

Aus der  
Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie  
Vertreten in der Sektion Naturwissenschaften durch  
Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse, Standortleiter der Fraunhofer EMB

**Xenogene Kokultur  
zur Induktion der neuronalen Differenzierung  
in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten  
Stammzellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Sektion Naturwissenschaften-

vorgelegt von  
Anna Emilia Petschnik  
aus Berlinchen

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse

2. Berichterstatter: PD Dr. Dr. Jens Habermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02. November 2011

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Stammzellen</b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Embryonalentwicklung und Abstammung der Organe.....	5
2.1.2 Definition einer Stammzelle.....	6
2.1.3 Der Grundgedanke der Stammzellforschung .....	7
2.1.4 Embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen .....	9
2.1.5 Adulte Stammzellen .....	11
2.1.5.1 Adulte Stammzellen aus der menschlichen Haut.....	12
2.1.5.2 Adulte Stammzellen aus dem Pankreas und den Speicheldrüsen des Menschen .....	14
<b>2.2 Das menschliche Nervensystem</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Der embryonale Ursprung des Nervensystems.....	17
2.2.2 Vielfalt der Zellen des zentralen- und peripheren Nervensystems .....	19
2.2.3 Neurale Stammzellen und die Neurogenese beim Erwachsenen .....	23
2.2.4 Generierung neuronaler Zellen aus humanen Stammzellen nicht-neuralen Ursprungs.....	25
<b>2.3 Möglichkeiten der Zelltherapie bei Erkrankungen des Nervensystems</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Zelltherapie zur Behandlung der Parkinson-Symptome .....	28
2.3.2 Zellbasierte Ansätze zur Behandlung von Schlaganfall-Patienten.....	31
2.3.3 Möglichkeiten der Stammzelltherapie bei der Huntington-Krankheit .....	33
2.3.4 Zellersatztherapie bei Erkrankungen des Nervensystems – ein Fazit .....	35
<b>2.4 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>37</b>
3.1.1 Chemikalien .....	37
3.1.2 Kits.....	38
3.1.3 Verbrauchsmittel.....	38
3.1.4 Geräte .....	38
3.1.5 Software .....	39
3.1.6 Primer .....	40
3.1.7 Antikörper.....	41
3.1.8 Medien.....	42
3.1.9 Lösungen und Puffer.....	43
3.1.10 Zellen und Gewebe .....	43
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>44</b>
3.2.1 Stammzellisolation .....	44
3.2.1.1 Stammzellisolation aus dem Pankreas, der Parotis und der Vollhaut des Menschen .....	44
3.2.1.2 Protokolletablierung zur Isolation adulter Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen .....	46
3.2.1.2.1 Isolation von Schweißdrüsen aus der Vollhaut.....	46

# Inhaltsverzeichnis

3.2.1.2.2 Generierung einer adhärennten Zellpopulation aus Schweißdrüsen .....	47
3.2.1.2.3 Isolation adulter Stammzellen aus den Schweißdrüsen des Menschen .....	47
<b>3.2.2 Kultivierung und Lagerung der Stammzellen .....</b>	<b>49</b>
3.2.2.1 Propagation der Stammzellen .....	49
3.2.2.2 Zellzahlbestimmung .....	50
3.2.2.3 Kryokonservierung .....	50
3.2.2.4 Auftauen kryokonservierter Zellen.....	51
<b>3.2.3 Charakterisierung der Stammzellpopulationen .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.4 Etablierung der Kokultur-Experimente .....</b>	<b>53</b>
3.2.4.1 Versuche mit Rattenhirn-konditioniertem Medium .....	53
3.2.4.2 Indirekte Kokultur mit Rattenhirnbiopsien .....	53
<b>3.2.5 Molekularbiologische Analysen .....</b>	<b>56</b>
3.2.5.1 RNA-Isolation.....	56
3.2.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	56
3.2.5.3 Reverse Transkription.....	57
3.2.5.4 Quantitative PCR .....	58
3.2.5.5 Kapillargelelektrophorese .....	60
<b>3.2.6 Proteinbiochemische Analysen .....</b>	<b>61</b>
3.2.6.1 Immuncytochemie.....	61
3.2.6.2 Immunhistochemie .....	62
3.2.6.3 Transkriptionsfaktor-Stammzellchip .....	63
3.2.6.3.1 Kernproteinextraktion .....	63
3.2.6.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentration.....	63
3.2.6.3.3 TF-Chip .....	64
3.2.6.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	66
3.2.6.5 Wachstumsfaktor-Antikörper-Array.....	67
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Etablierung einer neuartigen adulten Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Charakterisierung der glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellpopulationen .....</b>	<b>71</b>
<b>4.3 Kokultivierung von Stammzellen und Hirnbiopsien .....</b>	<b>82</b>
4.3.1 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung pankreatischer Stammzellen .....	83
4.3.2 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Parotis.....	87
4.3.3 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Vollhaut .....	91
4.3.4 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus den Schweißdrüsen ..	95
4.3.5 Einfluss der Kokultur auf die unterschiedlichen Stammzellpopulationen im Vergleich .....	99
4.3.6 Nachweis von Neurotransmittern in pankreatischen Stammzellen .....	103
4.3.7 Detektion von Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand nach der Kokultur .....	104
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>107</b>
<b>5.1 Nestin-positive Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen .....</b>	<b>107</b>
<b>5.2 Vergleichbare Eigenschaften glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen .....</b>	<b>110</b>
<b>5.3 Neuronale Differenzierungsinduktion durch Kokultur mit Hirnbiopsien .....</b>	<b>113</b>
<b>5.4 Sekretion neurotropher Faktoren durch Hirnbiopsien und Stammzellen .....</b>	<b>121</b>

# Inhaltsverzeichnis

5.5 Fazit und Ausblick der Arbeit.....	126
<b>6. Referenzen .....</b>	<b>128</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>143</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	143
7.2 Tabellenverzeichnis.....	145
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	146
7.4 Eidesstattliche Versicherung .....	148
7.5 Hinweis zur Publikation von Daten aus dieser Arbeit.....	149
<b>8. Sonstiges .....</b>	<b>150</b>
8.1 Lebenslauf .....	150
8.2 Wissenschaftliche Publikationen.....	151
8.3 Master-Urkunde .....	154
Danksagungen .....	155

## 1. Zusammenfassung

### 1. Zusammenfassung

Im erwachsenen Organismus spielen Stammzellen bei der Homöostase und Regeneration von Geweben eine wichtige Rolle. Zu Geweben aus denen besonders vielversprechende Stammzellen gewonnen werden können, zählen glanduläre Gewebe wie das Pankreas oder die Speicheldrüsen, aber auch die menschliche Haut. Das hohe Differenzierungspotential und die regenerationsfördernde Wirkung dieser Zellen konnten in anderen Versuchen bereits erfolgreich demonstriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue glanduläre Stammzellquelle identifiziert – die humane Schweißdrüse. Es wurde ein Protokoll etabliert, mit dem es gelungen ist, Stammzellen aus diesem glandulären Gewebe zu isolieren und über einen langen Zeitraum in Kultur zu halten. Zusammen mit weiteren Stammzellpopulationen, die aus dem Pankreas, der Parotis und der Vollhaut des Menschen gewonnen wurden, wurden die Zellen mittels proteinbiochemischer und molekularbiologischer Analysen auf ihre Stammzellartigkeit und ihr Differenzierungspotential untersucht. Dabei zeigten glanduläre und Haut-abgeleitete Stammzellpopulationen des Menschen vergleichbare Eigenschaften. Es konnten sowohl Stammzellmarker als auch Marker für Zellen, die ihren Ursprung in den drei embryonalen Keimblättern Ektoderm, Mesoderm und Endoderm haben, nachgewiesen werden. Insbesondere das neuroektodermale Differenzierungspotential sollte sich für die nachfolgenden Versuche der gezielten Differenzierung in neuronale Zellen als nützlich erweisen. Es wurde ein xenogenes Kokultursystem etabliert, bei dem die Stammzellen getrennt durch eine poröse Membran mit Hirnbiopsien der Ratte für zwei Tage zusammen im selben Kultivierungsmedium inkubiert worden sind. So konnte die Stammzelldifferenzierung von der ganzen Bandbreite an Faktoren, die von den Hirnbiopsien abgegeben wurden, beeinflusst werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine neuronale Differenzierung erfolgreich induziert werden konnte. Das äußerte sich zum einen in einer morphologischen Änderung der Zellen, die mit der Ausbildung von axonähnlichen Fortsätzen mit bis zu 450 µm Länge einherging; zum anderen konnte eine stark erhöhte mRNA- und Proteinexpression neuroassoziierter Strukturproteine wie den Neurofilamenten und Enzymen wie der Neuron-spezifischen Enolase und dem *Protein Gene Product 9.5* detektiert werden. Es zeigte sich

## 1. Zusammenfassung

auch, dass das Potential, innerhalb von zwei Tagen in neuronale Zellen differenzieren zu können, von Haut-abgeleiteten Stammzellen, über Stammzellen aus den Schweißdrüsen und der Parotis, zu pankreatischen Stammzellen anstieg. In den pankreatischen Stammzellen wurde zudem der Gehalt an intrazellulärem Dopamin bestimmt, welcher nach der Kokultur um 273 % anstieg, was die Annahme einer gezielten neuronalen Differenzierung der Zellen untermauert. Um Faktoren, die bei den Differenzierungsprozessen eine Rolle gespielt haben könnten, zu identifizieren, wurden die Kultivierungsmedien aus der Kokultur, den Stammzellen und den Hirnbiopsien auf die Existenz verschiedener Wachstumsfaktoren untersucht. Dabei konnten Faktoren mit einer neurotrophen Wirkung identifiziert werden, die häufig bei verletzungsbedingten Abläufen im Gehirn auftreten, wie beispielsweise der *basic Fibroblast Growth Factor*. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass es eine Interaktion zwischen den Stammzellen und den Hirnbiopsien gab, die zur Ausschüttung weiterer neurotropher Faktoren geführt hat, welche ausschließlich im Kokulturansatz und nicht in den separat kultivierten Stammzellen oder Hirnbiopsien detektierbar waren. Dazu gehörten das Amphiregulin und der *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor*. Diese Interaktion zusammen mit dem Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die neuronale Differenzierung zeigt, dass dieses Kokultursystem ein vielversprechendes *in vitro*-Modell darstellt, um das Verhalten von Stammzellen nach einer Transplantation im Rahmen neuroregenerativer Therapien zu prognostizieren. Eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz der Stammzellen in der zellbasierten Therapie ist die Erreichbarkeit und Verfügbarkeit der Spenderorgane, die insbesondere bei Stammzellen aus der Vollhaut und den Schweißdrüsen, aber auch bei den Stammzellen aus der Parotis gegeben ist. Das sehr hohe neuronale Differenzierungspotential pankreatischer Stammzellen besitzt andererseits viel Potential zur Entwicklung von *in vitro*-Testsystemen, beispielsweise zur Testung von Medikamenten.

## 1. Abstract

# ”Xenogeneic Coculture-induced Neuronal Differentiation in Human Glandular and Skin-derived Stem Cells”

## 1. Abstract

In the adult organism, stem cells play an important role in homeostasis and tissue regeneration and thereby possess a restricted differentiation potential. However, there are some sources, offering stem cells with promising characteristics: Stem cells from glandular tissues like pancreas, salivary glands and even human skin have already shown high differentiation potential and enormous regeneration capability. In this work a new glandular stem cell source could be located – the sweat gland. A protocol was established to isolate stem cells from human sweat glands and to keep them successfully in long-term culture. Together with other stem cell populations from pancreas, parotid and skin, this new stem cell population was tested on the expression of various stem cell and differentiation markers. Thereby, the similarity of glandular and skin-derived stem cell populations could be demonstrated. They were expressing various stem cell specific markers as well as markers for the three embryonic germ layers ectoderm, mesoderm, and endoderm. In particular, the neuroectodermal differentiation capability proved to be promising for pioneering experiments on guided neuronal differentiation. Therefore, a xenogeneic coculture system was established where human stem cells from pancreas, parotid, skin and sweat glands were cultivated together with rat brain biopsies for two days, sharing the same cultivation medium but separated by a porous membrane. That way, stem cell differentiation could be influenced by all factors secreted by the biopsies. The results indicate that there is the potential for guided neuronal differentiation in adult stem cells, which could be induced by the proposed treatment. This was shown by a morphological change towards a neuron-like phenotype with axon-like processes up to 450  $\mu\text{m}$  length. Furthermore, an increased mRNA and protein expression for neuron-specific structural proteins (neurofilaments) and enzymes (neuron-specific enolase and protein gene product 9.5) could be demonstrated. It was also revealed that the neuronal differentiation potential is rising from skin-derived stem cells, over stem cells from sweat

## 1. Abstract

glands and parotid with the highest potential in pancreatic stem cells. Moreover, in pancreatic stem cells a high increase (+273 %) in the intracellular amount of the neurotransmitter dopamine could be detected after stimulation, corroborating the assumption of guided neuronal differentiation. To determine factors that are responsible for the induced differentiation, the cultivation medium from the coculture as well as from the cultured stem cells and brain biopsies separately were analyzed for various growth factors. It turned out that neurotrophic factors, playing a role in brain injury, were released by the brain biopsies (basic fibroblast growth factor) and even from the stem cells themselves. Interestingly, it could also be shown that in the coculture an interaction between the stem cells and brain biopsies appears to happen, resulting in the additional expression of growth factors only detectable in the coculture (amphiregulin and granulocyte macrophage colony-stimulating factor). This interaction together with the ability to induce a guided neuronal differentiation in adult human stem cells makes this coculture system a promising tool to predict stem cell behavior after transplantation in the context of neuroregenerative cell replacement therapies. A prerequisite for the use of adult stem cells in such therapeutic approaches is the accessibility and abundant availability of donor tissues, which is apparently given for skin, sweat glands and even parotid. On the other hand, the enormous neuronal differentiation potential of pancreatic stem cells offers new perspectives for *in vitro* test systems in example for drug discovery.

## 2. Einleitung

## **2. Einleitung**

### ***2.1 Stammzellen***

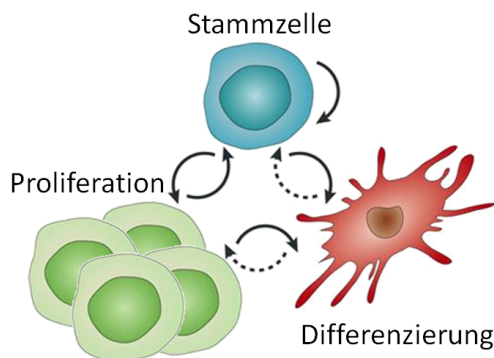
#### **2.1.1 Embryonalentwicklung und Abstammung der Organe**

Alles Leben entsteht aus einer einzelnen Zelle, der Zygote. Von der Befruchtung bis zum 8-Zell-Stadium sind die Zellen der Zygote totipotent. Das heißt, jede einzelne Zelle hat die Fähigkeit, einen vollständigen Organismus hervorzubringen. Voraussetzung hierfür ist nicht nur eine Differenzierungskapazität in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, aus denen später alle somatischen Zellen hervorgehen, sondern auch in Trophoblastenzellen, die sich zu dem embryonalen Teil der Plazenta entwickeln. Bis zum Morulastadium teilen sich die Zellen, bevor am fünften Tag der Embryonalentwicklung das erste Differenzierungsereignis stattfindet. Durch Umorganisation und Zusammenschluss von Zellverbänden entsteht die Blastozyste. Diese besteht aus zwei Zelltypen: der inneren Zellmasse und den äußeren Trophoblastenzellen. Ab diesem Zeitpunkt sind die Zellen der inneren Zellmasse pluripotent, aus ihnen allein kann sich kein lebensfähiger Organismus mehr entwickeln, sie sind jedoch der Ursprung aller somatischen Gewebe. Zunächst entsteht die zweiblättrige Keimscheibe, die aus dem nach außen gerichteten Ektoderm und dem zur Blastozystenhöhle gewandten Endoderm besteht. Im Laufe der Entwicklung beginnen mesodermale Zellen zwischen das ektodermale und endodermale Keimblatt einzuwandern. In dem dreiblättrigen Keimblatt haben die Zellen ein multipotentes Entwicklungspotential, sie können nur noch in die verschiedenen Zelltypen ihres Keimblattes differenzieren. So entsteht während der Organogenese durch Proliferation und zunehmende Spezialisierung der Zellen die Vielfalt an Geweben und Organen, die einen erwachsenen Organismus ausmacht. Aus dem Ektoderm gehen beispielsweise die Haut inklusive der Hautanhangsgebilde, die Ohrspeicheldrüse (Parotis) und das zentrale und periphere Nervensystem hervor, während sich aus dem Mesoderm z. B. die Blutzellen und die Blutgefäße, die Knochen sowie die Skelettmuskulatur herausbilden. Aus dem Endoderm gehen beispielsweise der Darm, die Leber und Drüsen wie das Pankreas und die Unterkieferspeicheldrüse (Submandibularis) hervor.

## 2. Einleitung

### 2.1.2 Definition einer Stammzelle

Während der Embryonalentwicklung sind es zunächst die totipotenten, dann die pluripotenten und im Laufe der Entwicklung die multipotenten Stammzellen, die schließlich über terminale Differenzierung zur Entwicklung der Gewebe und Organe eines Organismus führen (siehe 2.1.1). Mit der Spezialisierung verlieren die Stammzellen zwar immer mehr an Potential, bleiben jedoch bis in den adulten Organismus erhalten und stellen dort eine Grundlage für die Homöostase und Regeneration der Organe dar (siehe 2.1.5) [Weissman, 2000]. Generell kann man Stammzellen daher als jene undifferenzierten Zellen eines Embryos, Fetus oder geborenen Individuums bezeichnen, die die Fähigkeit besitzen, sich durch symmetrische Teilung selbst zu erneuern sowie auch in der Lage sind, sich durch asymmetrische Teilung nicht nur selbst zu erneuern, sondern sich auch in einen spezialisierten Zelltyp zu entwickeln (Abbildung 1) [Molofsky et al., 2004].



**Abbildung 1 | Die Stammzelle.** Eine Stammzelle zeichnet sich zum einen dadurch aus, dass sie sich durch Teilung (Proliferation) selbst erneuern kann und zum anderen durch ihre Fähigkeit in spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Diese Differenzierung ist in der Regel unter physiologischen Bedingungen endgültig und nicht umkehrbar. Quelle: nach Zipori (2004).

## 2. Einleitung

### 2.1.3 Der Grundgedanke der Stammzellforschung

Beim adulten Menschen sind die Gewebe und Organe nur noch zu einer eingeschränkten Regeneration in der Lage. Während bei dem Schwanzlurch Axolotl gesamte Gliedmaßen und Teile des Nervensystems regenerieren können [Kragl et al., 2009] und man beim Zebrafisch 20 % des Herzens entfernen und es sich regenerieren kann [Poss et al., 2002], steht beim Menschen der Wundverschluss durch Narbenbildung und nicht die Rekonstruktion beschädigter Gewebe im Vordergrund [Gurtner et al., 2008]. Lediglich einzelne Zellen oder kleinere Gewebefragmente können ersetzt werden. Eine Ausnahme stellt die Leber dar, von der seit langem bekannt ist, dass sie ein enormes Regenerationspotential aufweist. Entfernt man bis zu 70 % der Leber, kann sich der restliche Teil wieder zu einem vollständigen, voll funktionsfähigen Organ entwickeln [Pack et al., 1962]. Die moderne Medizin würde das gerne auch für Organe und Gewebe ermöglichen, die nicht über ein so hohes Regenerationspotential verfügen oder deren Regenerationsfähigkeit gestört ist. Da man bisher nicht in der Lage ist, fertig ausdifferenzierte Gewebezellen in der Zellkultur zu vermehren, setzt man große Hoffnung auf Stammzellen, die ein hohes Proliferationspotential aufweisen und die Fähigkeit besitzen, sich in spezialisierte Zelltypen zu entwickeln.

Bereits 1908 postulierte der russische Histologe Alexander Maksimov auf einem Kongress die Existenz von Stammzellen. Die von ihm beschriebenen Stammzellen sollten einen Teil des blutbildenden Systems darstellen. Damals wusste Maksimov noch nicht, dass diese Stammzellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben, in der Medizin eine wichtige Rolle spielen werden. Knochenmarkstammzellen sind unter anderem für die Homöostase des Blutes zuständig und seit 1959 die erste Knochenmarktransplantation durchgeführt wurde [Mathe et al., 1959], ist die Transplantation von Knochenmarkstammzellen fester Bestandteil bei der Behandlung von Erkrankungen, die das Blut oder seine Stammzellen betreffen.

Die Manipulation von Stammzellen in der Zellkulturschale (*in vitro*) sowie die gezielte Anwendung solcher Zellen im Menschen (*in vivo*) könnten bei der Behandlung vieler Erkranken-

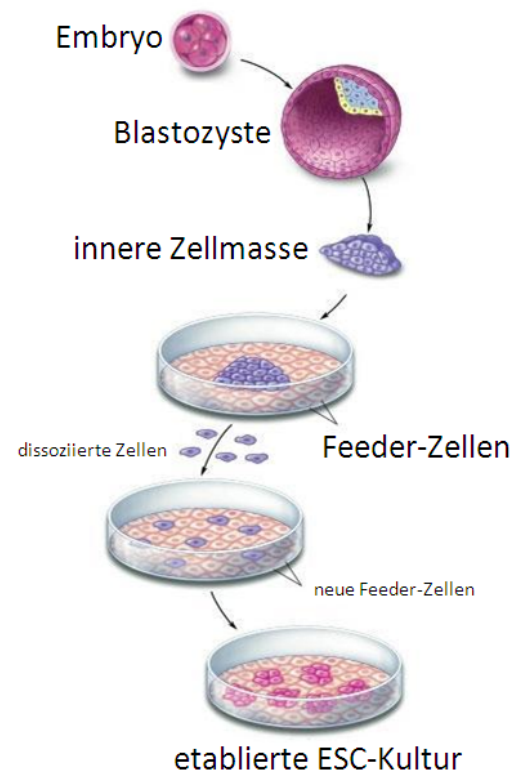
## 2. Einleitung

kungen dienlich sein. Beispielsweise könnten aus Stammzellen differenzierte Insulinproduzierende Betazellen helfen, Diabetes entgegen zu wirken. Oder Kardiomyocyten, die aus Stammzellen hervorgegangen sind, könnten nach einem Herzinfarkt zur Regeneration des geschädigten Gewebes beitragen. Und auch der Einsatz von Stammzellen zur Behandlung neurodegenerativer Krankheiten könnte zur Heilung oder zumindest zu einer Linderung der neurologischen Symptome führen. Voraussetzung dafür ist, Stammzellen zur Verfügung zu haben, die über das notwendige Differenzierungspotential verfügen und ohne ein Risiko für den Patienten transplantiert werden können.

## 2. Einleitung

### 2.1.4 Embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen

Vor 30 Jahren ist es der Arbeitsgruppe um Evans gelungen, aus der inneren Zellmasse der Blastozyste von Mäusembryonen Zellen zu isolieren und zu kultivieren – die Geburtsstunde der embryonalen Stammzellen [Evans and Kaufman, 1981]. Fast 20 Jahre später konnten auch die ersten humanen embryonalen Stammzellen (*human Embryonic Stem Cells*, hESCs) in Kultur genommen werden [Thomson et al., 1998]. Um hESCs zu generieren werden Embryonen, die im Rahmen der künstlichen Befruchtung *in vitro* erzeugt, jedoch nicht zum Einsatz gekommen sind, verwendet. Aus der inneren Zellmasse der Embryonen, die aus etwa 30 bis 34 Zellen besteht, werden die hESCs gewonnen (Abbildung 2) [Bishop et al., 2002]. Um die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung zu erhalten, erfolgt die Kultivierung der hESCs im klassischen Isolationsprotokoll in Gegenwart sogenannter Feeder-Zellen, meist primäre embryonale Fibroblasten der Maus [Thomson et al., 1998]. *In vitro* zeichnen sich hESCs dadurch aus, dass sie unbegrenzt proliferieren können und in der Lage sind, in Zelltypen der drei Keimblätter und Zellen der Keimbahn zu differenzieren. Des Weiteren haben hESCs die Eigenschaft, nach Implantation *in vivo* Teratome zu bilden [Thomson et al., 1998].



**Abbildung 2 | Isolation embryonaler Stammzellen.** Embryonale Stammzellen (ESCs) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und auf Feeder-Zellen, meist primäre embryonale Fibroblasten der Maus, kultiviert. Quelle: nach Winslow (2001).

2007 ist es einer Arbeitsgruppe um Yamanaka erstmals gelungen, sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) aus adulten ausdifferenzierten Zellen des Men-

## 2. Einleitung

schen zu generieren, die sehr ähnliche Eigenschaften wie hESCs aufweisen [Takahashi et al., 2007]. Grundlage für die iPS-Zellen stellten humane dermale Fibroblasten dar, die mit den vier Transkriptionsfaktoren *Octamer-binding Transcription Factor 4* (Oct-4), *SRY (Sex determining Region Y)-Box 2* (Sox2), *Krüppel-like Factor 4* (Klf-4), und c-Myc retroviral transduziert wurden. Fast zeitgleich konnte eine Arbeitsgruppe um Thomson mit Hilfe der vier Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox2, NANOG und Lin28 ganz ähnliche Stammzellpopulationen generieren [Yu et al., 2007]. iPS-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl in der Genexpression, dem Proliferationsverhalten, der Morphologie als auch den Oberflächenmarkern den hESCs stark ähneln. Zudem zeigen die Zellen ein pluripotentes Differenzierungsverhalten, da sie in der Lage sind, Zelltypen der drei Keimblätter zu generieren. Ähnlich wie zuvor für hESCs gezeigt wurde [Thomson et al., 1998], bilden iPS-Zellen nach Implantation in immundefiziente Mäuse Teratome, die Zellen des Ekto-, Meso- und Endoderms beinhalten [Yu et al., 2007]. Weitere Ergebnisse von der Arbeitsgruppe um Yamanaka zeigen, dass es auch ohne den Faktor c-Myc möglich ist, iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten zu generieren [Nakagawa et al., 2008]. Da jedoch das Verfahren zur Herstellung von iPS-Zellen auf die virale Transduktion von Vektoren angewiesen ist und diese Vektoren ins Genom integrieren, ist die Gefahr von Mutationen sehr hoch und der Nutzen dieser Zellen für forschungsorientierte und klinische Anwendungen zum jetzigen Stand der Forschung stark limitiert.

## 2. Einleitung

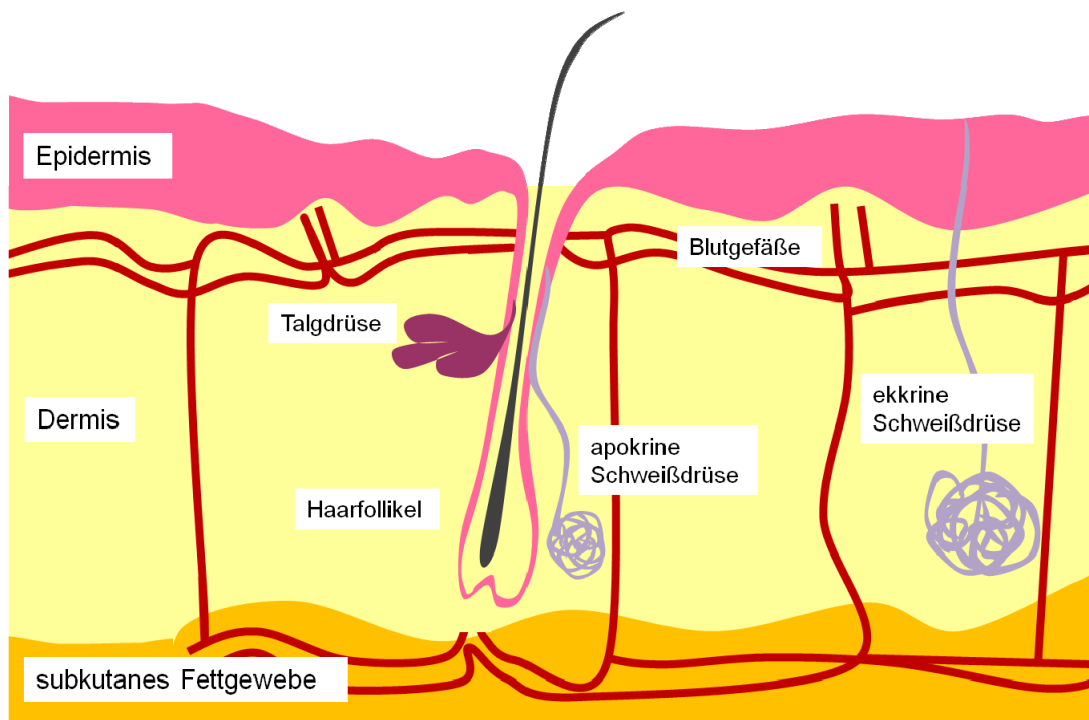
### 2.1.5 Adulte Stammzellen

Im erwachsenen Organismus spielen adulte Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Homöostase und der Regeneration von Geweben. Demnach sind sie in der Lage, terminal differenzierte Zellen mit den entsprechenden funktionellen Eigenschaften zu generieren. Dies kann im Zusammenhang mit dem physiologischen Zellumsatz als auch aufgrund von Gewebeschäden geschehen. Zu finden sind adulte Stammzellen in spezifischen Nischen fast aller Gewebe des adulten Organismus, wobei sie für diese vorwiegend spezifisch sind, wie beispielsweise hämatopoietische Stammzellen des blutbildenden Systems [Baum et al., 1992], mesenchymale Stammzellen des Bindegewebes [Pittenger et al., 1999], epidermale Stammzellen der Haut [Watt, 1998], neurale Stammzellen des zentralen Nervensystems [Kukekov et al., 1999] und intestinale Stammzellen des Darms [Yatabe et al., 2001]. Adulte Stammzellen werden in der Regel in multi-, oligo- und unipotente Stammzellen untergliedert. Multipotente Stammzellen können in verschiedene Zelltypen eines Keimblattes differenzieren, oligopotente Stammzellen sind wesentlich limitierter in ihrer Differenzierungskapazität und unipotente Stammzellen sind nur noch in der Lage in einen einzigen Zelltyp zu differenzieren [Wagers and Weissman, 2004]. Adulte Stammzellen weisen *in vitro* zwar ein hohes Proliferationspotential auf, können aber im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht unbegrenzt lange in Kultur gehalten werden [Young and Black, 2004]. Eine keimbahnübergreifende Differenzierung ist bei adulten Stammzellen eher die Ausnahme. Selten kann es dazu kommen, dass Zellen transdifferenzieren, d.h. dass sich ausdifferenzierte Zellen über eine Reprogrammierung zu Zellen einer anderen Keimblattanlage entwickeln [Metcalf, 1999]. Es sind jedoch auch Stammzellpopulationen beschrieben worden, die *in vitro* ein sehr hohes keimblattübergreifendes Differenzierungspotential aufweisen und daher multi- bis pluripotent sind. Diese Stammzellen können beim Menschen beispielsweise aus Drüsengeweben wie dem Hoden [Golestaneh et al., 2009, Kossack et al., 2009], dem Pankreas [Kruse et al., 2004, Seeberger et al., 2006] oder den Speicheldrüsen [Rotter et al., 2008] isoliert werden. Auch humanen mesenchymalen Stammzellen wird zum Teil ein keimblattübergreifendes Differenzierungspotential zugeschrieben [Jiang et al., 2002].

## 2. Einleitung

### 2.1.5.1 Adulte Stammzellen aus der menschlichen Haut

Viele Bestandteile humaner Haut werden als Nische verschiedenartiger Stammzellpopulationen beschrieben (Abbildung 3). So konnten Stammzellen aus der Epidermis [Jones and Watt, 1993] und dem subkutanen Fettgewebe [Gimble et al., 2007] isoliert werden. Ferner wurden unterschiedliche Stammzellpopulationen aus der Dermis gewonnen. Toma et al. konnten zeigen, dass es sogenannte *Skin-derived Precursors* (SKPs) in der mensch-



**Abbildung 3 | Nischen verschiedenartiger Stammzellpopulationen in der humanen Haut.** In der menschlichen Haut findet man Stammzellen in der Epidermis, der Dermis und dem subkutanen Fettgewebe. Aber auch aus Hautanhangsgebilden wie den Haarfollikeln können Stammzellen isoliert werden. Talg- und Schweißdrüsen stellen potentielle Stammzellquellen in der Haut dar. Quelle: nach Petschnik et al. (2010).

lichen Dermis gibt, die Ähnlichkeiten mit den embryonalen Neuralleistenstammzellen aufweisen [Toma et al., 2001, Toma et al., 2005]. Auch multipotente Stammzellen, die mesenchymalen Stammzellen ähneln [Bartsch et al., 2005], und dermale Fibroblasten mit multipotenten Eigenschaften [Chen et al., 2007, Bi et al., 2010] konnten aus der Dermis isoliert werden. Daneben sind auch in Hautanhangsgebilden wie den Haarfollikeln

## 2. Einleitung

Stammzellen identifiziert worden [Yu et al., 2007]. Weitere Hautanhangsgebilde wie die Talg- und Schweißdrüsen stellen darüber hinaus potentielle Stammzellquellen dar [Kruse et al., 2006a, Tiede et al., 2007]. Neben jenen Stammzellen der Haut, die aus ganz bestimmten Kompartimenten isoliert werden, gibt es auch Stammzellpopulationen, die durch eine einfache Isolationstechnik aus Vollhaut gewonnen werden können [Kruse et al., 2006a]. Diese Populationen zeichnen sich dadurch aus, dass sie den Marker Nestin in 10 % bis 20 % der Zellen exprimieren. Nestin ist ein Intermediärfilament, welches 1985 von Hockfield und McKay mittels Immunocytochemie identifiziert wurde [Hockfield and McKay, 1985]. Zunächst wurde angenommen, Nestin sei ausschließlich ein Marker für neurale Stammzellen [Yaworsky and Kappen, 1999]. Da Nestin allerdings auch in anderen Progenitor- und Stammzellen detektiert werden konnte [Wiese et al., 2004, Toma et al., 2005], ist heutzutage die Expression dieses Markers als ein generelles Charakteristikum adulter Stammzellen anerkannt. In menschlicher Haut wird Nestin ausschließlich im Mesenchym der Haarfollikel, der Talgdrüsen und der Schweißdrüsen exprimiert [Tiede et al., 2009].

Für die Stammzellen, die aus der Vollhaut des Menschen isoliert werden, wurde gezeigt, dass sie viele Eigenschaften mit pankreatischen Stammzellen gemeinsam haben (siehe 2.1.5.2) [Kajahn et al., 2008] und spontan in die neuronale und gliale Richtung differenzieren können [Kruse et al., 2006a].

## 2. Einleitung

### 2.1.5.2 Adulte Stammzellen aus dem Pankreas und den Speicheldrüsen des Menschen

Stammzellen aus dem humanen Pankreas (*Pancreatic Stem Cells*, PSCs) weisen *in vitro* ein hohes Differenzierungspotential auf. Publikationen beschreiben für Stammzellen aus den pankreatischen Gängen einen mesenchymalen Charakter [Lin et al., 2006] und eine keimblattübergreifende Differenzierung in mesodermale und endodermale Zellen [Seeberger et al., 2006]. Für Stammzellen, die aus pankreatischen Acini gewonnen werden, wurde neben der endo- und mesodermalen Differenzierung auch ein ektodermales Differenzierungspotential aufgezeigt [Kruse et al., 2004].

Über den exakten Ursprung dieser Zellen ist jedoch nicht viel bekannt. Diesbezüglich haben Rapoport et al. berichtet, dass es die *in vitro*-Kultivierung an sich ist, die dazu führt, dass aus adulten Zellen des menschlichen exokrinen Pankreas Zellen mit typischen Stammzeleigenschaften werden [Rapoport et al., 2009]. Um das zu beweisen, wurden Acini, die über mechanische Zerkleinerung und enzymatischen Verdau aus dem exokrinen Teil des Pankreas gewonnen wurden, in Kultur genommen. Eine zeitraffermikroskopische Observation ließ erkennen, dass die Acini an die Plastikoberfläche der Kultivierungsschale anhafteten und mit der Zeit Zellen aus den Acini auswuchsen. Es konnte gezeigt werden, dass eine beträchtliche Anzahl pankreatischer Zellen eine Trypsinierung überlebte und die verbliebenen Zellen eine drastische Veränderung im Proteinexpressionsprofil aufzeigten. Zuvor exprimierten die Zellen noch typische Marker des exokrinen Pankreas, wie beispielsweise Amylase, nun wiesen sie typische Stammzellmarker, wie Nestin oder Oct-4, auf. Es konnte eine heterogene Zellpopulation mit typischen Charakteristika multipotenter Stammzellen beobachtet werden. Neben der Expression von spezifischen Stammzellmarkern zeigten die Zellen ein hohes Proliferationspotential und konnten spontan in Zelltypen von zumindest zwei Keimblättern (Ektoderm und Mesoderm) differenzieren. Daher propagieren Rapoport et al., dass durch die Isolation und Kultivierung der Zellen eine Dedifferenzierung in einen Stammzellzustand stattgefunden haben muss.

## 2. Einleitung

Für humane PSCs konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Expression der aufgefundenen Marker, die charakteristisch für eine spontane Differenzierung der Zellen sind, über die Passagen hinweg steten Schwankungen unterliegt [Ciba et al., 2009]. Da der Mechanismus, der einer spontanen Differenzierung adulter Stammzellen zugrunde liegt, weitestgehend ungeklärt ist, haben die Autoren das Differenzierungsverhalten der humanen PSCs über elf Passagen untersucht und herausgefunden, dass das Expressionsverhalten der Zellen von Passage zu Passage stark variiert. Da eine Zellkultur kein hermetisch abgeschlossenes System ist und komplexen dynamischen Strukturen unterliegt, nehmen sie an, dass die spontanen Differenzierungsvorgänge durch mehr oder weniger zufällige Stimuli induziert werden. Diese Reize können aus der spezifischen Mikroumgebung der Zellen kommen, wie der Zell-Zell-Kommunikation über lösliche und nicht-lösliche Faktoren, oder aus der Makroumgebung, die durch die Kultivierungsbedingungen, wie den Gaspartialdruck, den pH-Wert oder die Temperatur, bestimmt wird. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Differenzierung humaner PSCs gesteuert werden kann. Durch den Einsatz von Retinsäure konnte ganz gezielt eine Differenzierung in glatte Muskelzellen induziert und durch Verwendung von Dimethylsulfoxid inhibiert werden [Petschnik et al., 2009]. Die Möglichkeit der Einflussnahme zeigt das Potential dieser wie auch anderer glandulärer Stammzellen für Zellersatztherapien, bei denen glatte Muskelzellen von Interesse sind [Petschnik et al., 2010a].

PSCs können nicht nur aus dem menschlichen Pankreas, sondern beispielsweise auch aus dem Pankreas von Mäusen [Choi et al., 2004, Seaberg et al., 2004] oder Ratten [Kruse et al., 2006b] gewonnen werden. Insbesondere für die PSCs aus Ratten konnte eine bemerkenswerte Differenzierungskapazität aufgezeigt werden. Neben einer spontanen Differenzierung in Zelltypen der drei Keimblätter [Kruse et al., 2006b] konnte für eine klonale Linie der Ratten PSCs die Differenzierung in oocytenähnliche Zellen nachgewiesen werden [Danner et al., 2007]. Die PSCs aus der Ratte wurden zudem auf ihr Regenerationspotential in einem Wundheilungsmodell bei Mäusen ausgetestet. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Vollhautwunde, die mit einer zellbesiedelten Kollagenmatrix abgedeckt wird, zweimal schneller heilt und eine um den Faktor 1,5 verbesserte Vaskularisierung

## 2. Einleitung

aufweist als eine unbehandelte Vollhautwunde [Salem et al., 2009]. Vergleichbare Ergebnisse konnten durch den Einsatz von Stammzellen aus dem murinen Pankreas und der murinen Submandibularis erzielt werden [Egaña et al., 2009].

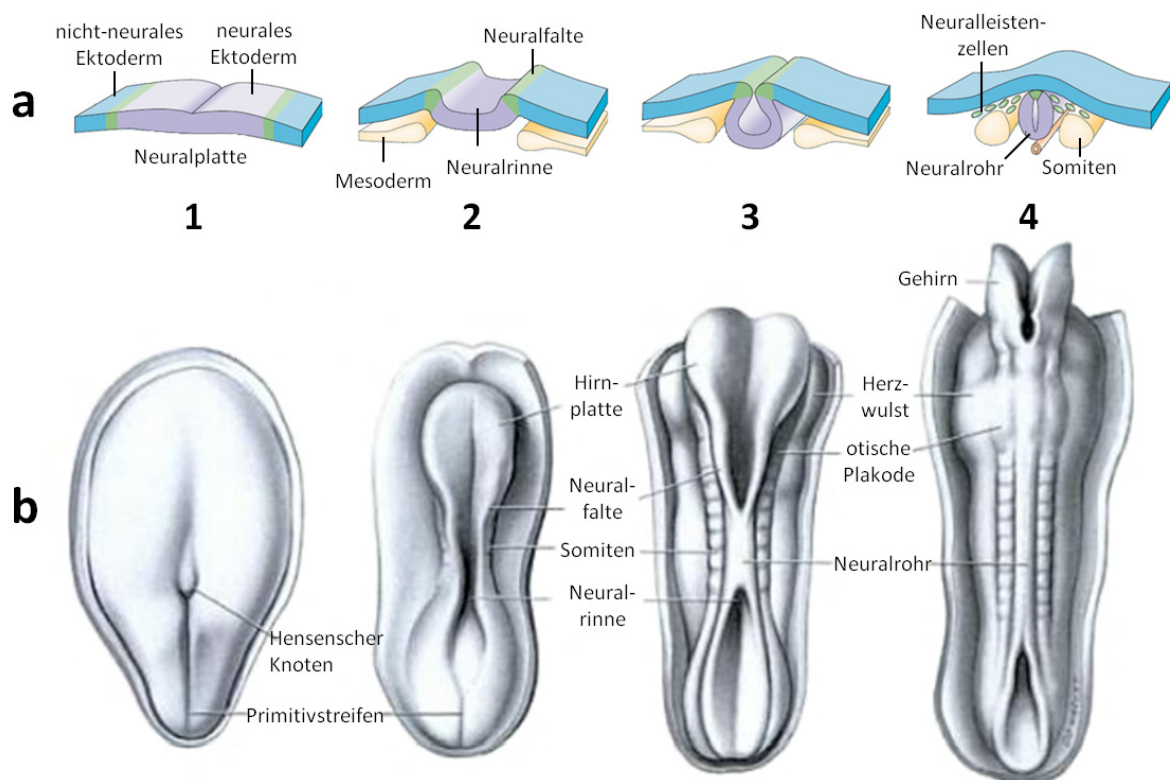
Dass Stammzellen aus dem Pankreas und den Speicheldrüsen bezüglich der Protein- und Genexpression *in vitro* eine starke Ähnlichkeit aufweisen, konnten Gorjup et al. in einer Vergleichsstudie von humanen PSCs und Stammzellen aus der Submandibularis zeigen [Gorjup et al., 2009]. Neben einer gerichteten Differenzierung in die mesodermale Richtung haben die Autoren auch eine spontane Differenzierung in Zelltypen des Neuroektoderms beobachten können. Ferner können auch aus der menschlichen Parotis Stammzellen mit multipotenten Eigenschaften isoliert werden. Für diese Zellpopulation wurde bisher eine mesodermale Differenzierung in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung aufgezeigt [Rotter et al., 2008].

## 2. Einleitung

### 2.2 Das menschliche Nervensystem

#### 2.2.1 Der embryonale Ursprung des Nervensystems

Bei der Embryogenese, der Frühentwicklung eines Lebewesens, entstehen während der Blastulation und der Gastrulation die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Aus mehreren Regionen der Keimblätter bilden sich anschließend während



**Abbildung 4 | Die Neurulation.** Die laterale (a) und dorsale Ansicht (b) eines Embryos zeigt sowohl neurales (inkl. Neuralplatte) und nicht-neurales Ektoderm als auch den Primitivstreifen und den Hensenschen Knoten eines 16 Tage alten Embryos (1). Am Tag 20 kommt es durch die Anhebung der Seitenränder der Neuralplatte zur Bildung der Neuralrinne und somit zur Entstehung der Neuralrinne (2). Des Weiteren sind die ersten Somiten zu erkennen. Zum 7-Somiten-Stadium ist der Embryo etwa 22 Tage alt (3). Mit der Schließung der Neuralrinne entsteht das Neuralrohr. Das Neuralrohr stellt die primordiale Anlage des zentralen Nervensystems dar, wobei sich aus dem oberen Ende die Hirnplatte herausbildet. Am Tag 23 der Embryonalentwicklung ist das Neuralrohr vollständig geschlossen (4). Gut zu erkennen ist die otische Plakode, aus der später das Innenohr hervorgehen wird. Aus der Hirnplatte wird sich das Gehirn entwickeln, während der Hohlraum des Neuralrohrs als Ventrikelsystem des Gehirns und als zentraler Kanal des Rückenmarks erhalten bleibt. An dem Übergang vom Hautektoderm zum Neuralrohr haben sich Neuralleistenzellen herausgebildet. Aus einem Teil dieser Zellen wird sich das periphere Nervensystem entwickeln. Quelle: nach Gammill und Bronner-Fraser (2003) und Noback et al. (2005).

