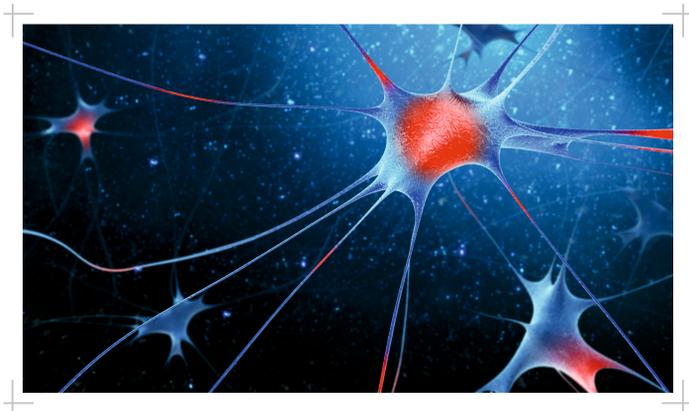


LAURA ELKE JUTTA HENNY

Neuronale *in vitro*-Differenzierung
humaner mesenchymaler Stammzellen
mit nachfolgender molekularbiologischer
Untersuchung bezüglich einer
neuronenspezifischen Kanalexpression



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Neuronale *in vitro*-Differenzierung humaner mesenchymaler
Stammzellen mit nachfolgender molekularbiologischer
Untersuchung bezüglich einer neuronenspezifischen
Kanalexpression**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Laura Elke Jutta Henny, geb. Strauß

aus Fritzlar

Gießen, 2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Ehemaliger Direktor: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler

Gutachter: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler

Gutachter: PD Dr. rer. nat. B. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 06.11.2017

In Gedenken an Gerhard Strauß

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Stammzellen	1
1.1.1	Gewinnung vitaler Zellen durch intramedulläre Marknagelung	1
1.1.1.1	Stammzellen aus „reaming debris“	1
1.1.2	Definition und Charakterisierung von Stammzellen	3
1.1.2.1	Adulte mesenchymale Stammzellen	6
1.2	Nervenzellen	9
1.2.1	Anatomischer Aufbau	9
1.2.2	Elektrophysiologische Eigenschaften	11
1.2.2.1	Spannungsabhängige Ionenkanäle	14
1.2.2.1.1	Spannungsabhängige Natriumkanäle (Na_v)	14
1.2.2.1.2	Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)	18
1.2.2.1.3	Spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_v)	21
1.2.3	Die neuronale Entwicklung im adulten ZNS	24
1.3.	Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	28
1.3.1	Differenzierung mittels chemischer Induktion	29
1.3.2	Differenzierung mittels Induktion durch Zytokine und Signalmoleküle	32
1.3.3	Differenzierung mithilfe von Ko-Kulturen	34
1.3.4	Differenzierung mittels „Genetic Engineering“	35
1.3.5	Kombinierte Differenzierungsansätze	36
1.4	Wachstums- und Differenzierungsfaktoren	38
1.4.1	Neurotrophine	38
1.4.2	Die GDNF-Familie	41
1.4.3	Das Neurokin CNTF	42
1.4.4	Wachstumsfaktoren	44
1.4.4.1	Die FGF-Familie	44

1.4.4.2	Die EGF-Familie	46
1.4.5	Antioxidative Substanzen	48
1.4.5.1	Edaravone	48
1.4.5.2	β -Mercaptoethanol	50
1.4.6	Pharmaka	51
1.4.6.1	Valproinsäure	51
1.4.6.2	Forskolin	52
1.4.6.3	JAK-Inhibitoren	54
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	58
2.	Material	60
2.1	Geräte, Glas-, Plastik- und Verbrauchsware, Chemikalien, Positivkontrollen	60
2.2	Primer	60
2.3	Zellen	61
2.3.1	Humane mesenchymale Stammzellen	61
3.	Methoden	62
3.1	Zellkultur	62
3.1.1	Isolierung und Kultivierung von MSC's	62
3.1.1.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	63
3.1.2	Zellaussaat	64
3.1.3	Neuronale Differenzierung	65
3.2	Molekularbiologische Untersuchungen	68
3.2.1	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	68
3.2.2	Messung der RNA-Konzentration im Spektrophotometer	70
3.2.3	Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription	70
3.2.4	Durchführung einer Qualitativen PCR (Konventionelle PCR)	72
3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung der DNA mittels Agarosegel	73

4.	Ergebnisse	74
4.1	Morphologische Beurteilung der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie	74
4.1.1	Undifferenzierte MSC's	74
4.1.2	Zelldifferenzierung nach Dezawa (modifiziert)	75
4.1.2.1	Schritt 1: DMEM hg, 10% FBS, 40 µg/ml JAK3-Inhibitor	75
4.1.2.2	Schritt 2: DMEM hg, 10% FBS, 50 ng/ml GDNF	76
4.1.2.3	Schritt 3: DMEM hg, 10% FBS, 5 µM Forskolin, 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml CNTF	76
4.1.2.4	Schritt 4: DMEM hg, 10% FBS, 50 ng/ml NGF, 50 ng/ml BDNF	77
4.1.3	Zelldifferenzierung nach Zeng (modifiziert)	78
4.1.3.1	Schritt 1: DMEM hg, 20% FBS, 10 ng/ml bFGF	78
4.1.3.2	Schritt 2: DMEM hg, 20 µg/ml Edaravone, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 4 µM Forskolin	79
4.1.3.3	Schritt 3: DMEM hg, 20 ng/ml BDNF, 20 ng/ml NGF, 4 µM Forskolin	80
4.1.4	Zelldifferenzierung nach Tatard	81
4.1.4.1	Schritt 1: DMEM hg, 20% FBS, 10 ng/ml bFGF	81
4.1.4.2	Schritt 2: DMEM hg, 1 mM β-ME, 30 ng/ml NT-3	82
4.1.4.3	Schritt 3: DMEM hg, 100-200 µM BHA, 25 mM KCl, 2 mM VPA, 1 µM Hydrocortison, 30 ng/ml NT-3, 50 ng/ml BDNF, 10 ng/ml NGF, 4 µM Forskolin, 5 µM Insulin	82
4.1.5	Überblickende Darstellung der morphologischen Ergebnisse	84
4.2	PCR und gelelektrophoretische Analyse	86
4.2.1	β2-Mikroglobulin	87
4.2.2	Nav1.1	88
4.2.3	Nav1.2	89
4.2.4	Nav1.6	90
4.2.5	Nav1.7	91
4.2.6	Nav1.8	92
4.2.7	Nav1.9	93
4.2.8	Kv1.2	94

4.2.9	K _v 1.3	95
4.2.10	Ca _v 1.2	96
4.2.11	Überblickende Darstellung der molekularbiologischen Ergebnisse	97
5.	Diskussion	99
5.1	Klinische Anwendungen neuronal differenzierter MSC's	99
5.2	Anforderungen an undifferenzierte MSC's	103
5.3	Reproduzierbarkeit der Originalprotokolle	106
5.3.1	Diskussion der morphologischen Ergebnisse	106
5.3.1.1	Differenzierte Zellen nach Dezawa (modifiziert)	106
5.3.1.2	Differenzierte Zellen nach Zeng (modifiziert)	109
5.3.1.3	Differenzierte Zellen nach Tatard	112
5.3.2	Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse der PCR	115
5.3.2.1	Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels modifiziertem Dezawa-Protokoll	115
5.3.2.2	Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels modifiziertem Zeng-Protokoll	117
5.3.2.3	Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels Tatard-Protokoll	119
5.4	Neuronale (Trans-)Differenzierung versus Artefakt	120
5.4.1	Der Verlust von Ionenkanälen in differenzierten Zellen	121
5.4.2	Neuronale Differenzierung als Artefakt	125
6.	Zusammenfassung	132
7.	Summary	134
8.	Abkürzungsverzeichnis	135
9.	Abbildungsverzeichnis	143
10.	Tabellenverzeichnis	146

11.	Literaturverzeichnis	148
12.	Anhang	196
12.1	Materialienliste	196
12.1.1	Geräte	196
12.1.2	Glas-, Plastik- und Verbrauchsware	197
12.1.3	Chemikalien	199
12.1.3.1	Medien	199
12.1.3.2	Selbsthergestellte Pufferlösungen und Medien	199
12.1.3.3	Zytokine, Medienzusätze, Differenzierungsfaktoren und Pharmaka	199
12.1.3.4	Enzyme, Kits und Reagenzien	200
12.1.3.5	Weitere Reagenzien und Chemikalien	201
12.1.4	Positivkontrollen	201
12.1.5	Verwendete Software und Suchmaschinen	202
13.	Ehrenwörtliche Erklärung	203
14.	Danksagung	204

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

1.1.1 Gewinnung vitaler Zellen durch intramedulläre Marknagelung

Im Rahmen der traumatologischen Versorgung von diaphysären Frakturen langer Röhrenknochen, besteht der heutige Behandlungsstandard in der Versorgung mit intramedullär in den Knochen eingebrachten Kraftträgern. Hierbei kann diesen Marknägeln zusätzliche Stabilität durch „reaming“, also durch das vorherige Aufbohren der Markhöhle, verliehen werden. Im optimalen Fall kann durch dieses Osteosyntheseverfahren sogar eine Belastungsstabilität der Fraktur erreicht werden.

