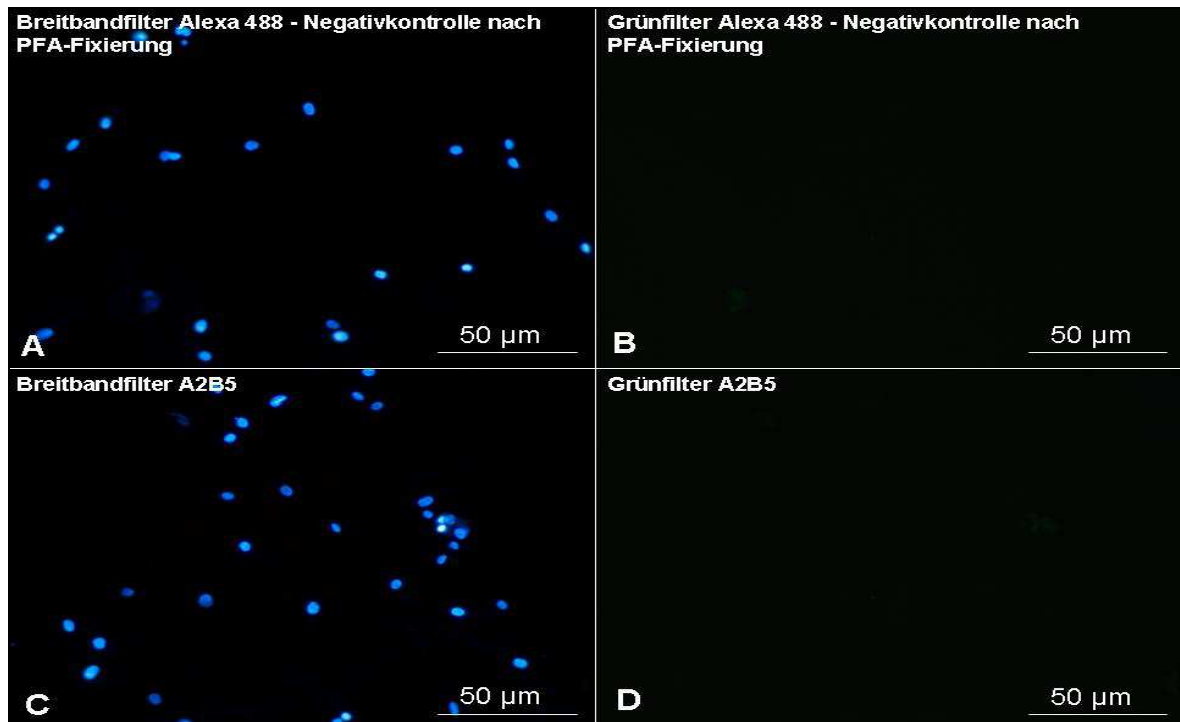


Abbildung 15: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 2 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) weisen deutlich negative Oberflächenfärbungen für A2B5 nach. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um eine Oberflächenfärbung anzuzeigen.