## 2. Einleitung

der Organogenese die Organe heraus (siehe 2.1.1). Die Entwicklung des menschlichen Nervengewebes beginnt mit der Entstehung des Ektoderms, wenn der menschliche Embryo etwa 18 Tage alt und somit ca. 1,5 mm groß ist (Abbildung 4) [Noback et al., 2005]. Bestimmte Teile des Ektoderms differenzieren, verdicken sich in der Kopfregion und bilden so genannte Plakoden. Eine besonders große Plakode stellt die Neuralplatte dar; aus den anderen Plakoden gehen später die Sinnesorgane (Augen, Ohren, Nase) hervor. Die Verlängerung und die Anhebung der Seitenränder der Neuralplatte führen zur Bildung der Neuralfalte und der gleichzeitigen Entstehung der Neuralrinne. Mit der Schließung der Neuralfalte entsteht das Neuralrohr. Aus dem oberen Ende des Neuralrohrs bildet sich das Gehirn aus, während der Hohlraum des Neuralrohrs als Ventrikelsystem des Gehirns und als zentraler Kanal des Rückenmarks erhalten bleibt. Beidseitig vom Neuralrohr bilden sich aus dem neuralen Ektoderm Zellen heraus, die ihren Ursprung im Übergang vom Hautektoderm zu den einrollenden Falten des Neuralrohrs haben. Diese Zellen bilden die Neuralleiste. Während das Neuralrohr die primordiale Anlage des zentralen Nervensystems (ZNS) darstellt, entsteht aus der Neuralleiste eine Anzahl neuraler und nicht-neuraler Derivate. Die neuralen Derivate bilden im Laufe der weiteren Entwicklung das periphere Nervensystem (PNS) [Noback et al., 2005].

## 2. Einleitung

### 2.2.2 Vielfalt der Zellen des zentralen- und peripheren Nervensystems

100 bis 200 Milliarden Nervenzellen und noch viel mehr Gliazellen sind in die strukturelle und funktionelle Einheit des Gehirns involviert, wobei sie in ihrer Größe und Form stark variieren können (Abbildung 5).

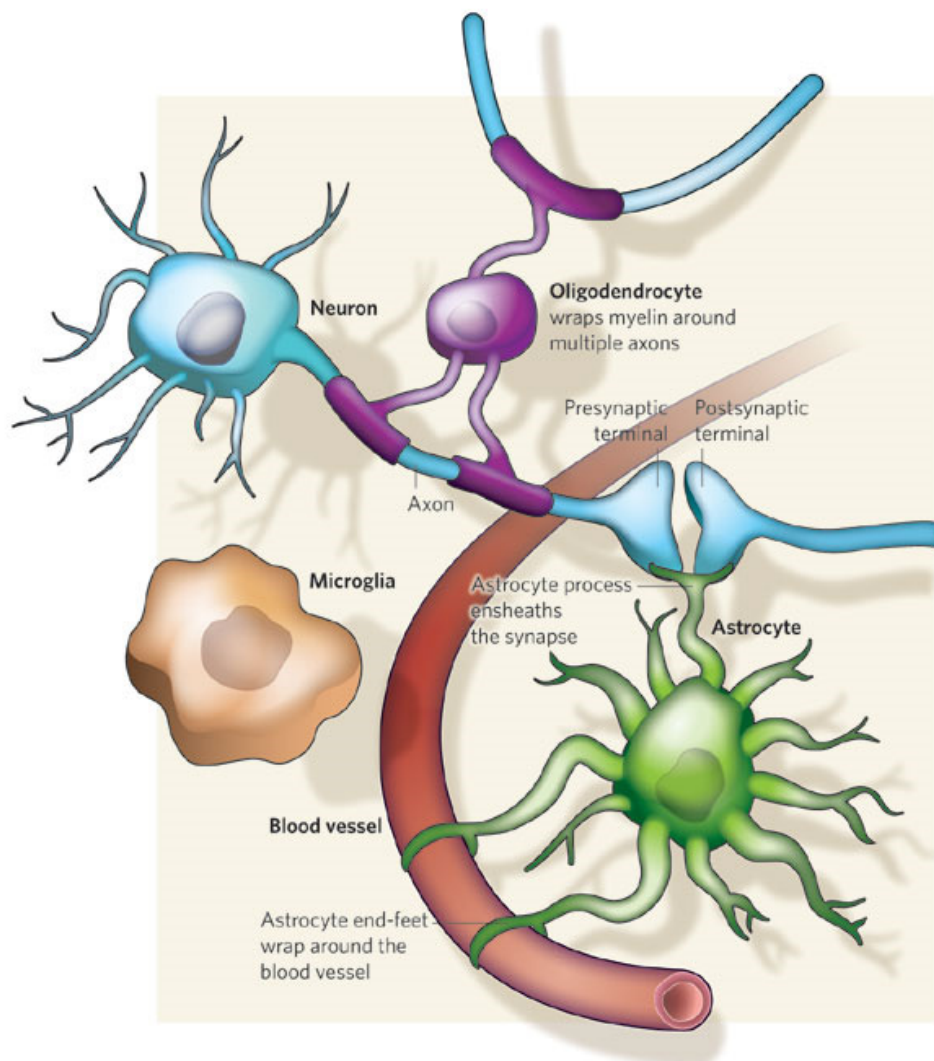
Die Nervenzelle bildet die Basis des Nervensystems und besteht aus vier strukturell zu unterscheidenden Regionen: einem Zellkörper (Soma), von dem ein einzelner Ausläufer ausgeht (Axon), der in der präsynaptischen Endigung mündet, sowie einer variablen Anzahl verzweigter Ausläufer (Dendriten). Der Zellkörper stellt das genomische und metabolische Zentrum eines Neurons dar. In den Dendriten werden neuronale Signale von anderen Nervenzellen empfangen, womit diese zur Kommunikation zwischen den Nervenzellen beitragen. Um Informationen an ein anderes Neuron weiter zu geben, werden Aktionspotentiale über das Axon an die präsynaptische Endigung weitergeleitet, wo das Neuron wiederum in Kontakt mit weiteren Nervenzellen steht und somit Teil eines großen Netzwerkes darstellt. Eine Nervenzelle ist so gestaltet, dass sie auf Reize reagieren, die Anregung schnell weiterleiten und letztlich andere Nerven-, Muskel- oder glanduläre Zellen beeinflussen kann. Der hohe Grad der Spezialisierung macht es diesen Zellen kaum möglich, sich nach der Ausdifferenzierung weiter zu teilen; zudem kann schon eine kurze Unterversorgung mit Sauerstoff zum Tod der Zellen führen.

Die Kommunikation der Nervenzellen untereinander wird über Neurotransmitter gewährleistet. Es gibt erregende und hemmende Neurotransmitter, wobei zu den wichtigsten erregenden Neurotransmittern im ZNS das Glutamat [Takamori, 2006] und zu den bedeutendsten hemmenden Neurotransmittern die Gamma-Aminobuttersäure [McCormick, 1989] und das Glycin zählen [Legendre, 2001]. Weitere bekannte Neurotransmitter sind Serotonin, Acetylcholin, Noradrenalin und Dopamin [Bear et al., 2007]. Dopamin ist der Botenstoff dopaminerger Neurone, welche überwiegend im Mittelhirn zu finden sind. Welche Wirkung das Dopamin auf die postsynaptische Nervenzelle hat, ist abhängig von der Art der Rezeptoren, die sich auf der Postsynapse befinden. Ist die Funktion

## 2. Einleitung

dopaminergem Neuron gestört, kann es zu neurologischen Erkrankungen wie der Parkinson-Krankheit kommen (siehe 2.3.1).

Im ZNS und PNS sind neben Nervenzellen auch verschiedenartige Zellen, die eine Stütz- und Versorgungsfunktion ausüben, vorzufinden – die Gliazellen. Im ZNS zählen dazu Astrocyten, Oligodendrocyten, mikrogliale und ependymale Zellen, wobei diese Zellen etwa 50 % des gesamten Hirnvolumens ausmachen und etwa zehn- bis 50-mal häufiger



**Abbildung 5 | Zellen des zentralen Nervensystems.** Um eine schnellere Reizfortleitung zu gewährleisten, bilden Oligodendrocyten im zentralen Nervensystems (ZNS) Myelinscheiden um die Axone der Neurone. Astrocyten stehen in engem Kontakt zu den Synapsen, um dort freigesetzte Neurotransmitter zu recyceln. Endfüßchen der Astrocyten winden sich um die Blutgefäße des ZNS und sorgen so für die Nährstoffversorgung der Nervenzellen. Mikrogliazellen sind die immunkompetenten Zellen des ZNS. Quelle: Allen und Barres (2009).

## 2. Einleitung

vorkommen als Nervenzellen. Während der Entwicklung steuern Gliazellen die Migration der Nervenvorläufer vom Neuroepithel zum jeweiligen Bestimmungsort. Beim Erwachsenen sind Gliazellen maßgebend am Erhalt und der Versorgung von Nervenzellen beteiligt.

Astrocyten besitzen Fortsätze, welche so genannte Endfüßchen ausbilden, die in engem Kontakt zu Neuronen und dem Endothel des Gefäßsystems stehen können. Aufgrund dieser strukturellen Verknüpfung sind Astrocyten in der Lage, Neurone mit Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten aus den Nervenzellen zu gewährleisten. Zudem sind Astrocyten an der Regulation der Durchblutung und an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Mit ihrem reich verzweigten Netzwerk an Fortsätzen stehen Astrocyten auch in engem Kontakt zu Synapsen und recyceln die dort freigesetzten Neurotransmitter. Eine weitere wichtige Funktion ist die Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration. Astrocyten können Kalium, welches durch neuronale Aktivität freigesetzt wird, aufnehmen und über Gap Junctions an benachbarte Astrocyten und somit zu Orten niedriger Kaliumkonzentration umverteilen.

Oligodendrocyten sind im ZNS für die Bildung und den Erhalt von Myelinscheiden verantwortlich. Myelinscheiden sind Plasmamembranausläufer der Oligodendrocyten, die eine vielschichtige Hülle um die Axone der Nervenzellen bilden und somit isolierend auf diese wirken. Dadurch wird eine saltatorische Weiterleitung von Impulsen entlang des Axons ermöglicht. Ein Oligodendrocyt ist in der Lage, bis zu 70 Axone gleichzeitig zu umhüllen. Im PNS stellen Schwann'sche Zellen das Analogon zu den Oligodendrocyten dar, wobei eine Schwann'sche Zelle jeweils nur eine Myelinscheide ausbilden kann.

Mikrogliazellen sind die immunkompetenten Zellen des ZNS und machen etwa 10 % der dortigen Gliazellen aus. Wie ihre Verwandten, die Makrophagen, haben auch Mikrogliazellen ihren Ursprung im Mesoderm und nicht wie die restlichen Gliazellen im Ektoderm. Sie dienen im ZNS als Mediatoren immunologischer Prozesse. Dazu gehört beispielsweise die Phagozytose aber auch die Sekretion proinflammatorischer Cytokine in Folge einer Hirnverletzung. Ähnlich wie die Mikrogliazellen übernehmen im PNS Schwann'sche Zellen

## 2. Einleitung

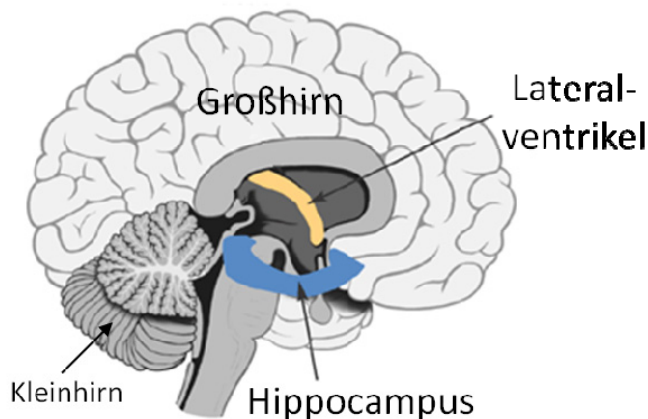
nach Nervenverletzungen oder in Folge von Entzündungen die Phagocytose.

Zu den Gliazellen des ZNS gehören auch die ependymalen Zellen. Diese Zellen kleiden die Liquorräume von Gehirn und Rückenmark aus. Zu ihren Aufgaben gehören die Sekretion und die Zirkulation der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit [Noback et al., 2005].

## 2. Einleitung

### 2.2.3 Neurale Stammzellen und die Neurogenese beim Erwachsenen

In adulten Geweben gewährleisten organspezifische Stammzellen den Ersatz abgestorbener Zellen und tragen so zum Erhalt der Gewebefunktion bei (siehe 2.1.5). Das adulte Gehirn wurde lange Zeit für ein „statisches“ Organ ohne Regenerationskapazität gehalten, bis Kaplan und Hinds 1977 mit Hilfe neuer Methoden die Entstehung von Neuronen aus Zellen des Gyrus dentatus und des Riechkolbens im Gehirn der Ratte zeigen konnten [Kaplan and Hinds, 1977]. Erst mehr als 20 Jahre später ist es Wissenschaftlern gelungen, Neurogenese auch im adulten Gehirn des Menschen zu belegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung neuraler Zellen auf den Hippocampus [Eriksson et al., 1998], die Subventrikuläre Zone [Johansson et al., 1999] und das Olfaktorische System [Pagano et al., 2000] konzentriert ist (Abbildung 6). Darüber hinaus konnte 2007 eine Forschergruppe um Curtis und Eriksson zeigen, dass es einen rostralen Migrationsstrom humaner neuraler Stammzellen aus der Subventrikulären Zone zum Riechkolben gibt

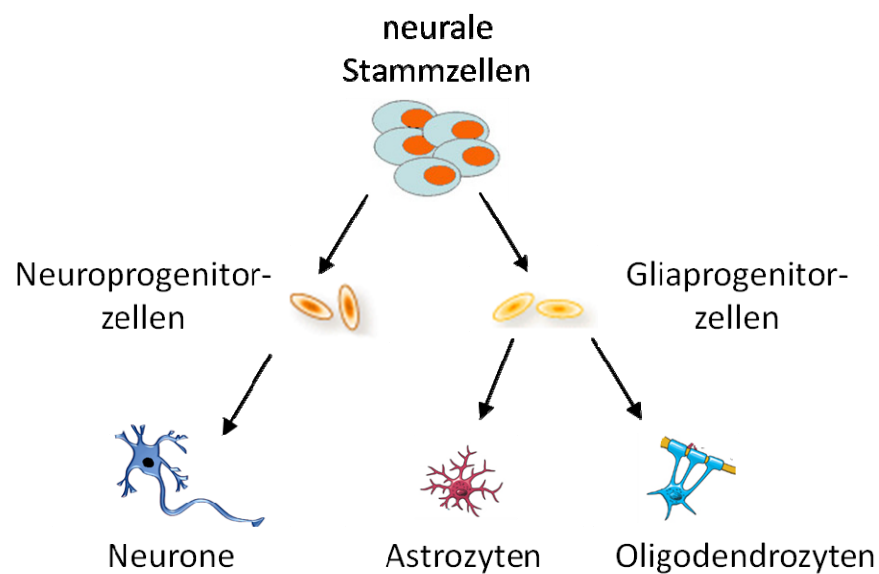


**Abbildung 6 | Hirnregionen adulter Neurogenese.** Neurogenese konnte im adulten Gehirn in zwei Regionen gezeigt werden: dem Gyrus dentatus des Hippocampus und der Subventrikulären Zone der Lateralventrikel, beides Teile des Großhirns. In der Subventrikulären Zone haben auch die Stammzellen des Riechkolbens ihren Ursprung. Quelle: nach Crews und Nixon (2003).

[Curtis et al., 2007]. Neurale Stammzellen aus dem Riechkolben des Menschen konnten bereits 2000 isoliert und *in vitro* vermehrt werden [Pagano et al., 2000] und auch Vorläuferzellen aus der Subventrikulären Zone des menschlichen Gehirns konnten erfolgreich in Kultur genommen werden [Ayuso-Sacido et al., 2008]. Neurale Stammzellen sind multipotent und können über Neuroprogenitorzellen in Neurone und über Gliaprogenitorzellen in Astrocyten und Oligodendrocyten differenzieren (Abbildung 7) [Pagano et al., 2000]. *In vivo* sind adulte Stammzellen in spezifischen Nischen zu finden,

## 2. Einleitung

die die Selbsterneuerung, die Aktivierung und die Differenzierung der Stammzellen regulieren. Diese Nische konnte für neurale Stammzellen der Maus bereits umfassend beschrieben werden. So sind dort die Stammzellen in der Subventrikulären Zone von ependymalen Zellen, die die Lateralventrikel auskleiden, und von einer speziellen Basallamina, die sich von den Blutgefäßen in die Subventrikuläre Zone ausdehnt, umgeben. Zudem liegen bei der Maus neben den neuronalen Stammzellen auch transient amplifizierende Vorläuferzellen vor, aus denen wiederum Neuroblasten hervorgehen, die zum Riechkolben migrieren [Doetsch, 2003].



**Abbildung 7 | Differenzierungspotential neuraler Stammzellen.** Neuronale Stammzellen können sich zunächst in Neuro- oder Gliaprogenitorzellen entwickeln. Aus den Neuroprogenitorzellen differenzieren sich wiederum Neurone und aus den Gliaprogenitorzellen Astrozyten oder Oligodendrocyten heraus.

## 2. Einleitung

### 2.2.4 Generierung neuronaler Zellen aus humanen Stammzellen nicht-neuralen Ursprungs

Stammzellen weisen ein vielfältiges Differenzierungspotential auf und können im Rahmen ihrer Möglichkeiten ohne zusätzlichen Stimulus spontan in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen differenzieren. Da für eine zelltherapeutische Anwendung jedoch ein bestimmtes Spektrum an Zellen benötigt wird, ist es das Ziel vieler Versuchsansätze, über bestimmte Stimuli eine gerichtete Differenzierung der Stammzellen zu erreichen. Zu diesen Stimuli gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren oder chemische Substanzen, die dem Kultivierungsmedium beigeführt werden, die Kultivierung auf unterschiedlichen Oberflächen oder die Kokultivierung der Stammzellen mit anderen Zellen und Geweben.

Während für viele Stammzellen aus den unterschiedlichsten humanen Geweben, wie der Vollhaut [Kruse et al., 2006a], den Haarfollikeln [Toma et al., 2005, Yu et al., 2006], dem Fettgewebe [Zuk et al., 2002], der dentalen Pulpa [Gronthos et al., 2002], dem Muskel [Alessandri et al., 2004] oder glandulären Geweben wie dem Pankreas und den Speicheldrüsen [Kruse et al., 2004, Gorjup et al., 2009] ein spontanes neuronales Differenzierungsverhalten gezeigt wurde, sind für eine gerichtete Differenzierung humaner Stammzellen bisher nur wenige Quellen beschrieben worden. Darunter zu finden sind hESCs [Schuldiner et al., 2001], mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (*human mesenchymal stem cells*, hMSCs) [Woodbury et al., 2000], Stammzellen aus dem Fettgewebe [Safford et al., 2002] und dermale Stammzellen [Joannides et al., 2004].

hESCs besitzen ein hohes Differenzierungspotential, welches es ihnen erlaubt, spontan in die neuronale Richtung zu differenzieren. Darüber hinaus gibt es Protokolle, welche die neuronale Differenzierung gezielt induzieren sollen. Dazu gehören zum Beispiel die Bildung von dreidimensionalen Zellaggregaten, den sogenannten *Embryoid Bodies*, und die Gabe von löslichen Faktoren, wie dem *basic Fibroblast Growth Factor*, dem *Nerve Growth Factor* oder der Retinsäure, zum Kultivierungsmedium [Reubinoff et al., 2001, Schuldiner et al., 2001, Zhang et al., 2001]. Lösliche Faktoren spielen auch bei der Differenzierung von humanen Stammzellen aus dem adulten Organismus eine wichtige

## 2. Einleitung

Rolle. So wurde Retinsäure verwendet, um eine neuronale Differenzierung von hMSCs aus dem Knochenmark zu begünstigen [Cho et al., 2005]. In weiteren Publikationen wurden hMSCs und Stammzellen aus dem Fettgewebe durch den Einsatz von chemischen Substanzen wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, Dimethylsulfoxid oder butyliertem Hydroxyanisol in neuronähnliche Zellen differenziert [Safford et al., 2002, Woodbury et al., 2000]. Des Weiteren wurde eine Kombination chemischer Substanzen mit einem Cocktail verschiedener Cytokine für eine neuronale Differenzierung verwendet [Scintu et al., 2006, Prabhakaran et al., 2009]. Dabei reichte der Mix an Cytokinen vom *Fibroblast Growth Factor*, über den *Epidermal Growth Factor*, den *Brain-derived Growth Factor*, bis hin zum *Nerve Growth Factor*. Die Wirksamkeit chemischer Substanzen, tatsächlich eine neuronale Differenzierung bei Stammzellen hervorzurufen, bleibt jedoch fraglich. So haben Lu et al. berichtet, dass es vielmehr zum Schrumpfen der Stammzellen und damit zum Zurücklassen von feinen Zellausläufern kommt, wenn sie chemischen Substanzen wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, Dimethylsulfoxid oder butyliertem Hydroxyanisol ausgesetzt werden, als zum Wachsen neuer Neuriten [Lu et al., 2004]. Das Schrumpfen der Zellen soll dann letztendlich auch dafür verantwortlich sein, dass vermehrt Zellen immunocytochemisch positiv für neuronale Marker gefärbt, diese Ergebnisse jedoch auf mRNA-Ebene nicht verifiziert werden können. Darüber hinaus soll diese Differenzierung nur ein kurzzeitiges, reversibles Phänomen darstellen [Zurita et al., 2008]. Es gibt aber auch Arbeiten, die eine stabile neuronale Differenzierung von hMSCs beschreiben, die durch den Einsatz von Cytokinen und einer Fibronectin-beschichteten Oberfläche induziert wurde [Tao et al., 2005].

In anderen Ansätzen versuchte man die neuronale Differenzierung nicht nur durch einige wenige Faktoren zu induzieren, sondern von der großen Bandbreite an Faktoren, die von Zellen oder Geweben sezerniert werden, zu profitieren. So konnte gezeigt werden, dass hESCs in Kokultur mit einer murinen stromalen Zelllinie verstärkt eine dopaminerge Differenzierungsrichtung einschlagen [Perrier et al., 2004, Zeng et al., 2004]. Joannides et al. haben für die Kultivierung von dermalen Stammzellen des Menschen ein Medium verwendet, welches zuvor mit neonatalen Gliazellen des Hippocampus konditioniert wurde,

## 2. Einleitung

um so die neuronale Differenzierung zu stimulieren [Joannides et al., 2004]. In anderen Publikationen ist man noch einen Schritt weitergegangen und hat hMSCs direkt mit fetalen Zellen des Mittelhirns und des Striatums kokultiviert und so in einigen Zellen neuronale Marker detektieren können [Sanchez-Ramos et al., 2000]. Darüber hinaus sind Versuche bekannt, bei denen die Kokultur nicht nur mit Zellen, sondern mit striatalen Hirnschnitten durchgeführt wurde [Anwar et al., 2008]. Allerdings handelt es sich bei den stimulierten Zellen um eine neurale Stammzelllinie aus fetalem humanen Gehirn und somit um eine Stammzellpopulation neuralen Ursprungs. Dieser Versuchsansatz zeigt dennoch, dass man bei der Stimulation der neuronalen Differenzierung von den Faktoren, die von Geweben sezerniert werden, profitieren kann.

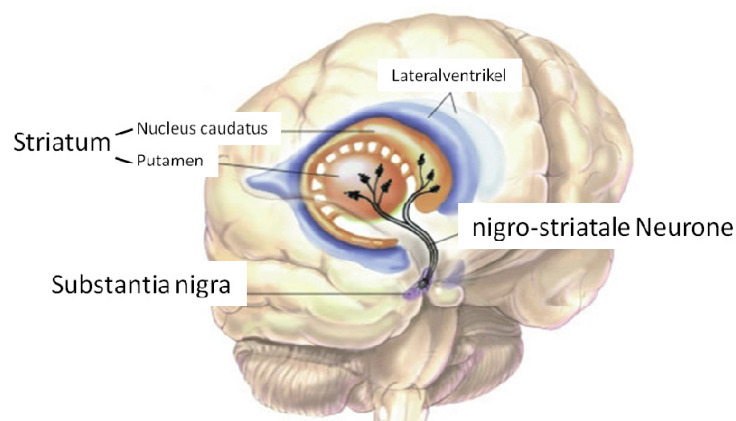
## 2. Einleitung

### ***2.3 Möglichkeiten der Zelltherapie bei Erkrankungen des Nervensystems***

Bei neurodegenerativen Erkrankungen des Nervensystems, wie der Parkinson-Krankheit, dem Schlaganfall oder der Huntington-Krankheit ist jeweils ein anderes Spektrum an Zellen betroffen. Somit wird bei einer möglichen Zellersatztherapie auch eine andere Zusammensetzung neuronaler Zellen benötigt. Im Folgenden sollen der Stand der Forschung, das Potential und die Voraussetzungen, die humane Stammzellen für eine zellbasierte Therapie dieser Erkrankungen mitbringen müssen, aufgezeigt werden.

#### **2.3.1 Zelltherapie zur Behandlung der Parkinson-Symptome**

Die Parkinson-Krankheit ist eine degenerative Erkrankung des Nervensystems, bei der es primär zum Abbau dopaminergener Neurone in der Substantia nigra im Bereich des Mittelhirns kommt (Abbildung 8). Die Neurone der Substantia nigra projizieren in das Striatum, welches in den Nucleus caudatus und das Putamen unterteilt ist. Dieses nigro-striatale dopaminerge System ist vor allem an der Kontrolle willkürlicher Bewegungen beteiligt. Ist der Dopaminfluss gestört, kommt es letztendlich zu den für die Parkinson-Krankheit typi-



**Abbildung 8 | Degenerierende Nervenbahnen bei der Parkinson-Krankheit.** Signale, die die Körperbewegungen kontrollieren, werden entlang von Neuronen, die aus der Substantia nigra ins Striatum projizieren, weitergeleitet. Die dopaminergen Neurone des nigro-striatalen Systems degenerieren bei Parkinson-Patienten. Quelle: nach Winslow (2001).

## 2. Einleitung

schen Symptomen Muskelstarre (Rigor), Muskelzittern (Tremor) und Bewegungsverlangsamung (Bradykinese), aber auch zur Verlangsamung der geistigen Prozesse (Bradyphrenie).

Eine Zellersatztherapie mit dopaminergen Neuronen könnte helfen, dem Dopaminmangel in diesem System entgegen zu wirken. In klinischen Studien wurde Parkinson-Patienten humanes fetales Gewebe des Mittelhirns, welches reich an dopaminergen Neuronen ist, ins Striatum transplantiert. Diese Studien haben gezeigt, dass neuronales Gewebe ersetzt werden kann: Ein Teil der Neurone hat die Transplantation überlebt und konnte das Striatum reinnervieren [Kordower et al., 1995, Piccini et al., 1999]. Selbst 10 Jahre nach der Behandlung und bei einem fortschreitenden Krankheitsverlauf, welcher zur Zerstörung der patienteneigenen dopaminergen Neurone geführt hat, konnten die transplantierten Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Erfolgchancen stark vom Alter und Krankheitszustand des Patienten abhängig waren [Freed et al., 2001].

Aus ethischen Gründen ist es ausgeschlossen, dass die Transplantation von fetalem humanen Mittelhirn zu einer Routinebehandlung für die Parkinson-Krankheit wird, aber anhand der Ergebnisse, die aus diesen Versuchen resultieren, kann eine Reihe von Voraussetzungen für die Stammzelltherapie abgeleitet werden. Zum einen sollten die generierten Zellen zu einer geregelten Dopamin-Ausschüttung in der Lage sein und den Neuronen der Substantia nigra morphologisch und elektrophysiologisch ähneln. Des Weiteren sollte in Tierversuchen belegt werden, dass die dopaminergen Zellen zur Minderung der Krankheitssymptome führen können. Die Anzahl der Zellen, die nach Transplantation ins Putamen überleben und reinnervieren muss, wird dabei auf 100 000 geschätzt [Lindvall et al., 2004]. Da nicht alle transplantierten Zellen überleben und reinnervieren, ergibt sich für die zu transplantierten Zellen eine noch viel höhere Zellzahl, die es zu generieren gilt. Viele Veröffentlichungen beschreiben die Differenzierung dopaminergener Neurone aus hESCs [Perrier et al., 2004, Sonntag et al., 2007, Song et al., 2008, Shimada et al., 2009]. Die Arbeitsgruppe um Perrier hat zur Induktion der dopaminergen Differenzierung hESCs zunächst auf einem Feederlayer aus murinen

## 2. Einleitung

Stromazellen kultiviert und dann sequenziell Wachstumsfaktoren, die bei der embryonalen Entwicklung des Mittelhirns eine Rolle spielen, zum Kultivierungsmedium hinzugeben [Perrier et al., 2004]. Des Weiteren konnten Iacovitti et al. zeigen, dass die Induktion dopaminergener Neurone aus hESCs durch den Einsatz rein humaner Additive möglich ist. Zudem ist es ihnen gelungen zu belegen, dass es nach Transplantation undifferenzierter hESCs ins Striatum eines Parkinson-Rattenmodells zu einer Differenzierung der Stammzellen in dopaminerge Neurone kommt [Iacovitti et al., 2007]. Eine weitere Quelle dopaminergener Neurone stellen die neuralen Stammzellen embryonalen oder fetalen Ursprungs dar. Diese Stammzellen lassen sich ebenfalls mit speziellen Protokollen, meist über lösliche Faktoren, in dopaminerge Neurone differenzieren [Kishi et al., 2005, Liste et al., 2004, Courtois et al., 2010]. Courtois et al. konnten kürzlich zeigen, dass neurale Stammzellen, die aus fetalem humanem Mittelhirn gewonnen wurden, *in vitro* in dopaminerge Neurone differenzieren und *in vivo* in einem Parkinson-Rattenmodell überlebten, innervierten und zu motorischen Verbesserungen geführt haben [Courtois et al., 2010]. Obwohl es viele Publikationen zur Isolation und Kultivierung neuraler Stammzellen des erwachsenen Menschen gibt [Pagano et al., 2000, Wachs et al., 2003, Ayuso-Sacido et al., 2008], ist in der Literatur kaum ein Verweis auf die dopaminerge Differenzierung dieser Zellen zu finden. Weitere humane adulte Stammzellen, in die man große Hoffnung legt, dass sie ein dopaminerges Differenzierungspotential aufweisen, stellen die adulten Stammzellen nicht-neuronalen Ursprungs dar. Dabei konnte in einigen wenigen Publikationen gezeigt werden, dass hMSCs aus dem Knochenmark das Potential besitzen, in einen dopaminergen Phänotyp differenzieren zu können [Tatard et al., 2007, Trzaska et al., 2007].

## 2. Einleitung

### 2.3.2 Zellbasierte Ansätze zur Behandlung von Schlaganfall-Patienten

Unter einem Schlaganfall (medizinisch auch zerebraler Insult genannt) versteht man einen rapiden Verlust von Hirnfunktionen aufgrund von Störungen in der Blutversorgung des Gehirns. Dies kann aufgrund einer Ischämie durch den Verschluss von Blutgefäßen (bedingt durch eine Embolie oder Thrombose) oder durch eine Blutung im Gehirn verursacht werden. Die Folge ist ein Ausfall von Hirnfunktionen, die sich je nach betroffener Hirnregion manifestieren. Ein Schlaganfall im Frontallappen des Großhirns spiegelt sich beispielsweise in einseitigen Lähmungen der Extremitäten, Sprach- und Verständnisdefiziten und einseitigem Gesichtsfeldausfall wider. Der Grund dafür ist die Degeneration vieler verschiedener Typen von Neuronen und glialer Zellen in der betroffenen Hirnregion. Doch wie sinnvoll ist eine Zelltherapie in solch einem Fall? In einer der ersten klinischen Studien wurden Patienten, bei denen die Basalganglien vom Schlaganfall betroffen waren, humane Neurone aus der NT-2 Karzinomzelllinie in den geschädigten Bereich implantiert [Kondziolka et al., 2000]. Bei einigen Patienten konnten anschließend Verbesserungen in den Schlaganfall-bedingten neurologischen Defiziten beobachtet werden. Darüber hinaus wurden bei einem Patienten ein Jahr nach dem Eingriff *post mortem* transplantierte Zellen im Gehirn wiedergefunden [Nelson et al., 2002]. Doch ob die Verbesserungen auf die implantierten Zellen zurückgeführt werden können und die Zellen auch funktional ins Gewebe integrierten, konnte bisher nicht belegt werden.

Als Alternative zur NT-2 Karzinomzelllinie beschreiben Bang et al. den Einsatz autologer hMSCs bei Schlaganfall-Patienten [Bang et al., 2005]. Die Stammzellen wurden dabei intravenös verabreicht, wobei sich die Autoren auf Studien berufen, die zeigen, dass hMSCs die Blut-Hirn-Schranke passieren und ins Hirngewebe integrieren können [Mezey et al., 2003]. In dieser einzigen klinischen Studie, bei der hMSCs zur Behandlung von Schlaganfall-Patienten verwendet wurden, konnte eine stete Verbesserung der neurologischen Defizite über drei, sechs, und zwölf Monate hinweg beobachtet werden. Allerdings waren in dieser Studie nur fünf Patienten behandelt worden; die Ergebnisse sind daher nur bedingt aussagekräftig.

## 2. Einleitung

Basierend auf Untersuchungen bei Nagern wird auch ein alternativer Ansatz der Zelltherapie bei einem Schlaganfall in Erwägung gezogen: die Stimulation der Selbstregenerationskräfte. Denn bedingt durch einen Schlaganfall kommt es zur vermehrten Neubildung von Neuronen in der Subventrikulären Zone. Die generierten Neurone migrieren zwar in den geschädigten Bereich, jedoch sterben über 80 % dieser Zellen innerhalb der ersten Wochen [Arvidsson et al., 2002]. Diesem Prozess könnte man durch die Gabe verschiedener Faktoren, die die Überlebensfähigkeit von Neuronen verbessern, entgegenwirken. Beispiele für solche Faktoren sind der *Fibroblast Growth Factor* oder der *Brain-derived Neurotrophic Factor* [Yoshimura et al., 2003, Chmielnicki et al., 2004]. Um eine maximale Verbesserung zu erzielen, wäre auch eine Kombination der Zellersatztherapie mit einer Stimulation der endogenen Regeneration ein möglicher Ansatz. Ein weiterer kritischer Punkt, den man bei der Behandlung von Schlaganfall-Patienten nicht außer Acht lassen sollte, ist die Blutversorgung der betroffenen Hirnregionen. Zwar findet nach einem Schlaganfall Angiogenese statt, diese könnte jedoch zusätzlich stimuliert werden, um das Überleben der neu generierten Neurone zu verbessern [Lindvall et al., 2004]. So konnten Wang et al. in einem Rattenmodell zeigen, dass Erythropoietin die Angiogenese nach einem Schlaganfall stimulierte und somit zur Verbesserung der neurologischen Funktionen der Tiere beigetragen hat [Wang et al., 2004].

## 2. Einleitung

### 2.3.3 Möglichkeiten der Stammzelltherapie bei der Huntington-Krankheit

Die Huntington-Krankheit ist eine Störung des Nervensystems, die sich in einer Chorea, das heißt in unwillkürlichen, plötzlich und unregelmäßig auftretenden Bewegungen der Extremitäten, des Gesichtes, des Halses und des Rumpfes, sowie in einer progressiven Demenz widerspiegelt. Grund für diese Anomalien ist eine Mutation im Huntingtin Gen. Ein Teil dieses Gens besteht aus einer Trinukleotid-Wiederholungssequenz, die bei verschiedenen Individuen unterschiedliche Längen annehmen und sich von Generation zu Generation verändern kann. Überschreitet die Länge der Wiederholungssequenz einen kritischen Wert, kommt es zur Bildung eines mutierten Huntingtin-Proteins mit abweichenden Funktionen. Diese Funktionsunterschiede sind letztendlich dafür verantwortlich, dass es zu einem Verlust von Projektionsneuronen im Putamen, einem Teil des Striatums und damit zu den beschriebenen Symptomen kommt [Albin et al., 1992, Landles and Bates, 2004]. Ein zelltherapeutischer Ansatz sollte also bei Huntington-Patienten zu einem Ersatz der defekten Projektionsneurone führen. Die Transplantation von fetalem Striatum ins Gehirn von Ratten und Primaten hat gezeigt, dass die Projektionsneurone des fetalen Gewebes in der Lage waren, eine Verbindung zum Globus pallidus der Basalganglien aufzunehmen und Signale von der Großhirnrinde zu empfangen. Dieses Maß der Rekonstruktion des corticostriatopallidalen Schaltkreises war ausreichend, um den motorischen und kognitiven Defiziten der Tiere entgegen zu wirken [Kendall et al., 1998, Palfi et al., 1998, Dunnett et al., 2000]. In einer klinischen Studie konnten Freeman et al. zeigen, dass auch beim Menschen die intrastriatale Transplantation von fetalem Striatum möglich ist [Freeman et al., 2000]. Bei einem Patienten, der 18 Monate nach der Operation aus anderweitigen Gründen verstarb, konnte gezeigt werden, dass die Zellen des transplantierten Gewebes überlebt und sich weiterentwickelt haben, ohne von dem Krankheitsverlauf beeinflusst zu werden. Klinische Verbesserungen wurden dabei auf eine Reduktion des striatalen und kortikalen Hypometabolismus zurückgeführt, der vermuten lässt, dass die Transplantate zu einer Wiederherstellung der Funktion in diesem System beigetragen haben [Gaura et al., 2004]. Es ist daher prinzipiell möglich, dass Zellen ins Striatum von Huntington-Patienten integrieren und dort die Funktionen der zerstörten Neurone über-

## 2. Einleitung

nehmen. Allerdings zeigen Langzeitstudien, dass die Transplantation fetalen Gewebes zwar für einige Jahre eine Verbesserung und Stabilität im Krankheitsverlauf mit sich bringt, aber keine dauerhafte Heilung der Huntington-Krankheit bewirken kann [Bachoud-Lévi et al., 2006]. Versuche, die den Einsatz von humanen Stammzellen bei der Behandlung der Huntington-Symptome beschreiben, sind derzeit nur auf Tiermodelle beschränkt. Dabei konnten Song et al. zeigen, dass aus hESCs abgeleitete neurale Stammzellen, die intravenös in ein Huntington-Rattenmodell transplantiert wurden, ins geschädigte Striatum migrierten und zur Verbesserung der Motorik beitrugen [Song et al., 2007]. In diesem wie auch in einem weiteren Ansatz mit fetalen neuronalen Stammzellen des Menschen wurde beschrieben, dass die transplantierten Zellen im Gehirn zu einem kleinen Teil in neuronale und überwiegend in gliale Zellen differenzierten [McBride et al., 2004, Song et al., 2007]. Dass es in diesen Versuchen dennoch zu einer Linderung der Krankheitssymptome gekommen ist, lässt vermuten, dass auch Astrocyten im Rahmen der Huntington-Degeneration einen neuroprotektiven Effekt haben könnten [Clelland et al., 2008]. Neben hESCs sind auch humane Nabelschnurblutstammzellen zur Behandlung der Huntington-Krankheit in Betracht gezogen worden [Ende and Chen, 2001]. Der Einsatz dieser Zellen war allerdings nur auf einen einzigen Tierversuch beschränkt und wurde nicht mehr weiter verfolgt. Zu Versuchen mit anderen humanen Stammzellen, die ihren Ursprung im adulten Organismus haben, ist in der Literatur kein Verweis zu finden.

## 2. Einleitung

### 2.3.4 Zellersatztherapie bei Erkrankungen des Nervensystems – ein Fazit

Bei vielen Ansätzen zur zellbasierten Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen spielt die Transplantation von fetalem Gewebe eine zentrale Rolle. Auch wenn sie ethisch nicht vertretbar sind, so zeigen diese Versuche, dass Zellersatztherapien prinzipiell möglich sind und weisen zudem gleich auf, welche Voraussetzung diese Therapien mitbringen müssen, um neurologische Verbesserungen zu bewirken.

hESCs, die ein breites Differenzierungsspektrum besitzen, sind ebenfalls häufig Gegenstand dieser Studien. Doch der Einsatz von hESCs für eine Therapie ist aufgrund vielfacher Gründe sehr unwahrscheinlich. Zwar könnte man versuchen, Problematiken wie die Bildung von Teratomen zu umgehen, indem nur vollständig ausdifferenzierte, homogene Zellpopulationen verwendet werden, aber die ethischen Bedenken, die aus der Zerstörung eines lebensfähigen Embryos bei der Generierung von hESCs resultieren, können nicht ohne weiteres außer Acht gelassen werden. Zudem fehlt bei hESCs die Möglichkeit, körpereigene Stammzellen für eine Therapie zu verwenden.

Auch Studien, in denen die Patienten mit neuronalen Stammzellpopulationen behandelt wurden, basieren überwiegend auf hESCs, die *in vitro* in neurale Stamm- oder Vorläuferzellen vordifferenziert wurden. Andere verwendete neurale Stammzellen wurden aus fetalem Hirngewebe gewonnen, woraus sich wiederum weitere ethische Problemstellungen ergeben.

Eine große Chance, es tatsächlich bis in die therapeutische Anwendung zu schaffen, wird adulten Stammzellen zugeschrieben. Diese Zellen könnten dem Patienten autolog entnommen werden und würden keinerlei immunologische oder ethische Probleme mit sich bringen. Dass es insbesondere bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen noch ein weiter Weg dorthin ist, zeigen die vorgestellten Beispiele. Es sind bis auf einige wenige Ausnahmen, in denen hMSCs verwendet worden sind, keine Studien zum Einsatz humaner adulter Stammzellen bekannt. Allerdings bietet das hohe Potential adulter Stammzellen, in die neuronale Richtung differenzieren zu können, eine vielversprechende Möglichkeit.

## 2. Einleitung

### ***2.4 Ziel der Arbeit***

Aus menschlicher Haut wurden durch eine einfache Isolationstechnik Stammzellpopulationen mit bis zu 20 % Nestin-positiven Zellen gewonnen. Nestin-positive Zellen wurden in der Haut neben Kompartimenten wie den Haarfollikeln und den Talgdrüsen auch im intramesenchymalen Schweißdrüsengewebe lokalisiert. Mit dem Ziel, die Ausbeute Nestin-positiver Zellen zu maximieren, war es Teil dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, um Nestin-positive Zellen der Schweißdrüse zu isolieren und in Kultur zu bringen.

Die Stammzellpopulation aus den Schweißdrüsen sollte daraufhin mit jenen Stammzellen, die aus der Vollhaut isoliert werden, und mit glandulären Stammzellen aus dem Pankreas und der Parotis hinsichtlich ihres Gen- und Proteinexpressionsmusters verglichen werden. Insbesondere sollte dabei das spontane neuronale Differenzierungspotential dieser Zellpopulationen aufgezeigt werden.

Hauptfokus dieser Arbeit war die Etablierung eines effektiven Protokolls zur gerichteten Differenzierung der zuvor charakterisierten humanen adulten Stammzellpopulationen in neuronale Zellen, um das Potential dieser Zellen für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu untersuchen. Die Wirksamkeit der etablierten Kokulturmethode, bei der die Stammzellen mit Rattenhirnbiopsien, getrennt durch eine poröse Membran, im selben Wachstumsmedium kultiviert wurden, sollte im Hinblick auf Veränderungen der Zellmorphologie und der Expression von neurospezifischen Strukturproteinen und Enzymen untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Stammzellpopulation mit der eindeutigsten neuronalen Differenzierungsinduktion hinsichtlich der Produktion von Neurotransmittern analysiert werden. Um zu klären, welche Faktoren für die neuronale Differenzierung der Stammzellen verantwortlich waren, sollte zudem das Kultivierungsmedium der Kokultur auf verschiedene Wachstumsfaktoren getestet werden.

## 3. Material und Methoden

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-Phenylindol	Roche, Schweiz
Aceton	Roth, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories, Österreich
Coomassie Brilliant Blue-G250	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
Fluoromount-G	Southern Biotechnologies, U.S.A.
Gelatine	PAA Laboratories, Österreich
HEPES	Roth, Deutschland
Isopropanol	Roth, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Deutschland
Kollagenase	Serva, Deutschland
Methanol	Roth, Deutschland
Modified Eagle's Medium	Gibco, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Deutschland
Neutralrot	Roth, Deutschland
ortho-Phosphorsäure	Merck, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
<i>QIAxcel Alignment Marker 15 bp/500 bp</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII</i>	Qiagen, Deutschland
Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat	Perkin-Elmer, U.S.A.
Trasylol	Bayer, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Deutschland
Trypsin	PAA Laboratories, Österreich
Tween 20	VWR, U.S.A.
Vectashield	Vector Laboratories, U.S.A.
Ziegennormalserum	Vector Laboratories, U.S.A.