Der Vorteil von Marknagelungen mit vorgebohrter Markhöhle ist gegenüber dem Verfahren direkt eingeschlagener Nägel (sog. unaufgebohrte Nagelung), bezogen auf den klinischen Langzeiterfolg, nicht von der Hand zu weisen, wie auch in zahlreichen Studien belegt werden konnte (Bråten et al. 1995; Brumback et al. 1989; Christie et al. 1988; Winqvist et al. 1984).

Allerdings kann die nicht ordnungsgemäße Durchführung eines solchen Eingriffes auch zahlreiche Komplikationen in sich bergen. Die wichtigsten Risiken, neben Infektionen (Bråten et al. 1995) v.a bei offenen Frakturen, bestehen dabei in der Verletzung nutritiver Gefäße (Trueta und Cavadias 1955), der Gefahr von hitzebedingten osteokutanen Nekrosen (Leunig und Hertel 1996) sowie in der Verursachung von Fettembolisationen (Pell et al. 1993).

Zudem zählt das Bohrmehl (engl. „reaming debris“), welches im Zuge der Eröffnung der Markhöhle gewonnen werden kann, zu den aussichtsreichsten Materialien des „tissue engineering“, da es lebende und zur Vermehrung befähigte Zellen beinhaltet, wie in unserem Labor gezeigt werden konnte (Wenisch et al. 2006; Wenisch et al. 2005).

1.1.1.1 Stammzellen aus „reaming debris“

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass thermische und druckbedingte Ereignisse während des „reamings“ nicht nur die umgebenden Strukturen innerhalb der Markhöhle, sondern auch die Zellen im hierbei gewonnen Bohrmehl schädigen

könnten. So wurde sogar ein negativer Effekt auf die Frakturheilung, bei Einsatz der „reaming“-Methode, postuliert (Bråten et al. 1990; Henry et al. 1987; Leunig und Hertel 1996).

Dagegen konnte in weiteren Studien widerlegend gezeigt werden, dass Bohrmehl keineswegs nur ein qualitativ minderwertiges Produkt darstellt, sondern neben Knochenfragmenten, -mark und Blut auch vitale Osteoblasten mit der Fähigkeit zur Kalzifikation besitzen muss (Hoegel et al. 2004). So konnte der Beweis angeführt werden, dass bei Frakturen, die mit bohrmehlbeschichteten Nägeln (engl. reamed nails) versorgt wurden, die Kallusbildung in der Folge signifikant höher war, als bei Frakturen, welche mit konventionellen Nägeln versorgt wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Bohrmehl, wenn es direkt in den Frakturspalt eingebracht wird, die Kallusbildung in ähnlicher Weise stimulieren kann wie Knochentransplantate (engl. bone grafts). (Frölke et al. 2001; Frölke et al. 2000)

Insgesamt wurde zudem eine Verkürzung des Heilungsprozesses erreicht (Clatworthy et al. 1998). Somit konnte hinreichend belegt werden, dass Bohrmehlzellen in ausreichender Zahl vital aus dem Operationsprozess hervorgehen, was auch in der Zellkultur bestätigt werden konnte (Trinkaus et al. 2005).

Weiterhin wurde geschlussfolgert, dass es sich bei den Zellen, welche aus humanem Bohrmehl angezüchtet werden konnten, aufgrund ihrer Morphologie und ihres Differenzierungsverhaltens in der Zellkultur, um mesenchymale Stammzellen (MSC's) handeln musste (Hung et al. 2002a; Wenisch et al. 2005). Im Großen und Ganzen konnten hierbei drei unterschiedliche Zellmorphologien beobachtet werden. So traten neben kleinen, spindelförmigen Zellen auch große, mehrkernige Zellen in Erscheinung, welche als reife MSC's identifiziert werden konnten (Hung et al. 2002a; Trinkaus et al. 2005). Die dritte Zellgruppe bestand aus kleinen, runden Zellen, die als „rapidly self-renewing cells“ (RS-Zellen) beschrieben und als Vorläufer reifer MSC's und somit als eigene Zellpopulation charakterisiert werden konnten (Colter et al. 2001). Colter et al. (2000, 2001) unterschieden dabei sogenannte RS-1- und RS-2-Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Phasen im Zellzyklus. Wobei die RS-2-Zellen einer in der Mitose befindliche Übergangsform der RS-1-Zellen entsprechen könnten (Colter et al. 2000; Colter et al. 2001).

Die morphologischen Ergebnisse konnten zusätzlich durch Oberflächenmarkierung, mit den MSC-typischen Markern cluster of differentiation (CD) 29, CD44, CD90, CD105 und CD106, in der Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse bestätigt werden (Pittenger 1999; Romanov et al. 2005; Trinkaus et al. 2005).

1.1.2 Definition und Charakterisierung von Stammzellen

Der Definition nach werden diejenigen Zellen eines Organismus, welche in der Lage sind im Rahmen der Zellteilung zwei im Typus unterschiedliche Arten von Abkömmlingen zu bilden, als Stammzellen beschrieben.

Adulte Stammzellen wiederum entsprechen *per definitionem* undifferenzierten Zellen innerhalb eines nicht näher bestimmten, differenzierten Gewebes (Pittenger 1999; Watt und Hogan 2000). Durch ihre Teilung können zwei Tochterzellen entstehen. Dabei unterscheidet man die symmetrische Teilung, im Rahmen der Selbsterneuerung, von der asymmetrischen Teilung, aus welcher jeweils eine Stamm- und eine Progenitorzelle hervorgeht. Im Rahmen der symmetrischen Teilung entstehen zwei Tochterzellen als identische Kopien der Mutterzelle. Bei der asymmetrischen Teilung hingegen besitzt der zweite Abkömmling die Eigenschaften der Mutterzelle nicht mehr. Er repräsentiert einen reiferen Zelltypus, dem Fähigkeiten zukommen, mit denen er im Organismus spezifisch eingesetzt werden kann. Die Mutterzelle hat sich in diesem Fall zu einer Progenitorzelle differenziert. Allerdings verliert dieser Abkömmling mit der Differenzierung auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (engl. self-renewal), das heißt aus ihm können in der Folge keine weiteren Tochterzellen durch Teilung entstehen. (Koestenbauer et al. 2006; Morrison und Kimble 2006)

Die Klassifikation von Stammzellen richtet sich sowohl nach ihrem Entwicklungsstadium bzw. -ursprung, als auch nach ihrem Entwicklungspotenzial (Raff 2003; Zech 2005).