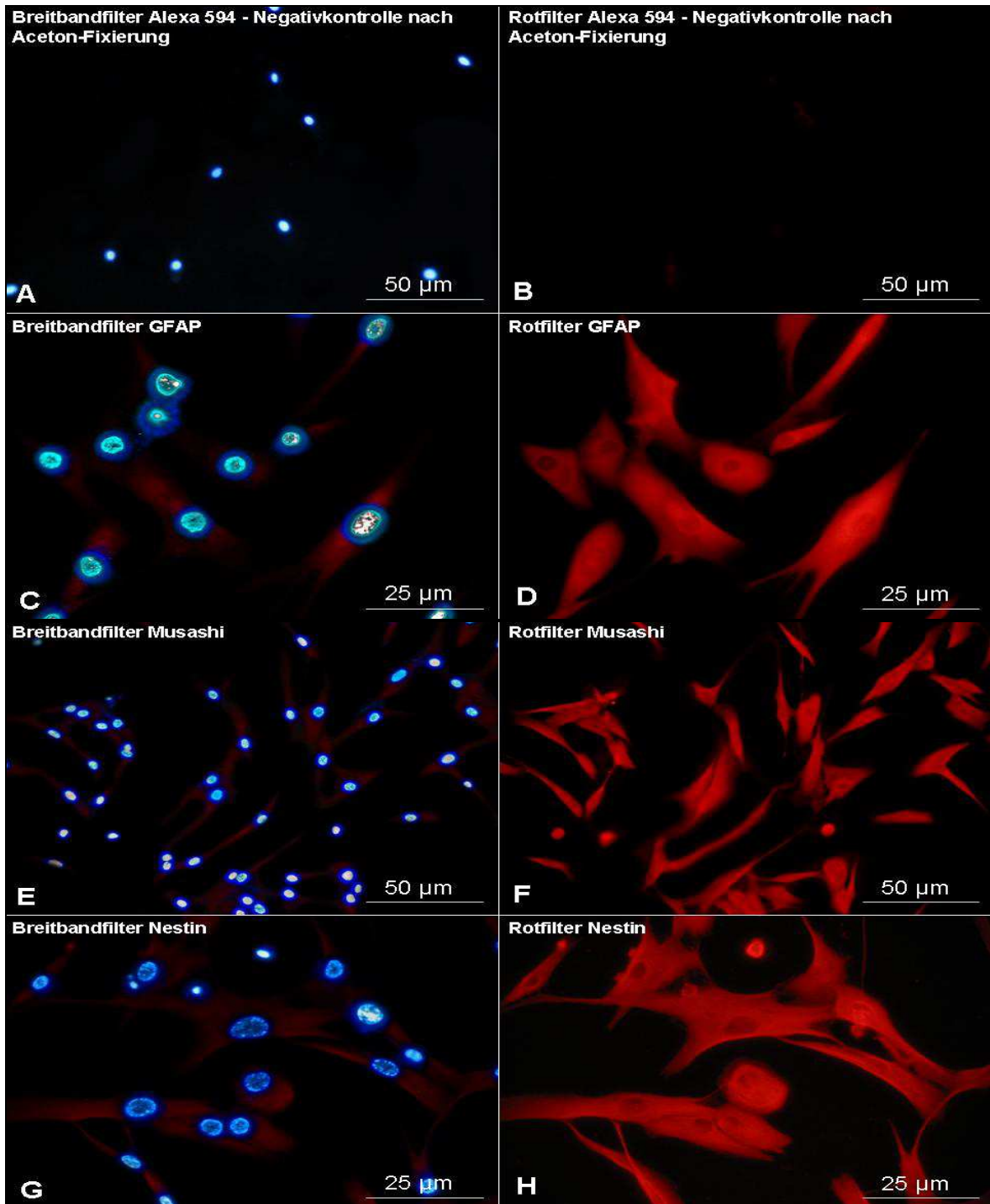


Abbildung 16: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 3 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die nachfolgenden Bilder weisen deutlich positive Zytoplasmafärbungen im Gesichtsfeld auf, wobei C) und D) für GFAP, E) und F) für Musashi, der vereinzelt auch im Zellkern nachzuweisen war, und G) und H) für Nestin stehen. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 594 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Rotfilter abbildet, um Zytoplasma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