## 3. Material und Methoden

### 3.1.2 Kits

<i>Nuclear Extract Kit</i>	Active Motif, Belgien
<i>RNeasy Plus Mini Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QIAxcel DNA Screening Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QuantiFast SYBR Green PCR Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>Silverquant Detection Kit</i>	Eppendorf, Deutschland
<i>Human Growth Factor Antibody Array I</i>	RayBiotech, U.S.A.
<i>Transcription Factor Stem Cell Chip</i>	Eppendorf, Deutschland

### 3.1.3 Verbrauchsmittel

2-Well-Chamberslides	BD Biosciences, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatten	Techno Plastic Products, Schweiz
Deckgläschen	Roth, Deutschland
Gewebekultureinsätze (0,4 µm Poren)	Greiner Bio-One, Deutschland
Glaspipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen (22,1 cm <sup>2</sup> )	BD Bioscience, U.S.A.
Nylonmembran	Sefar, Schweiz
Propidiumiodid-Einwegkassetten	IUL Instruments, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	Techno Plastic Products, Schweiz
Zellkulturschalen (22,1 cm <sup>2</sup> )	Techno Plastic Products, Schweiz

### 3.1.4 Geräte

Array Scanner <i>Axon GenePix</i>	Molecular Devices, U.S.A.
Fluoreszenzmikroskop <i>Axioskop2 mot pus</i>	Zeiss, Deutschland
Isopropanoleinfrierbox	Thermo Fisher Scientific, Denmark
Kapillargelelektrophorese <i>QIAxcel</i>	Qiagen, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer <i>NanoDrop 1000</i>	PaqLab, Deutschland
Nukleinsäureaufreinigungsroboter <i>QIAcube</i>	Qiagen, Deutschland
qPCR Cycler <i>Mastercycler ep Realplex<sup>2</sup></i>	Eppendorf, Deutschland
Silverquant Scanner	Eppendorf, Deutschland

### 3. Material und Methoden

Thermocycler *Mastercycler*  
Zellzählgerät *Nucleocounter*

Eppendorf, Deutschland  
IUL Instruments, Deutschland

#### 3.1.5 Software

*AxioVision Rel. 4.7*  
*BioCalculator 3.0*  
Microsoft Exel 2007  
Microsoft PowerPoint 2007  
*realplex 2.2*  
*TF Chip Data Analysis Tool v1.2*

Zeiss, Deutschland  
Qiagen, Deutschland  
Microsoft, Deutschland  
Microsoft, Deutschland  
Eppendorf, Deutschland  
Eppendorf, Deutschland

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.6 Primer

**Tabelle 1 | Verwendete Primer.** Aufgelistet sind alle Primer für Gene, deren Expression untersucht wurde. Es sind Angaben, ob die Primer Intron-spannend binden, die Amplikonlänge in Basenpaaren (bp) und die Schmelztemperatur des entstandenen Produktes sowie die Herstellerbezeichnung des jeweiligen Primers aufgeführt. Alle Primer wurden von der Firma Qiagen bezogen.

Gen	Intron spannend	Amplikonlänge	Schmelztemperatur	Herstellerbezeichnung
$\alpha$ -SMA	✓	83 bp	82,5 °C	Hs_ACTA2_1_SG
$\beta$ III Tubulin	✓	78 bp	85,6 °C	Hs_TUBB3_1_SG
$\beta$ -Aktin	✓	146 bp	88,2 °C	Hs_ACTB_1_SG
c-Myc	✓	129 bp	84,4 °C	Hs_MYC_1_SG
CD9	✓	95 bp	81,6 °C	Hs_CD9_1_SG
CK18	-	97 bp	83,3 °C	Hs_KRT18_1_SG
Ki67	✓	86 bp	79,6 °C	Hs_MKI67_1_SG
KIF-4	✓	72 bp	84,9 °C	Hs_KLF4_1_SG
MEF2D	✓	85 bp	81,8 °C	Hs_MEF2D_2_SG
Nestin	✓	75 bp	85,0 °C	Hs_NES_2_SG
NF_H	-	97 bp	83,9 °C	Hs_NEFH_1_SG
NF_L	✓	99 bp	80,2 °C	Hs_NEFL_1_SG
NF_M	✓	74 bp	80,3 °C	Hs_NEFM_1_SG
NSE	✓	61 bp	82,1 °C	Hs_ENO2_1_SG
Oct-4	-	75 bp	79,6 °C	Hs_POU5F1_va.2_SG
PGP 9.5	✓	110 bp	84,8 °C	Hs_UCHL1_1_SG
PPAR $\gamma$	✓	113 bp	79,6 °C	Hs_PPARG_1_SG
S100 $\beta$	✓	64 bp	81,5 °C	Hs_S100B_1_SG
Sox2	-	64 bp	76,8 °C	Hs_SOX2_1_SG
SPP1	-	115 bp	83,0 °C	Hs_SPP1_1_SG
vWF	✓	108 bp	84,1 °C	Hs_VWF_1_SG

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.7 Antikörper

**Tabelle 2 | Verwendete Primärantikörper.** Antikörper, spezifisch für die jeweilige humane Zielstruktur, sind mit der verwendeten Abkürzung, dem Herkunftsorganismus, der eingesetzten Verdünnung in der Immunocytochemie und dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Zielstruktur	Abkürzung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Smooth Muscle Actin	$\alpha$ -SMA	Maus monoklonal	1:100	DAKO, Dänemark
Cytokeratin 18	CK18	Maus monoklonal	1:800	Sigma Aldrich, Deutschland
Glial Fibrillary Acidic Protein	GFAP	Kaninchen polyklonal	1:100	DAKO, Dänemark
Ki 67	-	Kaninchen polyklonal	1:500	Novitec, Deutschland
Nestin	-	Maus monoklonal	1:100	Chemicon, Deutschland
Neurofilamente*	NF	Kaninchen polyklonal	1:500	Serotec, Deutschland
pan Cytokeratin**	pan CK	Maus monoklonal	1:100	Sigma Aldrich, Deutschland
Vigillin	-	Kaninchen polyklonal	1:200	Charli Kruse

\* Mix aus Neurofilament leichte, mittlere und schwere Kette

\*\* Mix aus Cytokeratin 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19

**Tabelle 3 | Verwendete Sekundärantikörper.** Antikörper, spezifisch für den jeweiligen Zielorganismus, sind unter Angabe des Konjugats, des Herkunftsorganismus, der eingesetzten Verdünnung in der Immunocytochemie und dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Zielorganismus	Konjugat	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen	FITC	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch, UK
Maus	Cy3	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch, UK
Maus	Biotin	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch, UK

## 3. Material und Methoden

### 3.1.8 Medien

**10 % FKS-DMEM Medium:** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
10 % fetales Kälberserum (FKS)  
100 U/ml Penicillin  
0,1 mg/ml Streptomycin

**20 % FKS-DMEM Medium:** DMEM  
20 % FKS  
100 U/ml Penicillin  
0,1 mg/ml Streptomycin

**Digestionsmedium:** 10 mM HEPES Puffer  
70 % (v/v) Modified Eagle's Medium  
0.5 % (v/v) Trasylol  
1 % (w/v) bovinem Serumalbumin  
2,4 mM Kalziumchlorid  
0.63 PZ/mg Kollagenase

**Einfriermedium:** 90 % (v/v) Dimethylsulfoxid  
10 % (v/v) fetales Kälberserum

**Isolationsmedium:** 10 mM HEPES Puffer  
70 % (v/v) Modified Eagle's Medium  
0.5 % (v/v) Trasylol  
1 % (w/v) bovines Serumalbumin  
2,4 mM Kalziumchlorid

## 3. Material und Methoden

### 3.1.9 Lösungen und Puffer

<b>Bradford-Reagenz:</b>	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue-G250 4,75 % (v/v) 25 ml 95% Methanol 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure
<b>PBS:</b>	137 mM g Natriumchlorid 9,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid
<b>TBST:</b>	150 mM Natriumchlorid 10 mM Tris (pH 8,8) 0,05 % Triton X-100
<b>TNT Puffer:</b>	0.1 M Tris-Hydrogenchlorid (pH 7,5) 0.15 M Natriumchlorid 0.05 % Tween 20

### 3.1.10 Zellen und Gewebe

Adulte Stammzellen aus dem humanen exokrinen Pankreas (*Pancreatic Stem Cells*, PSCs)

Adulte Stammzellen aus der humanen Parotis (*Parotis-derived Stem Cells*, PDSCs)

Adulte Stammzellen aus humaner Vollhaut (*Skin-derived Stem Cells*, SDSCs)

Adulte Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen (*Sweat Gland-derived Stem Cells*, SGSCs)

Rattenhirnbiopsien aus acht Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten

## 3. Material und Methoden

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Stammzellisolation**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stammzellpopulationen wurden aus verschiedenen humanen Biopsien gewonnen. Diese Biopsien fielen bei routinemäßigen Operationen an und wurden nicht eigens für diese Versuche entnommen. Bereit gestellt wurden die Biopsien nach Aufklärung und rechtlich wirksamer Einwilligung (*informed consent*) der Patienten durch die Klinik für Allgemeine Chirurgie, die Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, die Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie und die Klinik für Plastische Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck. Alle Versuche wurden gemäß der Deklaration von Helsinki, in Übereinkunft mit den nationalen Bestimmungen für die experimentelle Verwendung von humanem Material durchgeführt.

##### **3.2.1.1 Stammzellisolation aus dem Pankreas, der Parotis und der Vollhaut des Menschen**

Eine Pankreasbiopsie wurde von einem 42 Jahre alten, männlichen Patienten mit Pankreatitis erhalten, wobei lediglich der gesunde Sicherheitsabstand zur Stammzellisolation genutzt wurde. Von einer 44 Jahre alten Patientin stammte die Parotis. Und für die Isolation von Stammzellen aus humaner Haut wurde gesunde Vollhaut von einer 61 jährigen Frau, bei der eine Gesichtsstraffung durchgeführt wurde, verwendet.

Stammzellen aus den jeweiligen Geweben wurden nach einem bereits beschriebenen Protokoll [Kruse et al., 2004, Kruse et al., 2006a] isoliert. Dafür wurden etwa  $1 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$  große Gewebestücke zunächst vom Fettgewebe befreit und mit chirurgischen Scheren in kleine Fragmente geschnitten. Der Präparationsmix wurde mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid (95 % (v/v)) begast und im Anschluss zweimal (20 und 15 Minuten) in einem Kollagenase-haltigen Digestionsmedium bei 37 °C und konstantem Schütteln (150 UpM) inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationen wurden die Gewebestückchen in einem Isolationsmedium gewaschen, welches bis auf die fehlende Kollagenase wie das

### 3. Material und Methoden

Digestionsmedium zusammengesetzt war und weiterhin mit kleinen chirurgischen Scheren zerkleinert. Im Anschluss an den enzymatischen Verdau wurden die verbliebenen Gewebestückchen durch Auf- und Abpipettieren in Glaspipetten mit immer kleineren Öffnungen (25 ml, 10 ml, 5 ml und 2 ml Pipetten) fast vollständig dissoziiert und durch eine Nylonmembran (250 µm Porengröße) gefiltert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation des Filtrats mit 130 g wurde das Pellet in 20 % FKS-DMEM Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und in 20 % FKS-DMEM Medium ausgesät. Dabei wurde das Zellkulturgefäß entsprechend der Pelletgröße ausgewählt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3. Material und Methoden

#### **3.2.1.2 Protokolletablierung zur Isolation adulter Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen**

##### ***3.2.1.2.1 Isolation von Schweißdrüsen aus der Vollhaut***

Um Stammzellen aus dem Schweißdrüsenmesenchym humaner Haut isolieren zu können, mussten zunächst die Schweißdrüsen aus der Haut separiert werden.

Dabei wurde die Haut zunächst nach einem Protokoll von Brayden und Fitzpatrick mit Hilfe chirurgischer Scheren zerschnitten, ein Vorgang, bei dem laut Protokoll die Schweißdrüsen durch die Scherkräfte von allein aus dem Gewebe hervorkommen sollten [Brayden and Fitzpatrick, 1995]. Anschließend sollten die Schweißdrüsen mit Hilfe von Neutralrot angefärbt und unter einem Mikroskop isoliert werden können. Doch es stellte sich heraus, dass die Ausbeute an Schweißdrüsen, die allein durch die Scherkräfte aus dem Gewebe gelöst wurden, nicht ausreichend war.

Daher wurde ein weiteres Protokoll zur Isolation der Schweißdrüsen ausprobiert. Okada et al. haben berichtet, dass bei der Trennung der Epidermis von der Dermis durch einen Dispase-Verdau, die Hautanhangsgebilde, darunter die Schweißdrüsen, an der Epidermis verbleiben und mit dieser vorsichtig abgezogen werden können [Okada et al., 1983]. Aber auch hier stellte sich heraus, dass die Schweißdrüsen zu fest in der Dermis verankert sind und sich nicht ohne weiteres zusammen mit der Epidermis ablösen lassen.

Zuletzt wurde die Haut nach einem modifizierten Protokoll von Kruse et al. mit Hilfe von chirurgischen Scheren mechanisch zerkleinert, durch Kollagenasen vorverdaut und anschließend weiter mechanisch zerkleinert [Kruse et al., 2006a]. Auf diese Weise behandelte Gewebereste konnten mit Neutralrot angefärbt und die Schweißdrüsen daraufhin unter dem Mikroskop mit Hilfe feinsten Pinzetten isoliert werden. Die Ausbeute der Schweißdrüsen war dabei sehr stark von der Herkunft der Hautbiopsie abhängig. Gesichts- und Bauchhaut lieferten wesentlich weniger Schweißdrüsen als Achselhaut.

### 3. Material und Methoden

#### **3.2.1.2.2 Generierung einer adhärennten Zellpopulation aus Schweißdrüsen**

Nun galt es die Schweißdrüsen in Kultur zu bringen und Zellen aus ihrem Mesenchym auswachsen zu lassen. Problematisch dabei war, dass die Schweißdrüsen stark von Kollagenfasern des Hautbindegewebes umgeben waren. Ohne weitere Behandlung war ein Anhaften der Schweißdrüsen am Zellkulturboden nicht möglich.

Um dieses Problem zu lösen, wurden isolierte Schweißdrüsen mit 0,05 % Trypsin für eine Stunde inkubiert, um die Bindegewebsfasern zu verdauen, und anschließend in die Zellkulturschalen gegeben. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Trypsin-Verdau nicht ausreichend war, um das Anhaften der Schweißdrüsen am Boden zu ermöglichen und so die Voraussetzung zu schaffen, dass Zellen aus den Schweißdrüsen auswachsen konnten. Da die Oberflächenbeschaffenheit für ein erfolgreiches Anhaften und Auswachsen von Zellen von Belang sein kann, wurden Gelatine- und Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen getestet. Dabei zeigte sich, dass Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen am besten geeignet waren, um Zellen aus den Schweißdrüsen auswachsen zu lassen. Mit Hilfe von Mikropinzetten wurde es zudem möglich, frisch isolierte Schweißdrüsen ohne anschließenden Trypsin-Verdau vom Bindegewebe zu befreien. Eine Immobilisierung der Schweißdrüsen durch Andrücken mit Injektionsnadeln am Zellkulturboden konnte die Zellausbeute weiter erhöhen.

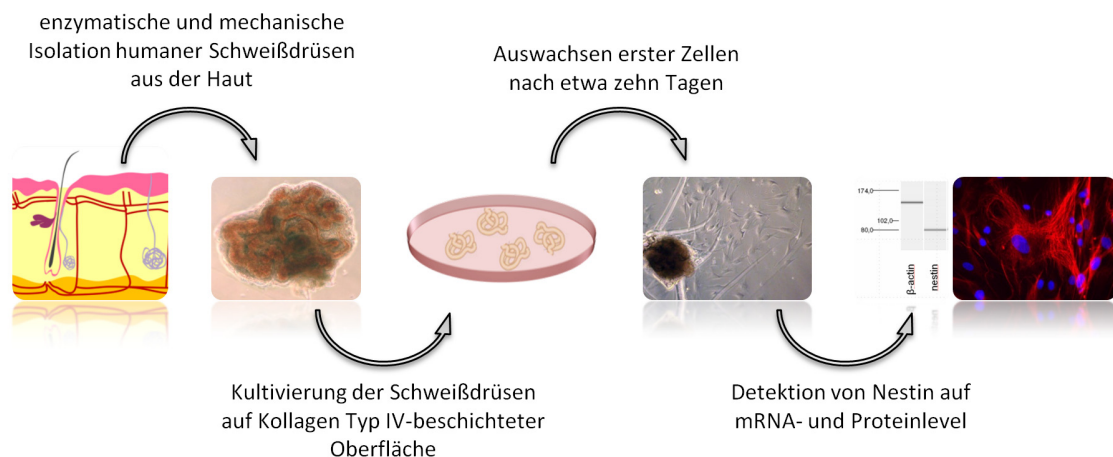
#### **3.2.1.2.3 Isolation adulter Stammzellen aus den Schweißdrüsen des Menschen**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stammzellen aus Schweißdrüsen wurden aus der Achselhaut eines 37 Jahre alten männlichen Patienten mit Inverser Akne isoliert.

Um die Schweißdrüsen aus der Achselhaut zu isolieren, wurde das zuvor etablierte Protokoll angewandt (Abbildung 9). Dafür wurden etwa  $1 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$  große Gewebestücke zunächst vom Fettgewebe befreit und mit chirurgischen Scheren in kleine Fragmente geschnitten. Der Präparationsmix wurde mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid (95 % (v/v)) begast und im Anschluss zweimal (20 und 15 Minuten) in einem

### 3. Material und Methoden

Kollagenase-haltigen Digestionsmedium bei 37 °C und konstantem Schütteln (150 UpM) inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationen wurden die Gewebestückchen in einem Isolationsmedium gewaschen und weiterhin mit kleinen chirurgischen Scheren zerkleinert. Im Anschluss an den enzymatischen Verdau wurden die verbliebenen Gewebestückchen durch Auf- und Abpipettieren in Glaspipetten mit immer kleineren Öffnungen (25 ml, 10 ml, 5 ml und 2 ml Pipetten) fast vollständig dissoziiert und durch eine Nylonmembran (250 µm Porengröße) gefiltert. Der im Gazefilter verbliebene Anteil des Präparationsmixes wurde in eine Zellkulturschale mit 20 % FKS-DMEM Medium überführt. Eine anschließende Neutralrot-Färbung (100 µg/ml) ließ die Gänge der Schweißdrüsen rot erscheinen und erleichterte damit die mechanische Isolation einzelner Schweißdrüsen unter dem Lichtmikroskop. Die Schweißdrüsen wurden mit Hilfe von Mikropinzetten weitestgehend vom umliegenden Hautbindegewebe befreit und in Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen überführt. Um die Schweißdrüsen am Boden der Zellkulturschale zu immobilisieren, wurden diese unter Verwendung von Injektionsnadeln zerdrückt und an den Schalenboden gepresst. Die Kultivierung der Schweißdrüsen fand bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im 20 % FKS-DMEM Medium statt.



**Abbildung 9 | Protokoll zur Stammzellisolation aus humanen Schweißdrüsen.** Um Schweißdrüsen aus humaner Haut zu isolieren, wurde das Gewebe zunächst enzymatisch und mechanisch zerkleinert und die Schweißdrüsen nach Anfärbung mit Neutralrot unter dem Mikroskop per Hand gepickt. Die Schweißdrüsen wurden mit Hilfe von Injektionsnadeln am Boden einer Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturschale fixiert, worauf nach etwa zehn Tagen die ersten auswachsenden Zellen sichtbar wurden. Die gut proliferierende Zellpopulation wurde auf die Expression des Stammzellmarkers Nestin analysiert (siehe 3.2.5 und 3.2.6.1).

## 3. Material und Methoden

### 3.2.2 Kultivierung und Lagerung der Stammzellen

#### 3.2.2.1 Propagation der Stammzellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen der Primärkulturen subkultiviert. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und vollständig durch Spülen des Zellrasens mit Phosphat-gepuffertem Kochsalz (*Phosphate buffered Saline*, PBS) beseitigt. Entsprechend der Flaschengröße wurde grade so viel 0,1 % Trypsin-Lösung hinzugegeben, dass der Flaschenboden mit Flüssigkeit bedeckt war. Da Trypsin bei 37 °C sein Wirkungsoptimum hat, diente eine zweiminütige Inkubation bei dieser Temperatur dazu, die Zellen vom Zellkulturboden zu lösen. Durch vorsichtiges Klopfen gegen das Zellkulturgefäß konnten die Zellen zudem restlos vom Boden abgelöst werden. Die enzymatische Wirkung von Trypsin wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens an 20 % FKS-DMEM Medium gestoppt und die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 180 g pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einem geeigneten Volumen 20 % FKS-DMEM Medium resuspendiert und auf zwei Zellkulturflaschen bisher verwendeter Größe ausgesät oder auf eine nächst größere Zellkulturflasche gegeben. Nach etwa drei Passagen und dem Erhalt einer stabil proliferierenden Zellpopulation wurde der FKS-Anteil im Medium auf 10 % reduziert (10 % FKS-DMEM Medium). Ein Mediumwechsel fand in der Regel alle drei bis vier Tage statt. Bei Erreichen eines konfluenten Zustands wurden die Zellen wie oben beschrieben subkultiviert. Für die Versuche verwendete Zellen befanden sich zwischen Passage acht und Passage 14.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Um für die Versuche eine definierte Anzahl an Zellen einzusetzen, wurde unter Verwendung von propidiumiodidhaltigen Einwegkassetten und des Fluoreszenzanalysegerätes *Nucleocounter* die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung abtrypsiniert (siehe 3.2.2.1) und 50 µl der Zellsuspension für die Analyse verwendet. Diese Zellsuspension wurde zunächst mit dem gleichen Volumen eines Lysispuffers versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und dann mit 50 µl eines Stabilisierungsreagenz versehen. Dieser Mix wurde anschließend mit einer propidiumiodidhaltigen Einwegkassette aufgenommen und das darin enthaltene Propidiumiodid konnte in die DNA der freigelegten Zellkerne interkalieren. Die Detektion der nun fluoreszenten Zellkerne fand im *Nucleocounter* statt. In einem automatisierten Verfahren wurde eine Aufnahme der Zellkerne gemacht, welche im Anschluss mit einer internen Bildverarbeitungssoftware analysiert wurde. Ausgegeben wurde die Zellzahl pro ml.

### 3.2.2.3 Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung wurden die Stammzellen bei -145 °C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dabei wurde so verfahren, dass die Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung trypsiniert und abzentrifugiert wurden (siehe 3.2.2.1). Der Resuspendierung des Zellpellets in einem dimethylsulfoxidhaltigen Einfriermedium folgte die Überführung in ein Kryoröhrchen. Das Dimethylsulfoxid fungierte als Frostschutzmittel und beugt der Bildung von Eiskristallen während des Gefriervorgangs vor. Durch die Verwendung einer Isopropanolbox wurden die Zellen in einem -80 °C Gefrierschrank mit 1 °C pro Minute abgekühlt. Anschließend fand die Überführung in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Tank statt und damit verbunden die Abkühlung auf -145 °C.

### 3. Material und Methoden

#### **3.2.2.4 Auftauen kryokonservierter Zellen**

Die bei -145 °C in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen wurden zunächst in -20 °C kalten Einfrierboxen zwischengelagert, um dann durch Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad möglichst schnell aufgetaut zu werden. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen, welches zuvor mit 10 ml 10 % FKS-DMEM Medium befüllt wurde, überführt und fünf Minuten mit 180 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in einem adäquaten Volumen an 10 % FKS-DMEM Medium resuspendiert und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.3 Charakterisierung der Stammzellpopulationen

Um die Stammzellpopulationen aus dem Pankreas, der Parotis, der Vollhaut und den Schweißdrüsen zu charakterisieren, wurden die Zellen zum einen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis zu einem konfluenten Stadium kultiviert und anschließend einer Genexpressionsanalyse unterzogen (siehe 3.2.5) und zum anderen in 2-Well-Chamberslides eingesät, um im Anschluss einer immunocytochemischen Analyse unterzogen zu werden (siehe 3.2.6.1). Des Weiteren wurden von jeder Zelllinie jeweils zwei zu 90 % konfluent bewachsene 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für die Isolation der Kernproteine und der Untersuchung von aktivierten Transkriptionsfaktoren herangezogen (siehe 3.2.6.3).

## 3. Material und Methoden

### 3.2.4 Etablierung der Kokultur-Experimente

Um eine neuronale Differenzierung der Stammzellen zu erzielen, sollte von allen Faktoren, die Rattenhirnbiopsien *in vitro* sezernieren, profitiert werden. Dafür sind zwei Vorgehensweisen herangezogen worden. Zum einen wurde Rattenhirn-konditioniertes Medium hergestellt, in welchem anschließend die Stammzellen kultiviert wurden, zum anderen fand eine Kokultivierung der Stammzellen mit Rattenhirnbiopsien statt.

#### 3.2.4.1 Versuche mit Rattenhirn-konditioniertem Medium

Zur Herstellung des Rattenhirn-konditionierten Mediums wurde jeweils ein halbes Rattenhirn von acht Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten in 20 ml 10 % FKS-DMEM Medium in 0,3 cm x 0,3 cm x 0,3 cm große Stücke geschnitten und für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, steril filtriert und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren. Die Stammzellen wurden auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät (5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml in 10 % FKS-DMEM Medium) und zunächst für zwei Tage kultiviert, bevor das 10 % FKS-DMEM Medium gegen ein Medium ausgetauscht wurde, welches zur Hälfte aus Rattenhirn-konditioniertem Medium und zur anderen Hälfte aus 10 % FKS-DMEM Medium bestand. So wurden die Zellen für zwei Tage weiterkultiviert, um anschließend einer immunocytochemischen Analyse unterzogen zu werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass ein Großteil der Zellen diese Behandlung nicht überlebte. Die Zellen lösten sich zu großen Teilen ab und machten optisch keinen vitalen Eindruck. Auch eine Wiederholung dieses Versuchsansatzes brachte kein gegenteiliges Ergebnis.

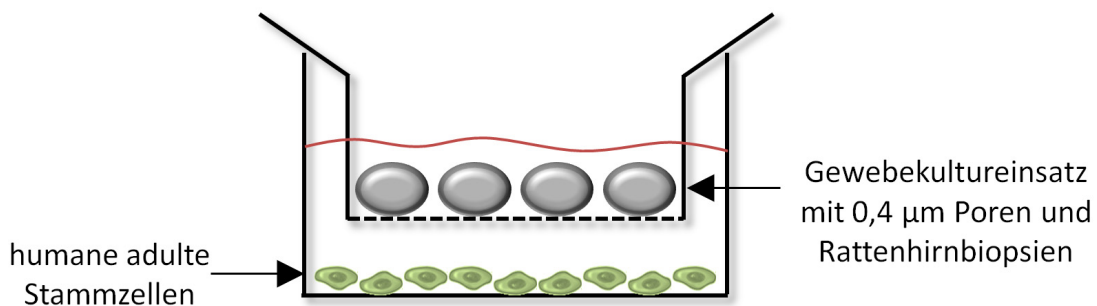
#### 3.2.4.2 Indirekte Kokultur mit Rattenhirnbiopsien

Es hat sich in Vorversuchen herausgestellt, dass eine gleichzeitige Kultivierung mit Rattenhirnbiopsien im Gegensatz zu einer Kultivierung mit Rattenhirn-konditioniertem Medium keinen Einfluss auf die Vitalität der Stammzellen zeigte. Daher wurde, um eine neuronale

### 3. Material und Methoden

Differenzierung der Stammzellen zu induzieren, eine indirekte Kokultur von Stammzellen und Rattenhirnbiopsien etabliert. Dafür wurden zwei Tage vor Beginn der Kokultur PSCs, PDSCs, SDSCs oder SGSCs auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät ( $5 \times 10^4$  Zellen/ml in 10 % FKS-DMEM Medium). Eine im Anschluss an die Versuche geplante immunocytochemische Analyse wurde durch unbehandelte Deckgläschen ermöglicht, die zuvor in jedem Well platziert wurden.

Die indirekte Kokultur fand unter Verwendung von Gewebekultureinsätzen statt, die für den Austausch löslicher Faktoren mit  $0,4 \mu\text{m}$  großen Poren versehen waren. Diese wurden in die bereits besiedelten Wells eingesetzt und mit vier Rattenhirnbiopsien (je  $0,3 \text{ cm} \times 0,3 \text{ cm} \times 0,3 \text{ cm}$ ) und 1 ml 10 % FKS-DMEM Medium befüllt (Abbildung 10). Dabei war darauf zu achten, dass das Medium, in dem die Stammzellen wuchsen, in direktem Kontakt zum Medium der Biopsien stand, um einen Austausch von löslichen Faktoren über das



**Abbildung 10 | Das Kokultursystem.** Separiert durch eine Membran mit Poren von  $0,4 \mu\text{m}$  wurden humane adulte Stammzellen aus dem Pankreas, der Parotis, der Vollhaut und den Schweißdrüsen mit Rattenhirnbiopsien im selben Wachstumsmedium kokultiviert.

Kultivierungsmedium zu ermöglichen. Die verwendeten Hirnbiopsien stammten ebenfalls aus acht Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten und setzten sich aus den folgenden Teilen des Gehirns zusammen: jeweils eine Biopsie aus den beiden Hemisphären des Großhirns und zwei Biopsien aus dem Kleinhirn. Als Kontrolle dienten Zellen, die unter den gleichen Bedingungen jedoch ohne Kokultivierung gehalten worden sind. Nach 48 Stunden der Inkubation wurden die Hirnbiopsien entfernt und die Stammzellen für weitergehende Analysen vorbereitet. Untersucht wurde die Expression von neuroassoziierten Proteinen und Enzymen sowohl auf Protein (siehe 3.2.6.1) als auch auf

### 3. Material und Methoden

mRNA-Ebene (siehe 3.2.5), in den PSCs wurde darüber hinaus auch die Produktion von Neurotransmittern analysiert (siehe 3.2.6.4) und das Kultivierungsmedium auf Wachstumsfaktoren untersucht (siehe 3.2.6.5). Die Kokulturversuche sind für jede Stammzellpopulation mindestens zweimal mit unterschiedlichen biologischen Proben durchgeführt worden.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.5 Molekularbiologische Analysen

#### 3.2.5.1 RNA-Isolation

In Vorbereitung der Charakterisierung der unterschiedlichen Stammzellpopulationen wurde die Gesamt-RNA aus jeweils einer konfluent gewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche isoliert. Die Durchführung der Kokultur-Experimente in 6-Well-Zellkulturplatten machte das Poolen der Zellen aller behandelten bzw. unbehandelten Wells notwendig, bevor daraus die RNA isoliert werden konnte. Die automatisierte Isolation der Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des *RNeasy Plus Mini Kits* und des Nukleinsäureaufreinigungsroboters *QIAcube* nach Herstellerangaben durchgeführt. Bevor die Proben jedoch in das Gerät gegeben wurden, mussten die Zellen durch den Einsatz von Kanülen mit einem Durchmesser von 0,9 mm in einem  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzten Lysispuffer aufgeschlossen werden. Das RNA-Isolationsverfahren des verwendeten Kits beruht auf der Bindung von RNA an einer Silikat-Gel-Membran und beinhaltet einen Schritt, bei dem genomische DNA (gDNA) eliminiert wird. Am Ende einer Reihe von Waschschritten findet dann die Eluation der RNA in 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser statt.

#### 3.2.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und die Qualität des Eluats wurden mit Hilfe des *NanoDrop 1000* Spektrophotometers bestimmt. Dieses Spektrophotometer benötigt zur Analyse 2  $\mu$ l RNA-Lösung. In diesem Tropfen wird in zwei unterschiedlichen Laufstrecken (1 mm und 0,2 mm) die Absorption bei 260 nm Wellenlänge gemessen, der Wellenlänge bei der Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum haben. Von der auf diese Weise erhaltenen optischen Dichte (OD) kann auf die RNA-Konzentration geschlossen werden. Zusätzlich dazu wird die Absorption bei 280 nm bestimmt, um über das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> auf die Reinheit der RNA-Probe bzw. auf Verunreinigungen mit Proteinen Rückschlüsse ziehen zu können.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.5.3 Reverse Transkription

Da bei der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) keine RNA sondern DNA eingesetzt wird, musste die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* verwendet. Wie zuvor bei der RNA-Isolation wird auch bei der cDNA-Synthese ein Schritt zum Verdau von gDNA eingefügt. Der dafür benötigte Ansatz setzte sich aus

2 µl gDNA-Verdaupuffer

1 µg RNA (in 12 µl Wasser)

zusammen und wurde für zwei Minuten bei 42 °C im *Mastercycler* inkubiert. Anschließend wurde der folgende Mastermix auf Eis zu jeder Probe hinzu gegeben:

1 µl Reverse Transkriptase (RT)

4 µl RT-Puffer

1 µl Primermix (inkl. Magnesium und Desoxyribonukleosidtriphosphaten).

Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation bei 42 °C, während der die RT die vorhandene RNA in cDNA umgeschrieben hat, wurde der Reaktionsmix für drei Minuten auf 95 °C erhitzt, um die RT zu inaktivieren, mit 180 µl Wasser aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.5.4 Quantitative PCR

Im Anschluss an die cDNA-Synthese fand eine quantitative PCR (qPCR) statt. Diese wurde in 96-Well-Platten in Doppelansätzen durchgeführt, wobei ein Reaktionsmix aus folgenden Komponenten zusammengesetzt war:

12,5 µl SYBR Green Master Mix (*QuantiFast SYBR Green PCR Kit*)

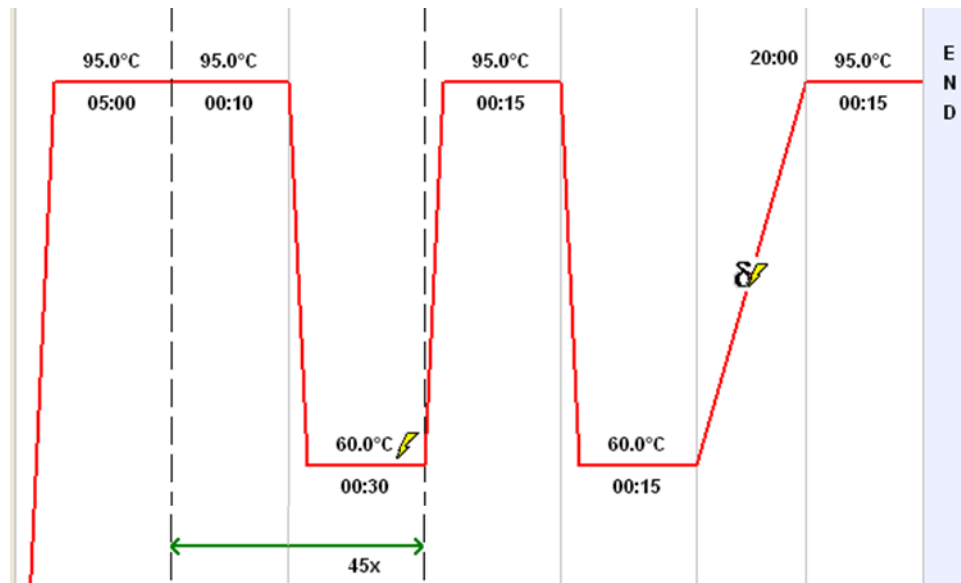
2,5 µl Primer-Mix (*QuantiTect Primer Assay*, siehe Tabelle 1)

10 µl cDNA bzw. Wasser

Zu jedem verwendeten Primer wurde auch eine Negativkontrolle angesetzt, in der Wasser anstatt cDNA verwendet wurde, um eine Kontamination der verwendeten Reagenzien mit genomischem Material ausschließen zu können.

Unter Verwendung des *Mastercyclers ep Realplex<sup>2</sup>* wurde ein Programm durchlaufen (Abbildung 11), bei dem der Reaktionsmix zunächst für fünf Minuten bei 95 °C erwärmt wurde, um die Hotstart-Polymerase zu aktivieren. Anschließend folgte der Zweischnitt-Amplifikationszyklus, bei dem die Doppelstränge erst für zehn Sekunden bei 95 °C aufgeschmolzen wurden, so dass dann bei 60 °C das Annealing der Primer und die Amplifikation durch die Polymerase stattfinden konnten. Im Anschluss an jeden Zyklus wurde der Anstieg der Fluoreszenz detektiert, worauf letztendlich auch die Detektion „in Echtzeit“ beruht. Um einen exponentiellen Zuwachs an Amplifikat zu erhalten, wurde dieser Zyklus 45- bis 50-mal wiederholt. Zuletzt wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu zeigen, dass die gemessenen Fluoreszenzsignale auf ein spezifisches PCR-Produkt zurück zu führen waren. Dazu wurden die Proben um 1,75 °C pro Minute von 60 °C auf 95 °C erhitzt und dabei stets die Fluoreszenz gemessen. Aus der gewonnenen Kurve konnte über das Maximum der ersten Ableitung die spezifische Schmelztemperatur für jedes PCR-Produkt ermittelt werden.

### 3. Material und Methoden



**Abbildung 11 | Thermozyklus der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.** Der Reaktionsmix wurde zunächst für fünf Minuten bei 95 °C erwärmt, um die Hotstart-Polymerase zu aktivieren. Anschließend folgte der Zweischritt-Amplifikationszyklus, bei dem die Doppelstränge erst für zehn Sekunden bei 95 °C aufgeschmolzen wurden und dann bei 60 °C das Annealing der Primer und die Amplifikation durch die Polymerase stattfinden konnte. Im Anschluss an jeden Zyklus wurde der Anstieg der Fluoreszenz detektiert, wobei dieser Zweischritt-Zyklus 45- bis 50-mal wiederholt wurde. Zuletzt wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Proben um 1,75 °C pro Minute kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhitzt und dabei stets die Fluoreszenz gemessen. Aus der gewonnenen Kurve konnte über das Maximum der ersten Ableitung die spezifische Schmelztemperatur für jedes PCR-Produkt ermittelt werden.

Um die Ergebnisse quantitativ auszuwerten, wurde mit Hilfe des *CalQplex*<sup>®</sup> Algorithmus der Schwellenwertzyklus (Ct) für jede Amplifikationskurve berechnet. Dieser Algorithmus bestimmt das Maximum der zweiten Ableitung, jenen Punkt bei dem der relativ größte Zuwachs an PCR-Produkt verzeichnet wird. Für die relative Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Dabei wird zunächst der Ct gegen eine endogene Kontrolle (Haushaltsgen) normalisiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Haushaltsgen})$$

und anschließend die behandelte Probe mit dem unbehandelten Kalibrator verglichen:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Probe}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kalibrator})$$

Das relative Expressionslevel (E) des Zielgens ergibt sich letztendlich aus  $E = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

## 3. Material und Methoden

### 3.2.5.5 Kapillargelelektrophorese

Als zusätzliche Kontrolle der Spezifität der PCR wurden die Produkte im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt. Analog zu herkömmlicher Gelelektrophorese wird Kapillargelelektrophorese angewandt, um DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe in einem elektrischen Feld zu separieren.

Dabei wurde die PCR-Probe bei 5 kV für zehn Sekunden in die mit einem Polymergel gefüllte Kapillare (*QIAxcel DNA Screening Kit*) gezogen und für sieben Minuten bei 5 kV aufgetrennt. Durch Interkalation des im Gel vorhandenen Ethidiumbromids mit der DNA wurde deren Detektion ermöglicht. Kleine Unterschiede zwischen den Kapillaren wurden mit Hilfe eines Alignmentmarkers bestehend aus 15 bp und 500 bp großen Fragmenten (*QIAxcel Alignment Marker 15 bp/500 bp*) und der Software *BioCalculator 3.0* ausgeglichen. Zudem ermöglichte ein DNA-Größenstandard (*QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII*) die Längenbestimmung der detektierten Fragmente. Die Ergebnisse wurden schließlich als Elektropherogramm und als Gelbild dargestellt.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.6 Proteinbiochemische Analysen

#### 3.2.6.1 Immuncytochemie

Um die Expression bestimmter zellulärer Strukturen nachzuweisen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dabei kamen spezifische unmarkierte Primärantikörper zum Einsatz, an die wiederum fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper binden.

Nach der Kultivierung von Zellen auf 2-Well-Chamberslides bzw. auf Glasplättchen wurden diese einmal mit PBS gespült, fünf Minuten in einer bei -20 °C gekühlten Methanol/Aceton (7:3)-Lösung, welche 1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) enthielt, fixiert und anschließend dreimal mit PBS gespült. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit 1,65 % Ziegennormalserum bei Raumtemperatur wurden die Zellen eine Stunde lang bei 37 °C mit der in TBST und 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnten Primärantikörperlösung (Tabelle 2) inkubiert. Auf dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS folgte die Inkubation mit der in PBS verdünnten Sekundärantikörperlösung (Tabelle 3), welche ebenfalls eine Stunde lang bei 37 °C erfolgte. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit Aqua dest. gewässert und anschließend in Vectashield eingedeckt. Die Analyse der Färbung wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Quantitative Aussagen wurden durch Auszählung von jeweils drei repräsentativen Aufnahmen mit durchschnittlich 500 Zellen pro Aufnahme erhalten. Aussagen zu Längen von Zellfortsätzen wurden durch Ausmessung von Neurofilament-positiven Zellen von jeweils drei repräsentativen Aufnahmen getroffen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.6.2 Immunhistochemie

In Zusammenarbeit mit Dr. Jennifer Kloepper (Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Lübeck) wurden immunhistochemische Untersuchungen 6 µm bis 8 µm dicker Kryoschnitte humaner Achselhaut durchgeführt. Für den Nachweis des Intermediärfilaments Nestin wurden die Schnitte bei -20 °C für zehn Minuten in Aceton fixiert und für zehn Minuten an der Luft getrocknet, endogene Peroxidase wurde nach dreimaligem Spülen mit TNT Puffer für 15 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung inhibiert. Die Schnitte wurden mit Avidin und Biotin für 15 Minuten und anschließend mit 5 % Ziegennormalserum für 30 Minuten vorinkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen humanes Nestin (eingesetzte Verdünnung 1:1000) fand über Nacht bei 4 °C statt, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation mit dem biotinmarkierten Zweitantikörper bei Raumtemperatur. Anschließend wurde ein Streptavidin-Meerrettich-peroxidase-Konjugat (1:100) für 30 Minuten dazugegeben. Eine Signalverstärkung wurde durch eine fünfminütige bei Raumtemperatur durchgeführte Inkubation mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Tyramid Verstärkerreagenz erwirkt. Zum Schluss wurden die Kryoschnitte mit DAPI für eine Minute gegengefärbt und in Fluoromount-G eingedeckt.

## 3. Material und Methoden

### 3.2.6.3 Transkriptionsfaktor-Stammzellchip

Mit Hilfe des Transkriptionsfaktor-Stammzellchips (*Transcription Factor Stem Cell Chip*, TF-Chip) kann man Stammzellen auf die Existenz bestimmter Transkriptionsfaktoren (TFs), die sich in einem aktivierten Zustand befinden und eine wichtige Funktion bei der Differenzierung, der Proliferation und der Apoptose ausüben, untersuchen. Dafür ist auf der beschichteten Glasoberfläche des Chips Doppelstrang-DNA (dsDNA) mit den spezifischen Bindungsstellen für die TFs gespottet (Abbildung 12).

#### 3.2.6.3.1 Kernproteinextraktion

Kernproteinextrakte wurden unter Verwendung des *Nuclear Extract Kits* nach Herstellerangaben aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen. Dafür wurden etwa zwei Millionen Zellen aus zwei zu 90 % konfluent bewachsenen 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen pelletiert und mit Hilfe eines hypotonen Puffers lysiert. Nach anschließender Zentrifugation konnte aus dem Überstand zunächst die cytoplasmatische Proteinfraktion gewonnen werden. Die Resuspension und Inkubation des verbliebenen Pellets mit einem vollständig lysierenden Puffer führte dazu, dass nach einem weiteren Zentrifugations-schritt im Überstand die Kernproteinfraktion zu finden war. Beide Proteinfractionen wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.6.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand nach einem Protokoll von Bradford statt [Bradford, 1976]. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G250“ an Proteine zu binden, wobei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 470 nm nach 595 nm stattfindet. Durch die Absorption bei 595 nm kann anhand einer Eichgeraden, die zuvor mit bekannten Proteinmengen erstellt wurde, die Proteinkonzentration ermittelt werden. Zur Bestimmung der Konzentration

### 3. Material und Methoden

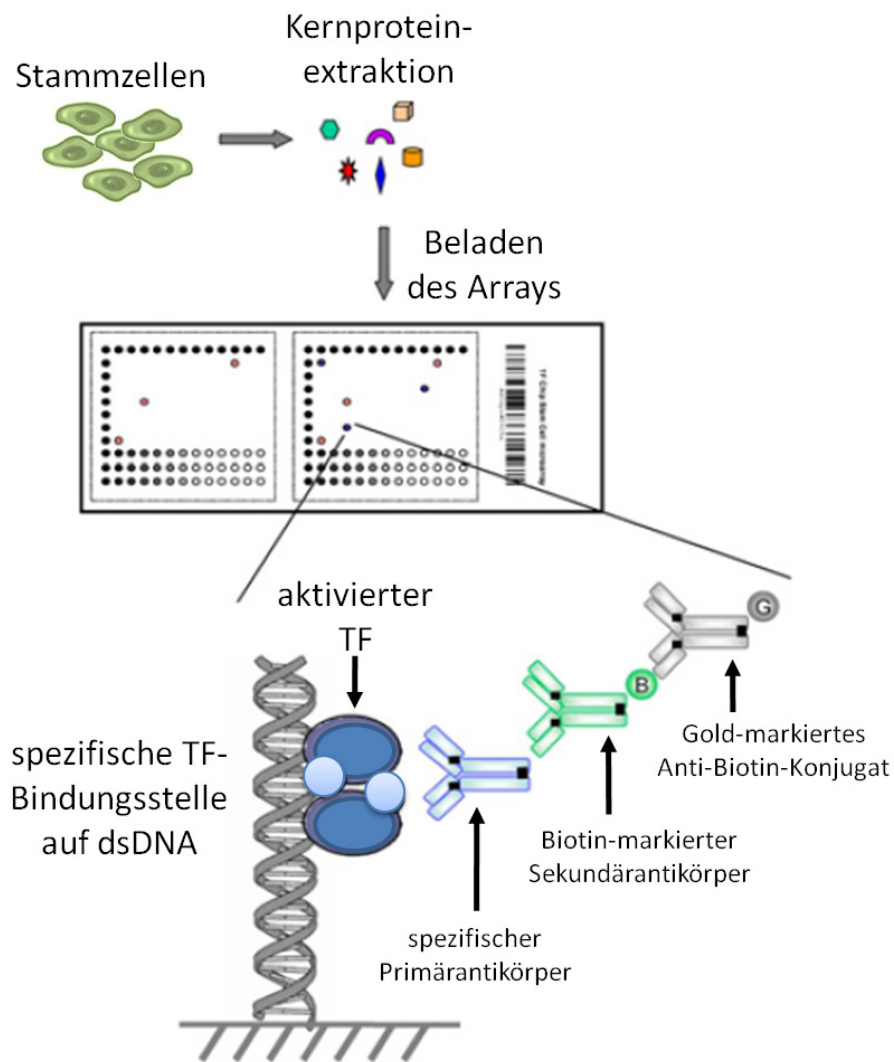
wurden je 1 µl Probe mit 99 µl Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz jeweils in Doppelbestimmung angesetzt. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 1 µl vollständigem Lysispuffer des *Nuclear Extract Kits*, 99 µl Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde durch einen Abgleich mit der im Photometer abgespeicherten Eichkurve ermittelt.