Ausgehend von ihrem Entwicklungsstadium wird zwischen embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen unterschieden. Adulte Stammzellen sind in der Lage, entgegen der ursprünglichen Meinung, sämtliche in einem Organismus vorkommende Zell- oder Gewebetypen zu erneuern. Sie weisen somit eine erhöhte Plastizität auf. (Koestenbauer et al. 2006)

Plastizität meint also die generelle Fähigkeit gewebespezifischer adulter Stammzellen zur Differenzierung in eine Zellart, die nicht Teil ihres Ursprungsgewebes ist (Verfaillie et al. 2002). Nach Lakshmiathy und Verfaillie (2005) lässt sich die Plastizität von Stammzellen über drei Merkmale definieren. Neben dem Punkt, dass sich aus einer einzelnen Zelle Zellen mehrerer Zelllinien differenzieren lassen sollten, schließen diese Kriterien auch die uneingeschränkte Funktionalität dieser Zellen *in vitro* sowie *in vivo*

ein. Der dritte Punkt umfasst schließlich ein stabiles und dauerhaftes Anwachsen solch transplanteder Zellen. (Lakshmiathy und Verfaillie 2005)

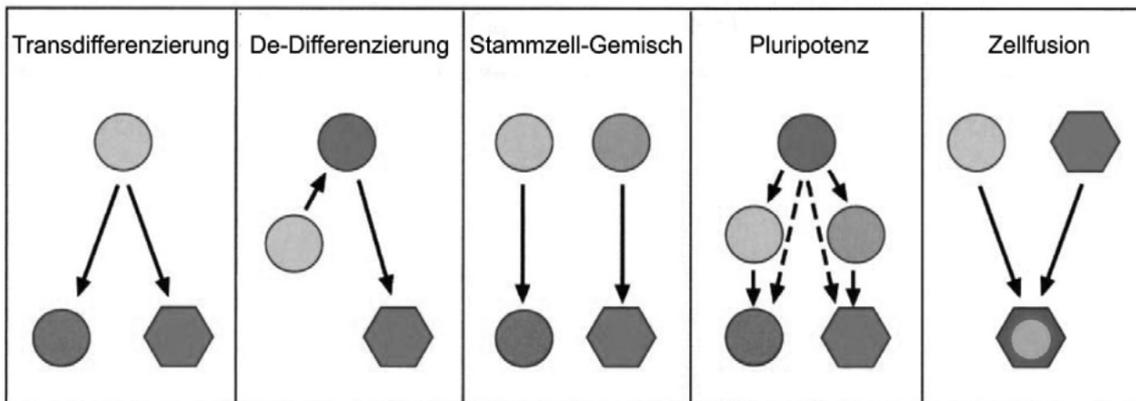


Abbildung 1:

Übersicht möglicher Plastizitätsmechanismen (Abb. aus Neuß-Stein, 2004).

Die genauen Mechanismen der Plastizität sind bis heute weitgehend ungeklärt, dennoch lassen sich in diesem Rahmen verschiedene Ansätze bzw. eine Mischung aus diesen vermuten (Verfaillie et al. 2002), wie sie auch in Abbildung 1 dargestellt sind.

Der erste Ansatz geht davon aus, dass bereits multiple gewebespezifische Stammzellen in den jeweiligen Organen existieren (Verfaillie et al. 2002). Zudem ist bekannt, dass beispielsweise hämatopoetische Stammzellen (HSC's) das Knochenmark verlassen können und im peripheren Blut zirkulieren, um sich schließlich in der Skelettmuskulatur anzusiedeln (McKinney-Freeman et al. 2002).

Eine weitere Hypothese postuliert, dass sich Plastizität lediglich aus der Fusion einer Spender-Zelle mit einer, in dem entsprechenden Organ ansässigen, Zelle ergibt (Verfaillie et al. 2002). Ying et al. (2002) legten zu diesem Zwecke eine Ko-Kultur aus embryonalen Stammzellen (ESC's) und Hirnzellen der Maus an, wobei Letztere im Rahmen des Experimentes durch Zellfusion die Charakteristiken Ersterer adaptierten. Damit konnte auch eine mögliche Transdifferenzierung dieser Zellen *in vitro*, also die Umprogrammierung der Zellen in die Richtung von Zellen eines anderen Keimblattes, widerlegt werden (Ying et al. 2002). In diesem Fall wäre das Phänomen der Transdifferenzierung lediglich ein Artefakt der Zellkultur, welches durch Zellfusion zustande käme.

Des Weiteren kommen die De- und Redifferenzierung von Stammzellen als ein möglicher Erklärungsansatz für deren Plastizität in Frage (Verfaillie et al. 2002). Diese

Phänomene sind bereits von Amphibien, wie z.B. den Schwanzlurchen (lat. Urodela), ausgiebig bekannt (Brockes 1997; Brockes und Kumar 2002).

Zudem konnte gezeigt werden, dass Vorläuferzellen von Oligodendrozyten unter bestimmten Kulturbedingungen wieder Kriterien neuraler Stammzellen (NSC's), wie etwa eine uneingeschränkte Proliferationskapazität, aufwiesen (Tang et al. 2001).

Ausgehend von diesen Ergebnissen kann also angenommen werden, dass eine Reprogrammierung adulter Stamm- und Vorläuferzellen eines Gewebes hin zu einem spezifischen Zelltyp eines anderen Gewebes stattfindet, wenn diese von ihrer ursprünglichen Umgebung in eine andere Nische verbracht werden (Tsai et al. 2002).

Eine weitere Erklärung für Plastizität könnte darin bestehen, dass multi- oder pluripotente Stammzellen auch postnatal weiterbestehen (Verfaillie et al. 2002). So haben multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC's), welche aus Zellen des Knochenmarks (BMC's) isoliert wurden, *in vitro* die Fähigkeit Abkömmlinge aller drei Keimblätter, wie z.B. Hepatozyten, Endothelzellen und Neurone, zu formen (Jiang et al. 2002b). Diese Eigenschaft konnte auch *in vivo*, durch Injektion der MAPC's in Nagetier-Blastozysten, bestätigt werden (Jiang et al. 2002a), sodass eine Einordnung der MAPC's als Subpopulation von MSC's vorgenommen werden konnte (Jiang et al. 2002b; Reyes und Verfaillie 2001).

Bezugnehmend auf ihr Entwicklungspotenzial kann man zwischen toti-, pluri- und multipotenten Stammzellen differenzieren.

Totipotente (lat. totus = ganz, ungeteilt, völlig) Stammzellen lassen sich, nach heutigem Erkenntnisstand, ausschließlich während der Embryonalentwicklung bis einschließlich des 8-Zellenstadiums nachweisen. Sie sind für die Erzeugung aller embryonalen und extraembryonalen Zellarten verantwortlich. Im Laufe der weiteren Entwicklung verlieren die Zellen ihre Totipotenz und werden zu pluripotenten Stammzellen. (Koestenbauer et al. 2006)

Pluripotente (lat.: pluris = höher, mehr) Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich in Zellen des Meso-, Ekto- und Endoderms sowie der Keimbahn zu differenzieren, da sie in ihrem Zustand noch auf keinen spezifischen Gewebetypus festgelegt sind. Allerdings verlieren sie die Eigenschaft theoretisch alle Zellarten eines Organismus bilden zu können, da aus ihnen kein extraembryonales Gewebe mehr hervorgehen kann. (Lakshmipathy und Verfaillie 2005)

Stammzellen mit Pluripotenz können von ihrem Entwicklungsstadium her sowohl embryonal, als auch fetal oder adult sein.

Eine weitere Abstufung tiefer steht der Begriff der Multipotenz (lat. multi = viele). Hierunter werden Zellen gefasst, die sich noch in viele Zell- und Gewebelinien eines adulten Organismus differenzieren können (Lakshmiathy und Verfaillie 2005). So besitzen beispielsweise adulte Stammzellen eine Multipotenz (Prockop et al. 2003; Verfaillie et al. 2003). Adulten Stammzellen kommt vorzüglich die Aufgabe der Erneuerung abgestorbener Zellen im Rahmen des self-renewal zu, welches v.a. in Geweben bzw. Organen mit erhöhten Zellumsätzen notwendig wird. So finden sich adulte Stammzellen in einer Reihe von Geweben und Organen, wie dem Knochenmark (Herzog 2003), der Haut (Gambardella und Barrandon 2003), der Muskulatur (Mauro 1961) oder dem zentralen Nervensystem (ZNS) (Johansson et al. 1999a).

1.1.2.1 Adulte mesenchymale Stammzellen

Einen wichtigen Pool für adulte Stammzellen stellt das Knochenmark dar. Neben den HSC's, die im Rahmen der Blutzellendifferenzierung eine grundlegende Rolle spielen, lassen sich hier im Weiteren auch MSC's sowie MAPC's ausmachen (Herzog 2003).