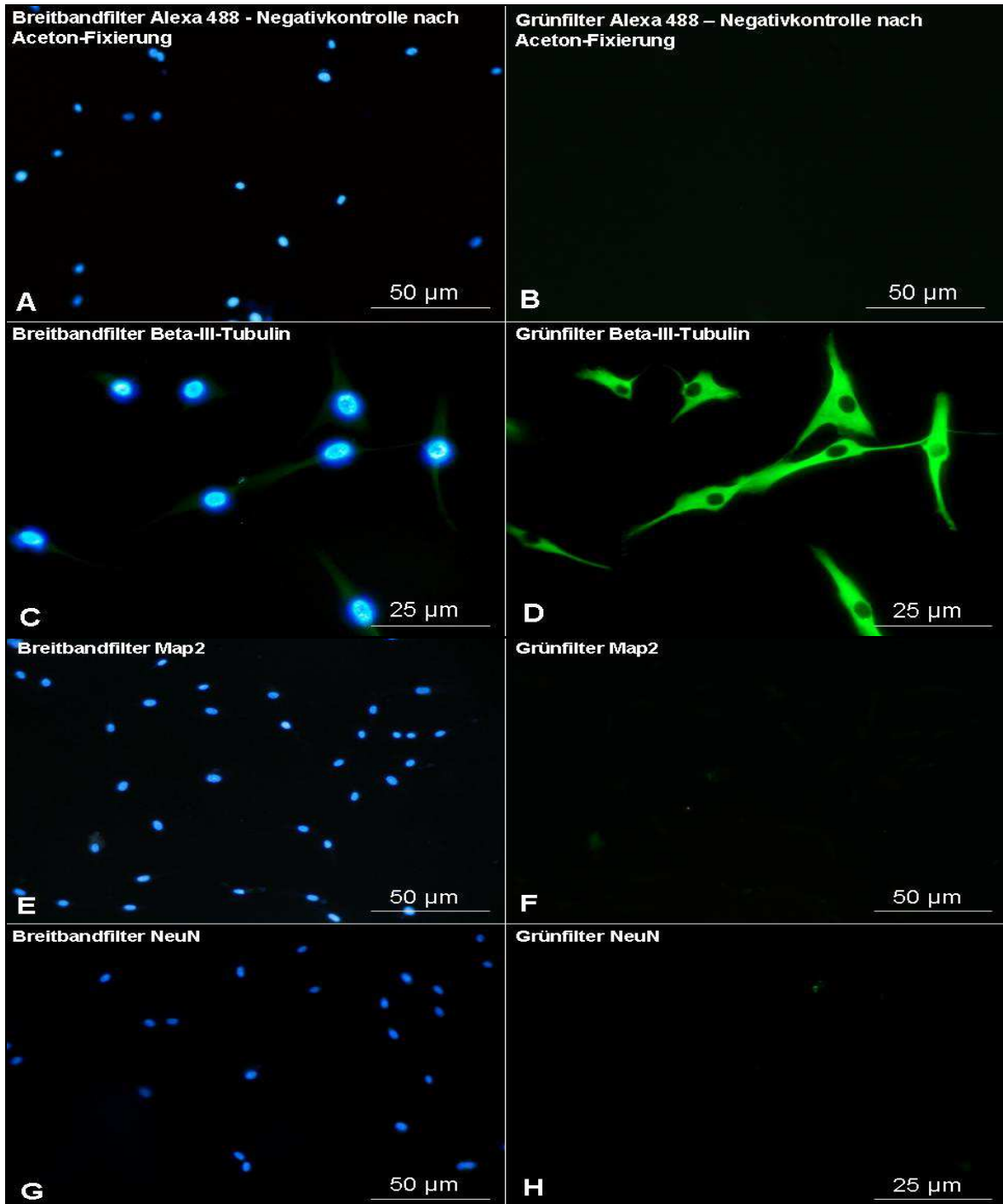


Abbildung 17: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 3 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) zeigen deutlich positive Zytosmafärbungen für Beta-III-Tubulin, E) und F) negative Zytosmafärbungen für MAP2 und G) und H) NeuN negative Kernfärbungen im Gesichtsfeld. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um Zytosma- und Kernfärbung voneinander unterscheiden zu können.