#### **3.2.6.3.3 TF-Chip**

Bei der Durchführung des TF-Chips wurde strikt nach Herstellerangaben verfahren. Für den Nachweis aktivierter TFs wurden je Probe 30 µg Protein benötigt. Bevor der Chip mit der Proteinlösung beladen wurde, mussten unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation mit einer Blockierlösung abgesättigt werden. Der beladene Chip wurde über Nacht inkubiert und die Detektion gebundener TFs am Folgetag unter Verwendung des *Silverquant Detection Kits* durchgeführt. Die dabei eingesetzten Primärantikörper sind so konstruiert, dass sie ganz spezifisch nur aktivierte TFs erkennen. Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte zunächst mit einem biotinmarkierten Sekundärantikörper, der anschließend durch ein goldmarkiertes Anti-Biotin-Konjugat markiert wurde. Die letztendliche Nachweisreaktion wurde mit einer Lösung aus Silbernitrat und einem reduzierenden Mittel durchgeführt, wobei die Goldpartikel als Katalysator für die Reaktion, bei der es zu einer Silberpräzipitation kommt, dienen.

Nach gründlichem Waschen und Trocknen des Chips konnte mit Hilfe des *Silverquant-Scanners* die colorimetrische Detektion erfolgen. Für die Datengenerierung wurde das *TF Chip Data Analysis Tool* verwendet, wobei die Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren in willkürlichen Einheiten (*Arbitrary Units, AU*) dargestellt wurde.

### 3. Material und Methoden



**Abbildung 12 | Der Transkriptionsfaktor-Stammzellchip.** Auf der Glasoberfläche des Chips ist Doppelstrang-DNA (dsDNA) mit den spezifischen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFs) gespottet. Wird der Chip mit Kernproteinextrakten, die aus Stammzellen gewonnen werden, beladen, binden aktivierte TFs an ihre charakteristischen Bindungsstellen. Die gebundenen TFs werden durch spezifische Primärantikörper erkannt, die wiederum von Biotin-markierten Sekundärantikörpern gebunden werden. Zuletzt bindet ein Gold-markiertes Anti-Biotin-Konjugat an den Sekundärantikörper. Die letztendliche Nachweisreaktion wird mit einer Lösung aus Silbernitrat und einem reduzierenden Mittel durchgeführt, wobei die Goldpartikel als Katalysator für die Reaktion, bei der es zu einer Silberpräzipitation kommt, dienen. Quelle: [www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de) (modifiziert).

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.6.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In Kooperation mit Susanne Löffler aus der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) durchgeführt, um den Neurotransmitter Dopamin in Kokultur-behandelten PSCs und der entsprechenden Kontrolle zu analysieren.

Dafür wurden die PSCs entsprechend des Kokultur-Protokolls behandelt (siehe 3.2.4.2). Zur Analyse wurden die Zellen vom Zellkulturboden abtypsiniiert (siehe 3.2.2.1) und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C zwischen gelagert. Um die Zellen zu lysieren wurde das Pellet in kaltem PBS resuspendiert und für zehn Minuten bei 180 g und 4 °C zentrifugiert. Pro 100 µl Zellpellet wurden daraufhin 500 µl PBS auf die Zellen gegeben, bevor mit einem Glashomogenisator die Zellen durch Scherkräfte lysiert wurden. Anschließend wurde dem Homogenisat 0,33 % Perchlorsäure hinzugefügt, alles für zehn Sekunden gevortext und für zehn Minuten bei 90 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen und für die HPLC-Analyse verwendet werden. Um die Messwerte anschließend mit einer Zellzahl korrelieren zu können, wurde zuvor durch Zellzählung die Anzahl lysierter Zellen bestimmt. Die HPLC-Analyse wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [Lotharius et al., 2002], wobei die Datenkalibrierung gegen eine Standardreihe mit bekannter Dopamin-Menge erfolgte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.6.5 Wachstumsfaktor-Antikörper-Array

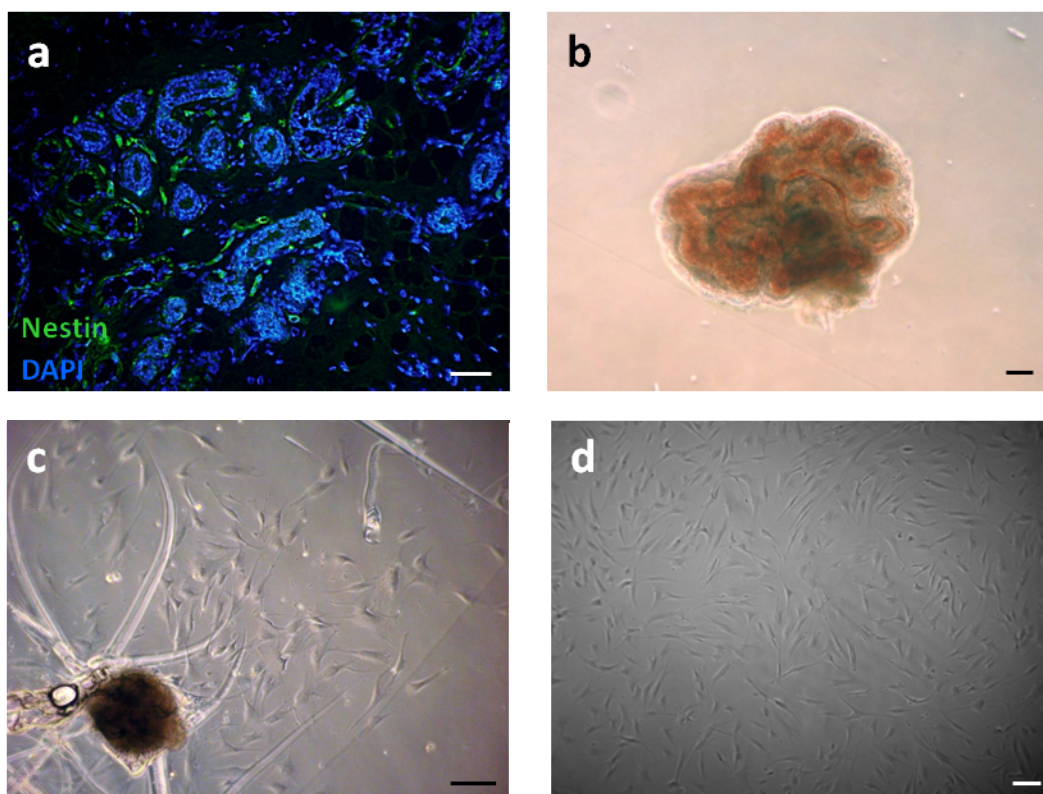
Um die während der Kokultivierung von Stammzellen und Rattenhirn ins Medium abgegebenen Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurde ein Wachstumsfaktor-Antikörper-Array (*Human Growth Factor Antibody Array I*) verwendet. Bei diesem chipbasierten Array sind Antikörper auf eine Glasoberfläche gespottet, die den Nachweis von 41 Wachstumsfaktoren in einem Ansatz ermöglichen. Untersucht wurde dabei Medium, welches nach zweitägiger Kokultur abgenommen wurde, Medium in dem nur die Zellen oder nur das Hirn kultiviert worden sind und das Kultivierungsmedium an sich.

Bei der Versuchsdurchführung wurde strikt nach Herstellerangaben verfahren. An eine bei 4 °C über Nacht stattgefundenen Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf dem Chip konnten am Folgetag jeweils 100 µl Probe für zwei Stunden in die Inkubationskammern gegeben werden. Bei den Proben handelte es sich um die zuvor abgenommenen konditionierten Medien, welche steril filtriert und auf Eis zwischengelagert wurden. Um die korrekte Durchführung der Methode zu überprüfen, wurde zudem zu jeder Probe 1 µl einer internen Kontrolle hinzu gegeben. Im Anschluss an mehrere Waschschriffe erfolgte die Detektion gebundener Wachstumsfaktoren. Dafür wurde der im Kit enthaltene Antikörper-Mix, der aus biotinmarkierten wachstumsfaktorspezifischen Antikörpern bestand, für zwei Stunden auf den Chip gegeben. Die Nachweisreaktion erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C durch Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin. Nach gründlichem Waschen und Trocknen des Chips wurde er unter Verwendung des *Axon GenePix Array Scanners* eingescannt (Cy3-Anregung: 532 nm) und ausgewertet. Dieser Versuch wurde fünfmal mit unterschiedlichen biologischen Proben wiederholt.

### 4. Ergebnisse

#### ***4.1 Etablierung einer neuartigen adulten Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen***

Innerhalb humaner Achselhaut wurde die Herkunft Nestin-exprimierender Zellen ermittelt. Dabei zeigten immunhistochemische Färbungen von Gewebekryoschnitten die Lokalisation dieser Zellen unter anderem im mesenchymalen Schweißdrüsengewebe (Abbildung 13 a). Um diese Nestin-positiven Zellen in Kultur zu bringen, wurde ein Protokoll etabliert (siehe 3.2.1.2.3), bei dem Schweißdrüsen explantiert (Abbildung 13 b) und auf Kollagen Typ IV-beschichteten Schalen kultiviert wurden. Innerhalb von zehn Tagen wuchsen aus den Schweißdrüsen die ersten spindelförmigen Zellen aus (Abbildung 13 c).

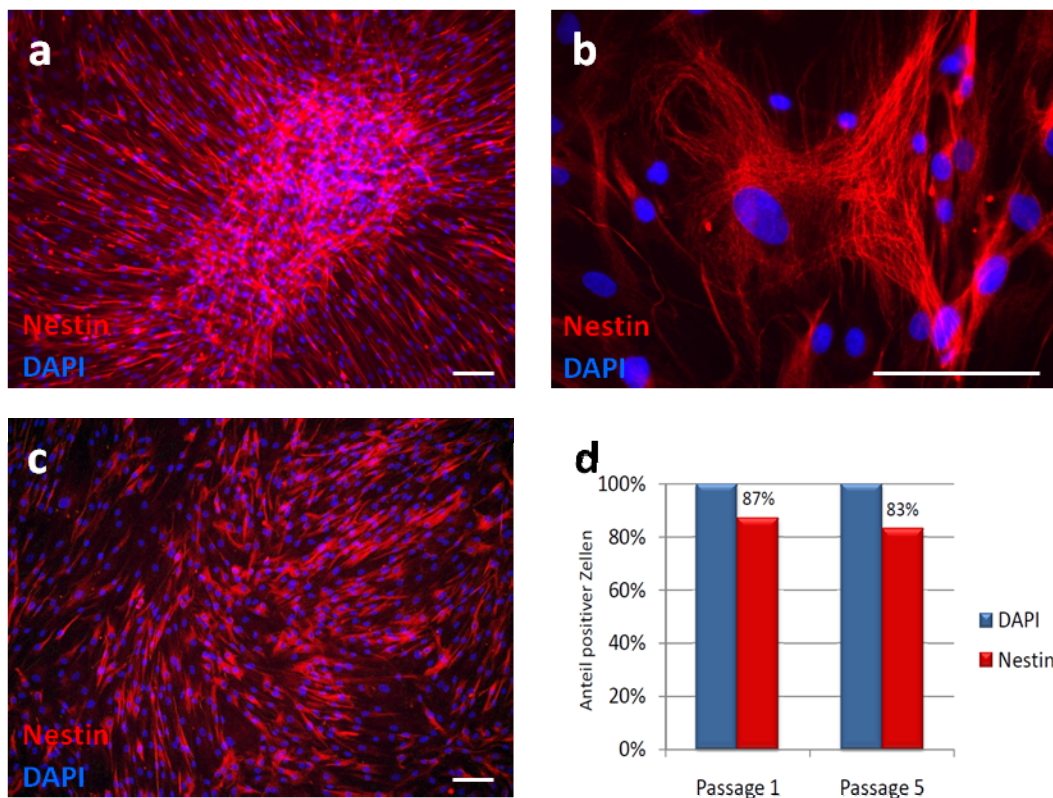


**Abbildung 13 | Humane Schweißdrüsen als Quelle hochproliferativer Zellen.** Eine immunhistologische Färbung von Kryoschnitten humaner Achselhaut belegte die Lokalisation Nestin-positiver Zellen unter anderem im mesenchymalen Schweißdrüsengewebe (a). Um diese Zellen zu isolieren, wurden Schweißdrüsen explantiert (b) und auf Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturschalen mit Hilfe von Injektionsnadeln am Schalenboden fixiert. Nach etwa zehn Tagen konnten auswachsende Zellen detektiert werden (c), woraus eine proliferierende Zelllinie hervorging (d). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

## 4. Ergebnisse

Bei der Verwendung von Zellkulturplastik sowie Gelatine-beschichteten Schalen konnte kein vergleichbares Auswachsen erzielt werden (ohne Abbildung). Eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen Typ IV war daher für eine erfolgreiche Isolierung der Zellen absolut notwendig.

Dieses Isolierungsverfahren resultierte in einer hochproliferativen Zellpopulation (Abbildung 13 d), die bis Passage 31 in Kultur gehalten werden konnte. Ob es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Nestin-positive Zellen handelte, konnte durch eine immunocytochemische Analyse geklärt werden. So wurden in der ersten Passage 87 % der Zellen positiv für das Intermediärfilament getestet (Abbildung 14 a, d), wobei die Zellen teilweise dazu tendierten, sich zu dreidimensionalen Aggregaten zusammen zu lagern (Abbildung 14 a). Eine stark vergrößerte Aufnahme einer Nestin-positiven Zelle verdeut-

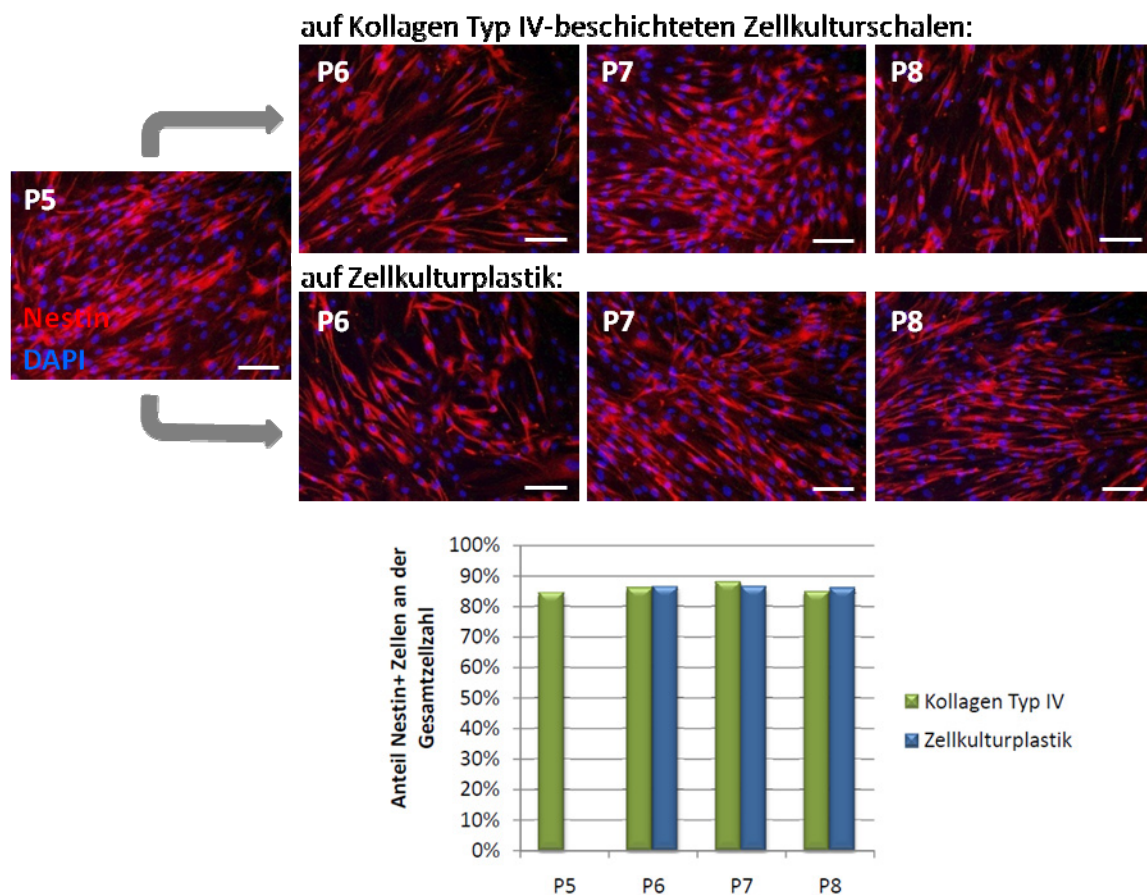


**Abbildung 14 | Nestin-Expression in Zellen aus humanen Schweißdrüsen.** Eine immunocytochemische Analyse ergab, dass nach der ersten Passage 87 % der Zellen positiv für den Stammzellmarker Nestin waren (a, d). Eine stark vergrößerte Aufnahme einer Nestin-positiven Zelle verdeutlicht die filamentäre Struktur des angefärbten Intermediärfilaments (b). Auch nach fünf Passagen waren 83 % der Zellen positiv für Nestin (c, d). Maßstabsbalken: 100 µm.

## 4. Ergebnisse

licht die filamentäre Struktur des angefärbten Intermediärfilaments (Abbildung 14 b). Nach fünf Passagen konnte Nestin in 83 % der Zellen detektiert werden (Abbildung 14 c, d).

Während eine Kollagen Typ IV-Beschichtung zum Auswachsen der Zellen unabdingbar war, konnte gezeigt werden, dass die Folgekultivierung auf Zellkulturplastik zum einen möglich war und zum anderen im Vergleich zur Kollagen-Beschichtung zu keiner signifikanten Änderung des Anteils Nestin-exprimierender Zellen führte. So konnten zwischen der fünften und achten Passage keine Unterschiede in der Anzahl positiver Zellen beobachtet werden. Sie schwankte um 86 %, unabhängig davon, welche Passage untersucht wurde und auf welchem Untergrund die Zellen gewachsen sind (Abbildung 15).



**Abbildung 15 | Einfluss der Zellkulturoberfläche auf die Nestin-Expression.** Ein Vergleich der Nestin-Expression einer aus Schweißdrüsen abgeleiteten Zellpopulation, die von Passage fünf bis Passage acht (P5-P8) auf Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturschalen und von P6 bis P8 auf Zellkulturplastik kultiviert wurde, zeigte keine signifikanten Unterschiede im Anteil Nestin-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. In allen untersuchten Passagen und auf beiden Oberflächen konnten etwa 86 % Nestin-positive Zellen detektiert werden. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

## 4. Ergebnisse

### ***4.2 Charakterisierung der glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellpopulationen***

Um die Stammzellpopulationen aus dem Pankreas (*Pancreatic Stem Cells*, PSC) und der Parotis (*Parotis-derived Stem Cells*, PDSC) mit den Stammzellen aus der Vollhaut (*Skin-derived Stem Cells*, SDSC) und den neuartigen Stammzellen aus den Schweißdrüsen (*Sweat Gland-derived Stem Cells*, SGSC), hinsichtlich ihrer Stammzellartigkeit und ihres spontanen Differenzierungspotentials zu untersuchen, wurde die Expression diverser Stammzellmarker und Marker für Zelltypen, die den drei embryonalen Keimblättern entstammen, auf mRNA- und Proteinebene analysiert.

Eine mittels PCR durchgeführte Analyse zeigte auf transkriptioneller Ebene die Expression verschiedener Stammzellmarker (Abbildung 16). So konnte Nestin sowohl in PSCs, PDSCs, SDSCs als auch in SGSCs detektiert werden. Des Weiteren konnte die mRNA der Stammzellmarker *Cluster of Differentiation Antigen 9* (CD9), *c-Myc*, *Krüppel-like Factor 4* (Klf-4), *Octamer-binding Transcription Factor 4* (Oct-4) und *SRY (Sex determining Region Y)-Box 2* (Sox2) in allen Zellpopulationen nachgewiesen werden.

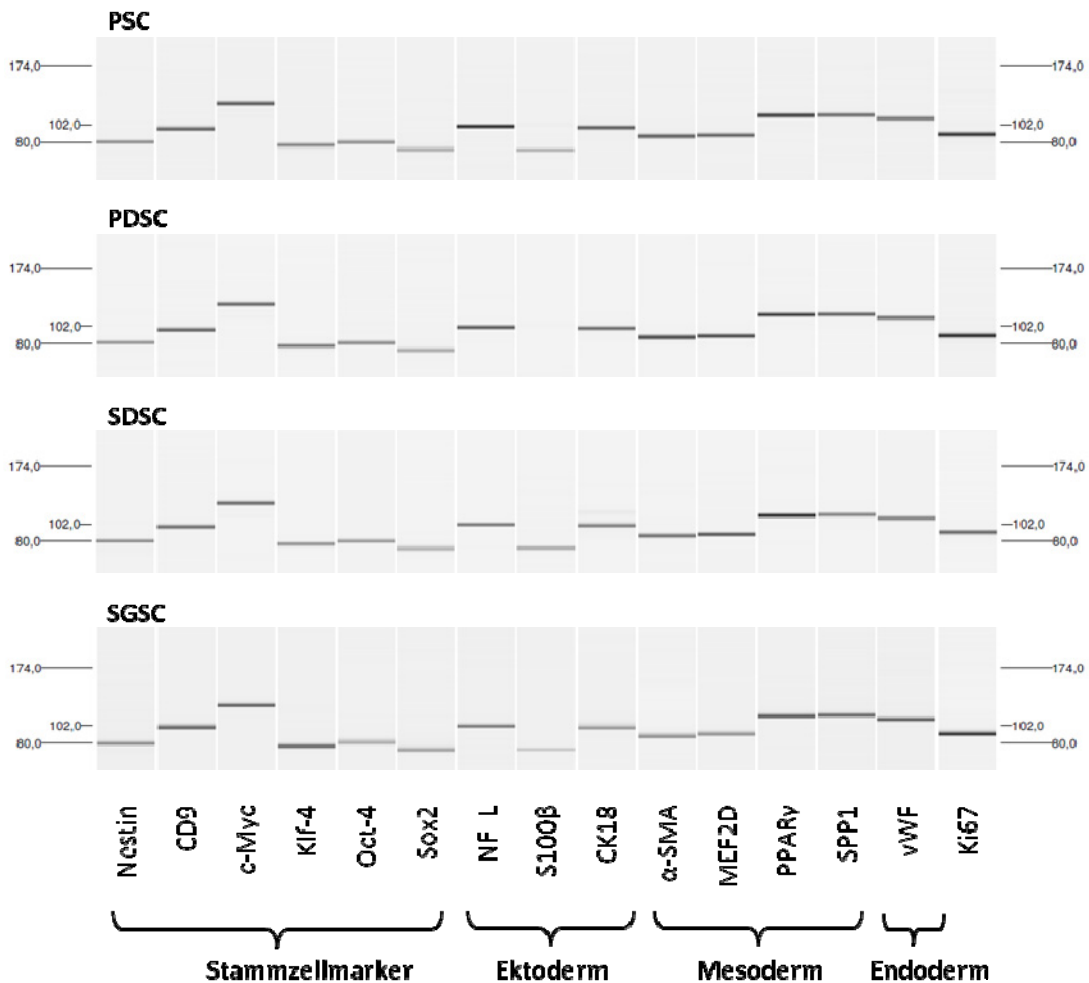
Um eine spontane Differenzierung in Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter zu demonstrieren, wurden exemplarisch Marker für Zellen ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Ursprungs analysiert. Dabei zeigte sich, dass in den untersuchten Stammzellpopulationen auf transkriptioneller Ebene eine spontane Differenzierung in Zellen aus eben diesen drei Keimblättern detektierbar war (Abbildung 16). So konnte die mRNA vom leichtkettigen Neurofilament (NF\_L), einem Marker für neuronale Zellen, und des epithelialen Markers Cytokeratin 18 (CK18), die beide ihren Ursprung im Ektoderm haben, in allen untersuchten Stammzellpopulationen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in PSCs, SDSCs und SGSCs der Schwanzzellmarker S100 $\beta$  aufgezeigt werden.

Ein mesodermales Differenzierungspotential wurde durch die Detektion von *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) und des *Myocyte-specific Enhancer Factors 2D* (MEF2D, beide myogen), des *Peroxisome Proliferator-activated Receptors gamma* (PPAR $\gamma$ , adipogen) und des *Secreted Phosphoproteins 1* (SPP1, osteogen) belegt.

## 4. Ergebnisse

Auch eine endodermale Differenzierung konnte in allen Zellpopulationen durch den Nachweis der mRNA des endothelialen Markers von-Willebrand-Faktor (vWF) gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde auf transkriptioneller Ebene die hohe Proliferationsaktivität der Stammzellen durch Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 belegt (Abbildung 16).

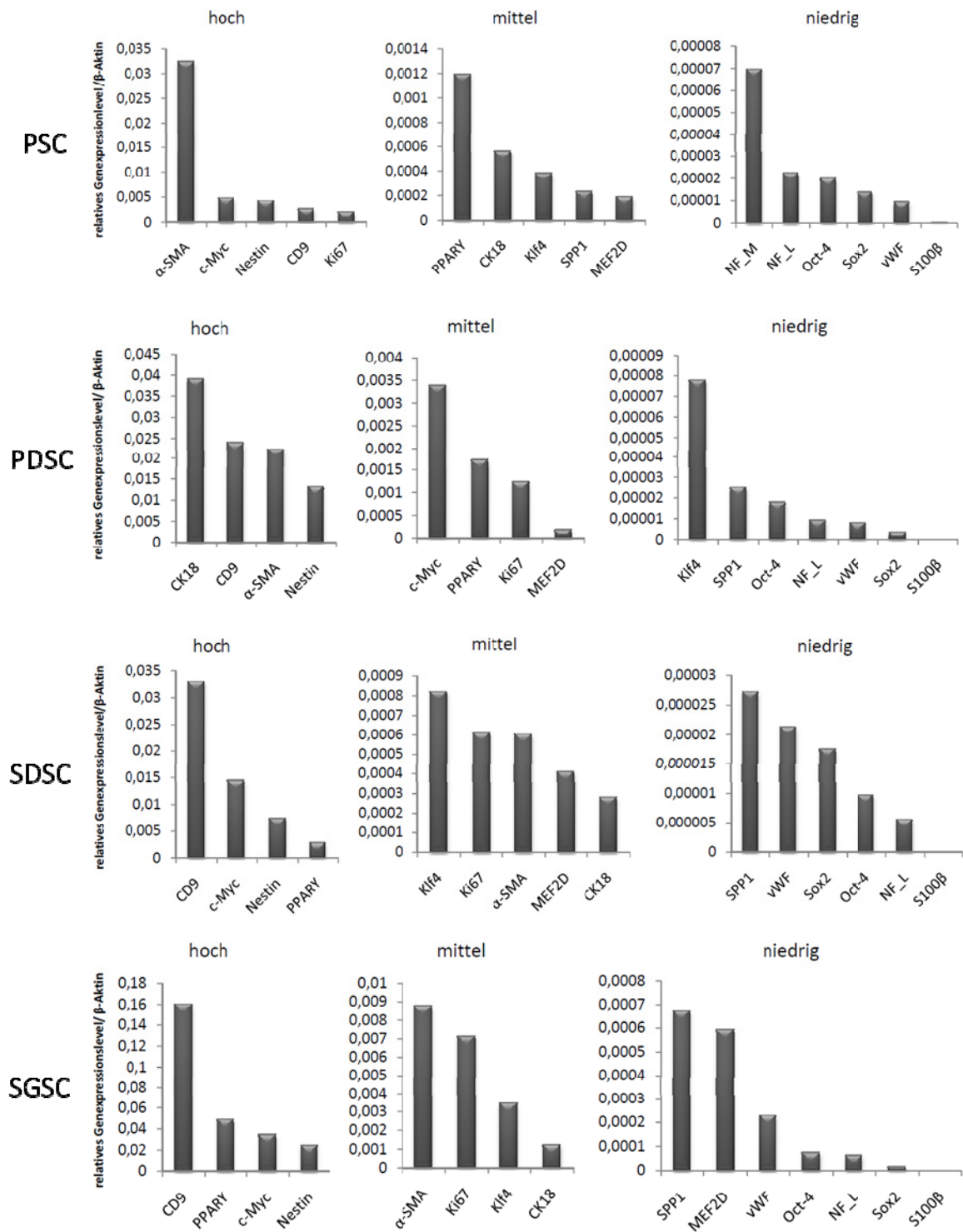


**Abbildung 16 | Spontane Expression spezifischer mRNAs in glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellpopulationen.** Mittels Reverser Transkriptions-PCR und anschließender Kapillargelelektrophorese konnte in Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) die Expression diverser Stammzellmarker, Marker für die ektodermale, mesodermale und endodermale Differenzierung und Proliferation (Ki67) nachgewiesen werden. Für die Überprüfung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Größenstandard verwendet.

## 4. Ergebnisse

Da es sich bei der durchgeführten PCR um eine quantitative PCR (qPCR) gehandelt hat, können die Ergebnisse neben der Bandendarstellung im Gelbild auch in ihrer Expressionsintensität relativ zum Haushaltsgen ( $\beta$ -Aktin) abgebildet werden (Abbildung 17). Diese Darstellung lässt einen Rückschluss darauf ziehen, ob ein Gen stark, mittel oder niedrig exprimiert worden ist.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 17 | Relative Expression spezifischer Marker-mRNAs spontan differenzierter Stammzellen.** Für Stammzellen aus dem Pankreas (PSCs), der Parotis (PDSCs), der Vollhaut (SDSCs) und den Schweißdrüsen (SGSCs) konnten hoch, mittel und niedrig exprimierte Gene spezifisch für Stammzellen (Nestin, CD9, c-Myc, Klf-4, Oct-4, Sox2), Zellen des ektodermalen (NF\_L, S100β, CK18), mesodermalen (α-SMA, MEF2D, PPARγ, SPP1) und endodermalen Keimblatts (vWF) sowie für Proliferation (Ki67) mittels quantitativer PCR in Abhängigkeit zum Haushaltsgen (β-Aktin) bestimmt werden.

## 4. Ergebnisse

Um auch auf Proteinebene zu zeigen, dass es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um Stammzellen handelte und diese ein hohes Differenzierungspotential aufwiesen, wurde zum einen eine immunocytochemische Analyse durchgeführt und zum anderen ein Transkriptionsfaktor-Stammzellchip (TF-Chip) zum Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren verwendet.

Auch in der Proteinexpressionsanalyse zeigte sich die Stammzellartigkeit aller Zellpopulationen in der Expression des Intermediärfilaments Nestin (Abbildung 18 a - Abbildung 21 a).

Ein neuroektodermales Differenzierungspotential konnte durch den Nachweis der filamentären Neurofilamente (NF, Abbildung 18 b - Abbildung 21 b) und des *Glial Fibrillary Acidic Proteins* (GFAP, Abbildung 19 c - Abbildung 21 c) aufgezeigt werden. Lediglich in PSCs konnte keine GFAP-Expression detektiert werden (Abbildung 18 c). Cytokeratin 18 (CK18) und ein Mix verschiedener Cytokeratine (pan CK), die ebenfalls charakteristisch für Zellen ektodermalen Ursprungs sind und eine filamentäre Struktur aufweisen, konnten in allen Zellpopulationen detektiert werden (Abbildung 18 d - Abbildung 21 d, Abbildung 18 e - Abbildung 21 e).

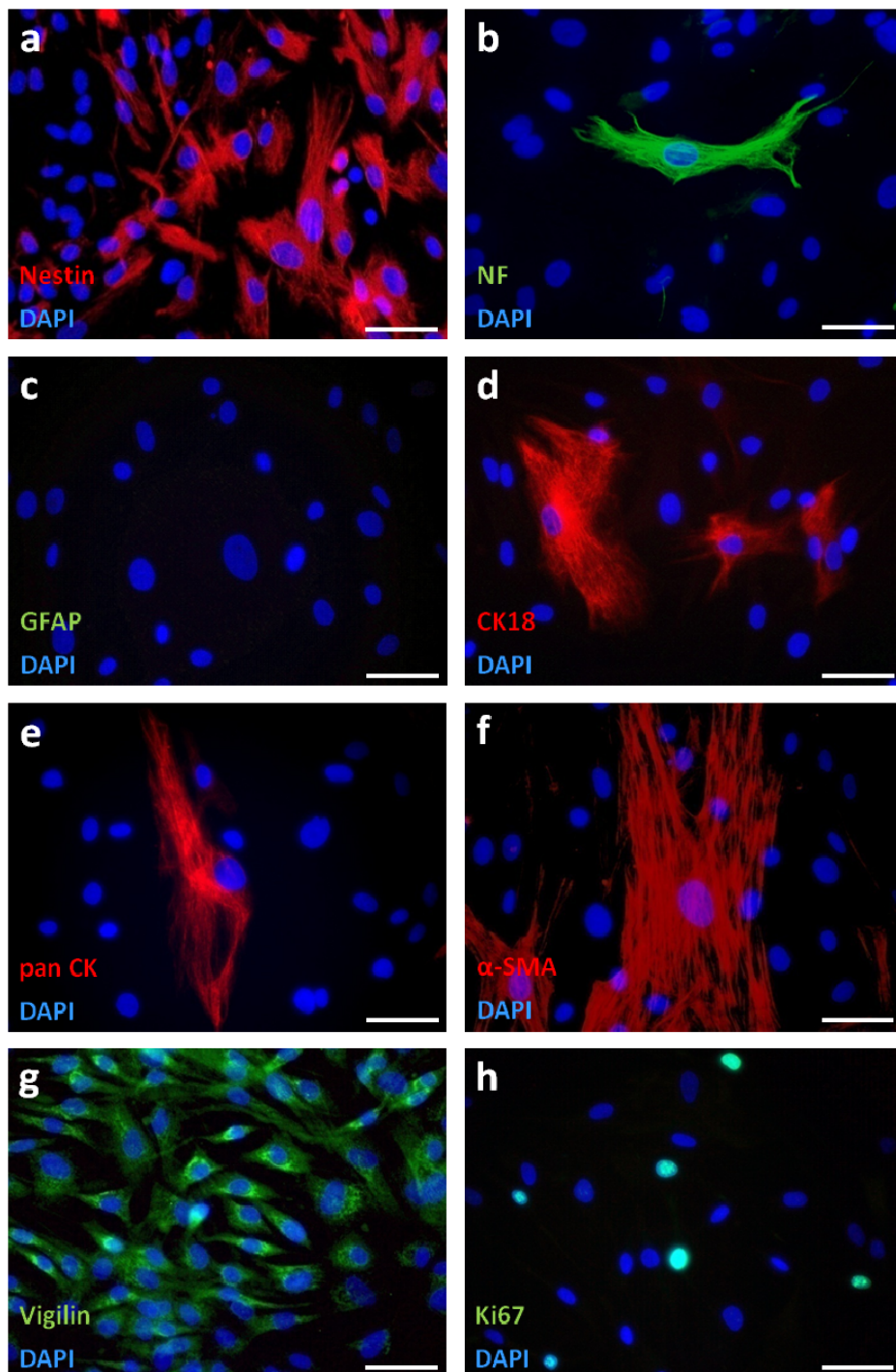
Eine mesodermale Differenzierung wurde immunocytochemisch durch Anfärbung von  $\alpha$ -SMA (Abbildung 18 f - Abbildung 21 f) und mit Hilfe des TF-Chips durch Detektion verschiedener Transkriptionsfaktoren nachgewiesen (Abbildung 22). Es wurden die adipogen-spezifischen Marker PPAR $\gamma$  (positiv in PDSC und SDSC) und das *CCAAT/Enhancer Binding Protein beta* (C/EBP $\beta$ , in allen untersuchten Populationen), die myogenen Marker MyoD (in PDSC und SDSC) und MEF2 (in allen Zellpopulationen) und der osteogene Marker RUNX2 (in PDSC, SDSC und SGSC) aufgezeigt.

Ein endodermales Differenzierungspotential konnte auf Proteinebene lediglich durch Detektion des leber- und pankreasspezifischen Transkriptionsfaktors *Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha/ beta* (HNF-1 $\alpha/\beta$ ) bei Stammzellen aus dem Pankreas, der Vollhaut und den Schweißdrüsen mit Hilfe des TF-Chips belegt werden.

## 4. Ergebnisse

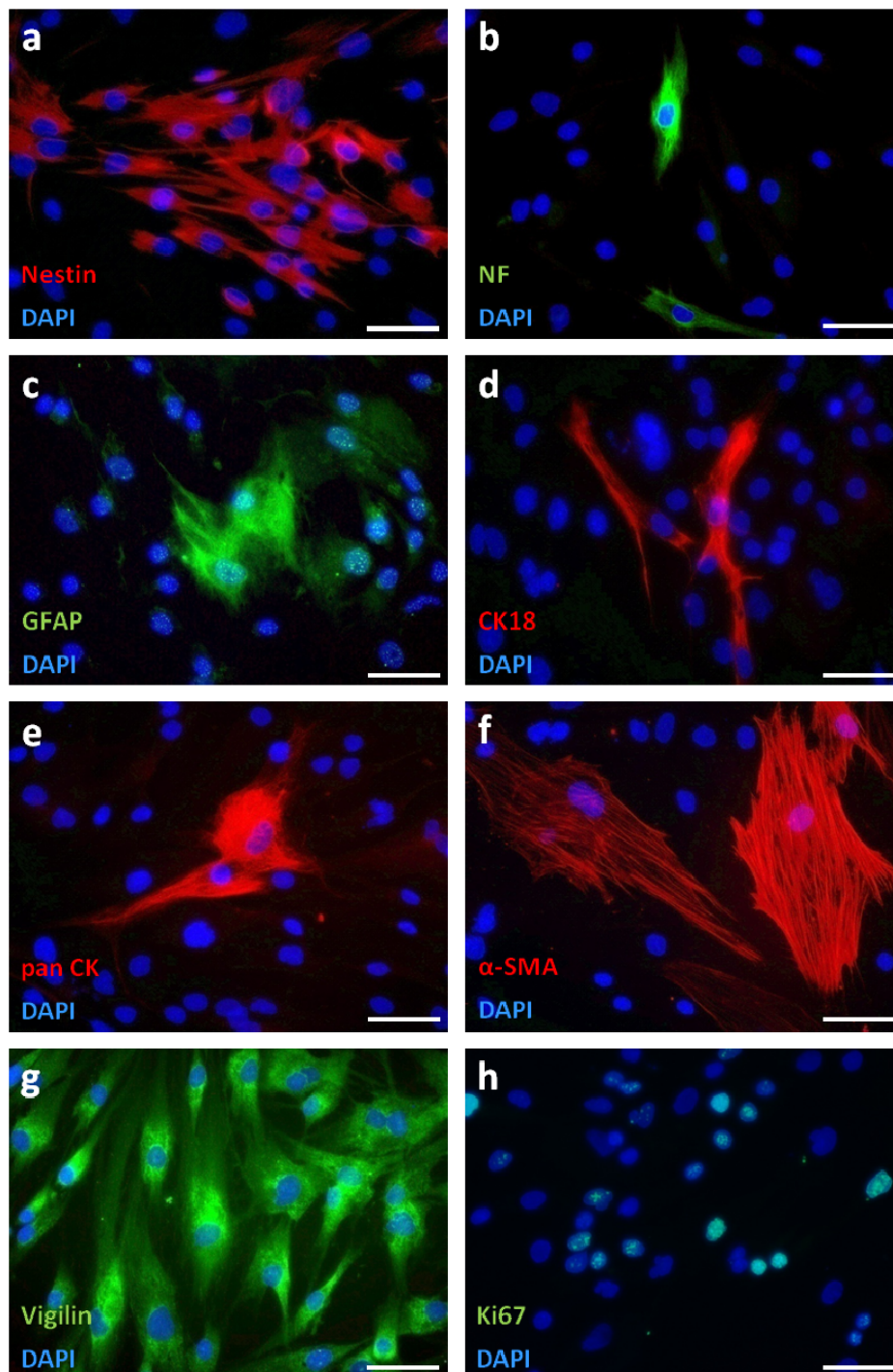
Dass die untersuchten Stammzellpopulationen über eine aktive Proteinbiosynthese verfügten, konnte durch Detektion des Markerproteins Vigilin belegt werden (Abbildung 18 g - Abbildung 21 g). Ein Nachweis der hohen Proliferationsaktivität glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen wurde immunocytochemisch durch Anfärbung des zellkern-assoziierten Proliferationsmarkers Ki67 (Abbildung 18 h - Abbildung 21 h) und durch ein positives Signal beim Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) im TF-Chip erbracht (Abbildung 22).