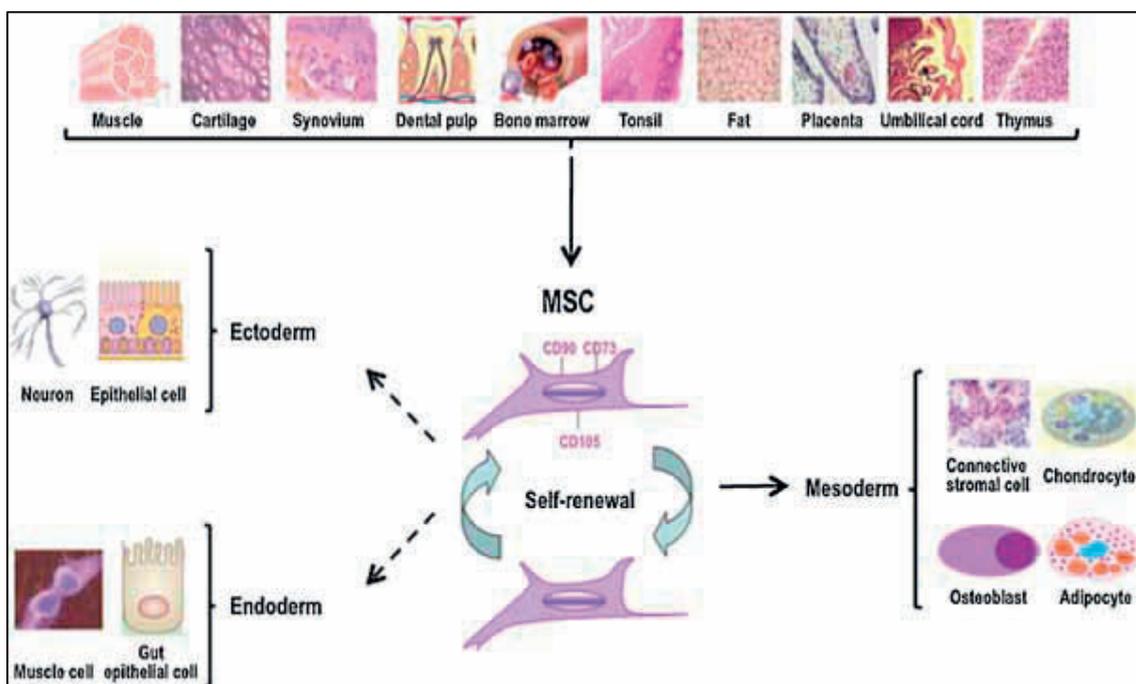


Abbildung 2:

Isolierung und Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen (MSC's).

Nachdem MSC-ähnliche Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus den verschiedensten Geweben gewonnen werden konnten, zeigte sich in der weiteren Forschung ihr multipotenter Charakter durch Differenzierungsversuche in die ekto-, endo- und mesodermale Zelllinie (Abb. aus Kuhn & Tuan, 2010).

Vorläuferzellen von MSC's im Knochenmark, welche morphologisch den Fibroblasten ähnelten, ließen sich erstmals im Jahre 1966 finden. Charakterisierung erfuhren diese Zellen dadurch, dass ihre Zellpopulation nicht den bis dahin bereits bekannten HSC's zugeordnet werden konnte. (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1966).

MSC's lassen sich darüber hinaus in zahlreichen weiteren Geweben und Organen ausmachen. Darunter fallen u.a. das Fettgewebe (Zuk et al. 2001), aber auch Nabelschnurblut (Erices et al. 2000), Synovialmembran (De Bari et al. 2001), Skelettmuskulatur (Asakura et al. 2001), das Kreislaufsystem (Kuznetsov et al. 2001), Zahnpulpa (Gronthos et al. 2000) und Fruchtwasser (in 't Anker et al. 2003).

MSC's wird ein multipotenter Charakter zugeschrieben. Das bedeutet, sie können sich, unter speziellen Kulturbedingungen, potenziell zu Abkömmlingen aller drei Keimblätter, also meso-, endo- und ektodermaler Abstammung, differenzieren bzw. transdifferenzieren (siehe Abbildung 2). Beispiele hierfür sind (Trans-)differenzierungen von MSC's in Osteozyten (Caplan 1991; Pittenger 1999), Chondrozyten (Mackay et al. 1998; Pittenger 1999), Tenozyten (Young et al. 1998), Adipozyten (Pittenger 1999), Sklettmuskelzellen (Wakitani et al. 1995) und Kardiomyozyten (Makino et al. 1999), Neurone (Woodbury et al. 2000; Tatard et al. 2007; Zeng et al. 2011) sowie in mesangiales Gewebe (Ito et al. 2001), Endothel (Oswald et al. 2004) oder zahlreiche Epithelien, wie die von Darm, Leber oder Lunge (Jiang et al. 2002a).

Kriterien, welche diese Multipotenz der MSC's definieren, wurden vom Komitee für mesenchymale und Gewebestammzellen der „International Society for Cellular Therapy“ festgelegt (Dominici et al. 2006) und umfassen drei Hauptmerkmale:

- ▶ Erstens sollten die Zellen, unter Standard-Kulturbedingungen, eine Plastikadhärenz gegenüber ihrer Zellkulturflasche aufweisen.
- ▶ Das zweite Kriterium definiert sich über das CD-Expressionsmuster ihrer Zelloberfläche. So sollte der Prozentsatz CD73, CD90 und CD105 positiver MSC's innerhalb einer Population über 95% liegen. Zusätzlich kann durch die FACS-Analyse die Negativität von MSC's für die Oberflächenantigene CD11b oder CD14, CD34, CD45, CD79 α oder CD19 und das humane Leukozytenantigen (HLA)-Klasse-II bestätigt werden. Andersherum bedeutet dies, dass lediglich $\leq 2\%$ der MSC's einer *in vitro*-Population positiv für diese Marker sein sollten. Dieser Fakt stellt zudem ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den HSC's dar, welche wiederum ein positives Antigenexpressionsmuster für CD14, CD34 und CD45 aufweisen.

► Drittens sollten die Zellen, wie bereits beschrieben, einen multipotenten Charakter *in vitro* zeigen, also die Fähigkeit besitzen unter speziell vorgeschriebenen Differenzierungsmedien und Kulturbedingungen mindestens drei verschiedene mesenchymale Zelllinien (z.B. Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten) bilden zu können.

In vitro verdoppelt sich eine Population von MSC's innerhalb von ca. 33 Stunden bei gleichzeitig hohem Expansionspotenzial, wobei Charakteristiken im Zellzyklus darauf hinweisen, dass sich ca. 20% der Zellen innerhalb dieser Population in einer Art Ruhephase befinden (Conget und Minguell 1999).

Die Zahl der im Knochenmark vorhandenen MSC's ist auch stark vom Alter des Spenders und dessen individuellen Vorerkrankungen abhängig. So lässt sich beispielsweise mit fortschreitendem Alter oder systemisch relevanter Erkrankung, eine Abnahme des Pools der MSC's beobachten (Majors et al. 1997; Stolzing et al. 2008). Demnach existiert in MSC's älterer Spender ein veränderter Zellzyklus inklusive einer Hochregulation relevanter Gene. So lässt sich z.B. ein Anstieg der Proteine p21 und p53 (Stolzing et al. 2008) feststellen, welche im Rahmen der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Reparatur eine wichtige Rolle spielen. Akkumuliert p53 jedoch zu stark, kommt es über die B-cell-lymphoma 2 (Bcl2)-Genfamilie zur Aktivierung von Caspasen und darüber zur Einleitung der Apoptose. Darüber hinaus nimmt auch der oxidative Stress durch reactive oxygen species (ROS) im Alter zu, was die Fitness der MSC's zusätzlich einschränkt (Stolzing et al. 2008).