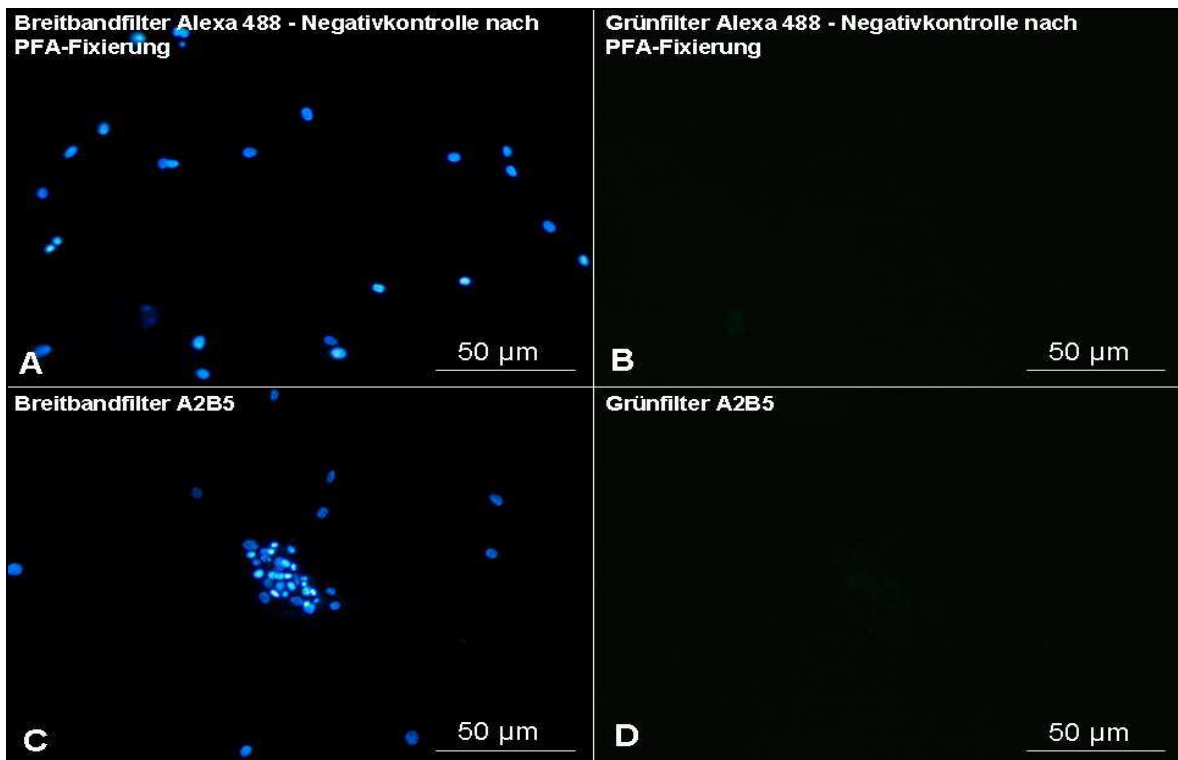


Abbildung 18: IF-Färbungen der neuronalen nasalen Progenitoren des Individuums PZ Pat 3 zu Beginn der ersten Kulturpassage ohne LPS-Stimulierung und mit DAPI-Zellkernfärbung.

A) und B) zeigen die abgelichteten Negativkontrollen. Die Bilder C) und D) weisen deutlich negative Oberflächenfärbungen für A2B5 nach. Die linke Bildreihe wurde mit einem Breitbandfilter, der DAPI und Alexa 488 darstellen kann, aufgenommen, während die rechte Bildreihe den Grünfilter abbildet, um eine Oberflächenfärbung anzuzeigen.

7.2 Daten der Zellzählungen

Tabelle 6:

Ermittelte Zellzahlen der nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren PZ Pat 1 bei Inkubation mit 0,1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,02 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	12	16	S2	19	16	S2	0,6	1,0
MCM6**	12	13	MCM6	12	9	MCM6	1,0	1,4
Ki-Mit**	9	7	Mit	19	11	Mit	0,5	0,6
AC3**	5	3	AC3	5	4	AC3	1,0	0,8

Tabelle 7:

Ermittelte Zellzahlen der nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren PZ Pat 1 bei Inkubation mit 1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,02 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	4	14	S2	19	16	S2	0,2	0,9
MCM6**	8	11	MCM6	12	9	MCM6	0,7	1,2
Ki-Mit**	7	6	Mit	19	11	Mit	0,4	0,5
AC3**	2	1	AC3	5	4	AC3	0,4	0,3

Tabelle 8:

Ermittelte Zellzahlen der nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren PZ Pat 1 bei Inkubation mit 0,02 µg/ml Haloperidol und 0,02 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	60	56	S2	47	64	S2	1,3	0,9
MCM6**	65	66	MCM6	48	50	MCM6	1,4	1,3
Ki-Mit**	44	43	Mit	46	30	Mit	1,0	1,4
AC3**	62	60	AC3	48	54	AC3	1,3	1,1

Tabelle 9:

Ermittelte Zellzahlen der nasal gewonnenen neuronalen Progenitoren PZ Pat 1 bei Inkubation mit 0,2 µg/ml Haloperidol und 0,02 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	55	46	S2	47	64	S2	1,2	0,7
MCM6**	61	55	MCM6	48	50	MCM6	1,3	1,1
Ki-Mit**	46	48	Mit	46	30	Mit	1,0	1,6
AC3**	44	48	AC3	48	54	AC3	0,9	0,9

*Die Quantifizierung der Zellzählung von Verum zu Kontrolle bildet das Ratio-Verhältnis.

**Ki-S2, MCM6 und Ki-Mit sind die nachgewiesenen Zellzyklusmarker und AC3, aktivierte Kaspase 3, ein Marker für Apoptose.

Tabelle 10:

Ermittelte Zellzahlen der humanen mikroglialen ZNS-Zelllinie CHME3 bei Inkubation mit 0,1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	35	31	S2	23	33	S2	1,5	0,9
MCM6**	53	70	MCM6	18	56	MCM6	2,9	1,3
Ki-Mit**	7	8	Mit	4	30	Mit	1,8	0,3
AC3**	1	2	AC3	1	3	AC3	1,0	0,7

Tabelle 11:

Ermittelte Zellzahlen der humanen mikroglialen ZNS-Zelllinie CHME3 bei Inkubation mit 1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	36	44	S2	35	20	S2	1,0	2,2
MCM6**	20	55	MCM6	3	10	MCM6	6,7	5,5
Ki-Mit**	0	1	Mit	0	12	Mit	0,0	0,1
AC3**	3	11	AC3	2	5	AC3	1,5	2,2

Tabelle 12:

Ermittelte Zellzahlen der humanen mikroglialen ZNS-Zelllinie CHME3 bei Inkubation mit 0,02 µg/ml Haloperidol und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Referenz	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	9	4	S2	32	28	S2	0,3	0,1
MCM6**	4	34	MCM6	28	44	MCM6	0,1	0,8
Ki-Mit**	2	9	Mit	3	2	Mit	0,7	4,5
AC3**	1	14	AC3	1	3	AC3	1,0	4,7

Tabelle 13:

Ermittelte Zellzahlen der humanen mikroglialen ZNS-Zelllinie CHME3 bei Inkubation mit 0,2 µg/ml Haloperidol und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Referenz	24h	48h	Ratio*	24h	48h
Ki-S2**	13	1	S2	1	5	S2	13,0	0,2
MCM6**	84	54	MCM6	47	91	MCM6	1,8	0,6
Ki-Mit**	14	1	Mit	2	5	Mit	7,0	0,2
AC3**	8	14	AC3	1	2	AC3	8,0	7,0

*Die Quantifizierung der Zellzählung von Verum zu Kontrolle bildet das Ratio-Verhältnis.

**Ki-S2, MCM6 und Ki-Mit sind die nachgewiesenen Zellzyklusmarker und AC3, aktivierte Kaspase 3, ein Marker für Apoptose.