## 4. Ergebnisse



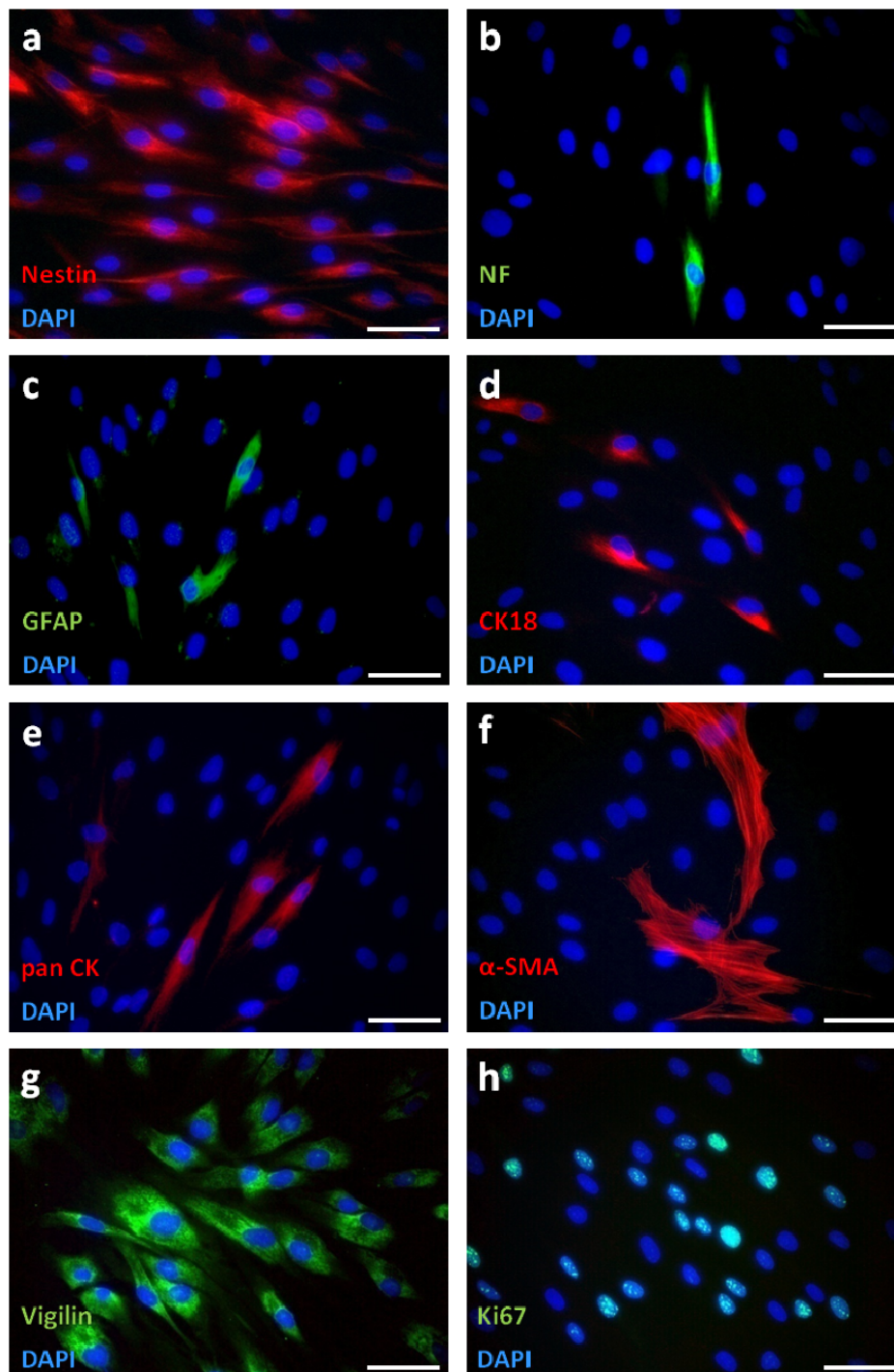
**Abbildung 18 | Charakterisierung spontan differenzierter pankreatischer Stammzellen.** Mit Hilfe einer immunocytochemischen Färbung konnte in pankreatischen Stammzellen der Stammzellmarker Nestin detektiert werden (a). Auch ectodermale Markerproteine wie Neurofilamente (NF, b), Cytokeratin 18 (CK18, d) und ein Mix verschiedener Cytokeratine (panCK, e) konnten in der Zellpopulation nachgewiesen werden. Eine positive Färbung für das *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) konnte nicht gezeigt werden (c). Stellvertretend für die mesodermale Differenzierungsrichtung wurde *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) spezifisch angefärbt (f). Vigilin wurde in Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese (g) und Ki67 in Zellen mit einer hohen Proliferationsaktivität (h) detektiert. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 4. Ergebnisse



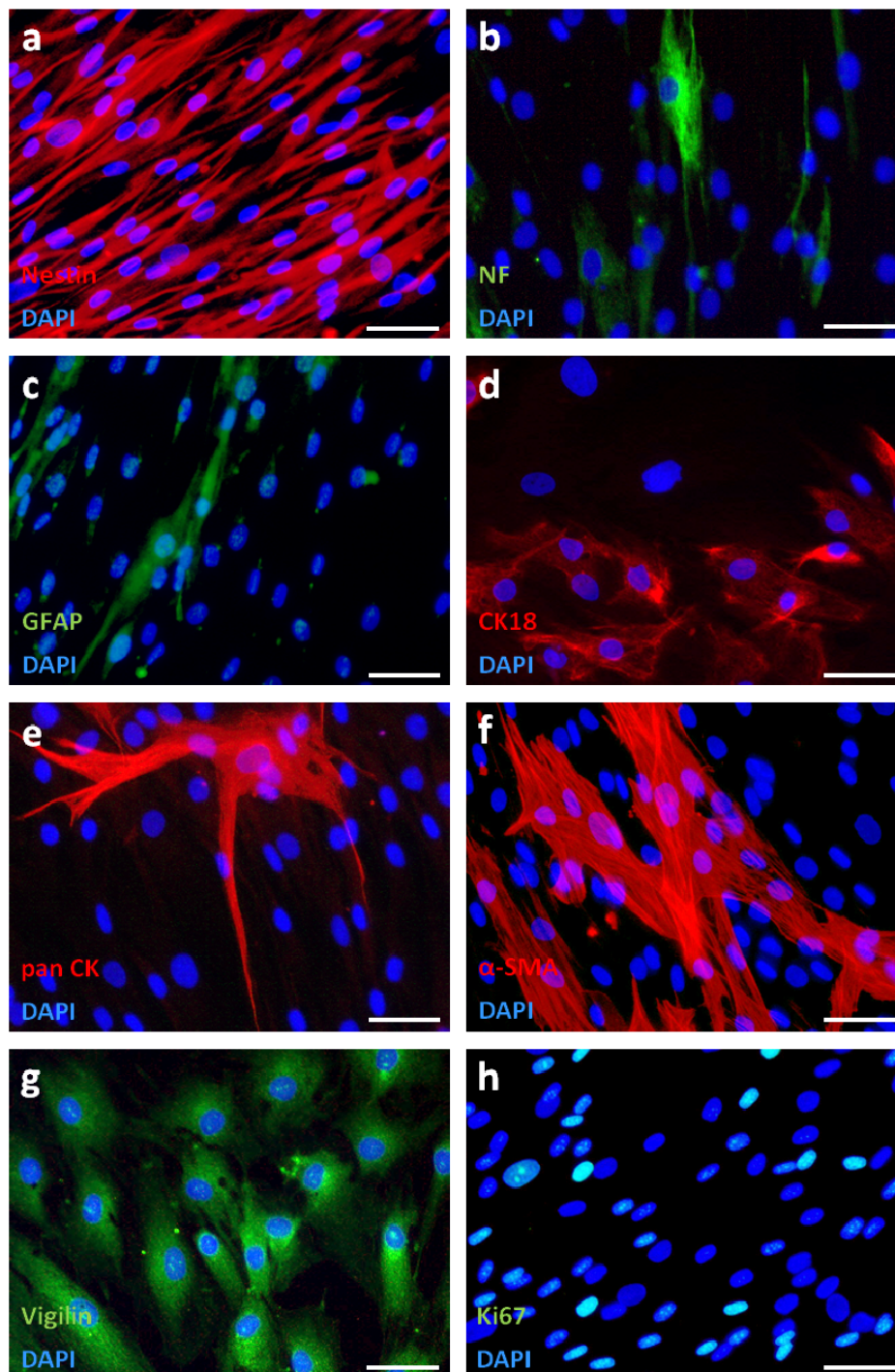
**Abbildung 19 | Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus der Parotis.** Mittels einer immunocytochemischen Analyse wurde in Stammzellen aus der Parotis der Stammzellmarker Nestin nachgewiesen (a). Ektodermale Differenzierung wurde durch die Detektion von Neurofilamenten (NF, b), des *Glial Fibrillary Acidic Proteins* (GFAP, c), von Cytokeratin 18 (CK18, d) und eines Cocktails verschiedener Cytokeratine (panCK, e) gezeigt. Eine mesodermale Differenzierungsrichtung konnte durch den Nachweis von *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) belegt werden (f). Vigilin wurde in Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese (g) und Ki67 in Zellen mit einer hohen Proliferationsaktivität (h) detektiert. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 4. Ergebnisse



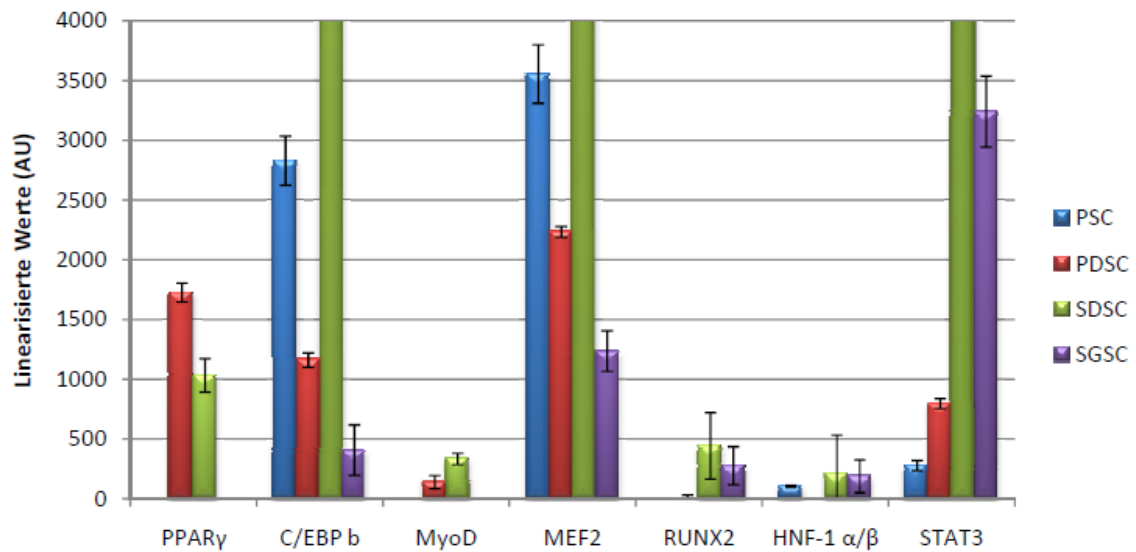
**Abbildung 20 | Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus der Vollhaut.** In spontan differenzierten Stammzellen aus der Vollhaut wurde der Stammzellmarker Nestin detektiert (a). Eine ektodermale Differenzierungsrichtung konnte durch spezifische Anfärbung von Neurofilamenten (NF, b), des Glial *Fibrillary Acidic Proteins* (GFAP, c), von Cytokeratin 18 (CK18, d) und eines Cocktails verschiedener Cytokeratine (panCK, e) aufgezeigt werden. Die Detektion von *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiven Zellen (f) belegte das mesodermale Differenzierungspotential von SDSCs. Dass die Zellen eine aktive Proteinbiosynthese und eine hohe Proliferationsaktivität aufwiesen, wurde durch eine Vigilin- (g) bzw. Ki67-Färbung (h) aufgezeigt. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 21 | Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus den Schweißdrüsen.** Mittels einer immunocytochemischen Analyse wurde in Stammzellen aus den Schweißdrüsen der Stammzellmarker Nestin nachgewiesen (a). Ektodermale Differenzierung wurde durch die Detektion von Neurofilamenten (NF, b), des *Glial Fibrillary Acidic Proteins* (GFAP, c), von Cytokeratin 18 (CK18, d) und eines Cocktails verschiedener Cytokeratine (panCK, e) gezeigt. Eine mesodermale Differenzierungsrichtung konnte durch den Nachweis von *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) belegt werden (f). Vigilin wurde in Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese (g) und Ki67 in Zellen mit einer hohen Proliferationsaktivität (h) detektiert. Maßstabsbalken: 50 µm.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 22 | Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren in glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen.** Mit Hilfe eines Transkriptionsfaktor (TF)-Stammzellchips konnten in den Kernprotein-extrakten der Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) aktivierte TFs für die adipogene (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), *CCAAT/Enhancer Binding Protein beta* (C/EBP b)), die myogene (*MyoD*, *Myocyte-specific Enhancer Factor 2* (MEF2)), die osteogene (*RUNX2*) und die hepatogene (*Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha/ beta* (HNF-1  $\alpha/\beta$ )) Differenzierungsrichtung, ebenso wie für die Proliferationsaktivität (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3)) nachgewiesen werden. Nach einer antikörperbasierten Detektion der Kernproteine erfolgte eine colorimetrische Detektion und die Expressionen aktivierter TFs konnten als linearisierte Werte in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*: AU) dargestellt werden. Für SDSCs lagen diese Werte teilweise in der Sättigung.

## 4. Ergebnisse

### ***4.3 Kokultivierung von Stammzellen und Hirnbiopsien***

Mit dem Ziel die Differenzierung glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen des Menschen in Nervenzellen zu induzieren, wurden diese für zwei Tage mit Hirnbiopsien aus der Ratte kokultiviert. Um von der Gesamtheit der durch die Hirnbiopsien sezernierten Faktoren zu profitieren, stellte sich diese Methode in einer Reihe von Optimierungsversuchen am vielversprechendsten heraus (siehe 3.2.4). Mit Hilfe von Gewebekultureinsätzen konnte dieser Versuch als indirekte Kokultur durchgeführt werden. Diese Art der Kultivierung erlaubt den Austausch löslicher Faktoren zwischen beiden Kultivierungspartnern und verhindert gleichzeitig die Kontamination der Stammzellen mit Zellen aus dem neuronalen Gewebe. Als Versuchskontrollen dienten die entsprechenden unbehandelten Stammzellpopulationen. Die Induktion einer neuronalen Differenzierung wurde auf Proteinebene durch eine immunocytochemische Anfärbung spezifischer Strukturproteine ausgewertet, wobei neben einer quantitativen Analyse auch die Morphologie der betreffenden Zellen bewertet werden konnte. Die relativen Genexpressionsunterschiede von neurospezifischen Strukturproteinen und Enzymen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen wurden mittels qPCR ermittelt.

## 4. Ergebnisse

### **4.3.1 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung pankreatischer Stammzellen**

Nach zwei Tagen Kokultur mit Rattenhirnbiopsien zeigten PSCs eine deutliche Änderung in der Expression des stammzell- und neuroprogenitorspezifischen Intermediärfilaments Nestin (Abbildung 23 a, b, g) und der nervenzellspezifischen NFs (Abbildung 23 c, d, g), wie mit einer immunocytochemischen Färbung gezeigt werden konnte.

In unbehandelten Populationen konnte Nestin in 76 % der Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit Hirngewebe ist die Anzahl Nestin-exprimierender Zellen auf 51 % gesunken. Gleichzeitig konnte eine morphologische Änderung in Nestin-positiven Zellen aufgezeigt werden. Unbehandelte PSCs wiesen deutlich kleinere Nestin-exprimierende Zellen auf, die eine rundliche Morphologie zeigten. Diese Zellstruktur konnte auch nach der Kokultur in einigen Nestin-positiven Zellen wiedergefunden werden; ein Teil der Zellen zeigte jedoch eine stark veränderte Zellmorphologie mit distinkten, langen Zellausläufern.

NF-positive Zellen machten in unbehandelten, spontan differenzierten PSCs 3 % der Gesamtzellzahl aus. Diese Zellen waren klein und wiesen keine nervenzellähnliche Morphologie auf. Die Kokultivierung der PSCs mit Hirnbiopsien führte zu einem Anstieg NF-positiver Zellen. NF wurde nun in 12 % der Zellen detektiert. Mit dem Anstieg NF-exprimierender Zellen war auch eine deutliche Änderung der Zellmorphologie zu verzeichnen. Nach der Stimulation wiesen NF-positive Zellen eine nervenzellähnliche Struktur auf, die zum Teil unipolare und bipolare Fortsätze erkennen ließ, wie in Abbildung 23 d durch Pfeile angedeutet wird. Die durchschnittliche Länge der Zellfortsätze erreichte 156  $\mu\text{m}$  und die maximale Länge betrug 340  $\mu\text{m}$  (Tabelle 4). Zudem konnten Zellen, die doppelt positiv für Nestin und NF waren, detektiert werden (Abbildung 24).

## 4. Ergebnisse

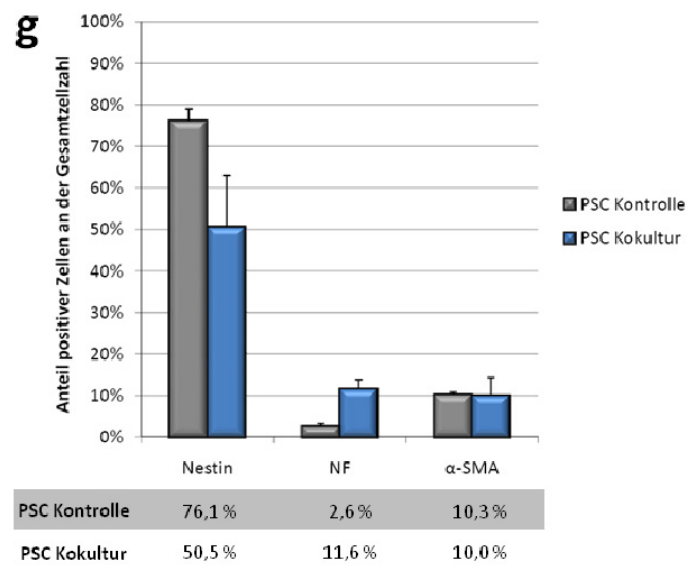
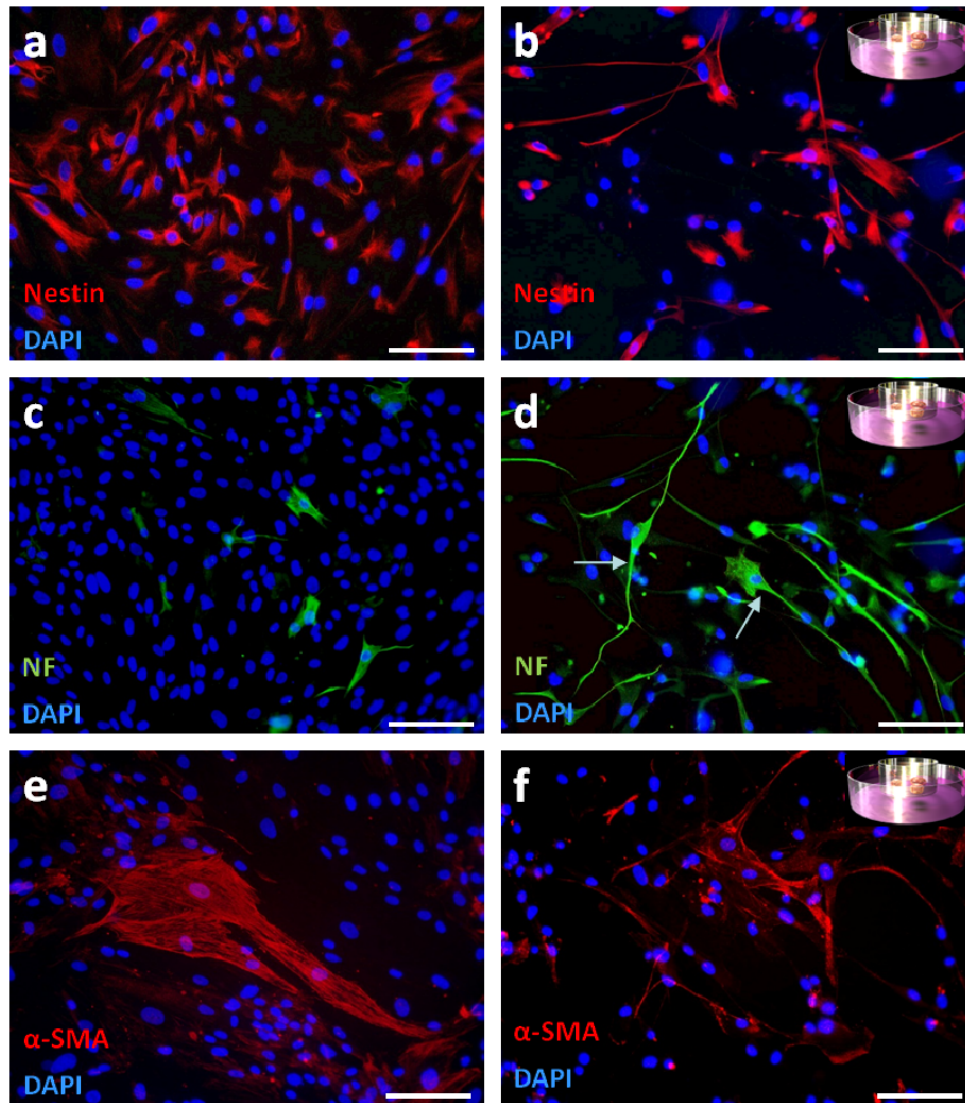
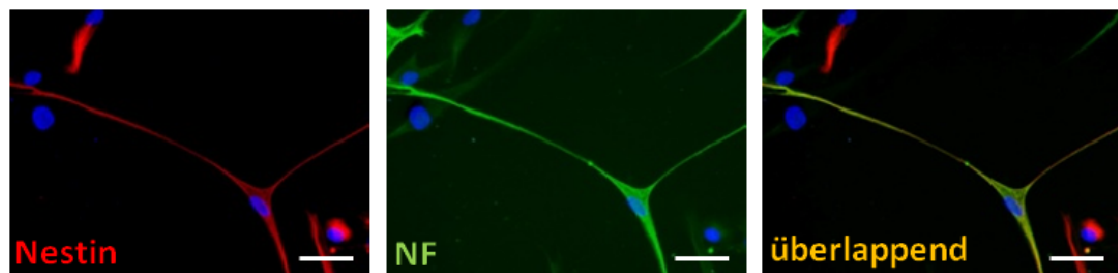


Abbildung 23 | Abbildungsunterschrift siehe Seite 85.

## 4. Ergebnisse

**Abbildung 23 | (S. 84) Kokultur-induzierte neuronale Differenzierung pankreatischer Stammzellen.** Eine immunocytochemische Analyse zeigte, dass Nestin in unbehandelten pankreatischen Stammzellen (PSCs) in 76,1 % der Zellen exprimiert wurde (a, g). Eine zweitägige Kokultur der Stammzellen mit Rattenhirnbiopsien hatte eine Reduktion Nestin-positiver Zellen auf 50,5 % und eine morphologische Änderung dieser Zellen zur Folge (b, g). Die Detektion von Neurofilamenten (NF) ergab einen deutlichen Anstieg NF-positiver Zellen in stimulierten Populationen (d, g) gegenüber nicht behandelten Zellen (c, g) von 2,6 % auf 11,6 %. Die behandelten NF-positiven Zellen wiesen zudem uni- und bipolare axonähnliche Fortsätze auf (d, Pfeile). Die Anzahl *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiver Zellen blieb nach der Kokultur unverändert bei 10 % (e, f, g), es konnte jedoch ein Zerfall der Aktinfilamente nach der Stimulation beobachtet werden (f). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

Hinsichtlich der Expression des für glatte Muskelzellen spezifischen Markers  $\alpha$ -SMA nahm die Kokultur keinen Einfluss auf die Anzahl positiver Zellen (Abbildung 23 e, f, g). Sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Populationen waren etwa 10 % der Zellen positiv für  $\alpha$ -SMA. Jedoch belegen die immunocytochemischen Aufnahmen den Zerfall bzw. den Abbau der Aktinfilamente in  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen nach der Kokultivierung mit Hirnbiopsien (Abbildung 23 f).

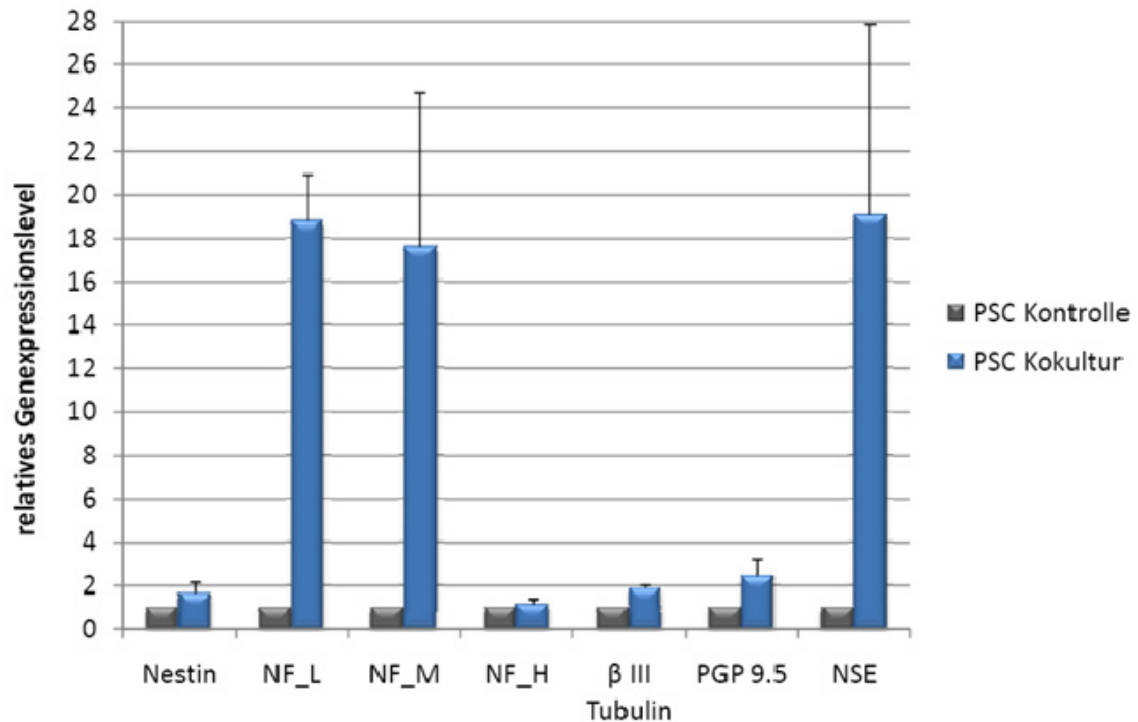


**Abbildung 24 | Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in differenzierten pankreatischen Stammzellen.** Während der Kokultur-induzierten neuronalen Differenzierung von pankreatischen Stammzellen konnten Zellen detektiert werden, die sowohl den Marker Nestin als auch Neurofilamente (NF) exprimierten. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Mit Hilfe der qPCR konnte auf mRNA-Ebene in Stammzellen aus dem Pankreas nach der Kokultur ein Expressionsanstieg von Genen, die für neuroassoziierte Strukturproteine kodieren, beobachtet werden (Abbildung 25). Dabei wurde Nestin marginal verstärkt transkribiert (1,7-fach); NF\_L und NF mittlere Kette (NF\_M) konnten hingegen mit einer 18,8- und 17,6-fachen Expressionszunahme detektiert werden. Für das schwerkettige NF (NF\_H) wurde nach der Kokultur kein und für  $\beta$  III Tubulin ein schwacher Anstieg (1,9-fach) in der mRNA-Expression beobachtet. Neben den Transkripten für nervenspezifische

## 4. Ergebnisse

Strukturproteine konnte auch eine Zunahme der Expression von Genen, die für neurospezifische Enzyme kodieren, detektiert werden. Das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5) wurde nach Kokultur 2,4-fach und die Neuron-spezifische Enolase (NSE) 19,1-fach stärker als in der unbehandelten Kontrolle exprimiert.



**Abbildung 25 | Relative Unterschiede in der mRNA-Expression Kokultur-stimulierter pankreatischer Stammzellen.** Eine quantitative PCR Analyse ergab in pankreatischen Stammzellen (PSCs) nach zweitägiger Stimulation mit Hirngewebe eine leichte Zunahme der mRNA-Expression von Nestin (1,7-fach). Für Neurofilament leichte und mittlere Kette (NF\_L, NF\_M) wurde ein 18,8- und 17,6-facher Anstieg der Transkription detektiert. Neurofilament schwere Kette (NF\_H) blieb von der Kokultur unbeeinflusst. Eine leichte Zunahme der mRNA wurde nach der Stimulation für  $\beta$  III Tubulin (1,9-fach) und das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5, 2,4-fach) nachgewiesen. Die mRNA für die Neuron-spezifische Enolase (NSE) wurde nach der Kokultur 19,1-mal stärker exprimiert als in der unbehandelten Population.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.2 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Parotis

Immuncytochemische Analysen zeigten, dass PDSCs nach zweitägiger indirekter Kokultur mit Hirnbiopsien der Ratte eine leichte Veränderung in der Anzahl Nestin-positiver Zellen aufwiesen (Abbildung 26 a, b, g). Es konnte ein Rückgang Nestin-exprimierender Zellen von 75 % in unbehandelten auf 68 % in stimulierten Zellen verzeichnet werden. Mit der Abnahme Nestin-positiver Zellen ging auch eine morphologische Änderung dieser Zellen einher. Während Nestin-positive Zellen in den Kontrollansätzen überwiegend spindelförmig waren und nur wenige Zellen längliche Ausläufer aufwiesen, besaßen fast alle Nestin-positiven Zellen in Kokultur-behandelten Populationen eine langgezogene Morphologie.

An der spontanen Differenzierung in NF-positive Zellen waren 6 % der PDSCs beteiligt. Nach der Stimulation mit neuralem Gewebe konnten etwa 8 % der Zellen positiv für NF detektiert werden, wobei auch in diesem Fall eine morphologische Veränderung zu beobachten war (Abbildung 26 c, d, g). In unbehandelten PDSCs waren NF-positive Zellen überwiegend großflächig und zeigten vereinzelt eine spindelförmige Beschaffenheit. Die Kokultur führte zu einer Änderung der Morphologie hin zu langgezogenen Zellen mit Fortsätzen von durchschnittlich 188  $\mu\text{m}$  Länge und einer maximalen Länge von 450  $\mu\text{m}$  (Tabelle 4). Diese Morphologie war auch bei Nestin-positiven PDSCs zu beobachten. Zudem konnten Zellen detektiert werden, die sowohl für Nestin als auch NF positiv waren (Abbildung 27).

Die Anzahl  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen konnte durch die Kokultivierung von 6 % auf 3 % gesenkt werden, wobei dieser Rückgang mit dem Zerfall oder Abbau von Aktinfilamenten einherging (Abbildung 26 e, f, g).

## 4. Ergebnisse

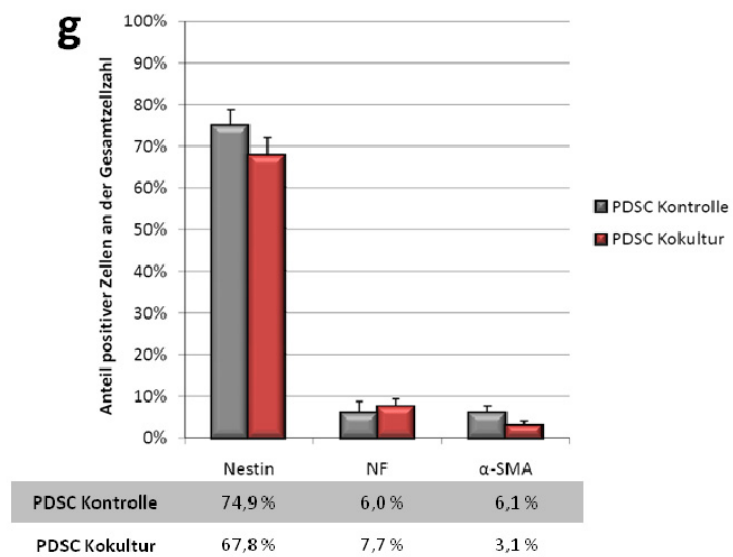
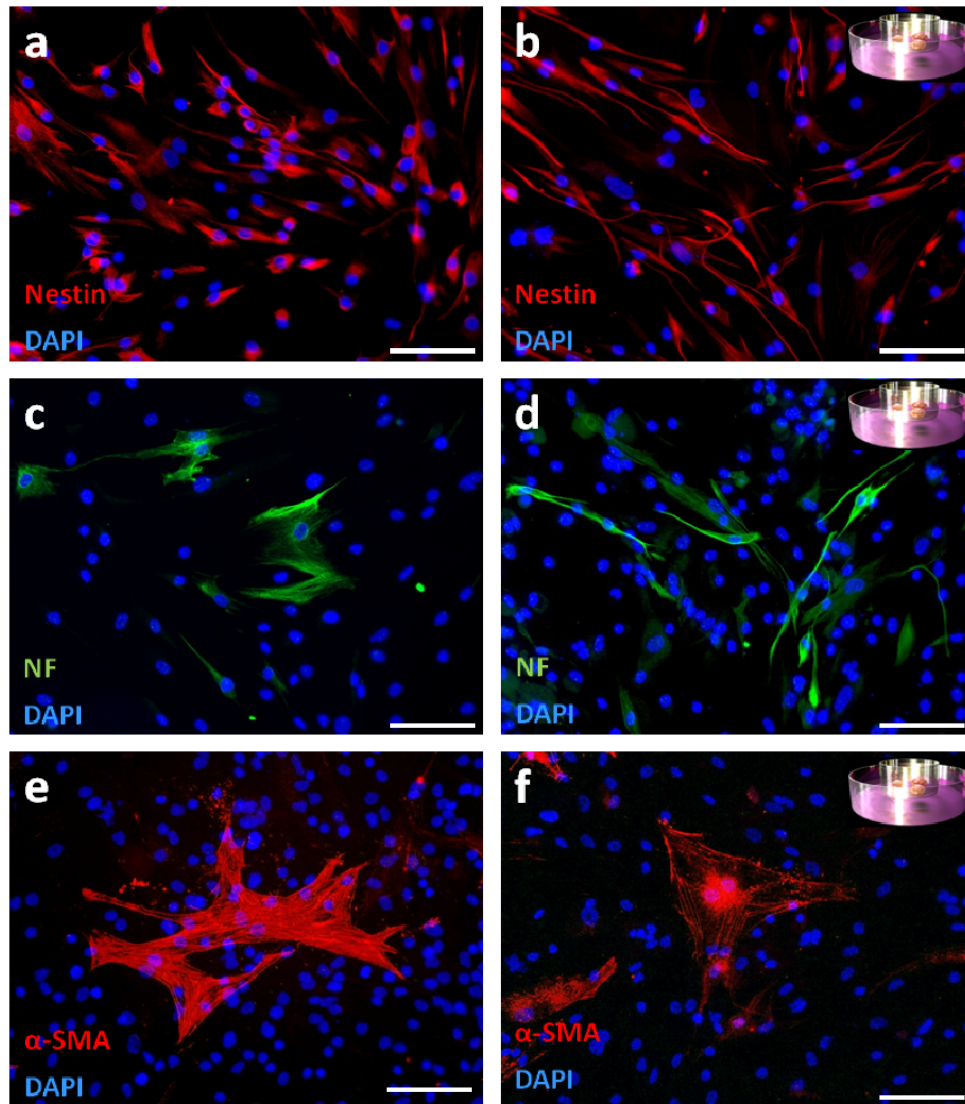
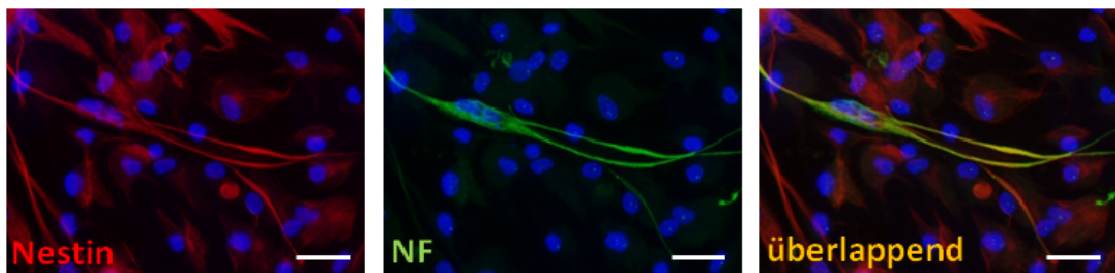


Abbildung 26 | Abbildungsunterschrift siehe Seite 89.

## 4. Ergebnisse

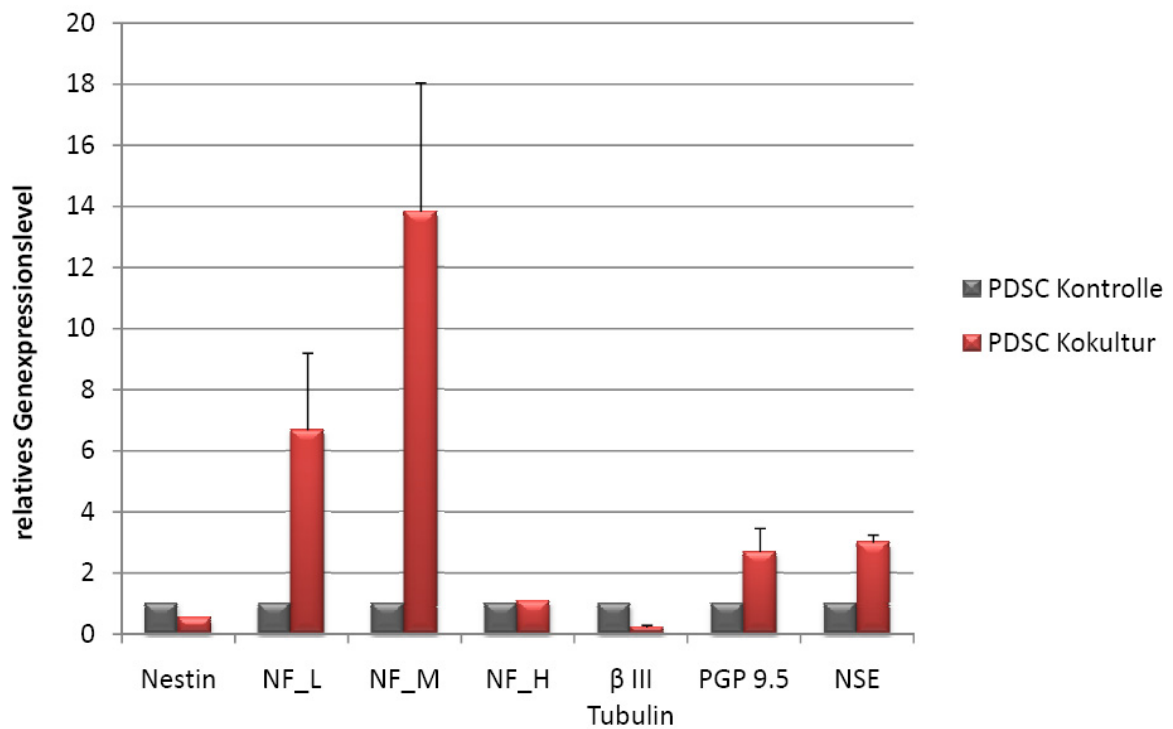
**Abbildung 26 | (S. 88) Kokultur-induzierte neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Parotis.** Eine immunocytochemische Färbung von Nestin in unbehandelten Stammzellen aus der Parotis (PDSCs) ergab die Expression dieses Markerproteins in 74,9 % der Zellen (a, g). Nach einer zweitägigen Kokultivierung mit Hirnbiopsien kam es zu einem leichten Rückgang Nestin-exprimierender PDSCs auf 67,8 % (b, g). Gleichzeitig konnte eine morphologische Veränderung hin zu Zellen mit langen Fortsätzen beobachtet werden (b). Neurofilamente (NF) wurden in 6 % der spontan differenzierten Zellen detektiert (c). Nach der Kokultur stieg dieser Wert auf 7,7 % an (d, g), wobei die Zellen ihr Aussehen verändert haben und lange Ausläufer ausbildeten (d). Die Anzahl *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiver Zellen fiel nach der Kokultur von 6,1 % (e, g) um die Hälfte auf 3,1 % ab (f, g) und es konnte ein Zerfall der Aktinfilamente beobachtet werden (f). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.



**Abbildung 27 | Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in Kokultur-stimulierten Stammzellen aus der Parotis.** Während der neuronalen Differenzierung von Stammzellen aus der Parotis konnten Zellen detektiert werden, die sowohl den Marker Nestin als auch Neurofilamente (NF) exprimierten. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Die Analyse der mRNA-Expression hat nach der Kokultur deutliche Änderungen in der Transkription nervenzellspezifischer Proteine und Enzyme ergeben (Abbildung 28). Während eine Reduktion der Nestin-mRNA um die Hälfte detektierbar war, stieg die Transkription von NF\_L und NF\_M nach der Kokultur um das 6,7- und 13,8-fache an. Bei der Expression von NF\_H konnte hingegen keine Veränderung und bei  $\beta$  III Tubulin eine Abnahme auf das 0,2-fache beobachtet werden. Die Genexpression von nervenspezifischen Enzymen konnte durch die Stimulation mit Hirngewebe leicht gesteigert werden; PGP 9.5 wurde 2,7-mal und NSE dreimal stärker exprimiert als in unbehandelten PDSCs.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 28 | Relative Expressionsunterschiede der mRNA von Kokultur-behandelten Stammzellen aus der Parotis.** Nach einer zweitägigen Kokultivierung von Stammzellen aus der Parotis (PDSCs) mit Hirnbiopsien ergab eine quantitative PCR Analyse für PDSCs eine leichte Abnahme der mRNA-Expression von Nestin (0,5-fach). Eine 6,7- und 13,8-fache Zunahme der mRNA wurde für Neurofilament leichte und mittlere Kette (NF\_L, NF\_M) beobachtet. Die Expression von schwerkettigem Neurofilament (NF\_H) blieb von der Kokultur unbeeinflusst. Für  $\beta$  III Tubulin wurde eine Abnahme (0,2-fach) in der mRNA-Expression verzeichnet, während für das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5, 2,7-fach) und die Neuron-spezifische Enolase (NSE, 3,0-fach) ein Anstieg verzeichnet werden konnten.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.3 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Vollhaut

Mit Hilfe der Immunocytochemie konnte in Stammzellen, die durch eine einfache Isolationsmethode aus humaner Vollhaut gewonnen wurden (SDSC), das Intermediärfilament Nestin nach zweitägiger Kokultur in mehr Zellen nachgewiesen werden als in der unbehandelten Zellpopulation (Abbildung 29 a, b, g). Allerdings war die Ausgangspopulation im Vergleich zu den PSCs und PDSCs (beide zu etwa 75 % positiv für Nestin) nur zu 33 % positiv für diesen Marker und stieg nach der Stimulation auf 41 % an. Die morphologische Veränderung Nestin-positiver Zellen von spindelförmigen Zellen zu Zellen mit ausgeprägten Ausläufern war in den SDSCs nur marginal zu beobachten.

Anders verhielt es sich mit NF-positiven Zellen (Abbildung 29 c, d, g). Es verdoppelte sich nicht nur die Anzahl NF-exprimierender Zellen von 2 % auf 4 %, auch das Erscheinungsbild dieser Zellen veränderte sich nach der Kokultur merklich. Zunächst kleine spindelförmige NF-positive Zellen wiesen nach Stimulation mit neuralem Gewebe eine Morphologie auf, die axonähnliche Strukturen mit Ausläufern bis zu 225  $\mu\text{m}$  erkennen ließ. Im Durchschnitt waren die Zellfortsätze NF-positiver Zellen 117  $\mu\text{m}$  lang (Tabelle 4). Darüber hinaus ließen sich Zellen, die doppelt positiv für Nestin und NF waren, detektieren (Abbildung 30).

Im Vergleich zu PSCs und PDSCs wiesen spontan differenzierte SDSCs kaum  $\alpha$ -SMA-positive Zellen auf, lediglich 0,7 % der Zellen exprimierten dieses Markerprotein. Nach der Kokultur war zwar eine Zunahme an  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen zu beobachten, die tatsächliche Menge lag allerdings mit 1,8 % immer noch sehr niedrig und es konnte ein Abbau oder Zerfall von Aktinfilamenten in  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen beobachtet werden (Abbildung 29 e, f, g).

## 4. Ergebnisse

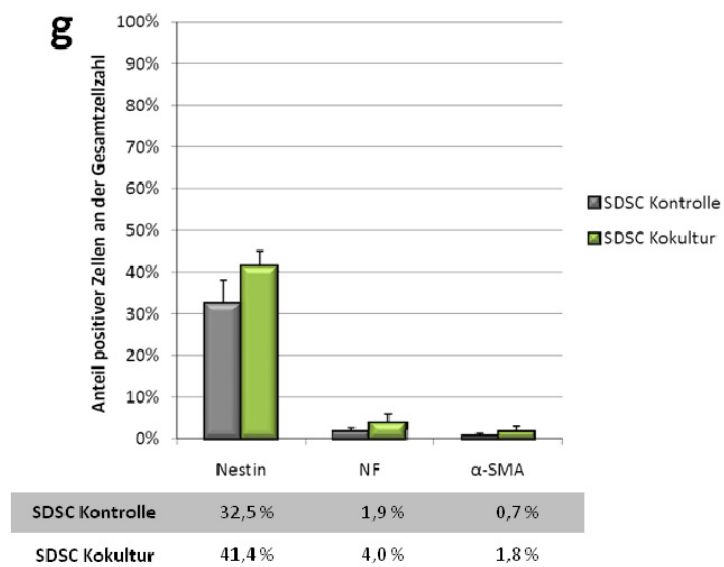
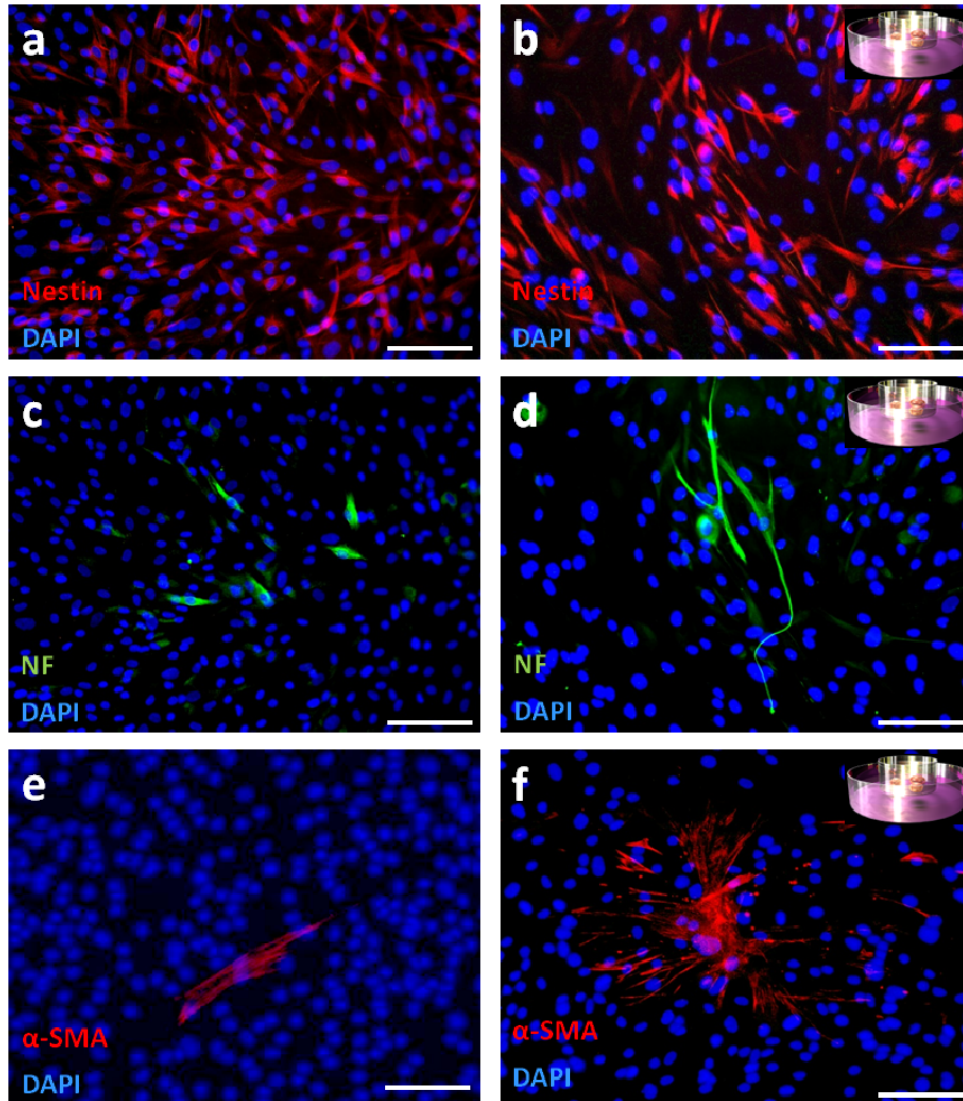
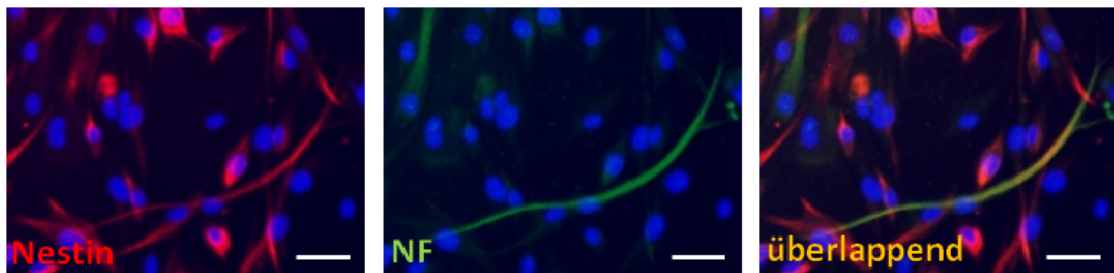


Abbildung 29 | Abbildungsunterschrift siehe Seite 93.