Veränderungen im Zellzyklus lassen sich ebenso in MSC's höherer Passagen beobachten. So scheint auch die Anzahl der Passagen das Entwicklungs- und Differenzierungspotenzial der Zellen zu beeinflussen. In der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass MSC's höherer Passagen die typischen Stammzellmarker CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 schwächer auf ihrer Oberfläche exprimierten als MSC's jüngerer Passagen. (Wagner et al. 2008)

Auch morphologisch zeigte sich in diesem Zusammenhang eine Verschiebung von spindelförmigen fibroblastenartigen MSC's hin zu breiten vakuolenreichen Zellen in höheren Passagen (DiGirolamo et al. 1999; Wagner et al. 2008).

Diese Phänomene lassen sich durch den Begriff der zellulären Seneszenz oder *in vitro*- Alterung beschreiben. Ursächlich hierfür ist vermutlich der Verlust von Telomeren während der Chromosomenreplikation (Di Donna et al. 2003). Des

Weiteren wird davon ausgegangen, dass die *in vitro*-Alterung maßgeblich durch epigenetische Veränderungen der DNA, wie Modifizierungen im Methylierungsmuster (Bork et al. 2010; Schellenberg et al. 2011) sowie die Acetylierung des Histons H3 (Li et al. 2011), kontrolliert wird. Zelluläre Seneszenz führt außerdem zu einer endlichen Teilungsfähigkeit der Zellen in der Langzeitkultur (Wagner et al. 2008).

Dennoch gelten MSC's, aufgrund ihrer vielfältigen Charakteristika sowie insbesondere ihres hohen Proliferationspotenzials, als geeignetes Ausgangsmaterial im Rahmen des modernen „tissue engineering“ und der Zelltherapie.

1.2 Nervenzellen

1.2.1 Anatomischer Aufbau

Die Grundlage für den Aufbau eines klassischen Neurons bildet sein Zelleib (griech. Soma, Perikaryon) inklusive des ihm innewohnenden Zellkerns. Vom Soma aus zweigen sich die Zellfortsätze in variabler Anzahl ab. Dabei unterscheidet man das Axon bzw. den Neurit von den Dendriten. Während das Neuron in der Regel nur ein Axon besitzt, kann es gleichzeitig aber multiple Dendriten ausbilden, welche sich in ihrem Verlauf baumartig verzweigen. Diese Aufzweigungen dienen in erster Linie der Oberflächenvergrößerung, denn über die Dendriten werden Signale aus anderen Nerven- oder Sinneszellen empfangen und über das Soma an das Axon weitergeleitet (Abbildung 3&3a). (Trepel 2008)

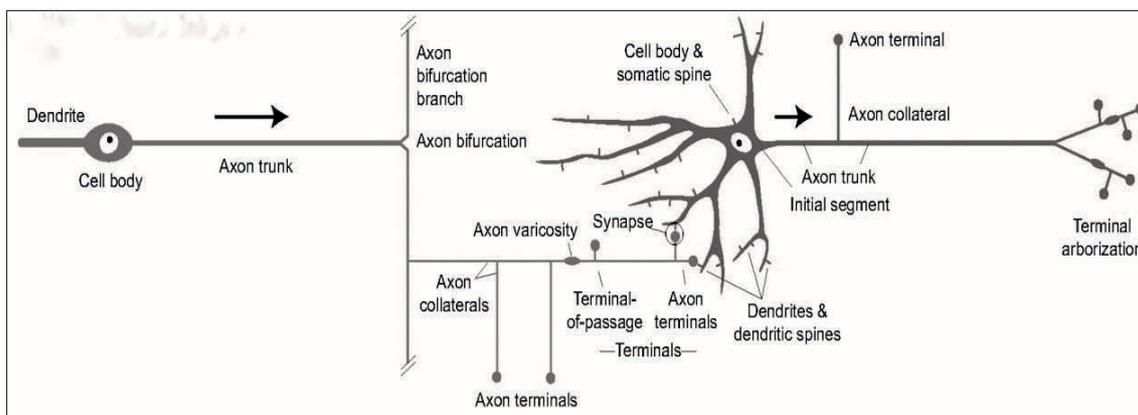


Abbildung 3:

Schematischer Aufbau klassischer Nervenzellen (Abb. aus Swanson & Bota 2010).

Elektrische Signale werden durch die rezeptiven Dendriten empfangen und über den Zellkörper an das effektorische Axon zu den synaptischen Endigungen weitergeleitet. Links: Bipolares sensorisches Neuron. Rechts: Multipolares Motoneuron.

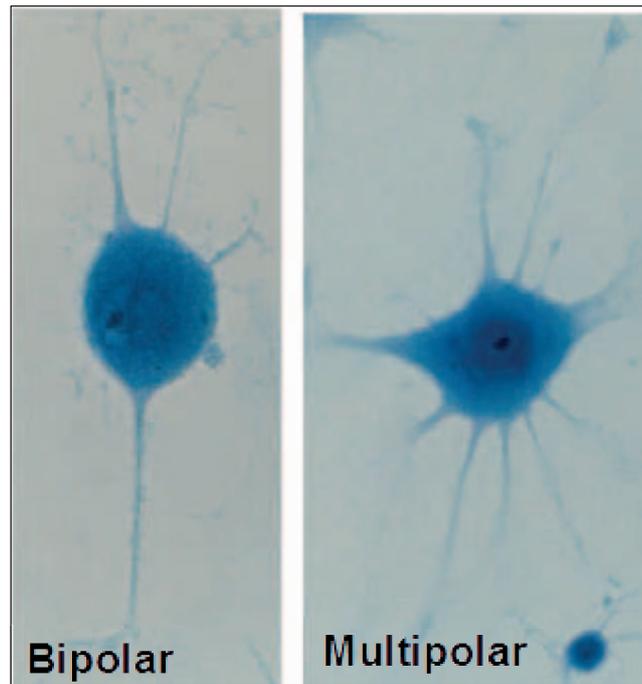


Abbildung 3a:

Mikroskopische Abbildung neuronentypiger Zellen in Toluidinblaufärbung im Verlauf ihrer Differenzierung aus multipotenten Stammzellen (aus Wenisch et al. 2005).

Solche Signale entsprechen elektrischen Potenzialänderungen über der neuronalen Plasmamembran, welche durch den Austausch von Ionen über die Membran mithilfe von spannungsabhängigen Ionenkanälen erfolgen (Hodgkin und Huxley 1952). Insgesamt bezeichnet man die Dendriten daher als rezeptiv, wohingegen das Axon einen effektorischen Fortsatz darstellt (Welsch und Sobotta 2006).

Neben der Erregungsweiterleitung besitzen die Zellfortsätze auch eine gewisse Transportfunktion für Stoffe, wie beispielsweise für Neurotransmitter und Elemente des Zytoskeletts, welche zuvor im Soma synthetisiert wurden. Der Transport kann sowohl anterograd, gesteuert durch das Protein Kinesin, als auch retrograd, durch das Dynein, erfolgen. Darüber hinaus unterscheidet man zwischen einer schnellen und einer langsamen Transportkomponente. (Welsch und Sobotta 2006)

Das Axon entspringt am Axonhügel des Perikaryons. In diesem Bereich findet sich zudem das sogenannte Axoninitialsegment (AIS), in welchem Aktionspotenziale generiert werden. Die nachfolgenden Abschnitte des Axons, welche hinter dem Initialsegment liegen, sind myelinisiert, also von einer Markscheide aus Gliazellen umgeben. Diese Markscheide wird im ZNS von Oligodendrogliazellen und im peripheren Nervensystem (PNS) von Schwann-Zellen ausgebildet. Durch ihren

Lipidreichtum stellt die Myelinscheide eine Art elektrische Isolationsschicht für das Axon dar, welches sich dementsprechend durch einen hohen elektrischen Widerstand bei einer jedoch geringen Kapazität auszeichnet. (Welsch und Sobotta 2006)

Unterbrechungen in der Markscheide peripherer Nervenfasern werden als Ranvier-Schnürringe bezeichnet, in welchen die Dichte spannungsabhängiger Natriumkanälen besonders hoch ist (Mainen et al. 1995).