Tabelle 14:

Ermittelte Zellzahlen der murinen mikroglialen ZNS-Zelllinie BV2 bei Inkubation mit 0,1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

Verum	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
MCM6**	64	54	MCM6	54	74	MCM6	1,2	0,7
AC3**	38	41	AC3	48	63	AC3	0,8	0,7

Tabelle 15:

Ermittelte Zellzahlen der murinen mikroglialen ZNS-Zelllinie BV2 bei Inkubation mit 1 µg/ml Clozapin/DMSO und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

BV2	24h	48h	Kontrolle	24h	48h	Ratio*	24h	48h
MCM6**	76	79	MCM6	70	46	MCM6	1,1	1,7
AC3**	41	66	AC3	53	75	AC3	0,8	0,9

Tabelle 16:

Ermittelte Zellzahlen der murinen mikroglialen ZNS-Zelllinie BV2 bei Inkubation mit 0,02 µg/ml Haloperidol und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

BV2	24h	48h	Referenz	24h	48h	Ratio*	24h	48h
MCM6**	47	33	MCM6	45	43	MCM6	1,0	0,8
AC3**	36	38	AC3	34	42	AC3	1,1	0,9

Tabelle 17:

Ermittelte Zellzahlen der murinen mikroglialen ZNS-Zelllinie BV2 bei Inkubation mit 0,2 µg/ml Haloperidol und 0,2 µg/ml LPS nach 24 und 48 h.

BV2	24h	48h	Referenz	24h	48h	Ratio*	24h	48h
MCM6**	66	46	MCM6	45	43	MCM6	1,5	1,1
AC3**	39	38	AC3	34	42	AC3	1,1	0,9

*Die Quantifizierung der Zellzählung von Verum zu Kontrolle bildet das Ratio-Verhältnis.

**MCM6 ist der nachgewiesene Zellzyklusmarker und AC3, aktivierte Kaspase 3, ein Marker für Apoptose.

Danksagung

Besonders danken möchte ich PD'in Dr. med. Dunja Hinze-Selch, die es mir ermöglichte, im Rahmen des SFB654 „Plastizität und Schlaf“ diese Arbeit im „Zentrum für integrative Psychiatrie“ in Kiel durchzuführen. Für aner kennenswert erachte ich auch, dass Frau Dunja Hinze-Selch mich während der Anfertigung der Dissertation fortwährend bestärkte, protegierte und unterstützte.

Dank bekunden möchte ich insbesondere auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Westermann aus Lübeck, der so entgegenkommend war, sich für meine externe Dissertation an der Universität zu Lübeck einzusetzen und diese zu befürworten. Er stand mir stets mit Ratschlägen konstruktiv zur Seite.

Herrn Prof. Dr. med. Josef Aldenhoff bin ich insofern zu besonderem Dank verpflichtet, als dass er mir meinen Arbeitsplatz an der ZIP gGmbH in Kiel bereitstellte. Des Weiteren bleibt anerkennend zu vermerken, dass er mir die Benutzung aller Geräte und Verbrauchsmaterialien im Rahmen dieses Projekts ermöglichte.

Letztendlich bin ich meiner Familie - insbesondere meiner Lebensgefährtin Ragna und meiner Tochter Lioba - dankbar dafür, dass sie mir während meiner Dissertation kontinuierlich ermutigend zur Seite stand.



Andreas Jeske

► geboren am 13.07.1976 in Greifswald

Heidmühlenweg 33

25336 Elmshorn

E-Mail: ajeske1@gmx.de

Schulbildung

Bis 1991 55. POS Peter Stucka, Rostock

1991 - 1992 Thomas Morus Gymnasium, Rostock

1992 - 1996 Gymnasium Bismarckschule, Elmshorn

Studium

1998 – 2003 ► absolviert an der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg im Studiengang Biotechnologie mit Kreditierung Mikro- und Molekularbiologie zum Dipl. Ing. (FH) Biotechnologie

► Titel der Diplomarbeit: *„Die Stromazelle des Riesenzelltumors des Knochens (homo sapiens) – Identifizierung von Riesenzelltumor-Entitäten durch erste Genexpressionsanalyse mit Hilfe mesenchymaler und hämatopoetischer Marker“*

Berufliche Praxis

2004 – 2010 ► angestellt in der ZIP gGmbH Kiel im zellbiologischen Labor

2010 – 2012 ► angestellt in der Atto-Lab GmbH Lübeck im Labor für Proteinanalytik

Promotion

2007 – 2013 ► Promotion über die medizinische Fakultät zu Lübeck

► Beginn der Studie nach positivem Ethikvotum am 18.03.2008