## 4. Ergebnisse

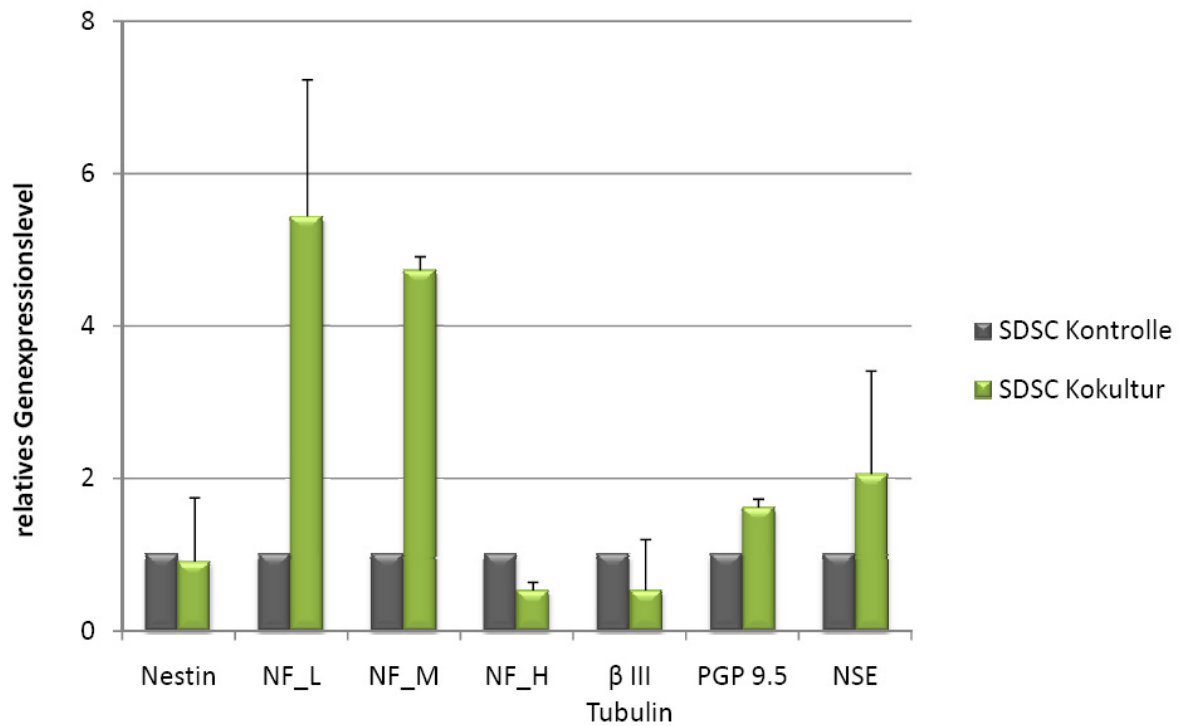
**Abbildung 29 | (S. 92) Neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Vollhaut induziert durch Kokultur.** Mittels Immunocytochemie konnte die Expression von Nestin in 32,5 % der unbehandelten Stammzellen aus der Vollhaut (SDSCs) nachgewiesen werden (a, g). Nach der zweitägigen Kokultivierung mit Rattenhirnbiopsien stieg die Anzahl dieser Zellen auf 41,4 % (b, g). Eine Färbung der Neurofilamente (NF) belegte, dass in unstimulierten Populationen 1,9 % der Zellen diese Intermediärfilamente exprimierten (c, g). Nach der Kokultur stieg dieser Wert auf 4 % an (d, g). Gleichzeitig konnte eine merkliche Morphologieänderung beobachtet werden. Zunächst kleine spindelförmige Zellen (c) wiesen nach der Stimulation axonähnliche Strukturen auf (d). Die Anzahl *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiver Zellen stieg leicht von 0,7 % in Kontroll-SDSCs (e, g) auf 1,8 % in der Kokultur-behandelten Population (f, g). Allerdings konnte ein Abbau der Aktinfilamente beobachtet werden (f). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.



**Abbildung 30 | Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in neuronal differenzierten Stammzellen aus der Vollhaut.** Nach Stimulation mit Hirngewebe konnten in SDSC-Kulturen Zellen detektiert werden, die sowohl Nestin als auch Neurofilamente (NF) exprimierten. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Die Untersuchung der Expression nervenzellassoziierter Gene mittels qPCR hat bei den SDSCs einen deutlichen Einfluss der Kokultur auf die Genexpression aufgezeigt (Abbildung 31). Zwar ergab sich keine Veränderung in der Transkription des Nestin-Gens, die Gene für NF\_L und NF\_M wurden nach der Kokultur allerdings 5,4- und 4,7-mal stärker exprimiert als in unbehandelten SDSCs. Die Transkription von NF\_H und  $\beta$  III Tubulin war in den Kokultur-stimulierten Populationen um die Hälfte reduziert. Hinsichtlich der mRNA-Expression von neuronalen Enzymen war in SDSCs nur eine leichte Veränderung zu beobachten. PGP 9.5 wurde 1,6- und NSE 2,1-mal mehr exprimiert als in unbehandelten Populationen.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 31 | Relative Unterschiede in der mRNA-Expression von Kokultur-behandelten Stammzellen aus der Vollhaut.** Eine quantitative PCR Analyse zeigte nach zwei Tagen der Kokultivierung von Stammzellen aus der Vollhaut (SDSCs) mit Hirnbiopsien keine Unterschiede in der Expression der Nestin-mRNA. Neurofilament leichte und mittlere Kette (NF\_L, NF\_M) wurden nach der Stimulation um das 5,4- bzw. 4,7-fache stärker transkribiert, während für Neurofilament schwere Kette (NF\_H) und  $\beta$  III Tubulin eine Reduktion der mRNA-Expression um die Hälfte zu verzeichnen war. Eine leichte Zunahme konnte für das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5, 1,6-fach) und die Neuron-spezifische Enolase (NSE, 2,1-fach) gezeigt werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.4 Einfluss der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus den Schweißdrüsen

Zuletzt wurde das Kokulturmodell auf die neuartigen Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen (SGSC) angewandt. Wie bereits in dem Abschnitt über die Etablierung von SGSCs beschrieben, wiesen SGSC in der Mehrheit ihrer Zellen das Intermediärfilament Nestin auf. Immunocytochemisch konnten 87 % der Zellen positiv für diesen Stammzell- und Neuroprogenitormarker detektiert werden. Die Stimulation mit Hirnbiopsien führte zu einer leichten Abnahme Nestin-exprimierender Zellen auf 82 % (Abbildung 32 a, b, g). Hinsichtlich der Morphologie zeigten diese Zellen keine Unterschiede in behandelten und unbehandelten Populationen. In beiden Fällen wiesen die Zellen ein längliches Erscheinungsbild ohne distinkte Ausläufer auf.

NF konnte in spontan differenzierten Zellen in beinahe 2 % der Zellen nachgewiesen werden. Nach der Kokultur stieg die Anzahl NF-positiver Zellen auf 6 % an (Abbildung 32 c, d, g). Bereits in unbehandelten Populationen wiesen NF-exprimierende Zellen eine langgezogene Morphologie auf, die nach Stimulation der Zellen noch ausgeprägter war und zumeist in bipolarer Ausrichtung verlief, wie durch einen Pfeil in Abbildung 32 d angedeutet wird. Diese zellulären Fortsätze waren maximal 265  $\mu\text{m}$  und im Durchschnitt 130  $\mu\text{m}$  lang. Zudem konnten Zellen detektiert werden, die sowohl Nestin- als auch NF-positiv waren (Abbildung 33).

Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Stammzellpopulationen, die mit Rattenhirnbiopsien kokultiviert worden sind, zeigten SGSCs in unstimulierten Kulturen den höchsten Anteil an  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen (22 %) auf. Nach der Kokultur konnte hier jedoch auch die stärkste Abnahme an  $\alpha$ -SMA-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abbildung 32 e, f, g). Die Anzahl positiver Zellen fiel auf etwa 5 % ab und auch eine Abnahme der Aktinfilamente in positiven Zellen wird in Abbildung 32 f deutlich.

## 4. Ergebnisse

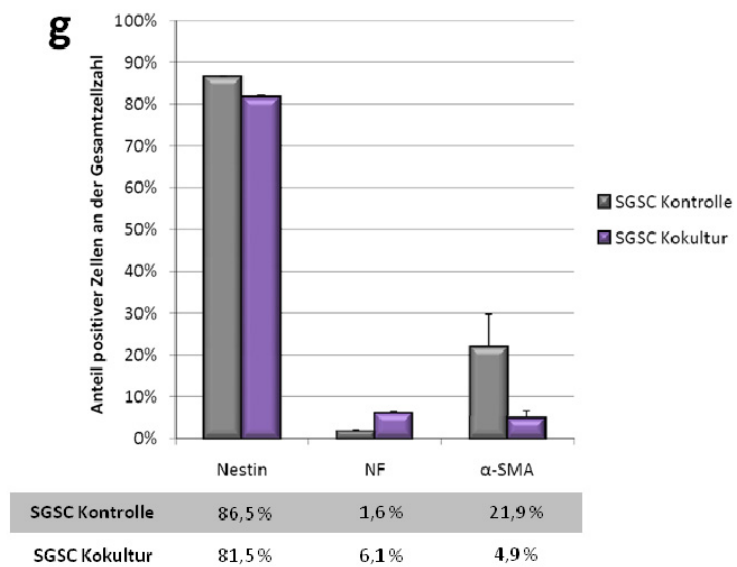
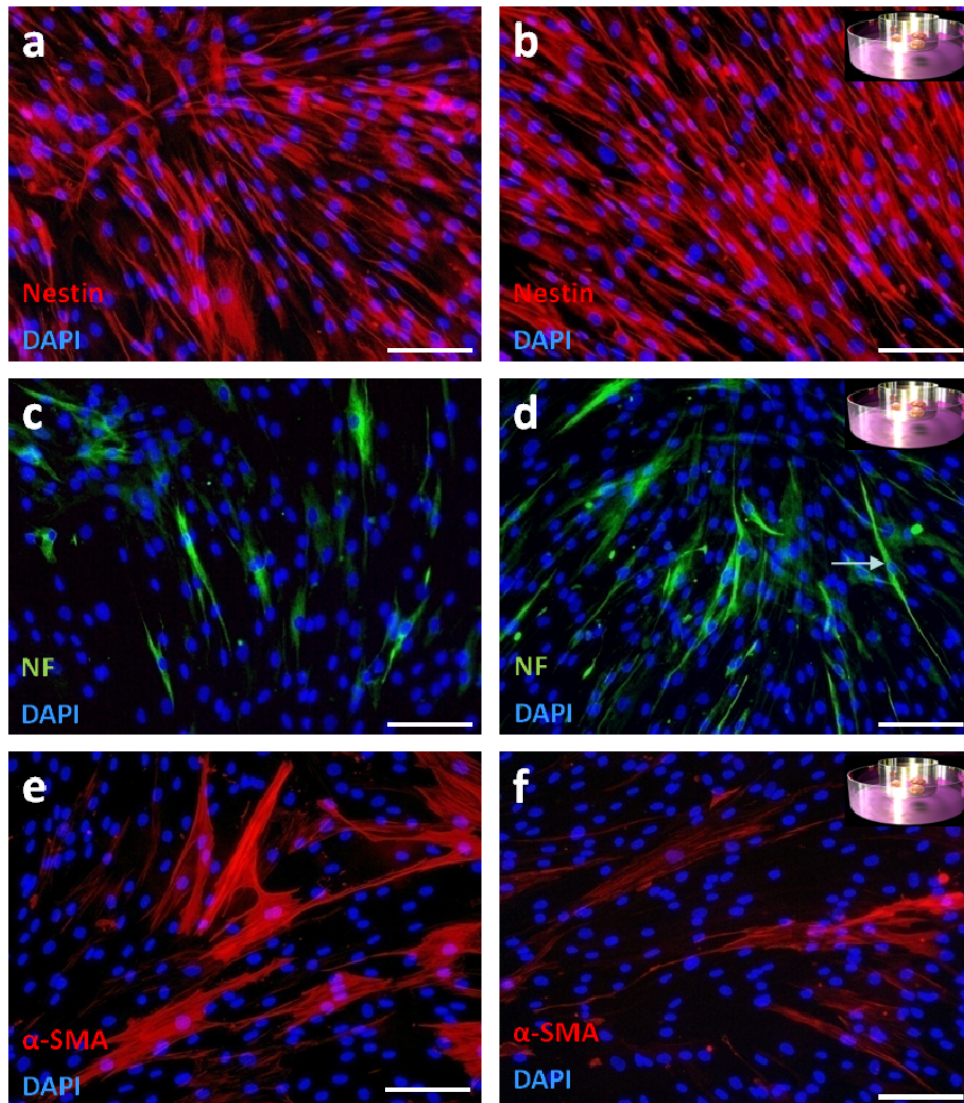
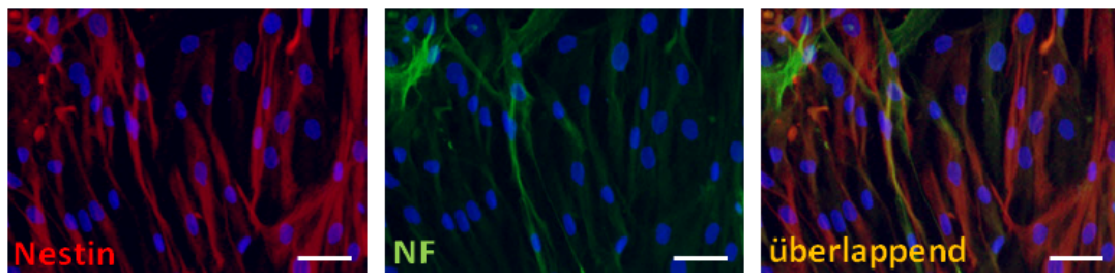


Abbildung 32 | Abbildungsunterschrift siehe Seite 97.

## 4. Ergebnisse

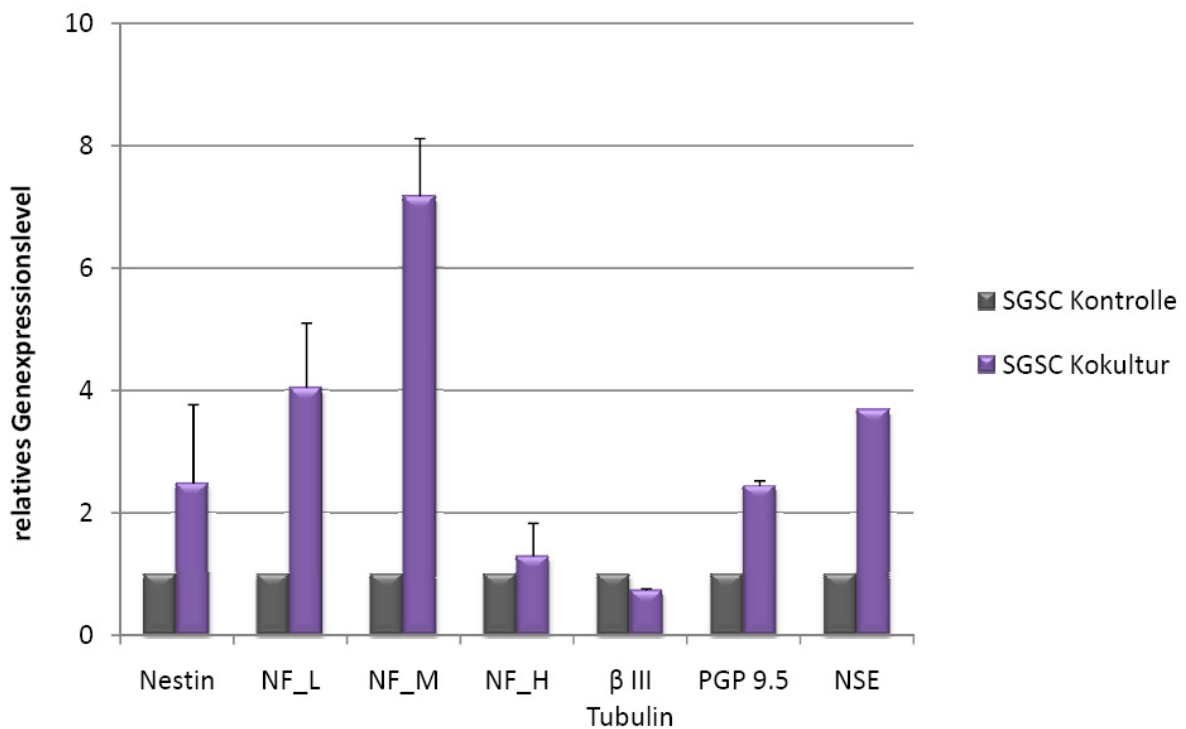
**Abbildung 32 | (S. 96) Auswirkung der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus den Schweißdrüsen.** Nach zwei Tagen der Kokultivierung mit Hirnbiopsien der Ratte wurden humane Stammzellen aus den Schweißdrüsen (SGSCs) immunocytochemisch analysiert. Dabei zeigte sich die Expression des Markerproteins Nestin in 86,5 % der unbehandelten Zellen (a, g). Nach der Kokultur fiel dieser Wert auf 81,5 % (b, g). Die Anzahl Neurofilament (NF)-positiver Zellen konnte mittels Kokultur von 1,6 % (c, g) auf 6,1 % (d, g) gesteigert werden. Die bereits in unbehandelten Zellen vorhandene langgezogene Morphologie (c) war nach der Stimulation mit neuralem Gewebe noch ausgeprägter zu beobachten und verlief meist in bipolarer Ausrichtung (d, Pfeil). Die Anzahl *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiver Zellen fiel nach der Kokultur von 21,9 % (e, g) auf 4,9 % (f, g). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.



**Abbildung 33 | Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in Kokultur-stimulierten Stammzellen aus den Schweißdrüsen.** Während der neuronalen Differenzierung von Stammzellen aus den Schweißdrüsen konnten Zellen detektiert werden, die sowohl den Marker Nestin als auch Neurofilamente (NF) exprimierten. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Auch bei den SGSCs wurden im Anschluss an die Kokultur die relativen Genexpressionslevel neuroverwandter Gene untersucht (Abbildung 34). Dabei war nach der Kokultur eine 2,5-fache Zunahme des Markers Nestin zu beobachten. Die Genexpression der Neurofilamente NF\_L und NF\_M war um das 4- bzw. 7,2-fache erhöht. Bei NF\_H und  $\beta$  III Tubulin konnte keine Änderung in der Transkriptionsaktivität aufgezeigt werden. Anders verhielt es sich bei der Expression von neuroassoziierten Enzymen wie PGP 9.5 und NSE; hier konnte nach der Kokultur eine Expressionszunahme um das 2,4- bzw. 3,7-fache detektiert werden.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 34 | Relative Expressionsunterschiede der mRNA von Kokultur-behandelten Stammzellen aus den Schweißdrüsen.** Nach einer zweitägigen Kokultivierung mit Hirnbiopsien ergab eine quantitative PCR Analyse für Stammzellen aus den Schweißdrüsen (SGSCs) eine Expressionssteigerung für Nestin um das 2,5-fache und für Neurofilament leichte und mittlere Kette (NF\_L, NF\_M) um das 4- bzw. 7,2-fache. Die Transkription der Gene für Neurofilament schwere Kette (NF\_H) und  $\beta$  III Tubulin blieb von der Kokultur unbeeinflusst. Eine Zunahme konnte für das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5, 2,4-fach) und die Neuron-spezifische Enolase (NSE, 3,7-fach) gezeigt werden.

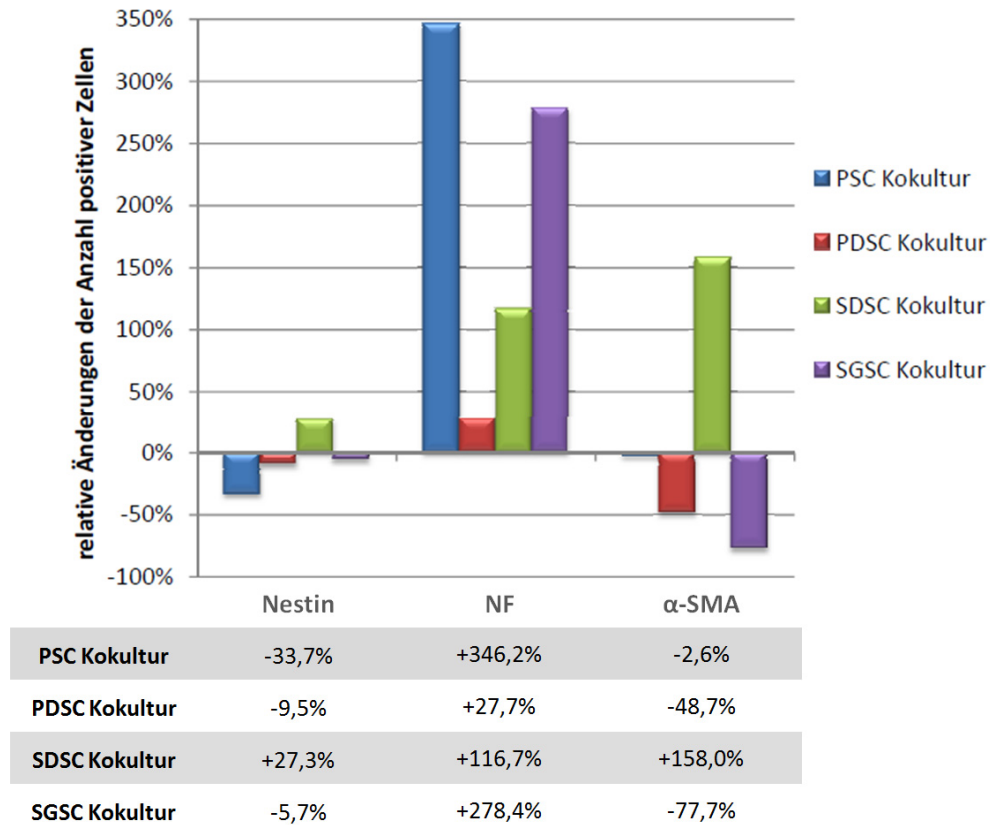
## 4. Ergebnisse

### 4.3.5 Einfluss der Kokultur auf die unterschiedlichen Stammzellpopulationen im Vergleich

Abschließend sollen die bisher gewonnenen Ergebnisse zum Einfluss der Kokultur mit Rattenhirnbiopsien auf die Differenzierung humaner glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen in neuronale Zellen verglichen werden.

Die Expression von stammzellspezifischen und neuronalen Markerproteinen zeigte ähnliche Tendenzen mit unterschiedlich starken Ausprägungen in den verschiedenen Stammzellpopulationen (Abbildung 35). Bei der Anzahl Nestin-positiver Zellen waren überwiegend Abnahmen zu erkennen, wobei diese bei PSCs mit -33,7 % am stärksten und bei den SGSCs mit -5,7 % am niedrigsten waren. Einzig bei den SDSCs war eine Zunahme Nestin-positiver Zellen um +27,3 % zu beobachten. Ein Vergleich der Anzahl NF-positiver Zellen zeigte bei allen untersuchten Populationen einen Anstieg positiver Zellen nach der Kokultur. Von einer relativen Steigerung um +27,7 % bei PDSCs, über +116,7 % bei SDSCs und +278,4 % bei SGSCs, konnte bei PSCs die höchste Zunahme um +346,2 % beobachtet werden. Zudem konnten in allen untersuchten Populationen Zellen detektiert werden, die sowohl Nestin als auch NF exprimierten. In Bezug auf den mesodermalen Marker  $\alpha$ -SMA konnte bei den untersuchten Stammzellpopulationen ein Zerfall bzw. Abbau der Aktinfilamente beobachtet werden, der sich in fast allen Populationen in einer Reduktion  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen widerspiegelte. Diese reichte von -2,6 % bei PSCs, über -48,7 % bei PDSCs, bis zu -77,7 % bei SGSCs. Lediglich bei SDSCs war ein Anstieg um +158 % an  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen zu verzeichnen, wobei die tatsächliche Anzahl  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen in dieser Population am geringsten war (siehe 4.3.3).

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 35 | Relative Änderungen in der Anzahl Marker-exprimierender Zellen nach Stimulation mit Hirngewebe.** Tendenziell reagierten die untersuchten Stammzellpopulationen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) vergleichbar auf die Kokultivierung mit Hirnbiopsien. Die Anzahl Nestin-positiver Zellen war überwiegend leicht reduziert, während die Anzahl Neurofilament (NF)-positiver Zellen in allen Populationen zunahm. Die stärkste Zunahme wurde für PSC (+346,2 %) beobachtet. Das *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) wurde nach der Kokultur in weniger Zellen als zuvor detektiert. Die stärkste Reduktion um -77,7 % konnte in SGSC gemessen werden; lediglich in SDSCs gab es eine Zunahme um +158 %.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Stammzellen auf die Stimulation mit Nervengewebe mit einer Änderung der Morphologie reagierten (Tabelle 4). Am stärksten zeigte sich dieser Effekt bei PDSCs, wo eine Ausbildung von axonähnlichen Fortsätzen mit bis zu 450  $\mu$ m Länge zu beobachten war. Doch auch bei PSCs war eine starke morphologische Änderung in eine nervenzellähnliche Struktur mit axonalen Strukturen von bis zu 340  $\mu$ m zu beobachten. Nicht ganz so ausgeprägt aber dennoch mit leichten Veränderungen in der Morphologie präsentierten sich nach der Kokultur SGSCs und SDSCs.

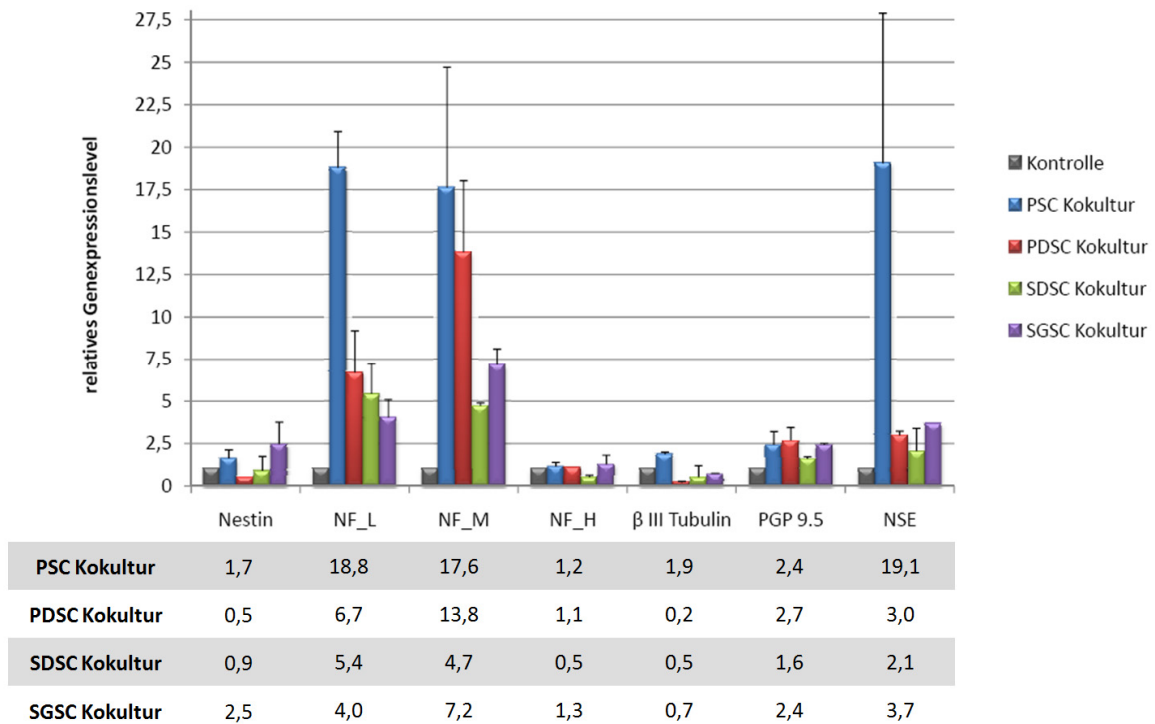
## 4. Ergebnisse

**Tabelle 4 | Durchschnittliche und maximale Länge der Zellfortsätze neuronal differenzierter Zellen.** Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) zeigten nach einer Kokultur-induzierten Differenzierung in Neurofilament-positive Zellen axon-ähnliche Zellfortsätze, die bei den verschiedenen Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt waren.

	PSC	PDSC	SDSC	SGSC
Ø Länge der Zellfortsätze	156 µm	188 µm	117 µm	130 µm
max. Länge der Zellfortsätze	340 µm	450 µm	225 µm	265 µm

Auch die Gegenüberstellung der Genexpressionsprofile der unterschiedlichen Populationen macht deutlich, dass die humanen Stammzellen aus dem Pankreas, der Parotis, der Vollhaut und den Schweißdrüsen ähnlich auf die Stimulation mit neuralem Gewebe reagierten (Abbildung 36). Die Transkription des Nestin-Gens wurde durch die Kokultur kaum beeinflusst, lediglich bei SGSCs zeigte sich eine 2,5-fache Erhöhung der mRNA-Expression. NF\_L und NF\_M wurden in allen untersuchten Zellpopulationen verstärkt exprimiert. Bei NF\_L lag die Spanne zwischen einem 4-fachen Anstieg bei SGSCs und einem 18,8-fachen Anstieg bei PSC und bei NF\_M zwischen einer 4,7-fachen Zunahme bei SDSCs und einer 17,6-fachen Zunahme bei PSCs. Auf die Transkription von NF\_H in den untersuchten glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen hatte die zweitägige Stimulation mit neuralem Gewebe keinen Einfluss. In den meisten Populationen konnte eine Reduktion der mRNA von  $\beta$  III Tubulin detektiert werden, die bei PDSCs bis auf das 0,2-fache zurückging. Einzig bei den PSCs konnte eine leichte Erhöhung um das 1,9-fache festgestellt werden. Das neurospezifische Enzym PGP 9.5 wurde in allen Populationen leicht erhöht exprimiert, wobei die relativen Werte von 1,6-fach bei SDSCs bis 2,7-fach bei PDSCs reichten. Bei NSE zeigten sich in der Genexpressionsintensität die größten Unterschiede. Während die Expressionssteigerung bei SDSCs (2,1-fach), PDSCs (3-fach) und SGSCs (3,7-fach) etwa in der gleichen Größenordnung einzuordnen war, stieg die Expression der mRNA für NSE bei PSCs um das 19,1-fache an. Insgesamt war die Expression der unterschiedlichen Gene bei den PSCs am stärksten zu beobachten gefolgt von den PDSCs, den SGSCs und den SDSCs.

## 4. Ergebnisse

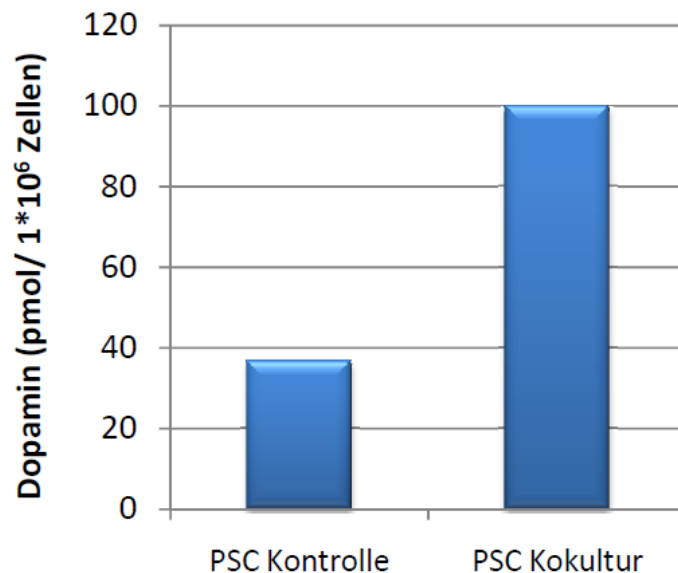


**Abbildung 36 | Vergleich der relativen Genexpressionslevel nach Stimulation mit Hirngewebe.** Eine Gegenüberstellung der mittels quantitativer PCR gewonnenen Genexpressionsmuster der untersuchten Populationen zeigt, dass die Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) ähnlich auf die Kokulturbedingungen reagierten. Die Transkription des Nestin-Gens wurde kaum beeinflusst; die stärkste Expressionszunahme konnte für die SGSCs (2,5-fach) beobachtet werden. Die mRNA für Neurofilament leichte und mittlere Kette (NF\_L, NF\_M) wurde bei allen Populationen verstärkt abgelesen, mit einer maximalen Zunahme um das 18,8- bzw. 17,6-fache bei PSCs. Nach Stimulation mit neuralem Gewebe blieb die Expression von Neurofilament schwere Kette (NF\_H) überwiegend unverändert. Für  $\beta$  III Tubulin konnte in den meisten Populationen eine Reduktion der mRNA gezeigt werden, nur in PSCs wurde eine leichte Zunahme um das 1,9-fache gemessen. Die Expression des *Protein Gene Products 9.5* (PGP 9.5) war bei allen untersuchten Populationen nach der Kokultur etwa doppelt so hoch wie in den Kontrollansätzen; der maximale Wert wurde für die PDSCs (2,7-fach) gemessen. Die Neuron-spezifische Enolase (NSE) wurde nach Stimulation mit Hirngewebe bei PDSC, SDSC und SGSC 3-mal so stark transkribiert, die Expression dieses Gens stieg bei PSCs dagegen um das 19,1-fache an.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.6 Nachweis von Neurotransmittern in pankreatischen Stammzellen

Die für zwei Tage mit Rattenhirnbiopsien stimulierten PSCs wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) hinsichtlich der Produktion von Neurotransmittern untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl in den unbehandelten Zellen als auch in den behandelten Zellen Dopamin nachgewiesen werden konnte. Dabei lag die Menge an Dopamin in unbehandelten Stammzellen bei  $36,5 \text{ pmol} / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$  und wurde durch die Kokultivierung um +273 % auf  $99,8 \text{ pmol} / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$  erhöht.



**Abbildung 37 | Dopamin-Nachweis in pankreatischen Stammzellen.** In Stammzellen aus dem Pankreas (PSC) konnte mittels HPLC bereits in den unbehandelten Kontroll-Zellen Dopamin detektiert werden. Eine zweitägige Stimulation mit Rattenhirnbiopsien führte zu einem Anstieg von  $36,5 \text{ pmol} / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$  um +273 % auf  $99,8 \text{ pmol} / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.3.7 Detektion von Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand nach der Kokultur

Um mögliche Faktoren zu identifizieren, die für die gerichtete Differenzierung der Stammzellen in die neuronale Richtung verantwortlich gewesen sein könnten, wurden sowohl die Zellkulturüberstände aus den zweitägigen Kokulturrexperimenten als auch jene von separat kultivierten Zellen und Hirnbiopsien mit Hilfe eines Wachstumsfaktor-Antikörper-Arrays auf die Präsenz von 41 Wachstumsfaktoren untersucht. Durchgeführt wurde dieses Experiment exemplarisch mit den am effektivsten durch die Kokultur beeinflussten Stammzellen, den PSCs. Es wurden insgesamt fünf voneinander unabhängige Versuche unternommen und die Faktoren als positiv gewertet, die in vier von fünf Versuchen detektiert wurden. Über die Fluoreszenzintensität wurde zudem eine semiquantitative Analyse der detektierten Wachstumsfaktoren ermöglicht (Abbildung 38).

Die Analyse der bereits im Kultivierungsmedium vorhandenen Wachstumsfaktoren zeigte die Existenz des *Granulocyte-Colony Stimulating Factors* (G-CSF) und des *Transforming Growth Factors beta* (TGF- $\beta$ ) in einer relativ schwachen Konzentration auf. Des Weiteren wurde der *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-II) in einer relativ hohen Konzentration im Medium detektiert. Die Analyse des Zellkulturüberstands nach zweitägiger Kultivierung der PSCs zeigte eine starke Sekretion des *Hepatocyte Growth Factors* (HGF) und eine relativ schwache Sekretion des *Insulin-like Growth Factor-binding Proteins 6* (IGFBP-6). Zudem wurden auch hier die zuvor im Medium detektierten Faktoren nachgewiesen, jedoch zum Teil mit anderen Intensitäten. Die Fluoreszenzintensität wies sowohl bei G-CSF als auch bei TGF- $\beta$  auf eine relativ hohe Konzentration im Zellkulturüberstand der PSCs hin. Für zwei Tage mit Rattenhirnbiopsien konditioniertes Medium ließ zusätzlich zu den im Medium vorhandenen Wachstumsfaktoren den *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) in einer schwachen Expression erkennen. Die Kombination von Stammzellen und Hirnbiopsien während der Kokultur führte dazu, dass im Vergleich zu den Einzelansätzen zusätzlich noch weitere Wachstumsfaktoren sezerniert wurden. Neben einer niedrigen Sekretion von Amphiregulin (Ar) konnte eine moderate Sekretion des *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factors* (GM-CSF) detektiert werden.

## 4. Ergebnisse

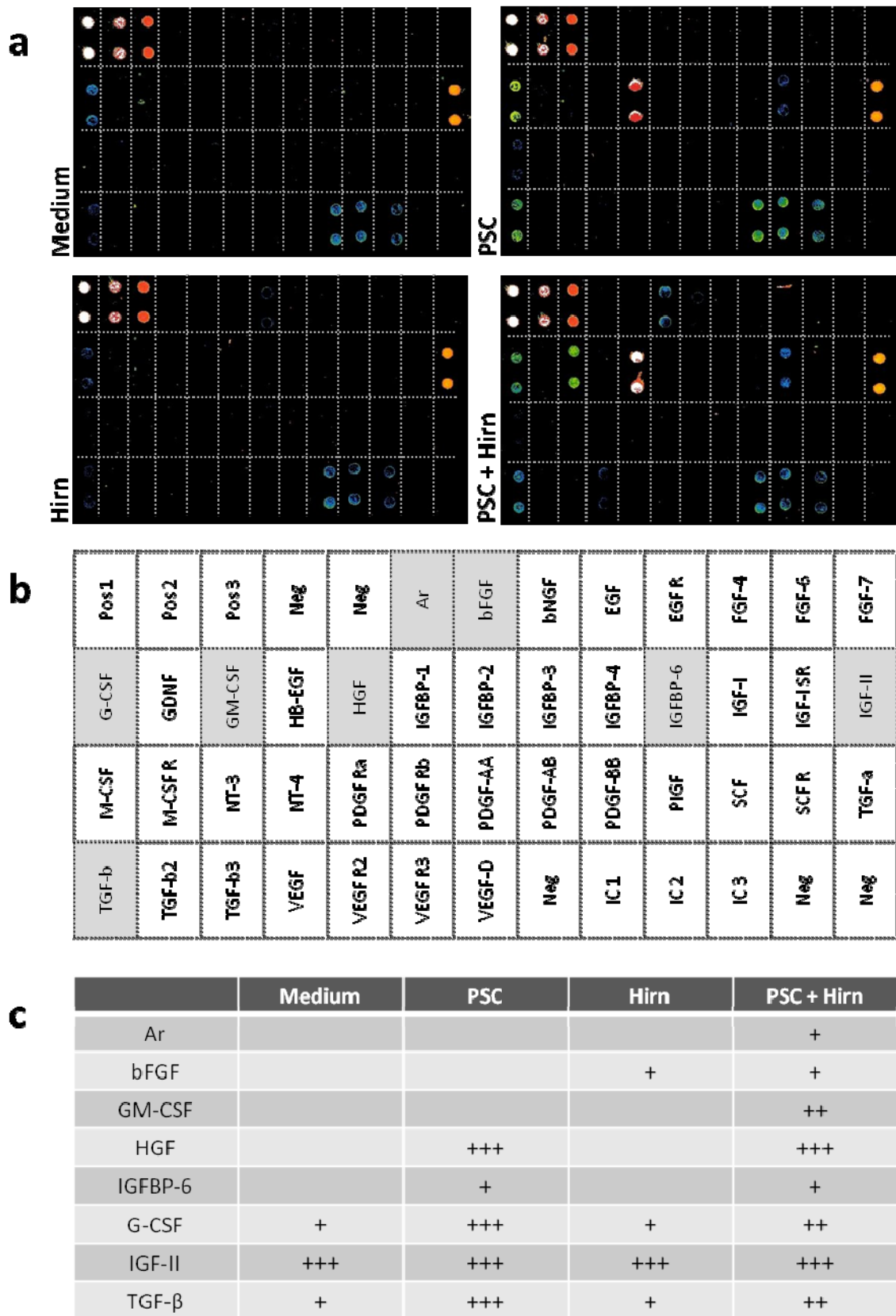


Abbildung 38 | Abbildungsunterschrift siehe Seite 106.

## 4. Ergebnisse

**Abbildung 38 | (S. 105) Detektion sekretierter Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand.** Mit Hilfe eines Wachstumsfaktor-Antikörper-Arrays wurde nach zwei Tagen der Kultivierung von pankreatischen Stammzellen (PSC), Rattenhirnbiopsien und deren Kombination die Sekretion bestimmter Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand untersucht (a). Faktoren, die in vier von fünf Experimenten detektiert wurden, sind grau unterlegt (b). Eine semiquantitative Analyse der Expression erfolgte über die Messung der Fluoreszenzintensität (a, c; blau = schwach/+; grün-gelb = moderat/++; orange-rot = stark/+++). Bereits im Medium waren der *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), der *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-II) und der *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ) vorhanden. Zusätzlich wurden im PSC-konditionierten Medium der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und das *Insulin-like Growth Factor-binding Protein 6* (IGFBP-6) nachgewiesen. Im Hirn-konditionierten Medium wurde neben den im Medium vorhandenen Wachstumsfaktoren der *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) detektiert. Die Kokultivierung von PSCs und Hirnbiopsien zeigte zudem eine Amphiregulin- und *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF)-Sekretion.

### 5. Diskussion

#### *5.1 Nestin-positive Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen*

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, humane adulte Stammzellen aus Schweißdrüsen zu isolieren und zu charakterisieren [Petschnik et al., 2010b]. Es wurde ein Protokoll etabliert, mit dem es möglich war, aus Schweißdrüsen eine hoch proliferative Stammzellpopulation zu isolieren, die den Stammzellmarker Nestin in mehr als 80 % der Zellen exprimiert und multipotente Eigenschaften aufwies.

In der menschlichen Haut gibt es zwei Arten von Schweißdrüsen, ekkrine und apokrine, die zur Thermoregulierung beitragen. Apokrine Schweißdrüsen sind hierbei ausnahmslos mit Haarfollikeln assoziiert und münden mit ihren Sekretionskanälen in den Haarfollikelkanal. Diese Art von Schweißdrüsen existiert hauptsächlich in der Achselhaut; ekkrine Drüsen, die in der Achsel zu gleichen Anteilen vorkommen, sind hingegen zusätzlich über die gesamte Körperfläche verteilt [Folk and Semken, 1991]. Obwohl die beiden Drüsenarten hinsichtlich Innervierung, Antigenexpression, Größe und ihres Sekretionsprodukts unterschiedlich sind, besitzen beide eine tubuläre Struktur und können sowohl mikro- als auch makroskopisch nur sehr schwer unterschieden werden [Lonsdale-Eccles et al., 2003]. Da das Hautgewebe vor Isolation der Schweißdrüsen stark verdaut wurde, ließ sich anschließend keine räumliche Nähe apokriner Drüsen zu Haarfollikeln ausmachen. Und auch die zur Markierung der Schweißdrüsen verwendete Neutralrotlösung färbte lediglich das saure Milieu der Schweißdrüsengänge rot und erlaubte ebenfalls keine Unterscheidung zwischen dem apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsentyp. Folglich war es mittels der vorgestellten Isolierungsmethode nicht möglich, gezielt einen Schweißdrüsentyp zu entnehmen. Da allerdings die Wahrscheinlichkeit eine gut proliferierende Stammzellpopulation zu generieren, bisher aus Achselhaut am höchsten war und in dieser Hautregion übermäßig viele apokrine Schweißdrüsen vorkommen, liegt die Vermutung nahe, dass überwiegend dieser Schweißdrüsentyp zu der Stammzellpopulation beigetragen hat.

Um das Auswachsen der Stammzellen aus den isolierten Schweißdrüsen zu ermöglichen, war eine Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen Typ IV erforderlich. Kollagen

## 5. Diskussion

Typ IV ist Bestandteil der extrazellulären Matrix, netzbildend und kommt vorwiegend in der Basalmembran vor. Es ist wurde gezeigt, dass extrazelluläre Matrixproteine der Basalmembran die Proliferation mesenchymaler Stromazellen verbessern konnten [Lindner et al., 2010] und eine Beschichtung der Oberfläche mit Kollagen Typ IV beispielsweise die Isolation humaner epithelialer Hornhautstammzellen aus dem Auge begünstigt hat [Li et al., 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit hat die Kollagen Typ IV-Beschichtung das Auswachsen von Zellen aus humanen Schweißdrüsen ermöglicht und zur Etablierung einer stabil proliferierenden Zellpopulation beigetragen, die 31 Passagen in Kultur gehalten werden konnte. Dass die Verwendung einer anderen Kultivierungsoberfläche zur Isolation eines weiteren Zelltyps aus humanen Schweißdrüsen führen kann, haben Biedermann et al. gezeigt [Biedermann et al., 2010]. Sie verwendeten einen Feederlayer aus murinen Fibroblasten, auf dem sie isolierte Schweißdrüsen aus humaner Haut platzierten, und erhielten auf diese Weise aus den Schweißdrüsen eine epitheliale Zellpopulation mit charakteristischen Eigenschaften.