Im Rahmen der Erregungsleitung kommt es aufgrund der oben beschriebenen isolatorischen Eigenschaft des Myelins nur im Bereich der Schnürringe zu einem Stromfluss und damit zur Ausbildung von Aktionspotenzialen. Die Ausbreitung der Erregung erfolgt dabei saltatorisch, also von einem Schnürring zum Nächsten. (Welsch und Sobotta 2006)

Im PNS kommen darüber hinaus auch nicht-myelinisierte Nervenfasern vor. Mehrere Axone werden hier von einer einzigen Schwann-Zelle umschlossen, mit welcher sie über das sogenannte Mesaxon kommunizieren. Auch hier sind mehrere Gliazellen hintereinander geschaltet, es kommt aber nicht zur Ausbildung einer Markscheide. (Welsch 2006 und Sobotta)

Am Telodendron, der terminalen Aufzweigung eines Axons, findet man die synaptischen Endknöpfchen, welche mit der Zellmembran der nachgeschalteten Zelle chemische Synapsen ausbilden. Diese dienen der Übertragung von Erregungen auf die postsynaptische Membran, durch die Ausschüttung inhibitorischer bzw. exzitatorischer Neurotransmitter. (Trepel 2008)

1.2.2 Elektrophysiologische Eigenschaften

Per definitionem werden Aktionspotenziale („Spikes“) als schnelle (1-2 ms), stereotyp ablaufende Änderungen des Membranpotenzials bezeichnet und gliedern sich in eine De- und eine Repolarisationsphase mit anschließender Refraktärzeit der Zelle (Klinke et al. 2010).

Ausgehend von einem Ruhemembranpotenzial von ca. -70 mV, welches in etwa dem Gleichgewichtspotenzial von Kalium (K) entspricht, kommt es durch erregende synaptische Potenziale zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Klinke et al. 2010) im Bereich des AIS (Araki und Otani 1955; Fuortes et al. 1957) bzw. des ersten Ranvier Schnürrings (Colbert und Johnston 1996; Coombs

et al. 1957; Gogan et al. 1983), was die Depolarisation der Zelle im Weiteren verstärkt und zur Öffnung zusätzlicher Natriumkanäle führt (Klinke et al. 2010).

Mit dem Erreichen eines Schwellenpotenzials (ca. -50 mV) steigt die Leitfähigkeit für Natrium (Na) in der Zelle schlagartig an, was letztendlich zur Aktivierung aller vorhandenen Natriumkanäle führt (Klinke et al. 2010).

Das Spitzenpotenzial im Rahmen der Depolarisation liegt bei ca. $+30$ mV. An diesem Punkt kommt es aufgrund der Inaktivierung der Natriumkanäle und dem Anstieg der Kaliumleitfähigkeit zu einem Auswärtsstrom von Kaliumionen durch verzögernd gleichrichtende (engl. delayed rectifier) Kaliumkanäle, sodass es letztendlich auch zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotenzials kommt (Repolarisation). Durch zusätzlich aktivierte Kaliumkanäle im Rahmen einer erhöhten Kaliumleitfähigkeit über das Ende des Aktionspotenzials hinaus erfolgt eine Hyperpolarisation in noch negativere Bereiche bevor sich das Ruhemembranpotenzial letztlich wiedereinstellt. (Klinke et al. 2010)

Den Verlauf eines Aktionspotenzials zeigt die Abbildung 4:

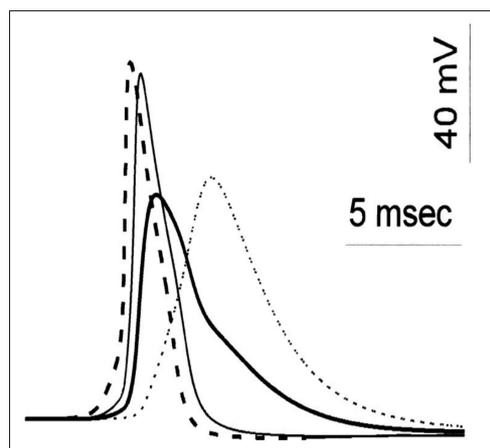


Abbildung 4:

Verlauf von Aktionspotenzialen in den verschiedenen Abschnitten eines Motoneurons (Abb. aus Lüscher & Larkum 1998).

Dicke gestrichelte Linie: Aktionspotenzial am AIS. Dünne durchgängige Linie: Aktionspotenzial im Soma. Dicke durchgängige Linie: Aktionspotenzial im somanahen Dendrit. Dünne gestrichelte Linie: Aktionspotenzial im somafernen Dendrit

An das Aktionspotenzial schließt sich eine wenige ms dauernde Refraktärzeit an, welche der Regeneration der Aktivierbarkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle dient. Man unterscheidet dabei die absolute von der relativen Refraktärzeit. Im Rahmen der absoluten Refraktärzeit ist die Zelle nicht, das heißt auch nicht durch

stärkste Depolarisationsreize, erregbar. Dagegen sind in der relativen Refraktärzeit bereits einige Natriumkanäle wieder aktivierbar. Allerdings erreichen Aktionspotenziale, welche in diese Phase fallen, nicht ihre volle Amplitude. Die Refraktärzeit dient also zum Einen der Limitierung der Frequenz, mit der Aktionspotenziale generiert werden, zum Anderen bestimmt sie auch die Ausbreitungsrichtung des Potentials und zwar in Richtung nicht refraktärer Bereiche. (Klinke et al. 2010)

Darüber hinaus konnte im Rahmen mehrerer Forschungsexperimente eine Art Rückleitung (engl. backpropagation) des Aktionspotenzials in Somata sowie die Dendriten von Neuronen nachgewiesen werden (Rall und Shepherd 1968; Terzuolo und Araki 1961). Das bedeutet, dass Erregungen auch retrograd verlaufen, wobei das Ausmaß der rückläufigen Erregung sowohl von der Art des Neurons, als auch von der Dichte an spannungsabhängigen Natriumkanälen in den Dendriten sowie deren Verzweigungsmuster abhängt (Spruston et al. 1995). So konnten Stuart und Sakmann (1994) zeigen, dass die Amplitude der Erregungsrückleitung eines Aktionspotenzials durch Blockade dendritischer spannungsabhängiger Natriumkanäle mit Tetrodotoxin (TTX) vermindert werden konnte. Dieses Phänomen der Erregungsrückleitung in dendritische Fortsätze konnte beispielsweise deutlich in neokortikalen Pyramidenzellen (Stuart und Sakmann 1994), hippocampalen Körnerzellen (Jefferys 1979) sowie Neuronen der Substantia nigra (Häusser et al. 1995) und des Rückenmarks (Larkum et al. 1996) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Rückleitung des Aktionspotenzials eine Art Rückmeldung an die Dendriten über den neuronalen Output darstellt und damit auch einen Beitrag zur synaptischen Plastizität leistet (Christie et al. 1996; Magee und Johnston 1997; Markram et al. 1997). Weiterhin kommt es durch die Erregungsrückleitung zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Ca) in den Dendriten und in der Folge zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Callaway und Ross 1995; Markram et al. 1995; Schiller et al. 1995), welche sowohl eine Funktion in der Ausschüttung von Transmittern (Häusser et al. 1995) als auch im Rahmen der synaptischen Integrität von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Tong et al. 1995) innehaben.

1.2.2.1 Spannungsabhängige Ionenkanäle

1.2.2.1.1 Spannungsabhängige Natriumkanäle (Na_v)

Die Genfamilie der spannungsabhängigen Natriumkanäle (engl. voltage-gated sodium channel, VGSC) umfasst insgesamt die neun Mitglieder SCN1A-SCN11A, welche für die Natriumkanäle Na_v1.1-1.9 sowie Na_x (SCN6A/7A) codieren und auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (Goldin et al. 2000). So findet man die Gene, welche für die TTX-sensitiven Na_v1.1-1.3 und Na_v1.7 codieren, auf dem Chromosom 2q23-24. Während die entsprechenden Gene, welche für die TTX-resistenten Na_v1.5, Na_v1.8 und Na_v1.9 codieren, auf dem Chromosom 3p21-24 lokalisiert sind. (Goldin et al. 2000)

Ausnahmen stellen die Kanäle Na_v1.4 und Na_v1.6 mit Genlokalisationen auf den Chromosomen 17 und 12 dar (Goldin 2002).