Das Bestreben dieses Ansatzes war, Nestin-positive Stammzellen aus der Haut anzureichern. Nestin galt lange Zeit ausschließlich als Marker für neurale Stammzellen [Yaworsky and Kappen, 1999], fand jedoch durch seine Detektion in anderen Progenitor- und Stammzellen generelle Akzeptanz als adulter Stammzellmarker (siehe 2.1.5.1) [Wiese et al., 2004]. Im Vergleich: ein Isolationsprotokoll aus Vollhaut hat zu einer Ausbeute von 10 % bis 20 % Nestin-positiver Zellen geführt (siehe 2.1.5.1) [Kruse et al., 2006a]. Andere Publikationen beschreiben die Isolation Nestin-positiver Zellen aus Haarfollikeln, allerdings ohne nähere Angaben zum Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation zu machen [Amoh et al., 2005, Yu et al., 2010]. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protokoll führte zu einer Zellpopulation, in der mehr als 85 % der Zellen das Intermediärfilament Nestin exprimierten.

Doch blieb die Eigenschaft der isolierten Zellen, den Stammzellmarker Nestin zu exprimieren, auch während der Langzeitkultivierung *in vitro* erhalten? Wie ein Versuch über mehrere Passagen zeigte, blieb der Anteil Nestin-positiver Zellen auch bei der Folgekultivierung stabil bei 86 %. Ferner ließ sich an diesem Anteil keine Änderung erkennen, wenn die

## 5. Diskussion

Zellen auf Zellkulturplastik und nicht auf Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturgefäßen weiterkultiviert wurden. Damit war die Beschichtung mit Kollagen zwar für die Isolation Nestin-exprimierender Zellen ausschlaggebend, für die Folgekultivierung war diese jedoch nicht mehr notwendig.

Die hier vorgestellte Methode konnte bereits erfolgreich zur Isolation drei weiterer Nestin-positiver Stammzellpopulationen aus humanen Schweißdrüsen verwendet werden.

Im Folgenden sollten die Stammzellen aus den Schweißdrüsen mit anderen glandulären Stammzellpopulationen des Menschen und vor allem mit jener Population, die aus Vollhaut gewonnen wurde, verglichen werden. Interessant war zu sehen, ob Stammzellen, die aus einem ganz bestimmten Hautkompartiment isoliert wurden und über einen hohen Nestin-Anteil verfügten, ein höheres Potential für eine gerichtete Differenzierung in die neuronale Richtung aufwiesen als eine Mischpopulation aus Vollhaut.

### ***5.2 Vergleichbare Eigenschaften glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen***

Um die Charakteristika der Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC) des Menschen zu untersuchen, wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Stammzellartigkeit und ihres Differenzierungspotentials verglichen.

Bereits in anderen Arbeiten konnte die Ähnlichkeit von Stammzellpopulationen aus glandulären Geweben und der Haut aufgezeigt werden. So konnten Kajahn et al. die Gleichartigkeit zwischen humanen PSCs und SDSCs belegen [Kajahn et al., 2008]. Darüber hinaus stellten Gorjup et al. einen Vergleich zwischen humanen PSCs und Speicheldrüsenstammzellen aus der Submandibularis an, der ebenfalls zeigte, dass auch diese Stammzellpopulationen sich sehr gleichen [Gorjup et al., 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Zellpopulationen hinsichtlich der Expression verschiedener Stammzellmarker ähneln. Das Intermediärfilamentprotein Nestin, ein charakteristischer Marker adulter Stammzellen [Wiese et al., 2004], konnte sowohl in PSCs, PDSCs, SDSCs als auch in den neuartigen SGSCs nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde auf transkriptioneller Ebene die Expression einer Reihe weiterer Stammzellmarker gezeigt. Detektiert wurde das *Cluster of Differentiation Antigen 9* (CD9), ein Oberflächenmolekül, das sowohl in embryonalen als auch in adulten Stammzellen nachgewiesen werden konnte [Oritani et al., 1996, Klassen et al., 2001, Oka et al., 2002, Kollé et al., 2009]. Darüber hinaus wurden die Transkriptionsfaktoren *c-Myc*, *Krüppel-like Factor 4* (Klf-4), *Octamer-binding Transcription Factor 4* (Oct-4) und *SRY (Sex determining Region Y)-Box 2* (Sox2) in allen untersuchten Stammzellpopulationen aufgezeigt. Diese Faktoren spielen bei der Zellproliferation, dem Erhalt der Pluripotenz von Stammzellen und bei der Induktion pluripotenter Stammzellen eine wichtige Rolle (siehe 2.1.4) [Carpenter et al., 2003, Wang et al., 2006, Takahashi et al., 2007, Bhandari et al., 2010].

## 5. Diskussion

Doch multi- oder pluripotente Stammzellen zeichnen sich nicht nur dadurch aus, dass sie Stammzellmarker exprimieren, sondern auch durch ihre Fähigkeit spontan in spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Daher wurde für die hier beschriebenen Zellpopulationen eine ektodermale, mesodermale sowie eine endodermale Differenzierungskapazität aufgezeigt.

Bei der Untersuchung des ektodermalen Differenzierungspotentials wurde im Hinblick auf die nachfolgenden Versuche der Fokus insbesondere auf die neuroektodermale Differenzierungskapazität gelegt. Es konnten bei der spontanen Differenzierung der PSCs, PDSCs, SDSCs und SGSCs jedoch auch verschiedene Cytokeratine nachgewiesen werden, die einen Hinweis auf eine epitheliale Differenzierung dieser Zellen geben [Brzoska et al., 2005]. Das spontane neurale Differenzierungspotential der Stammzellen konnte durch den Nachweis verschiedener Marker, unter anderem von Neurofilamenten und des *Glial Fibrillary Acidic Proteins* (GFAP), erbracht werden. Neurofilamente stellen spezifische Strukturproteine dar, die während der Entwicklung von Neuronen und in ausgereiften Nervenzellen exprimiert werden [Braissant, 2007]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Neurofilamente bei der neuronalen *in vitro*-Differenzierung embryonaler und adulter Stammzellen eine wichtige Rolle spielen [Woodbury et al., 2000, Schuldiner et al., 2001]. Die Expression von GFAP ist auf Astrocyten, nicht-myelinbildende Schwann'sche Zellen sowie auf Neuroprogenitorzellen begrenzt [Jessen and Mirsky, 1984, Eng, 1985, Witusik et al., 2007] und ist ebenfalls ein anerkannter Marker der glialen Differenzierung von humanen Stammzellen [Hermann et al., 2004].

Für eine spontane mesodermale Differenzierung konnten sowohl Marker für die myogene, adipogene als auch die osteogene Richtung für die untersuchten Populationen aufgezeigt werden. Mit der Detektion von *alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) [Skalli et al., 1986] konnte in allen Stammzellpopulationen eine spontane Differenzierung in glatte Muskelzellen beobachtet werden. Der Transkriptionsfaktor MyoD, der bei der Bildung von Skelettmuskeln eine Rolle spielt [Rudnicki et al., 1993], und der *Myocyte-specific Enhancer Factor 2D* (MEF2D) ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in seiner aktiven Form in differenzierenden Myocyten detektierbar ist [Breitbart et al., 1993], konnten in PDSCs

## 5. Diskussion

und SDSCs, bzw. im Fall von MEF2D in allen untersuchten Populationen, nachgewiesen werden. Der *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, ist bei der Entwicklung von Fettgewebe unverzichtbar [Rosen et al., 1999]. Aktiviert wird PPAR $\gamma$  durch den Transkriptionsfaktor *CCAAT/Enhancer Binding Protein beta* (C/EBP $\beta$ ), die beide zusammen die Adipogenese stimulieren [Wu et al., 1995] und durch ihre Detektion in den untersuchten Stammzellpopulationen auf eine spontane adipogene Differenzierung hindeuten. RUNX2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten [Ziros et al., 2002] und konnte in PDSCs, SDSCs und SGSCs nachgewiesen werden. Zwar wurde dieser Marker in PSCs nicht detektiert, dass diese Zellen dennoch in der Lage sind in einen osteogenen Zelltyp zu differenzieren, konnten Gorjup et al. demonstrieren [Gorjup et al., 2009]. Die Autoren konnten darüber hinaus für PSCs eine chondrogene Differenzierungskapazität aufzeigen, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Obwohl Stammzellen aus dem Pankreas endodermalen Ursprungs sind, ist die Fähigkeit dieser wie auch der anderen untersuchten Stammzellpopulationen aus Geweben ektodermalen Ursprungs, spontan in endodermale Zellen zu differenzieren, sehr eingeschränkt. Von-Willebrand-Faktor (vWF), ein Protein, welches von Endothelzellen produziert wird und damit ein Marker für Zellen endodermalen Ursprungs ist [Jaffe et al., 1974], konnte in den untersuchten Stammzellpopulationen lediglich auf transkriptioneller Ebene detektiert werden. Zumindest der leber- und pankreasspezifische Transkriptionsfaktor *Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha/beta* (HNF-1 $\alpha/\beta$ ) [Odom et al., 2004] konnte in PSCs, SDSCs und SGSCs in seiner aktivierten Form aufgezeigt werden.

Die vergleichende Charakterisierung von Stammzellen aus dem Pankreas, der Parotis, der Vollhaut und den Schweißdrüsen zeigte die Ähnlichkeit dieser Stammzellpopulationen hinsichtlich der Expression von spezifischen Stammzellmarkern, aber auch von Markern, welche die Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter belegen. Insbesondere die spontane Differenzierung in Zelltypen des Neuroektoderms zeigte das hohe Potential dieser Zellen für neuroregenerative Therapieansätze und machte diese Zellen überaus interessant für Versuche zur gerichteten neuronalen Differenzierung.

## 5. Diskussion

### ***5.3 Neuronale Differenzierungsinduktion durch Kokultur mit Hirnbiopsien***

In der Literatur sind neben humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) [Schuldiner et al., 2001, Perrier et al., 2004, Zeng et al., 2004] und neuralen Stammzellen fetalen Ursprungs [Anwar et al., 2008] nur wenige Stammzellen des adulten Menschen für eine gerichtete Differenzierung in die neuronale Richtung beschrieben worden. Unter diesen adulten Stammzellen sind zwar humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark zu finden [Sanchez-Ramos et al., 2000, Woodbury et al., 2000, Tao et al., 2005], die Ergebnisse, die mit diesen Stammzellen erzielt wurden, werden jedoch teilweise sehr kontrovers diskutiert (siehe 2.2.4) [Lu et al., 2004, Zurita et al., 2008]. So wurde berichtet, dass der Einsatz chemischer Substanzen zur Induktion der neuronalen Differenzierung ein Schrumpfen der Stammzellen und damit das Zurücklassen feiner Zellausläufer verursachte. Diese Beobachtung zusammen mit einer durch die Zellschrumpfung bedingten, falsch positiven Färbung neuronaler Strukturen führte dann zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse und damit zur Beschreibung einer vermeintlichen neuronalen Differenzierung der Stammzellen.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden keine chemischen Faktoren für eine gerichtete neuronale Differenzierung der Stammzellen verwendet. Es wurde vielmehr ein Kokultursystem humaner adulter Stammzellen aus glandulären Geweben und der Haut mit Rattenhirnbiopsien etabliert. Dieses System sollte es ermöglichen von der ganzen Bandbreite an Faktoren, die von Hirnbiopsien sezerniert werden, zu profitieren und so eine neuronale Differenzierung der Stammzellen zu erzielen. Die Ergebnisse zeigten, dass das kokultivierte Hirngewebe tatsächlich die Differenzierung der Stammzellen in die neuronale Richtung induzieren konnte. Dabei stellte sich heraus, dass das neuronale Differenzierungspotential von SDSCs, über SGSCs und PDSCs, zu PSCs anstieg.

Bei der Differenzierung neuronaler Zellen im zentralen Nervensystem verändert sich das Expressionsmuster nervenzellspezifischer Intermediärfilamente. Während neurale Progenitorzellen Nestin exprimieren [Kaplan et al., 1990, Lendahl et al., 1990], induziert

## 5. Diskussion

eine neuronale Differenzierung die Expression von Neurofilamenten [Shaw and Weber, 1982, Nixon and Shea, 1992]. Zu Beginn wird das leichtkettige Neurofilament (NF\_L) exprimiert. Mit dem Beginn des Neuritenwachstums tritt Neurofilament mittlere Kette (NF\_M) in Erscheinung und erst später, während der axonalen Reifung, wird auch das schwerkettige Neurofilament (NF\_H) exprimiert [Willard and Simon, 1983, Carden et al., 1987].

Auch die untersuchten Stammzellpopulationen wiesen nach zweitägiger Kokultur mit Rattenhirnbiopsien ein verändertes Expressionsmuster nervenzellspezifischer Intermediärfilamente auf. In den Populationen mit einer hohen basalen Nestin-Expression (PSCs, PDSCs und SGSCs) konnte eine Abnahme Nestin-positiver Zellen beobachtet werden. Lediglich bei den SDSCs, die relativ arm an Nestin-exprimierenden Zellen waren, wurde eine leichte Zunahme verzeichnet. Nestin ist ein Marker sowohl für adulte Stammzellen als auch für Neuroprogenitorzellen (siehe 2.1.5.1). Bei der Differenzierung adulter Stammzellen in neuronale Zellen lässt sich allerdings schwer sagen, ob eine Nestin-positive Zelle eine adulte Stammzelle oder bereits eine Neuroprogenitorzelle darstellt. Im Fall der PSCs, PDSCs und SGSCs, wo schon in der Ausgangspopulation eine hohe Anzahl der Zellen Nestin-positiv war, könnte man annehmen, dass sich bereits Neuroprogenitorzellen unter den Nestin-exprimierenden Zellen befanden, die durch die Kokultur zur Differenzierung in Nervenzellen stimuliert worden sind. Diese Annahme deckt sich mit der Tatsache, dass nach Stimulation mit Hirngewebe die Anzahl Neurofilament-exprimierender Zellen bei den Stammzellpopulationen mit der höchsten Nestin-Expression (PSC und SGSC) am stärksten zunahm. Zusammen mit der Detektion doppelt positiver Zellen, die sowohl Nestin als auch Neurofilamente exprimierten, kann man davon ausgehen, dass die neuronalen Zellen aus Nestin-positiven Zellen hervorgegangen sind. Eine Beobachtung, die bei der neuronalen Differenzierung von hESCs ebenfalls gemacht werden konnte [Carpenter et al., 2001] und in Analogie zu der *in vivo*-Entwicklung von Nervenzellen steht [Nixon and Shea, 1992].

Doch wie lässt sich der Anstieg Nestin-positiver Zellen in der Stammzellpopulation aus der Vollhaut erklären? Viele Kompartimente der Haut wurden als Nische für Stammzellen be-

## 5. Diskussion

schrieben (siehe 2.1.5.1). Durch die einfache Isolationsmethode, aus der die SDSCs resultierten, wurden Teile dieser unterschiedlichen Stammzellpopulationen in einer Mischpopulation vereint [Kruse et al., 2006a]. Die Kokultur-bedingte Stimulation könnte Einfluss auf die nicht-Nestin-positiven Stammzellen genommen und diese zur Differenzierung in neurale Progenitorzellen bewegt haben, was wiederum zu einem Anstieg Nestin-exprimierender Zellen geführt hat. Ähnliches haben Joannides et al. für Stammzellen aus humaner Dermis beobachtet, die zunächst kein Nestin exprimierten [Joannides et al., 2004]. Dort konnten Nestin-positive Zellen erst nach einer Stimulation mit neurotrophen Wachstumsfaktoren, wie dem *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und dem *Epidermal Growth Factor* (EGF), detektiert werden. Da es nicht ausgeschlossen ist, dass dermale Stammzellen einen Teil der SDSCs ausmachten, könnte die Zunahme Nestin-positiver Zellen auf eben diese Zellen zurück geführt werden.

In Bezug auf die Expression von Neurofilamenten deckt sich der Kokultur-bedingte Anstieg früher Neurofilamente (NF\_L und NF\_M) in allen untersuchten Zellpopulationen mit der frühen Entwicklung von Neuronen *in vivo*. Dagegen wurde die Expression von NF\_H, welches bei der Neurogenese erst mit der Ausdifferenzierung in Erscheinung tritt, bei der gezielten Differenzierung der Stammzellen nicht beeinflusst. Ähnliches wurde für die Expression von  $\beta$  III Tubulin beobachtet, einem Protein, welches eine wichtige Rolle während der fetalen und postnatalen Entwicklung des menschlichen Nervensystems spielt [Katsetos et al., 2003]. Es konnte kein Expressionsanstieg dieses Markers durch die Stimulation mit Hirngewebe bewirkt werden.

Neben den Veränderungen im Expressionsmuster neuroassoziierter Intermediärfilamente konnte zudem ein Expressionsanstieg neurospezifischer Enzyme in den Kokultur-stimulierten Stammzellpopulationen aus glandulären Geweben und der Haut beobachtet werden. Das *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5) ist eine Ubiquitin-Carboxyl-Terminale Hydrolase, die hauptsächlich in Nervenzellen vorkommt [Doran et al., 1983, Wilkinson et al., 1989, Osaka et al., 2003]. Auf transkriptioneller Ebene konnte in den hier untersuchten Stammzellpopulationen eine Zunahme der mRNA dieses nervenzellspezifischen Enzyms nach der Kokultur beobachtet werden. Ein weiteres Enzym, dessen Expression in

## 5. Diskussion

glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen nach neuronaler Differenzierungs-induktion verstärkt beobachtet werden konnte, ist die Neuron-spezifische Enolase (NSE). NSE stellt eine spezifische Form des glykolytischen Enzyms Enolase dar, welche hauptsächlich von Nervenzellen aber auch von neuroendokrinen Geweben exprimiert wird [Marangos and Schmechel, 1987]. Während der Differenzierung von Neuronen wird zunächst eine nicht-neuronale Enolase exprimiert, die erst im Laufe der Entwicklung durch die neuronspezifische Form ersetzt wird [Schmechel et al., 1980], was bei den untersuchten Stammzellpopulationen ebenfalls der Fall gewesen sein könnte.

Doch Nervenzellen zeichnen sich nicht nur durch die Expression spezifischer Strukturproteine oder Enzyme, sondern auch durch ihre charakteristische Morphologie aus. Diese kann je nach Nervenzelltyp verschiedene Formen annehmen, wobei zu den primitivsten Formen neuronaler Zellen die uni- und bipolare Anordnung der Zellfortsätze gehört. Die indirekte Kokultivierung von Stammzellen und Hirnbiopsien hat dazu geführt, dass das Aussehen der Zellen sich veränderte und die Zellen eine Morphologie ähnlich der von uni- und bipolaren Nervenzellen annahmen. Dieses Erscheinungsbild wurde in Zellen, die positiv für neuronale Marker waren, vorgefunden und war bei Stammzellen aus dem Pankreas und der Parotis am stärksten ausgeprägt. Hier konnten mit bis zu 340 µm bzw. 450 µm die längsten Ausläufer detektiert werden. Zudem wurde in diesen beiden Populationen nach der Kokultur der höchste Expressionsanstieg von NF\_M verzeichnet, dem Neurofilament, welches mit dem Beginn des Neuritenwachstums in Erscheinung tritt [Willard and Simon, 1983, Carden et al., 1987]. Dass es sich hierbei tatsächlich um ein Wachstum axonähnlicher Fortsätze handelte und nicht um Zellschrumpfungsercheinungen, wird durch einen Größenvergleich Neurofilament-positiver Zellen auf den immunocytochemischen Aufnahmen deutlich. Unbehandelte Stammzellen wiesen eine durchschnittliche Größe von etwa 70 µm auf.

Ein Vergleich der SGSCs mit den SDSCs zeigt, dass die Stammzellen aus den Schweißdrüsen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlicher auf die Stimulation mit Hirngewebe reagierten als Stammzellen aus der Vollhaut. Zudem wurden mit 265 µm Länge in SGSCs stärker ausgeprägte axonähnliche Ausläufer detektiert. Dennoch, die

## 5. Diskussion

Stammzellpopulationen aus den anderen glandulären Geweben (PSCs und PDSCs) wiesen eine höhere neuronale Differenzierungskapazität als die SGSCs auf.

Eine vorläufige Analyse der Produktion von Neurotransmittern in den PSCs, der Stammzellpopulation, die am eindeutigsten auf die Stimulation mit Rattenhirngewebe reagierte, zeigte die Existenz des Neurotransmitters Dopamin. Dabei war das Dopamin bereits in unbehandelten Stammzellen nachweisbar, was auf die spontane neuronale Differenzierung zurück geführt werden kann, und nahm durch die Kokultur von 37 pmol/  $1 \cdot 10^6$  Zellen auf 100 pmol/  $1 \cdot 10^6$  Zellen um über 270 % zu. Dopaminerge Neurone sind vor allem im zentralen Nervensystem zu finden (siehe 2.2.2) und spielen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Krankheit eine zentrale Rolle (siehe 2.3.1). Aus diesem Grund ist die Generierung dopaminergener Neurone aus humanen Stammzellen Forschungsschwerpunkt vieler Arbeitsgruppen. Die Vergleichbarkeit der dabei gewonnenen Erkenntnisse ist allerdings sehr schwierig. In den Arbeiten um Liste und Courtois wurde zum Beispiel der intrazelluläre Dopamingehalt der generierten Neurone als Masse wiedergegeben, wobei sich die Autoren leider nicht auf eine bestimmte Zellzahl beriefen, die diese Dopaminmenge beinhaltet haben soll [Liste et al., 2004, Courtois et al., 2010]. In anderen Arbeiten wurde die Dopaminkonzentration in Folge einer kalium-induzierten Ausschüttung gemessen, jedoch ohne Angaben zum tatsächlichen Volumen oder der Zellzahl zu machen, so dass man auf eine Dopaminmenge pro Zellzahl zurückrechnen könnte [Zeng et al., 2004, Trzaska et al., 2007, Song et al., 2008]. Aber auch ohne die direkte Vergleichbarkeit der produzierten Dopaminmenge ist die Tatsache, dass Dopamin in stimulierten PSCs verstärkt zu detektieren war, ein weiterer Hinweis dafür, dass die Zellen sich auch funktionell einem neuronalen Zustand annäherten.

Bei der gerichteten Differenzierung ist es nicht nur wichtig, dass die gewünschten Zelltypen vermehrt auftreten, sondern dass Zelltypen anderer Differenzierungsrichtungen inhibiert werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch die Ausprägung von glatten Muskelzellen, charakterisiert durch die Expression von  $\alpha$ -SMA, vor und nach der Kokultur untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Kokultivierung mit Hirnbiopsien zu

## 5. Diskussion

einem Abbau bzw. Zerfall von Aktinfilamenten geführt hat, was auf eine Inhibierung der mesodermalen Differenzierungsrichtung hindeutet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kokultivierung von Stammzellen aus glandulären Geweben und der Haut des Menschen mit Hirnbiopsien der Ratte zu einer Induktion der neuronalen Differenzierung führte, die bei den verschiedenen Stammzellpopulationen unterschiedlich stark ausgeprägt war (Tabelle 5). Diese Differenzierungsinduktion äußerte sich in der verstärkten Expression von neuroassoziierten Strukturproteinen und Enzymen, einer drastischen Veränderung der Zellmorphologie, bis hin zur Produktion des Neurotransmitters Dopamin, welche vorläufig nur in PSCs nachgewiesen wurde. Gleichzeitig war eine Inhibierung der myogenen Differenzierung zu beobachten. Die unvollständige neuronale Differenzierung könnte mit der kurzen Inkubationszeit von 48 Stunden, die die Zellen den Hirnbiopsien ausgesetzt waren, in Verbindung stehen. In dieser Zeit ist es gelungen die Differenzierungsmaschinerie in Gang zu setzen. Die Ausdifferenzierung der Zellen zu reifen Neuronen bedarf vermutlich einer längeren Inkubationszeit. Bei der Differenzierung humaner neuraler Stammzellen zu dopaminergen Neuronen inkubierten Anwar et al. die Stammzellen für zwölf Tage mit striatalen Hirn-

**Tabelle 5 | Auswirkungen der Kokultur auf die verschiedenen Stammzellpopulationen.** Dargestellt ist die relative Veränderung im Anteil Nestin-positiver Zellen in unbehandelten Populationen (Kontrolle) und nach einer Kokultur mit Rattenhirnbiopsien (Kokultur) für Stammzellen aus dem Pankreas (PSC), der Parotis (PDSC), der Vollhaut (SDSC) und den Schweißdrüsen (SGSC). Die Änderungen der Protein- und Genexpression neuronaler Strukturproteine und Enzyme sind unter „Expression neuronaler Marker“ für die untersuchten Stammzellpopulationen zusammengefasst. Die Ausprägung axonähnlicher Strukturen und damit die relative Länge der gebildeten Zellfortsätze ist ebenfalls dargestellt. Zeichenerklärung: - nicht vorhanden, + gering, +/++ gering bis mäßig, ++ mäßig, ++/+++ mäßig bis hoch, +++ hoch.

	Anteil Nestin-positiver Zellen		Expression neuronaler Marker		Ausprägung Axon-ähnlicher Ausläufer	
	Kontrolle	Kokultur	Kontrolle	Kokultur	Kontrolle	Kokultur
PSC	+++	+/++	+	+++	-	++
PDSC	+++	++/+++	++	++/+++	-	+++
SDSC	+	+/++	+	+/++	-	+
SGSC	+++	+++	+	++	-	+/++

## 5. Diskussion

schnitten der Ratte [Anwar et al., 2008]. Erst dann konnten sie die Sekretion von Dopamin detektieren. Interessanterweise wurde auch dort ein xenogenes Kokultursystem vorgestellt, was zeigt, dass es für *in vitro*-Versuche nicht unüblich ist, menschliche Zellen mit Geweben aus einer Ratte zu kultivieren und so eine gerichtete Differenzierung zu induzieren.

Um eine Aussage zur Effektivität des hier vorgestellten neuroinduzierenden Systems treffen zu können, wäre es hilfreich gewesen, abschließend die gewonnenen Ergebnisse mit jenen zu vergleichen, die in der Literatur beschrieben wurden. Im Falle adulter humaner Stammzellen wurden diese hauptsächlich mit hMSCs generiert. Der direkte Vergleich stellte sich jedoch als problematisch heraus, da in vielen Publikationen über hMSCs die zu Beginn dieses Abschnitts beschriebenen Fehlinterpretationen der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. Zudem führen viele Autoren Tabellen auf, in denen sie aus-sagen, dass 40 % bis 60 % der Zellen positiv für einen neuronalen Marker waren, in der dazugehörigen Abbildung wird dem Leser allerdings nur eine positive Zelle gezeigt [Tao et al., 2005]. Ebenso sind auch Abbildungen möglich, auf denen mehrere Zellen zu sehen sind, die alle positiv für die untersuchte Struktur angefärbt wurden [Trzaska et al., 2007]. Dabei stellt sich die Frage, ob wirklich alle Zellen diesen Marker exprimierten oder aber Optimierungen an der immunocytochemischen Methode von Vorteil wären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde strikt darauf geachtet, dass die immunocytochemische Färbung folgende Merkmale aufwies: Die angefärbte Struktur sollte charakteristisch und klar zu erkennen sein, nicht alle Zellen sollten positiv für die spezifischen Marker sein und die Negativkontrolle sollte nur schwache Hintergrundfluoreszenz aufweisen. Erst wenn die Fluoreszenzfärbungen diese Qualitätskontrolle passierten, konnte die Auswertung der Markerexpression erfolgen. Daraus ergab sich für die stärkste neuronale Differenzierungsinduktion, die in PSCs beobachtet wurde, nach zwei Tagen eine Ausbeute an neuronalen Zellen (Neurofilament positiv) von 12 %, die sich auch in den dargestellten Abbildungen widerspiegelt. Zudem kann man anhand der morphologischen Veränderungen in Nestin-positiven Zellen (Neuroprogenitorzellen) davon ausgehen, dass deutlich mehr Stammzellen eine neuronale Differenzierungsrichtung eingeschlagen haben, als sich an-

## 5. Diskussion

hand Neurofilament-positiver Zellen aussagen lässt. Die Ergebnisse wurden zudem mit einer weiteren Methode (quantitative PCR) untermauert und auch die veränderte Zellmorphologie spricht ebenfalls für eine gerichtete Differenzierung. So lässt sich bei der Kocultur mit Hirnbiopsien zweifelsfrei von einer effektiven Methode sprechen, mit der es erfolgreich gelungen ist, bei humanen adulten Stammzellen aus glandulären Geweben und der Haut eine neuronale Differenzierung zu induzieren. Welche Faktoren diese Differenzierung bedingt haben könnten, wurde ebenfalls untersucht und soll im Folgenden diskutiert werden.

## 5. Diskussion

### ***5.4 Sekretion neurotropher Faktoren durch Hirnbiopsien und Stammzellen***

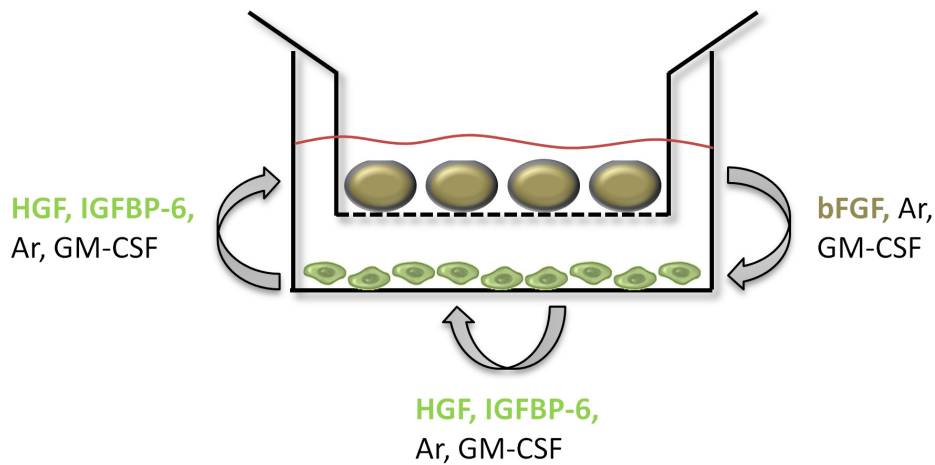
In dem hier vorgestellten Ansatz handelte es sich um ein Kokultursystem, bei dem die Stammzellen vom Hirngewebe durch eine poröse Membran separiert waren und lediglich das Kultivierungsmedium miteinander teilten. Daher kann man annehmen, dass lösliche Faktoren, die von dem Gewebe abgegeben wurden, die Stammzellendifferenzierung beeinflussten. Um die Faktoren, die zur Stimulation der neuronalen Differenzierung beigetragen haben, zu untersuchen, wurde das Kultivierungsmedium auf verschiedene Wachstumsfaktoren getestet.

Interessanterweise scheint es so zu sein, dass eine direkte Interaktion zwischen den Zellen und den Hirnbiopsien stattgefunden hat, die zur Sekretion von Wachstumsfaktoren führte, die weder in der Stammzellkultur noch in den alleine kultivierten Hirnbiopsien detektiert werden konnten, sondern ausschließlich in dem Kokulturansatz nachweisbar waren. Zu diesen Signalstoffen gehörten Wachstumsfaktoren, die bei verletzungsbedingten Abläufen im Nervensystem eine Rolle spielen und neurogene Eigenschaften besitzen (Abbildung 39), wie beispielsweise das Amphiregulin. Nilsson et al. konnten im Dorsalganglion von Mäusen nach Durchtrennung des Ischiasnervs eine erhöhte mRNA-Expression von Amphiregulin nachweisen [Nilsson et al., 2005]. Zudem ist es ihnen gelungen zu zeigen, dass Amphiregulin das Auswachsen von Axonen aus organotypischen Kulturen des Dorsalganglions stimulieren kann. Von diesen Ergebnissen ausgehend haben sie weitere Versuche unternommen und gezeigt, dass Amphiregulin ein neurotropher Faktor ist, der als autokrines Signal auf das Überleben adulter Neurone Einfluss nimmt und die Ausbildung axonaler Ausläufer fördert [Nilsson and Kanje, 2005]. Zudem konnten Falk und Friséen belegen, dass Amphiregulin als Mitogen für neurale Stammzellen fungiert [Falk and Friséen, 2002]. In dem hier präsentierten System könnte Amphiregulin ebenfalls einen neurotrophen Einfluss auf die Stammzellen ausgeübt haben und für die Ausbildung der axonähnlichen Ausläufer verantwortlich sein. Die Quelle des Amphiregulins konnte dabei nicht eindeutig bestimmt werden, da es ausschließlich im Kokulturansatz detektierbar war. Tondreau et al. konnten jedoch in neuronal differenzierten humanen Zellen

## 5. Diskussion

mesenchymalen Ursprungs die Expression von Amphiregulin detektieren [Tondreau et al., 2008], so dass zumindest die Möglichkeit besteht, dass auch pankreatische Stammzellen, induziert durch die Hirnbiopsien, zur Sekretion des Amphiregulins beigetragen haben. Es wäre allerdings auch denkbar, dass die Stammzellen Einfluss auf die Hirnbiopsien genommen und diese zur Sekretion des Amphiregulins angeregt haben.

Neben Amphiregulin konnte auch der *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF) im Medium der Kokultur von Stammzellen und Hirnbiopsien detektiert werden, wobei sich für den Ursprung dieses Faktors ebenfalls die zuvor geschilderten Möglichkeiten ergeben. GM-CSF ist ein Cytokin, von dem bekannt ist, dass es die Differenzierung und Funktion hämatopoetischer Stammzellen fördert [Armitage, 1998, Kessinger and Sharp, 1998]. Es konnte aber auch anhand von Nagerzellen gezeigt werden, dass GM-CSF Einfluss auf die Proliferation und Vitalität neuraler Progenitorzellen nehmen kann [Kim et al., 2004, Huang et al., 2007] und die Differenzierung von neuronalen Stammzellen [Krüger



**Abbildung 39 | Von Rattenhirnbiopsien und humanen Stammzellen sezernierte Wachstumsfaktoren.** Mit Hilfe eines Wachstumsfaktor-Antikörper-Arrays konnten neurotrophe Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, die Einfluss auf die neuronale Differenzierung der Stammzellen genommen haben könnten. Der *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), der bei verletzungsbedingten Prozessen im Gehirn sezerniert und dem eine neurogene Wirkung zugeschrieben wird, konnte auf das Hirngewebe zurückgeführt werden. Auch dem *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) wird eine Rolle als neurotropher Faktor zugeschrieben, der ebenso wie das *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6* (IGFBP-6) seinen Ursprung in den Stammzellen hatte. IGFBP-6 weist im konfluenten Zustand einen antiproliferativen Effekt auf. Amphiregulin (Ar), ein neurotropher Faktor, der das Auswachsen von Axonen stimulieren kann, und der *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF), der positiven Einfluss auf die Vitalität von Neuronen nehmen kann, wurden ausschließlich im Kokulturansatz nachgewiesen.

## 5. Diskussion

et al., 2007] und Knochenmarkzellen [Lin et al., 2007] in Neurone *in vitro* induziert. Diesen Effekt könnte GM-CSF auch auf die neuronale Differenzierung glandulärer und Haut-abgeleiteter Stammzellen gehabt haben.

Ein weiterer Faktor, der auf die Differenzierung der Stammzellen Einfluss genommen haben könnte, ist bFGF. Yoshimura et al. konnten zeigen, dass bFGF die Proliferation sowie die Differenzierung muriner neuraler Progenitorzellen in der Zellkultur stimuliert und im Gehirn von Mäusen nach einer Verletzung vermehrt exprimiert wird [Yoshimura et al., 2001, Yoshimura et al., 2003]. bFGF wurde neben dem Kokulturansatz auch in dem Medium, in welchem ausschließlich Hirn kultiviert wurde, detektiert. Daher kann man annehmen, dass die Hirnbiopsien auch im Kokulturansatz zur Sekretion dieses Faktors beitragen. Auslöser für die Sekretion von bFGF könnte die Zerteilung des Gehirns in kleine Biopsien gewesen sein, da dieses Vorgehen einer gravierenden Hirnverletzung gleicht.

Einer der detektierten Wachstumsfaktoren, dessen Expression auf die Stammzellen zurück geführt werden konnte, ist der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF). HGF ist ein pleiotropischer Wachstumsfaktor, der unter anderem die Proliferation, Morphogenese und die Vitalität einer Vielzahl von Zellen fördert, die Geweberegeneration und Wundheilung positiv beeinflussen kann und beispielsweise von mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird [Neuss et al., 2004]. Daneben wird HGF aber auch eine Rolle als neurotropher Faktor und als Chemoattraktans für Axone von Motoneuronen zugeschrieben [Ebens et al., 1996]. Zeng et al., die hESCs durch Kokultivierung mit einer murinen stromalen Zelllinie in dopaminerge Neurone differenzierten, konnten zeigen, dass im Vergleich zu den Standard-Feeder-Zellen in der stromalen Zelllinie eine sechsfach höhere mRNA-Expression von HGF detektierbar war [Zeng et al., 2004]. In den hier beschriebenen Versuchen könnte das von den Stammzellen selbst sezernierte HGF, die neuronale Differenzierung und die Ausbildung axonaler Ausläufer, welche durch die Hirnbiopsien induziert wurden, verstärkt haben.

Neben HGF konnte auch die Sekretion des *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins 6* (IGFBP-6) den Stammzellen zugeschrieben werden. IGFBP-6 wird von vielen Zelltypen *in*

## 5. Diskussion

*in vitro* exprimiert. Darunter sind beispielsweise Myoblasten, Endothelzellen oder Keratinocyten [Bach, 1999]. Darüber hinaus ist bekannt, dass IGFBP-6 bei konfluentem Zustand der Zellen einen antiproliferativen Effekt aufweist [Bach, 2005], was in Zusammenhang mit der untersuchten Stammzellpopulation durchaus plausibel wäre, da die Zellen sehr dicht ausgesät worden sind.

Da das verwendete Medium mit fetalem Kälberserum supplementiert war, konnten bestimmte Wachstumsfaktoren bereits im Kultivierungsmedium detektiert werden. Unter ihnen waren der *Granulocyte Colony-stimulating Factor* (G-CSF), der *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-II) sowie der *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ). G-CSF spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung myeloider Zellen, indem es Einfluss auf das Wachstum neutrophiler Granulocytenvorläufer oder das Überleben reifer Neutrophiler durch Inhibition der Apoptose nimmt [Welte et al., 1985, Begley et al., 1986, Hu and Yasui, 1997]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass G-CSF einen protektiven Effekt auf neuronale Vorläuferzellen haben kann, indem es den programmierten Zelltod inhibiert und die Differenzierung dieser Zellen stimuliert [Schneider et al., 2005]. IGF-II hat generell einen mitogenen und somit antiapoptotischen Effekt auf Zellen [Stewart and Rotwein, 1996]. TGF- $\beta$  spielt bei der Inflammation und bei verletzungsbedingten Prozessen im Gehirn eine Rolle [Lindholm et al., 1992, Allan et al., 2005]. Unter anderem wird diesem Wachstumsfaktor eine neurotrophe Funktion zugeschrieben [Ling et al., 1998, Roussa et al., 2009]. Es wäre also möglich, dass auch diese Faktoren begünstigend auf die Kokultur-induzierte neuronale Differenzierung der Stammzellen wirkten.

Ein weiterer Faktor, der in Folge von Hirnverletzungen hochreguliert wird, ist der *Glial-derived Neurotrophic Factor* (GDNF) [Cheng et al., 2008]. Dieser Faktor wird von Astrocyten sezerniert, dem vorherrschenden Zelltyp im Gehirn [Schaar et al., 1993]. Auch in dem vorgestellten Kokultursystem könnte dieser Faktor von den Hirnbiopsien exprimiert worden sein, wenn man annimmt, dass die Zellen im zerkleinerten Hirngewebe sich ähnlich wie die Hirnzellen *in vivo* verhielten. Bei der Detektion der Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand konnte allerdings weder im Hirn-konditionierten Medium noch im

## 5. Diskussion

Kokulturansatz GDNF detektiert werden, was jedoch auch an der Nachweisgrenze der verwendeten Methode gelegen haben könnte.

Bezüglich des verwendeten Systems zur Detektion der Wachstumsfaktoren muss darauf hingewiesen werden, dass es sich um einen humanspezifischen antikörperbasierten Chip handelt, hier jedoch ein xenogener Ansatz untersucht wurde. Es lagen in dem analysierten Zellkulturüberstand humane Wachstumsfaktoren, die von den Stammzellen sezerniert worden sind, Wachstumsfaktoren aus den Hirnbiopsien der Ratte und bovine Wachstumsfaktoren aus dem fetalen Kälberserum vor. Dass Wachstumsfaktoren eine hohe Kreuzreaktivität aufweisen, lässt sich alleine an der Tatsache, dass fetales Kälberserum routinemäßig zur Kultivierung von Zellen jeglicher Spezies verwendet wird, ableiten [Gimbrone et al., 1974, Evans and Kaufman, 1981, Ciba et al., 2008]. Zudem sind viele Wachstumsfaktoren evolutionär stark konserviert [Hallböök et al., 1991, Collett-Solberg and Cohen, 1996, Derynck and Feng, 1997, Ornitz and Itoh, 2001]. Daher kann man annehmen, dass es eine Kreuzreaktivität der Wachstumsfaktoren der Ratte mit den Rezeptoren der humanen Zellen, ebenso wie mit den Antikörpern auf dem humanspezifischen Wachstumsfaktor-Antikörper-Array gegeben hat.

Mit Hilfe dieses Arrays ist es daher gelungen, Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand der zusammen und separat kultivierten Stammzellen und Hirnbiopsien zu detektieren. Für diese Faktoren konnten neurotrophe Wirkungen aufgezeigt werden, die für die neuronale Differenzierung der Stammzellen verantwortlich gewesen sein könnten. Interessanterweise zeigte sich auch, dass es eine direkte Interaktion zwischen den Stammzellen und den Hirnbiopsien gab, die zur Ausschüttung zusätzlicher Faktoren mit neurotrophen Eigenschaften führte.

## 5. Diskussion

### ***5.5 Fazit und Ausblick der Arbeit***

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Nestin-positive Zellen aus humaner Haut über gezielte Isolation von Stammzellen aus Schweißdrüsen anzureichern. Diese Stammzellpopulation konnte ohne Änderungen in der Expression dieses Intermediärfilaments unter Standardbedingungen über viele Passagen kultiviert werden.

Ein Vergleich dieser neuartigen Stammzellpopulation mit glandulären Stammzellen aus dem Pankreas und der Parotis und mit Stammzellen, die aus der Vollhaut gewonnen wurden, hat qualitativ eine hohe Übereinstimmung in der Gen- und Proteinexpression von stammzellspezifischen Markern und Markern der drei embryonalen Keimblätter Ekto-derm, Mesoderm und Endoderm ergeben. Weitere Analysen, wie eine Untersuchung von spezifischen Oberflächenmolekülen mittels *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS), die Bestimmung des Wachstumsverhaltens der Stammzellpopulationen über Wachstumskurven und die Untersuchung des Differenzierungspotentials in die mesodermale oder endodermale Richtung könnten einen detaillierteren Einblick in die Vergleichbarkeit dieser Stammzellpopulationen geben.

In dieser Arbeit wurde das neuroektodermale Differenzierungspotential von PSCs, PDSCs, SDSCs sowie SGSCs untersucht. Dabei wurde nicht nur die spontane Differenzierungskapazität aufgezeigt, sondern die Differenzierung in Nervenzellen über eine Kokultivierung mit Rattenhirnbiopsien gezielt induziert. Diese Differenzierungsinduktion konnte sowohl über eine Änderung der Zellmorphologie, den Anstieg neuroassoziierter Strukturproteine als auch über eine Zunahme der Genexpression von neurospezifischen Enzymen belegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass PSCs stärker auf die Stimulation reagierten als PDSCs und dass Stammzellen die aus Schweißdrüsen isoliert wurden und über einen sehr hohen Nestin-Anteil verfügten, stärker in die neuronale Richtung differenzierten als eine Mischpopulation von Stammzellen aus der Vollhaut. Zudem konnte in den PSCs nach der Kokultur ein starker intrazellulärer Anstieg des Neurotransmitters Dopamin aufgezeigt werden. Einen eindeutigen Nachweis für die Funktionalität der generierten neuronalen Zellen kann nur eine induzierte Ausschüttung von Neuro-

## 5. Diskussion

transmittern zusammen mit der Messung der Reizfortleitung mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik oder eines Multielektroden-Arrays erbringen.

Die Analyse der potentiellen Faktoren, die zu der gezielten neuronalen Differenzierung der Stammzellen beitragen, ergab, dass es sich überwiegend um Faktoren mit einer neurotrophen Wirkung handelte. Mit Hilfe des verwendeten Wachstumsfaktor-Antikörper-Arrays konnte jedoch nur eine limitierte Anzahl der möglichen Wachstumsfaktoren, die tatsächlich in die Differenzierungsprozesse involviert waren, untersucht werden. Daher muss die Analyse der Faktoren noch ausgeweitet werden und beispielsweise mit Hilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) eine quantitative Untersuchung durchgeführt werden. So wären genauere Aussagen zu den Faktoren, die eine zentrale Rolle in der Differenzierungsinduktion spielen, möglich. Vorab ist es allerdings auch denkbar, die Wirkung einzelner bisher detektierter Faktoren auf die Differenzierung der glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen zu untersuchen.