Die Nomenklatur der Kanäle beinhaltet (Goldin et al. 2000):

- ▶ das chemische Symbol des durchströmenden Ions (Na),
- ▶ die physiologische Funktionsweise des Kanals (voltage, v),
- ▶ die Angabe der Gen-Unterfamilie, charakterisiert durch die vordere Zahl,
- ▶ sowie die der Isoform als nachfolgende Dezimalzahl.

Alle Natriumkanäle dieser Art bestehen aus einer 260 Kilodalton (kDa) α-Untereinheit, welche mit einer oder mehreren akzessorischen β-Untereinheiten (β1-β4), von 33-36 kDa, assoziiert sein kann (Catterall 2000a; Hartshorne und Catterall 1981; Hartshorne et al. 1982; Isom 2001; Isom und Catterall 1996). Die β-Untereinheiten tragen sowohl zur Lokalisation des Kanals als auch zu seiner Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen der Extrazellulärmatrix oder des Zytoskeletts bei, wodurch sie maßgeblichen Einfluss auf die Kinetik und Spannungsabhängigkeit des gesamten Ionenkanals nehmen (Isom 2001). Alle β-Untereinheiten bestehen aus je einem Transmembransegment (S) sowie einer extrazellulären Domäne, welche strukturelle Ähnlichkeit zu den Immunglobulin-G-ähnlichen Domänen der L1-Zelladhäsionsmoleküle (L1 CAMs) aufweist (Isom und Catterall 1996; Lai und Jan 2006; Vaughn und Bjorkman 1996).

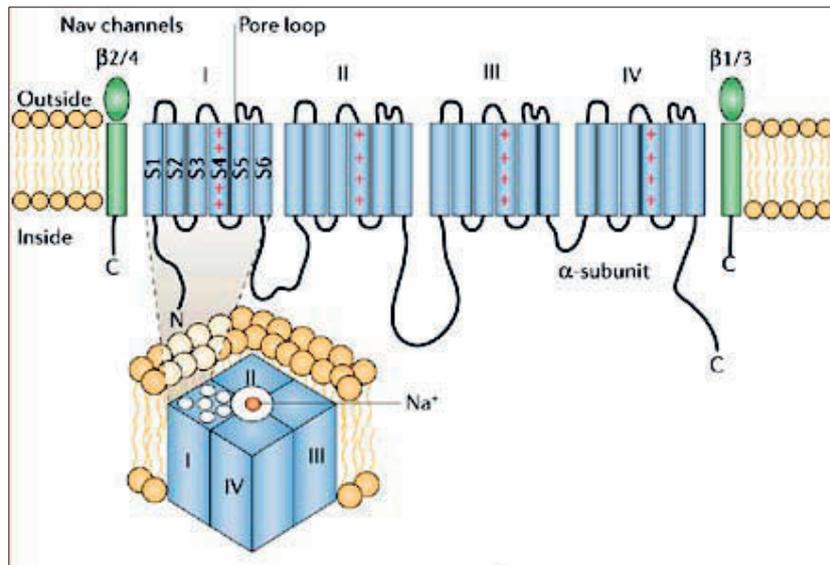


Abbildung 5:

Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Natriumkanals (Na_v) (Abb. aus Lai & Jan 2006).

Die α -Untereinheit stellt hingegen ein fortlaufendes Polypeptid dar, welches aus vier homologen Domänen (DI-IV) besteht, wobei jeweils eine Domäne sechs α -helikale Transmembransegmente (S1-S6) enthält, die wiederum durch extrazelluläre Schleifen (engl. loops) miteinander in Verbindung stehen (Lai und Jan 2006). Aufgrund seines hohen Lysin- und Arginingehaltes, ist das Segment S4 in der Lage Änderungen des Membranpotenzials festzustellen und fungiert damit als eine Art Spannungssensor. Die haarnadelähnliche P-loop zwischen S5 und S6 formt den engsten Bereich des ionenselektiven Filters am extrazellulären Ende der Pore, während der breitere intrazelluläre Anteil der Kanalpore durch die vier S6-Segmente gebildet wird (siehe Abbildung 5). (Catterall 2000a; Guy und Seetharamulu 1986; Lai und Jan 2006; Yu und Catterall 2003)

Die spannungsabhängige Funktionsweise der Natriumkanäle beruht dabei auf der Bewegung von Ladungen in einem elektrischen Feld, welches sich durch die Membran hindurch ausbreitet (Hodgkin und Huxley 1952). Als Spannungssensor ist somit v.a. das S4-Segment maßgeblich an der Aktivierung des Kanals beteiligt. Wie oben bereits beschrieben, entsteht durch die helikale Anordnung von jeweils einer positiv geladenen Aminosäure gefolgt von zwei hydrophoben Aminosäureresten in S4 eine positive Spannung innerhalb der Membran (Guy und Seetharamulu 1986; Yu und Catterall 2003).

Insgesamt können spannungsabhängige Natriumkanäle in drei Zustandsformen vorliegen, und zwar „geschlossen und aktivierbar“, „offen“ sowie „geschlossen und inaktiviert“ (Klinke et al. 2010). Herrscht ein Ruhemembranpotenzial so befinden sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle im geschlossenen Zustand, sind jedoch aktivierbar. Im Rahmen der Depolarisation kommt es zu einer Veränderung des elektrischen Feldes mit anschließender Konformationsänderung des Kanals durch Rotation der S4-Segmente von DI-III nach außen, sodass in der Folge die Kanalpore geöffnet wird (Catterall 1986; Guy und Seetharamulu 1986; Yu und Catterall 2003). Die Inaktivierung des Kanals wird durch die langsamere Bewegung von S4 der Domäne IV getriggert und folgt verzögert auf die Aktivierung (Sheets et al. 1999). Zur Inaktivierung führt letztendlich ein Komplex (engl. gate), bestehend aus drei Aminosäuren (IFM), welche sich innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen DIII und DIV befinden (West et al. 1992). Dieser Komplex verschließt die Kanalpore und bedingt so eine Inaktivierung des Kanals (Vassilev et al. 1988), welche bis zur Hyperpolarisation der Membran anhält. Der Kanal ist in dieser Zeit geschlossen und inaktiviert, also refraktär.

Eine Ausnahme stellt die Isoform Na_x dar, welche zwar zu der Familie der spannungsabhängigen Natriumkanäle gezählt wird, aber weder in größerem Ausmaße durch eine Membrandepolarisation, noch durch veränderte Konzentrationen von Natrium aktiviert werden kann (Goldin et al. 2000).

Im Allgemeinen bestehen die Aufgaben spannungsabhängiger Natriumkanäle (Lai und Jan 2006) :

- ▶ in der Initiierung von Aktionspotenzialen in der Nähe des AIS bzw. der Ranvier Schnürringe,
- ▶ der Weiterleitung von Aktionspotenzialen in unmyelinisierten Nervenfasern
- ▶ sowie der Rückleitung dieser in die neuronalen Somata und Dendriten.

Während $Na_v1.1-1.3$ und $Na_v1.6$ hauptsächlich im ZNS vorzufinden sind, zeigen $Na_v1.7-1.9$ eine große Verbreitung im PNS. Dahingegen sind $Na_v1.4$ und $Na_v1.5$ v.a. in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert, sodass diese in der Folge nicht weiter besprochen werden sollen. (Lai und Jan 2006)

Die Kanäle $Na_v1.1$ und $Na_v1.3$ sind hauptsächlich im Bereich des Somas sowie der Dendriten von Neuronen zu finden (Trimmer und Rhodes 2004; Whitaker et al. 2001), wo sie mittels Integration synaptischer Impulse die neuronale Erregbarkeit steuern (Yu

und Catterall 2003). Dabei zeigt $Na_v1.1$ eine vermehrte Expression in inhibitorischen Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-ergen Interneuronen (Yu et al. 2006). Zudem bestimmen diese Kanäle vermutlich den Schwellenwert, welcher zur Initiation und Weiterleitung von Aktionspotenzialen in dendritische und axonale Fortsätze benötigt wird (Yu und Catterall 2003).