Insgesamt stellt das Kokulturmodell mit Stammzellen und Hirnbiopsien ein gutes *in vitro*-Modell dar, um das Verhalten der Stammzellen nach einer Transplantation im Rahmen neuroregenerativer zellbasierter Therapien vorherzusagen. Es zeigt das Differenzierungsverhalten der Stammzellen in unmittelbarer Umgebung des Zielgewebes und der sezernierten Faktoren. Eine mögliche Erweiterung dieses Modells würde die direkte Kultivierung der Stammzellen auf Hirnschnitten darstellen, wodurch die Integrität der Zellen in das Zielgewebe untersucht werden könnte.

Eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz humaner Stammzellpopulationen bei zellulären Therapien ist die Erreichbarkeit und Verfügbarkeit der Spenderorgane. Das ist insbesondere bei Stammzellen aus der Vollhaut und den Schweißdrüsen, aber auch bei Stammzellen aus der Parotis gegeben. Das sehr hohe neuronale Differenzierungspotential pankreatischer Stammzellen besitzt hingegen viel Potential zur Entwicklung von *in vitro*-Testsystemen, beispielsweise zur Testung von Medikamenten.

## 6. Referenzen

### 6. Referenzen

- Albin**, R. L., Reiner, A., Anderson, K. D., Dure, L. S., Handelin, B., Balfour, R., Whetsell, W. O., Penney, J. B. and Young, A. B. (1992). Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 31, 425–430.
- Alessandri**, G., Pagano, S., Bez, A., Benetti, A., Pozzi, S., Iannolo, G., Baronio, M., Invernici, G., Caruso, A., Muneretto, C., Bisleri, G. and Parati, E. (2004). Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* 364, 1872–1883.
- Allan**, S. M., Tyrrell, P. J. and Rothwell, N. J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5, 629–640.
- Allen**, N. J. and Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677.
- Amoh**, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S. and Hoffman, R. M. (2005). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17734–17738.
- Anwar**, M. R., Andreasen, C. M., Lippert, S. K., Zimmer, J., Martinez-Serrano, A. and Meyer, M. (2008). Dopaminergic differentiation of human neural stem cells mediated by co-cultured rat striatal brain slices. *J Neurochem* 105, 460–470.
- Armitage**, J. O. (1998). Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4491–4508.
- Arvidsson**, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963–970.
- Ayuso-Sacido**, A., Roy, N. S., Schwartz, T. H., Greenfield, J. P. and Boockvar, J. A. (2008). Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 62, 223–9; discussion 229–31.
- Bach**, L. A. (1999). Insulin-like growth factor binding protein-6: the "forgotten" binding protein? *Horm Metab Res* 31, 226–234.
- Bach**, L. A. (2005). IGFBP-6 five years on; not so 'forgotten'? *Growth Horm IGF Res* 15, 185–192.
- Bachoud-Lévi**, A.-C., Gaura, V., Brugières, P., Lefaucheur, J.-P., Boissé, M.-F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M.-J., Bourdet, C., Remy, P., Cesaro, P., Hantraye, P. and Peschanski, M. (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 5, 303–309.
- Bang**, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H. and Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57, 874–882.
- Bartsch**, G., Yoo, J. J., Coppi, P. D., Siddiqui, M. M., Schuch, G., Pohl, H. G., Fuhr, J., Perin, L., Soker, S. and Atala, A. (2005). Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev* 14, 337–348.

## 6. Referenzen

- Baum**, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M. and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 2804–2808.
- Bear**, M. F., Connors, B. W. and Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: exploring the brain*. 3 edition, Lippincott Williams and Wilkins.
- Begley**, C. G., Lopez, A. F., Nicola, N. A., Warren, D. J., Vadas, M. A., Sanderson, C. J. and Metcalf, D. (1986). Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood* *68*, 162–166.
- Bhandari**, D. R., Seo, K.-W., Jung, J.-W., Kim, H.-S., Yang, S.-R., Kang, S.-K. and Kang, K.-S. (2010). The regulatory role of c-MYC on HDAC2 and PcG expression in human multipotent stem cells. *J Cell Mol Med* .
- Bi**, D., Chen, F. G., Zhang, W. J., Zhou, G. D., Cui, L., Liu, W. and Cao, Y. (2010). Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. *BMC Cell Biol* *11*, 46.
- Biedermann**, T., Pontiggia, L., Böttcher-Haberzeth, S., Tharakan, S., Braziulis, E., Schiestl, C., Meuli, M. and Reichmann, E. (2010). Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. *J Invest Dermatol* *130*, 1996–2009.
- Bishop**, A. E., Buttery, L. D. K. and Polak, J. M. (2002). Embryonic stem cells. *J Pathol* *197*, 424–429.
- Bradford**, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248–254.
- Braissant**, O. (2007). Neurofilament proteins in brain diseases. In: Arlen R. K. *New research on neurofilament proteins*. Nova Science Publishers, 25–51.
- Brayden**, D. J. and Fitzpatrick, J. (1995). Cultured human sweat gland epithelia: isolation of glands using neutral red. *Pharm Res* *12*, 171–175.
- Breitbart**, R. E., Liang, C. S., Smoot, L. B., Laheru, D. A., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1993). A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development* *118*, 1095–1106.
- Brzoska**, M., Geiger, H., Gauer, S. and Baer, P. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* *330*, 142–150.
- Carden**, M. J., Trojanowski, J. Q., Schlaepfer, W. W. and Lee, V. M. (1987). Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* *7*, 3489–3504.
- Carpenter**, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P. and Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* *172*, 383–397.
- Carpenter**, M. K., Rosler, E. and Rao, M. S. (2003). Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* *5*, 79–88.

## 6. Referenzen

- Chen**, F. G., Zhang, W. J., Bi, D., Liu, W., Wei, X., Chen, F. F., Zhu, L., Cui, L. and Cao, Y. (2007). Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci* 120, 2875–2883.
- Cheng**, Q., Liberto, V. D., Caniglia, G. and Mudò, G. (2008). Time-course of GDNF and its receptor expression after brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 439, 24–29.
- Chmielnicki**, E., Benraiss, A., Economides, A. N. and Goldman, S. A. (2004). Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* 24, 2133–2142.
- Cho**, K. J., Trzaska, K. A., Greco, S. J., McArdle, J., Wang, F. S., Ye, J.-H. and Rameshwar, P. (2005). Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells* 23, 383–391.
- Choi**, Y., Ta, M., Atouf, F. and Lumelsky, N. (2004). Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells* 22, 1070–1084.
- Ciba**, P., Schick Tanz, S., Anders, E., Siegl, E., Stielow, A., Klink, E. and Kruse, C. (2008). Long-term culture of a cell population from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. *Fish Physiol Biochem* 34, 367–372.
- Ciba**, P., Sturmheit, T. M., Petschnik, A. E., Kruse, C. and Danner, S. (2009). In vitro cultures of human pancreatic stem cells: gene and protein expression of designated markers varies with passage. *Ann Anat* 191, 94–103.
- Clelland**, C. D., Barker, R. A. and Watts, C. (2008). Cell therapy in Huntington disease. *Neurosurg Focus* 24, E9.
- Collett-Solberg**, P. F. and Cohen, P. (1996). The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25, 591–614.
- Courtois**, E. T., Castillo, C. G., Seiz, E. G., Ramos, M., Bueno, C., Liste, I. and Martínez-Serrano, A. (2010). In vitro and in vivo enhanced generation of human A9 dopamine neurons from neural stem cells by Bcl-XL. *J Biol Chem* 285, 9881–9897.
- Crews**, F. T. and Nixon, K. (2003). Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Res Health* 27, 197–204.
- Curtis**, M. A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M. F., Axell, M. Z., Wikkelso, C., Holtås, S., van Roon-Mom, W. M. C., Björk-Eriksson, T., Nordborg, C., Frisén, J., Dragunow, M., Faull, R. L. M. and Eriksson, P. S. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243–1249.
- Danner**, S., Kajahn, J., Geismann, C., Klink, E. and Kruse, C. (2007). Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 13, 11–20.
- Derynck**, R. and Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333, F105–F150.

## 6. Referenzen

- Doetsch, F.** (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13, 543–550.
- Doran, J. F., Jackson, P., Kynoch, P. A. and Thompson, R. J.** (1983). Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 40, 1542–1547.
- Dunnett, S. B., Nathwani, F. and Björklund, A.** (2000). The integration and function of striatal grafts. *Prog Brain Res* 127, 345–380.
- Ebens, A., Brose, K., Leonardo, E. D., Hanson, M. G., Bladt, F., Birchmeier, C., Barres, B. A. and Tessier-Lavigne, M.** (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17, 1157–1172.
- Egaña, J. T., Danner, S., Kremer, M., Rapoport, D. H., Lohmeyer, J. A., Dye, J. F., Hopfner, U., Lavandero, S., Kruse, C. and Machens, H.-G.** (2009). The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials* 30, 5918–5926.
- Ende, N. and Chen, R.** (2001). Human umbilical cord blood cells ameliorate Huntington’s disease in transgenic mice. *J Med* 32, 231–240.
- Eng, L. F.** (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8, 203–214.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H.** (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313–1317.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Falk, A. and Frisé, J.** (2002). Amphiregulin is a mitogen for adult neural stem cells. *J Neurosci Res* 69, 757–762.
- Folk, G. E. and Semken, H. A.** (1991). The evolution of sweat glands. *Int J Biometeorol* 35, 180–186.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D. and Fahn, S.** (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson’s disease. *N Engl J Med* 344, 710–719.
- Freeman, T. B., Cicchetti, F., Hauser, R. A., Deacon, T. W., Li, X. J., Hersch, S. M., Nauert, G. M., Sanberg, P. R., Kordower, J. H., Saporta, S. and Isacson, O.** (2000). Transplanted fetal striatum in Huntington’s disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13877–13882.
- Gammill, L. S. and Bronner-Fraser, M.** (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795–805.
- Gaura, V., Bachoud-Lévi, A.-C., Ribeiro, M.-J., Nguyen, J.-P., Frouin, V., Baudic, S., Brugières, P., Mangin, J.-F., Boissé, M.-F., Palfi, S., Cesaro, P., Samson, Y., Hantraye, P., Peschanski, M. and Remy, P.** (2004). Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington’s disease patients. *Brain* 127, 65–72.

## 6. Referenzen

- Gimble**, J. M., Katz, A. J. and Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100, 1249–1260.
- Gimbrone**, M. A., Cotran, R. S. and Folkman, J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60, 673–684.
- Golestaneh**, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rone, J. D., Haddad, B. R., Gallicano, G. I. and Dym, M. (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev* 18, 1115–1126.
- Gorjup**, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T. H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C. and von Briesen, H. (2009). Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur J Cell Biol* 88, 409–421.
- Gronthos**, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G. and Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81, 531–535.
- Gurtner**, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Hallböök**, F., Ibáñez, C. F. and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845–858.
- Hermann**, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. and Storch, A. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 117, 4411–4422.
- Hockfield**, S. and McKay, R. D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5, 3310–3328.
- Hu**, B. and Yasui, K. (1997). Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *Int J Hematol* 66, 179–188.
- Huang**, X., Choi, J.-K., Park, S. R., Ha, Y., Park, H., Yoon, S. H., Park, H. C., Park, J. O. and Choi, B. H. (2007). GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Neurosci Res* 58, 50–57.
- Iacovitti**, L., Donaldson, A. E., Marshall, C. E., Suon, S. and Yang, M. (2007). A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: Studies in vitro and in vivo. *Brain Res* 1127, 19–25.
- Jaffe**, E. A., Hoyer, L. W. and Nachman, R. L. (1974). Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1906–1909.
- Jessen**, K. R. and Mirsky, R. (1984). Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol* 13, 923–934.
- Jiang**, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.

## 6. Referenzen

- Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A. and Chandran, S.** (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet* *364*, 172–178.
- Johansson, C. B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A. M. and Frisé, J.** (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* *253*, 733–736.
- Jones, P. H. and Watt, F. M.** (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* *73*, 713–724.
- Kajahn, J., Gorjup, E., Tiede, S., von Briesen, H., Paus, R., Kruse, C. and Danner, S.** (2008). Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* *87*, 39–46.
- Kaplan, M. P., Chin, S. S., Fliegner, K. H. and Liem, R. K.** (1990). Alpha-interneixin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J Neurosci* *10*, 2735–2748.
- Kaplan, M. S. and Hinds, J. W.** (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* *197*, 1092–1094.
- Katsetos, C. D., Herman, M. M. and Mörk, S. J.** (2003). Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* *55*, 77–96.
- Kendall, A. L., Rayment, F. D., Torres, E. M., Baker, H. F., Ridley, R. M. and Dunnett, S. B.** (1998). Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med* *4*, 727–729.
- Kessinger, A. and Sharp, J. G.** (1998). Mobilization of blood stem cells. *Stem Cells* *16 Suppl 1*, 139–143.
- Kim, J. K., Choi, B. H., Park, H. C., Park, S. R., Kim, Y. S., Yoon, S. H., Park, H. S., Kim, E. Y. and Ha, Y.** (2004). Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells. *Neuroreport* *15*, 2161–2165.
- Kishi, Y., Takahashi, J., Koyanagi, M., Morizane, A., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S. and Hashimoto, N.** (2005). Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J Neurosci Res* *79*, 279–286.
- Klassen, H., Schwartz, M. R., Bailey, A. H. and Young, M. J.** (2001). Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett* *312*, 180–182.
- Kolle, G., Ho, M., Zhou, Q., Chy, H. S., Krishnan, K., Cloonan, N., Bertoncello, I., Laslett, A. L. and Grimmond, S. M.** (2009). Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells* *27*, 2446–2456.
- Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K. R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E. M., McGrogan, M., Reitman, M. A. and Bynum, L.** (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* *55*, 565–569.

## 6. Referenzen

- Kordower**, J. H., Freeman, T. B., Snow, B. J., Vingerhoets, F. J., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., Hauser, R. A., Smith, D. A., Nauert, G. M. and Perl, D. P. (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 332, 1118–1124.
- Kossack**, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H. N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P. J. and Reijo-Pera, R. A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 27, 138–149.
- Kragl**, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H. and Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65.
- Krüger**, C., Laage, R., Pitzer, C., Schäbitz, W.-R. and Schneider, A. (2007). The hematopoietic factor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promotes neuronal differentiation of adult neural stem cells in vitro. *BMC Neurosci* 8, 88.
- Kruse**, C., Birth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A. and Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A* 79, 1617–1624.
- Kruse**, C., Bodó, E., Petschnik, A. E., Danner, S., Tiede, S. and Paus, R. (2006a). Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Exp Dermatol* 15, 794–800.
- Kruse**, C., Kajahn, J., Petschnik, A. E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D. H. and Wedel, T. (2006b). Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 188, 503–517.
- Kukekov**, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M. and Steindler, D. A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156, 333–344.
- Landles**, C. and Bates, G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 5, 958–963.
- Legendre**, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760–793.
- Lendahl**, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- Li**, D.-Q., Chen, Z., Song, X. J., de Paiva, C. S., Kim, H.-S. and Pflugfelder, S. C. (2005). Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res* 80, 581–590.
- Lin**, H.-T., Chiou, S.-H., Kao, C.-L., Shyr, Y.-M., Hsu, C.-J., Tarng, Y.-W., Ho, L. L.-T., Kwok, C.-F. and Ku, H.-H. (2006). Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol* 12, 4529–4535.
- Lin**, X., Zhang, Y., Dong, J., Zhu, X., Ye, M., Shi, J., Lu, J., Di, Q., Shi, J. and Liu, W. (2007). GM-CSF enhances neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 18, 1113–1117.

## 6. Referenzen

- Lindholm**, D., Castrén, E., Kiefer, R., Zafra, F. and Thoenen, H. (1992). Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* *117*, 395–400.
- Lindner**, U., Kramer, J., Behrends, J., Driller, B., Wendler, N.-O., Boehrsen, F., Rohwedel, J. and Schlenke, P. (2010). Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins. *Cytotherapy* .
- Lindvall**, O., Kokaia, Z. and Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* *10 Suppl*, S42–S50.
- Ling**, Z. D., Potter, E. D., Lipton, J. W. and Carvey, P. M. (1998). Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* *149*, 411–423.
- Liste**, I., García-García, E. and Martínez-Serrano, A. (2004). The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci* *24*, 10786–10795.
- Lonsdale-Eccles**, A., Leonard, N. and Lawrence, C. (2003). Axillary hyperhidrosis: eccrine or apocrine? *Clin Exp Dermatol* *28*, 2–7.
- Lotharius**, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H. K. and Brundin, P. (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem* *277*, 38884–38894.
- Lu**, P., Blesch, A. and Tuszynski, M. H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* *77*, 174–191.
- Marangos**, P. J. and Schmechel, D. E. (1987). Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* *10*, 269–295.
- Mathe**, G., Jammet, H., Pendic, B., Schwarzenberg, L., Duplan, J. F., Maupin, B., Latarjet, R., Larrieu, M. J., Kalic, D. and Djukic, Z. (1959). Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev Fr Etud Clin Biol* *4*, 226–238.
- McBride**, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E.-Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N. and Kordower, J. H. (2004). Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* *475*, 211–219.
- McCormick**, D. A. (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* *62*, 1018–1027.
- Metcalfe**, D. (1999). Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann N Y Acad Sci* *872*, 289–303; discussion 303–4.
- Mezey**, E., Key, S., Vogelsang, G., Szalayova, I., Lange, G. D. and Crain, B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1364–1369.
- Molofsky**, A. V., Pardal, R. and Morrison, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 700–707.

## 6. Referenzen

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. and Yamanaka, S. (2008).** Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101–106.
- Nelson, P. T., Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Gebel, J., DeCesare, S., Elder, E. M., Zhang, P. J., Jacobs, A., McGrogan, M., Lee, V. M.-Y. and Trojanowski, J. Q. (2002).** Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol* 160, 1201–1206.
- Neuss, S., Becher, E., Wöltje, M., Tietze, L. and Jahnen-Dechent, W. (2004).** Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22, 405–414.
- Nilsson, A. and Kanje, M. (2005).** Amphiregulin acts as an autocrine survival factor for adult sensory neurons. *Neuroreport* 16, 213–218.
- Nilsson, A., Moller, K., Dahlin, L., Lundborg, G. and Kanje, M. (2005).** Early changes in gene expression in the dorsal root ganglia after transection of the sciatic nerve; effects of amphiregulin and PAI-1 on regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 136, 65–74.
- Nixon, R. A. and Shea, T. B. (1992).** Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton* 22, 81–91.
- Noback, C. R., Strominger, N. L. and Demarest, R. J. (2005).** The human nervous system: structure and function. 6th edition, Humana Press.
- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I. and Young, R. A. (2004).** Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378–1381.
- Oka, M., Tagoku, K., Russell, T. L., Nakano, Y., Hamazaki, T., Meyer, E. M., Yokota, T. and Terada, N. (2002).** CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 1274–1281.
- Okada, N., Kitano, Y. and Morimoto, T. (1983).** Isolation of a viable eccrine sweat gland by dispase. *Arch Dermatol Res* 275, 130–133.
- Oritani, K., Wu, X., Medina, K., Hudson, J., Miyake, K., Gimble, J. M., Burstein, S. A. and Kincade, P. W. (1996).** Antibody ligation of CD9 modifies production of myeloid cells in long-term cultures. *Blood* 87, 2252–2261.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2001).** Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.
- Osaka, H., Wang, Y.-L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.-J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K. (2003).** Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 12, 1945–1958.
- Pack, G. T., Islami, A. H., Hubbard, J. C. and Brasfield, R. D. (1962).** Regeneration of human liver after major hepatectomy. *Surgery* 52, 617–623.

## 6. Referenzen

- Pagano, S. F., Impagnatiello, F., Girelli, M., Cova, L., Grioni, E., Onofri, M., Cavallaro, M., Etteri, S., Vitello, F., Giombini, S., Solero, C. L. and Parati, E. A. (2000).** Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* *18*, 295–300.
- Palfi, S., Condé, F., Riche, D., Brouillet, E., Dautry, C., Mittoux, V., Chibois, A., Peschanski, M. and Hantraye, P. (1998).** Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* *4*, 963–966.
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L. and Studer, L. (2004).** Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12543–12548.
- Petschnik, A. E., Ciba, P., Kruse, C. and Danner, S. (2009).** Controlling alpha-SMA expression in adult human pancreatic stem cells by soluble factors. *Ann Anat* *191*, 116–125.
- Petschnik, A. E., Fell, B., Klatte, J. E., Evers, L. H., Kruse, C. and Danner, S. (2010).** Humane Schweißdrüsen: eine viel versprechende Quelle für Nestin-positive Stammzellen. *Regenerative Medizin* *1*, 8–11.
- Petschnik, A. E., Fell, B., Kruse, C. and Danner, S. (2010a).** The role of alpha-smooth muscle actin in myogenic differentiation of human glandular stem cells and their potential for smooth muscle cell replacement therapies. *Expert Opin Biol Ther* *10*, 853–861.
- Petschnik, A. E., Klatte, J. E., Evers, L. H., Kruse, C., Paus, R. and Danner, S. (2010b).** Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol* *162*, 380–383.
- Piccini, P., Brooks, D. J., Björklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H. and Lindvall, O. (1999).** Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* *2*, 1137–1140.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999).** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143–147.
- Poss, K. D., Wilson, L. G. and Keating, M. T. (2002).** Heart regeneration in zebrafish. *Science* *298*, 2188–2190.
- Prabhakaran, M. P., Venugopal, J. R. and Ramakrishna, S. (2009).** Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials* *30*, 4996–5003.
- Rapoport, D. H., Schicktanz, S., Gürleyik, E., Zühlke, C. and Kruse, C. (2009).** Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Ann Anat* *191*, 446–458.
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A. and Ben-Hur, T. (2001).** Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1134–1140.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M. (1999).** PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* *4*, 611–617.

## 6. Referenzen

- Rotter**, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Böhrnsen, F., Kramer, J., Rohwedel, J., Huss, R., Brandau, S., Wollenberg, B. and Lang, S. (2008). Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* 17, 509–518.
- Roussa**, E., von Bohlen und Halbach, O. and Kriegelstein, K. (2009). TGF-beta in dopamine neuron development, maintenance and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 651, 81–90.
- Rudnicki**, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351–1359.
- Safford**, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y.-D. C., Wilkison, W. O., Gimble, J. M. and Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 371–379.
- Salem**, H., Ciba, P., Rapoport, D. H., Egana, J. T., Reithmayer, K., Kadry, M., Machens, H. G. and Kruse, C. (2009). The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration. *Biomaterials* 30, 789–796.
- Sanchez-Ramos**, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. and Sanberg, P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164, 247–256.
- Schaar**, D. G., Sieber, B. A., Dreyfus, C. F. and Black, I. B. (1993). Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol* 124, 368–371.
- Schmechel**, D. E., Brightman, M. W. and Marangos, P. J. (1980). Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Res* 190, 195–214.
- Schneider**, A., Krüger, C., Steigleder, T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., Aronowski, J., Maurer, M. H., Gassler, N., Mier, W., Hasselblatt, M., Kollmar, R., Schwab, S., Sommer, C., Bach, A., Kuhn, H.-G. and Schäbitz, W.-R. (2005). The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 115, 2083–2098.
- Schuldiner**, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R. S. and Benvenisty, N. (2001). Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 913, 201–205.
- Scintu**, F., Reali, C., Pillai, R., Badiali, M., Sanna, M. A., Argioli, F., Ristaldi, M. S. and Sogos, V. (2006). Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci* 7, 14.
- Seaberg**, R. M., Smukler, S. R., Kieffer, T. J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M. B., Korbitt, G. and van der Kooy, D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22, 1115–1124.
- Seeberger**, K. L., Dufour, J. M., Shapiro, A. M. J., Lakey, J. R. T., Rajotte, R. V. and Korbitt, G. S. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 86, 141–153.
- Shaw**, G. and Weber, K. (1982). Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature* 298, 277–279.

## 6. Referenzen

- Shimada**, H., Yoshimura, N., Tsuji, A. and Kunisada, T. (2009). Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: modulation of differentiation by FGF-20. *J Biosci Bioeng* *107*, 447–454.
- Skalli**, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. and Gabbiani, G. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* *103*, 2787–2796.
- Song**, J., Lee, S.-T., Kang, W., Park, J.-E., Chu, K., ee Lee, S., Hwang, T., Chung, H. and Kim, M. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci Lett* *423*, 58–61.
- Song**, T., Chen, G., Wang, Y., Mao, G., Wang, Y. and Bai, H. (2008). Chemically defined sequential culture media for TH+ cell derivation from human embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod* *14*, 619–625.
- Sonntag**, K.-C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R. and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem Cells* *25*, 411–418.
- Stewart**, C. E. and Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* *76*, 1005–1026.
- Takahashi**, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Takamori**, S. (2006). VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* *55*, 343–351.
- Tao**, H., Rao, R. and Ma, D. D. F. (2005). Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev Growth Differ* *47*, 423–433.
- Tatard**, V. M., D'Ippolito, G., Diabira, S., Valeyev, A., Hackman, J., McCarthy, M., Bouckenooghe, T., Menei, P., Montero-Menei, C. N. and Schiller, P. C. (2007). Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone* *40*, 360–373.
- Thomson**, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Tiede**, S., Kloepper, J. E., Bodò, E., Tiwari, S., Kruse, C. and Paus, R. (2007). Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* *86*, 355–376.
- Tiede**, S., Kloepper, J. E., Ernst, N., Poeggeler, B., Kruse, C. and Paus, R. (2009). Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol* *129*, 2711–2720.

## 6. Referenzen

- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2001).** Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* *3*, 778–784.
- Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D. and Miller, F. D. (2005).** Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* *23*, 727–737.
- Tondreau, T., Dejeneffe, M., Meuleman, N., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Martiat, P., Bron, D. and Lagneaux, L. (2008).** Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics* *9*, 166.
- Trzaska, K. A., Kuzhikandathil, E. V. and Rameshwar, P. (2007).** Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *25*, 2797–2808.
- Wachs, F.-P., Couillard-Despres, S., Engelhardt, M., Wilhelm, D., Ploetz, S., Vroemen, M., Kaesbauer, J., Uyanik, G., Klucken, J., Karl, C., Tebbing, J., Svendsen, C., Weidner, N., Kuhn, H.-G., Winkler, J. and Aigner, L. (2003).** High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Lab Invest* *83*, 949–962.
- Wagers, A. J. and Weissman, I. L. (2004).** Plasticity of adult stem cells. *Cell* *116*, 639–648.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W. and Orkin, S. H. (2006).** A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* *444*, 364–368.
- Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R. and Chopp, M. (2004).** Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* *35*, 1732–1737.
- Watt, F. M. (1998).** Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *353*, 831–837.
- Weissman, I. L. (2000).** Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* *100*, 157–168.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabilove, J. L., Levi, E., Mertelsmann, R. and Moore, M. A. (1985).** Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 1526–1530.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R. and Wobus, A. M. (2004).** Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* *61*, 2510–2522.
- Wilkinson, K. D., Lee, K. M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M. and Pohl, J. (1989).** The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* *246*, 670–673.
- Willard, M. and Simon, C. (1983).** Modulations of neurofilament axonal transport during the development of rabbit retinal ganglion cells. *Cell* *35*, 551–559.
- Winslow, T. (2001).** Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>.

## 6. Referenzen

- Witusik, M.,** Gresner, S. M., Hulas-Bigoszewska, K., Krynska, B., Azizi, S. A., Liberski, P. P., Brown, P. and Rieske, P. (2007). Neuronal and astrocytic cells, obtained after differentiation of human neural GFAP-positive progenitors, present heterogeneous expression of PrPc. *Brain Res* *1186*, 65–73.
- Woodbury, D.,** Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* *61*, 364–370.
- Wu, Z.,** Xie, Y., Bucher, N. L. and Farmer, S. R. (1995). Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* *9*, 2350–2363.
- Yatabe, Y.,** Tavaré, S. and Shibata, D. (2001). Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10839–10844.
- Yaworsky, P. J.** and Kappen, C. (1999). Heterogeneity of neural progenitor cells revealed by enhancers in the nestin gene. *Dev Biol* *205*, 309–321.
- Yoshimura, S.,** Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S. S., Waeber, C., Bakowska, J. C., Breakefield, X. O. and Moskowitz, M. A. (2001). FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5874–5879.
- Yoshimura, S.,** Teramoto, T., Whalen, M. J., Irizarry, M. C., Takagi, Y., Qiu, J., Harada, J., Waeber, C., Breakefield, X. O. and Moskowitz, M. A. (2003). FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest* *112*, 1202–1210.
- Young, H. E.** and Black, A. C. (2004). Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* *276*, 75–102.
- Yu, H.,** Fang, D., Kumar, S. M., Li, L., Nguyen, T. K., Acs, G., Herlyn, M. and Xu, X. (2006). Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* *168*, 1879–1888.
- Yu, H.,** Kumar, S. M., Kossenkov, A. V., Showe, L. and Xu, X. (2010). Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol* *130*, 1227–1236.
- Yu, J.,** Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. and Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.
- Zeng, X.,** Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.-B., Fötter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., Chen, G.-J., Rao, M. S. and Freed, W. J. (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *22*, 925–940.
- Zhang, S. C.,** Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O. and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1129–1133.
- Zipori, D.** (2004). The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* *5*, 873–878.

## 6. Referenzen

**Ziros**, P. G., Gil, A.-P. R., Georgakopoulos, T., Habeos, I., Kletsas, D., Basdra, E. K. and Papavassiliou, A. G. (2002). The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277, 23934–23941.

**Zuk**, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., Ugarte, D. A. D., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279–4295.

**Zurita**, M., Bonilla, C., Otero, L., Aguayo, C. and Vaquero, J. (2008). Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res* 60, 275–280.

## 7. Anhang

### 7.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1   Die Stammzelle.....	6
Abbildung 2   Isolation embryonaler Stammzellen. ....	9
Abbildung 3   Nischen verschiedenartiger Stammzellpopulationen in der humanen Haut.....	12
Abbildung 4   Die Neurulation .....	17
Abbildung 5   Zellen des zentralen Nervensystems .....	20
Abbildung 6   Hirnregionen adulter Neurogenese .....	23
Abbildung 7   Differenzierungspotential neuraler Stammzellen.....	24
Abbildung 8   Degenerierende Nervenbahnen bei der Parkinson-Krankheit.....	28
Abbildung 9   Protokoll zur Stammzellisolation aus humanen Schweißdrüsen .....	48
Abbildung 10   Das Kokultursystem.....	54
Abbildung 11   Thermozyklus der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.....	59
Abbildung 12   Der Transkriptionsfaktor-Stammzellchip .....	65
Abbildung 13   Humane Schweißdrüsen als Quelle hochproliferativer Zellen.....	68
Abbildung 14   Nestin-Expression in Zellen aus humanen Schweißdrüsen.....	69
Abbildung 15   Einfluss der Zellkulturoberfläche auf die Nestin-Expression .....	70
Abbildung 16   Spontane Expression spezifischer mRNAs in glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellpopulationen .....	72
Abbildung 17   Relative Expression spezifischer Marker-mRNAs spontan differenzierter Stammzellen.....	74
Abbildung 18   Charakterisierung spontan differenzierter pankreatischer Stammzellen.....	77
Abbildung 19   Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus der Parotis.....	78
Abbildung 20   Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus der Vollhaut .....	79
Abbildung 21   Charakterisierung spontan differenzierter Stammzellen aus den Schweißdrüsen .....	80

## 7. Anhang

Abbildung 22   Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren in glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen.....	81
Abbildung 23   Kokultur-induzierte neuronale Differenzierung pankreatischer Stammzellen .....	85
Abbildung 24   Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in differenzierten pankreatischen Stammzellen.....	85
Abbildung 25   Relative Unterschiede in der mRNA-Expression Kokultur-stimulierter pankreatischer Stammzellen.....	86
Abbildung 26   Kokultur-induzierte neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Parotis.....	89
Abbildung 27   Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in Kokultur-stimulierten Stammzellen aus der Parotis.....	89
Abbildung 28   Relative Expressionsunterschiede der mRNA von Kokultur-behandelten Stammzellen aus der Parotis.....	90
Abbildung 29   Neuronale Differenzierung von Stammzellen aus der Vollhaut induziert durch Kokultur .....	93
Abbildung 30   Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in neuronal differenzierten Stammzellen aus der Vollhaut .....	93
Abbildung 31   Relative Unterschiede in der mRNA-Expression von Kokultur-behandelten Stammzellen aus der Vollhaut .....	94
Abbildung 32   Auswirkung der Kokultur auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus den Schweißdrüsen .....	97
Abbildung 33   Koexpression von Nestin und Neurofilamenten in Kokultur-stimulierten Stammzellen aus den Schweißdrüsen.....	97
Abbildung 34   Relative Expressionsunterschiede der mRNA von Kokultur-behandelten Stammzellen aus den Schweißdrüsen.....	98
Abbildung 35   Relative Änderungen in der Anzahl Marker-exprimierender Zellen nach Stimulation mit Hirngewebe.....	100
Abbildung 36   Vergleich der relativen Genexpressionslevel nach Stimulation mit Hirngewebe.....	102
Abbildung 37   Dopamin-Nachweis in pankreatischen Stammzellen.....	103
Abbildung 38   Detektion sekretierter Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand .....	106
Abbildung 39   Von Rattenhirnbiopsien und humanen Stammzellen sezernierte Wachstumsfaktoren.....	122

## 7. Anhang

### **7.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1   Verwendete Primer.....	40
Tabelle 2   Verwendete Primärantikörper.....	41
Tabelle 3   Verwendete Sekundärantikörper .....	41
Tabelle 4   Durchschnittliche und maximale Länge der Zellfortsätze neuronal differenzierter Zellen. ....	101
Tabelle 5   Auswirkungen der Kokultur auf die verschiedenen Stammzellpopulationen .....	118

## 7. Anhang

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	<i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP $\beta$	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein beta</i>
CD9	<i>Cluster of Differentiation Antigen 9</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK	Cytokeratin
Cy3	Cyanin 3
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-Phenylindol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E	Expressionslevel
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
gDNA	genomische DNA
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
hESC	<i>human Embryonic Stem Cells</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
hMSC	<i>human Mesenchymal Stem Cells</i>
HNF-1 $\alpha/\beta$	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha/beta</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IGF-II	<i>Insulin-like Growth Factor II</i>
IGFBP-6	<i>Insulin-like Growth Factor-binding Protein 6</i>
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen

## 7. Anhang

Klf-4	<i>Krüppel-like Factor 4</i>
MEF2D	<i>Myocyte-specific Enhancer Factor 2D</i>
NF	Neurofilament
NF_H	Neurofilament schwere Kette
NF_L	Neurofilament leichte Kette
NF_M	Neurofilament mittlere Kette
NSE	Neuron-spezifische Enolase
Oct-4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
OD	optische Dichte
P	Passage
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDSC	<i>Parotis-derived Stem Cells</i>
PGP 9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PNS	peripheres Nervensystem
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma</i>
PSC	<i>Pancreatic Stem Cells</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RT	Reverse Transkriptase
SDSC	<i>Skin-derived Stem Cells</i>
SGSC	<i>Sweat Gland-derived Stem Cells</i>
SKP	<i>Skin-derived Precursors</i>
Sox2	<i>SRY (Sex determining Region Y)-Box 2</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7. Anhang

### ***7.4 Eidesstattliche Versicherung***

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 10.01.2011

## 7. Anhang

### ***7.5 Hinweis zur Publikation von Daten aus dieser Arbeit***

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Petschnik AE**, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol.* **2010** Feb 1; 162(2):380-3. Epub 2009 Sep 22.

**Petschnik AE**, Fell B, Tiede S, Habermann JK, Pries R, Kruse C, Danner S. A novel xenogenic co-culture system to examine neuronal differentiation capability of various adult human stem cells. *PLoS One.* **2011**; 6(9):e24944

## 8. Sonstiges

### 8. Sonstiges

#### 8.1 Lebenslauf

**Name:** Anna Emilia Petschnik  
**Anschrift:** Dorfstraße 32  
23619 Mönkhagen  
**Geburtsdatum:** 04. November 1981  
**Geburtsort:** Berlinchen

#### BERUFLICHER WERDEGANG

- Apr. 2007 - Dez. 2010** Doktorarbeit: „Xenogene Kokultur zur Induktion der neuronalen Differenzierung in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen“. Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie. Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse.
- Feb. 2006 - Sep. 2006** Masterarbeit: „Differenzierung glandulärer adulter Stammzellen in neuronale, gliale und muskuläre Zellen“. Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik. Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse (Note 1,0).
- Okt. 2004 - Sep. 2006** Molecular Life Science Master-Studium an der Universität zu Lübeck (Note 1,8).
- Apr. 2004 - Juli 2004** Bachelorarbeit: „Stimulation von adulten Stammzellen aus dem exokrinen Pankreas mittels Retinsäure zu Muskel- und Nervenzellen“. Institut für medizinische Molekularbiologie an der Universität zu Lübeck. Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse (Note 1,0).
- Okt. 2001 - Juli 2004** Bachelorstudium der Molekularen Biotechnologie an der Universität zu Lübeck (Note 2,5).

#### SCHULAUSSBILDUNG

- 1991 - 2001** Carl-Jakob-Burckhardt-Gymnasium in Lübeck.  
**1987 - 1991** Grundschule.

## 8. Sonstiges

### **8.2 Wissenschaftliche Publikationen**

#### **Artikel peer-reviewed:**

Kruse C, Kajahn J, **Petschnik AE**, Maass A, Klink E, Rapoport DH, Wedel T. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat*, **2006**, *188*, 503-517

Kruse C, Bodó E, **Petschnik AE**, Danner S, Tiede S, Paus R. Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Exp Dermatol*, **2006**, *15*, 794-800

**Petschnik AE**, Ciba P, Kruse C, Danner S. Controlling alpha-SMA expression in adult human pancreatic stem cells by soluble factors. *Ann Anat*, **2009**, *191*, 116-125

Ciba P, Sturmheit TM, **Petschnik AE**, Kruse C, Danner S. In vitro cultures of human pancreatic stem cells: gene and protein expression of designated markers varies with passage. *Ann Anat*, **2009**, *191*, 94-103

**Petschnik AE**, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol*, **2010** Feb 1, *162*(2):380-3. Epub 2009 Sep 22

**Petschnik AE**, Fell B, Kruse C, Danner S. The role of alpha-smooth muscle actin in myogenic differentiation of human glandular stem cells and their potential for smooth muscle cell replacement therapies. *Expert Opin Biol Ther*, **2010** Jun;10(6):853-61. Review.

Langner S, Rakers S, Ciba P, **Petschnik AE**, Rapoport DH, Kruse C. Long-term culture and cryopreservation of cells from adipopancreatic tissue of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Aquatic Biol*. **2011**, Vol. 11: 271–278

**Petschnik AE**, Fell B, Tiede S, Habermann JK, Pries R, Kruse C, Danner S. A novel xenogenic co-culture system to examine neuronal differentiation capability of various adult human stem cells. *PLoS One*. **2011**; 6(9):e24944

## 8. Sonstiges

### weitere Artikel:

**Petschnik AE**, Langner S. Etablierung einer (Stamm)-Zellbibliothek wilder Tierarten – Von der Zellisolation bis zur Kryokonservierung. *BIOforum* 1/2009, S. 26–27

Danner S, **Petschnik AE**, Jany C, Kruse C. Successful Isolation of a Proliferating Cell Population with Stem Cell-like Properties from Rat Pancreas using Liberase TL Research Grade. *Biochemica*, 2009

**Petschnik AE**, Fell B, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Danner S. Humane Schweißdrüsen: eine viel versprechende Quelle für Nestin-positive Stammzellen. *Regenerative Medizin* 2010, 3. Jahrgang, Heft 1, S. 8-9

### Posterpräsentationen:

Ciba P, **Petschnik AE**, Geissmann C, Kruse C. Differentiation of Adult Pancreatic Stem/Progenitor Cells into Somatic Cell Line of all three Germ Layers. *Fraunhofer Life Science Symposium*, 22.10-24.10.2006, Leipzig

Ciba P, Danner S, Geissmann C, **Petschnik AE**, Guldner N, Kruse C. Gerichtete Differenzierung adulter Stammzellen. 24. *DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, 26.09.-28.09.2006, Wiesbaden

**Petschnik AE**, Danner S, Kruse C. Differentiation of human adult pancreatic stem cells into neural and muscle cells. *World Congress Regenerative Medicine*, 18.10.-20.10.2007, Leipzig

**Petschnik AE**, Tiede S, Kruse C, Danner S. Neuronal Differentiation of Human Adult Stem Cells mediated by Co-Cultured Brain Biopsies. *Stem Cells Europe*, 01.09-03.09.2008, Amsterdam, Niederlande

Langner S, **Petschnik AE**, Maass A, Kajahn J, Rapoport DH. A Co-Culture Model improves Differentiation of Glandular Stem Cells into Cardiomyocytes. *Fraunhofer Life Science Symposium*, 24.10-25.10.2008, Leipzig

**Petschnik AE**, Fell B, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. Human Sweat Glands – a Rich Source of Nestin Positive Stem Cells. *World Congress Regenerative Medicine*, 29.10-31.10.2009 Leipzig

**Petschnik AE**, Fell B, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. From Human Sweat Gland-derived Stem Cells to Neuronal-like Cells - a coculture mediated approach. *Stem Cells 2009*, 19.11-22.11.2009 Antigua

## 8. Sonstiges

Danner S, **Petschnik AE**, Nagel S, Klätte JE, Kruse C. Novel adult stem cells from human sweat glands with neuronal differentiation potential. *3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation*, 11.07.-14.07.2010 Dresden

**Petschnik AE**, Fell B, Kruse C, Danner S. Human Gland-derived Stem Cells and their Potential for Neuronal Regeneration. *Cellular Therapy Summit 2010*, 24.08-25.08.2010 Edinburgh

Salem H, Nagel S, Evers L, **Petschnik AE**, Mailänder P, Kruse C, Danner S. Human Gland-derived Stem Cells and their Potential for Neuronal Regeneration. *Cellular Therapy Summit 2010*, 24.08-25.08.2010 Edinburgh

Nagel S, Salem H, **Petschnik AE**, Evers LH, Kruse C, Danner S. Multipotent human sweat gland-derived cells accelerate skin regeneration in a mouse model. *4th Congress on Regenerative Biology and Medicine – BioStar 2010*, 13- 15 October 2010 Stuttgart

### Vorträge

Quantitative Genexpressionsanalyse mikrodissasierter 3D-Zellaggregate. Life Science Spotlight, *Biotechnica 2008*. 07.10.2008 Hannover

## 8. Sonstiges

### 8.3 Master-Urkunde



Universität zu Lübeck

**Die Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
der Universität zu Lübeck  
The Faculty of Technology and Natural Sciences  
of the University of Lübeck**

verleiht / awards to

**Anna Emilia Petschnik**

geboren am 04.11.1981 in Berlinchen den akademischen Grad eines  
born on 4 November 1981 in Berlinchen the degree

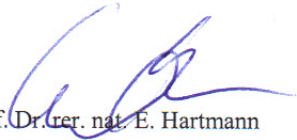
**Master of Science (M. Sc.)**

nachdem sie den Master-Studiengang „Molecular Life Science“ mit der Gesamtnote  
**gut (1,8)**  
abgeschlossen hat.

for she has successfully finished the Master's Program "Molecular Life Science"  
with the final grade  
**good (1.8).**

Lübeck, 17.10.2006

Der Vorsitzende des Prüfungsausschusses und Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
The Chairman of the Examination board and Dean of the Faculty of Technology and Natural Sciences

  
Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann

Dieses Zeugnis basiert auf der Prüfungsordnung für Studierende des Masterstudienganges „Molecular Life Science“ der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck vom 01.10.2005. Der Studiengang wurde entsprechend den staatlichen Richtlinien durch die ASIIN am 24.06.2003 akkreditiert.  
This certificate is awarded under the examination regulations dated 1 October 2005 for Students of the Master Program "Molecular Life Science" as issued by the Faculty of Technology and Natural Sciences of the University of Lübeck. This program was accredited by the ASIIN on 24 June 2003 in accordance with government directives.

## 8. Sonstiges

### ***Danksagungen***

Prof. Dr. Charli Kruse möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit auf diesem spannenden Gebiet durchführen zu können. Danke für die Unterstützung und die wertvollen Anregungen, für die Freiheit zu eigenen Entscheidungen und für immer neue Herausforderungen, die mich fachlich und persönlich geprägt haben.

Ich danke Dr. Sandra Danner für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit sowie allen Kollegen der EMB, insbesondere den Diffis, für die tolle Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Umgang miteinander.

Dr. Jennifer Klöpfer aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck möchte ich für die Durchführung der Kryoschnitte und der immunhistologischen Färbungen der Haut danken.

Ebenso danke ich Susanne Löffler aus der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck für die Durchführung der HPLC-Analyse.

Ein großer Dank gilt auch Frau Frackowski aus dem Institut für Physiologie an der Universität zu Lübeck für die Überlassung der Rattenhirne.

Prof. Dr. Amir Madany Mamlouk danke ich sehr für die detaillierte Durchsicht des ersten Entwurfs und die kritischen Anregungen. Ebenso danke ich Sabine Folchert und Christof Mattheießen für ihre Hilfsbereitschaft bei der Korrektur meiner Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt „Room No. 5 and Friends“ für die tolle Zeit, all die Hilfe und Motivation während der letzten drei Jahre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie; meinen Eltern, die immer für mich da sind, die während des Studiums und der Doktorarbeit stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben; und Christof, für seinen unermüdlichen Rückhalt und seine umfassende Liebe. Danke!