Mit der Weiterleitung von Aktionspotenzialen, kommt dem Kanal $Na_v1.2$ eine ähnliche Aufgabe in den nicht-myelinisierten Nervenfasern (Boiko et al. 2001) von Kortex und Hippocampus zu (Westenbroek et al. 1989). In frühen Entwicklungsphasen findet sich $Na_v1.2$ zudem im Bereich unreifer Ranvier-Schnürringe. Im Laufe des Reifungsprozesses der Schnürringe scheint es dann zu einem Ersatz von $Na_v1.2$ durch $Na_v1.6$ zu kommen. (Boiko et al. 2001; Kaplan et al. 2001)

Darüber hinaus können $Na_v1.1$ und $Na_v1.6$ zusätzlich aber auch in Neuronen des PNS exprimiert werden (Yu und Catterall 2003). Insgesamt lässt sich $Na_v1.6$ mit einer gewissen Häufigkeit beispielsweise in Purkinje-Zellen, Motoneuronen, Pyramiden- und Körnerzellen sowie Glia- und Schwann-Zellen finden (Caldwell et al. 2000).

Typische Kanäle des PNS werden dennoch von den Isoformen $Na_v1.7-1.9$ repräsentiert. Hierbei ist $Na_v1.7$ v.a. in den Axonen sensorischer und sympathischer Neurone lokalisiert, wo dem Kanal eine Beteiligung bei der Generierung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen zukommt. Seine Expression wird beispielsweise durch den Einfluss inflammatorischer Mediatoren, wie dem Nervenwachstumsfaktor (NGF), reguliert. (Toledo-Aral et al. 1997)

Die Kanäle $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ zeigen eine sehr spezialisierte Expression. So kommen sie beispielsweise in kleinen sensorischen Neuronen von Spinal- und Trigemininalganglien vor, wo ihnen eine bedeutende Rolle in der Nozizeption zugeschrieben wird (Akopian et al. 1999; Black et al. 1999; Djouhri et al. 2003; Fang et al. 2002; Yu und Catterall 2003). $Na_v1.8$ stellt weiterhin einen der Hauptkanäle zur Auslösung eines Aktionspotenzials in diesen Zellen dar (Renganathan et al. 2001). Darüber hinaus lässt sich $Na_v1.9$ auch in sensorischen Neuronen des enterischen Nervensystems (Rugiero et al. 2003) sowie als Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-abhängiger Kanal in Neuronen des Hippocampus finden (Blum et al. 2002).

1.2.2.1.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)

Die Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle stellt mit ca. 40 verschiedenen Genen für die K_v-Kanal α -Untereinheiten die größte Gruppe unter allen Kaliumkanälen des Menschen dar und lässt sich in insgesamt 12 Subfamilien (K_v1.x-K_v12.x) untergliedern (Gutman 2005). Auch für sie existiert eine einheitliche Nomenklatur, welche sich aus dem Symbol des durchströmenden Ions (K), der Abkürzung des Liganden (voltage, v) und der Subfamilie, gefolgt von der jeweiligen Isoform, zusammensetzt (Chandy 1991).

Im Aufbau bestehen die K_v-Kanäle aus vier gleichen oder zumindest ähnlichen α -Untereinheiten, welche jeweils eine einzige Domäne enthalten und die Kanalpore formen, wie in Abbildung 6 gezeigt wird. Jeder Domäne sind dabei sechs Transmembransegmente (S1-S6) zugeordnet (Jan und Jan 1992; Pongs 1992). Hinzu kommt eine extrazellulär gelegene P-Schleife (Syn. H5, P-Region) sowie die C- und N-Terminals der Untereinheiten auf der intrazellulären Seite. Die P-Schleife verbindet die Segmente 5 und 6 und bildet damit den Großteil der eigentlichen Porenstruktur aus. Ähnlich wie bei den spannungsabhängigen Natriumkanälen, kommt dem Segment S4, durch seinen Gehalt an basischen Aminosäuren, eine spannungssensitive Funktion zu. (Catterall 1988; Gutman 2005; Papazian et al. 1991)

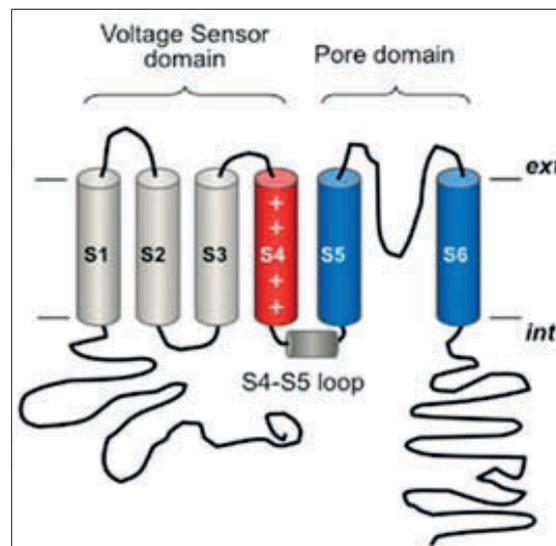


Abbildung 6:

Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (K_v) (Abb. aus Barros et al. 2012).

Auch bei diesem Kanaltypus können die α -Untereinheiten mit β -Untereinheiten assoziiert sein. Diese Hilfsmoleküle können sowohl durch zytoplasmatische, periphere Membranproteine (β -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Kv β s), Kv-Kanal interagierende Proteine (KvCHIPs)) repräsentiert werden, als auch in Form integraler Transmembranproteine (Dipeptidyl-Peptidase-like Protein-6 (DPPX), Major iron-regulated protein (MiRP)) auftreten (Gulbis et al. 2000; McCrossan et al. 2003; Nadal et al. 2003; Scannevin et al. 2004). So können beispielsweise die α -Untereinheiten von Kv1 über ihre N-Terminus-T1-Domänen mit den β -Untereinheiten Kv β 1.1, Kv β 1.2, Kv β 2 und Kv β 3, unter Bildung einer α 4 β 4-Stöchiometrie, in Verbindung stehen (Gulbis et al. 2000; Lai und Jan 2006).

Durch Depolarisation der Membran kommt es im Rahmen von Aktionspotenzialen zur Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle ab einer Spannung von ca. -40 mV. An einer solchen Aktivierung sind maßgeblich die Segmente S3 und S4 beteiligt, welche als sogenanntes „voltage-sensor paddle“ eine funktionelle Einheit bilden (Long et al. 2005a, 2005b). Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass sich die im Ruhezustand antiparallel zueinander stehenden Segmente durch ihre Aktivierung empor bewegen, wodurch sie am Ende des Prozesses parallel zur Porenachse zum Stehen kommen. Diese Bewegung führt gleichzeitig zu einer Verschiebung der Segmente S5 und S6, durch welche die Öffnung des intrazellulären Poreneingangs freigegeben wird. (Long et al. 2005b)

Durch den Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle kommt es dann im Rahmen der Repolarisation wieder zu einer Annäherung des Membranpotenzials an das Gleichgewichtspotenzial für Kalium. Sobald der depolarisierende Reiz hiermit verloren gegangen ist, kommt es mit einer gewissen Verzögerung zu einer Inaktivierung der Kaliumkanäle. Die Kaliumleitfähigkeit bleibt hingegen am Ende des Aktionspotenzials gegenüber dem Ruhezustand noch etwas erhöht. (Klinke et al. 2010)

Für die Inaktivierung der Kv-Kanäle werden zwei unterschiedliche Mechanismen, genauer die N-Typ- bzw. die C-Typ-Inaktivierung, differenziert. Im Rahmen der schnellen N-Typ-Inaktivierung, wie sie bei den Kv1 (Shaker) beschrieben ist (Hoshi et al. 1990; Zagotta et al. 1990), kommt es durch Interaktion zwischen den positiv geladenen hydrophoben Aminosäuren des N-Terminus und den negativ geladenen Aminosäuren der T1-Domäne zu einem Eindringen Ersterer in die Kanalpore mit nachfolgendem Verschluss derselben. Die hydrophoben Aminosäuren des N-Terminus bilden damit die sogenannte Inaktivierungsdomäne (Aldrich 2001; Long et al. 2005a).

Diese Art der Inaktivierung wird in der Literatur auch als „ball-and-chain“-Mechanismus bezeichnet (e.g. Zagotta et al. 1990). Bei der langsameren C-Typ-Inaktivierung von K_v1 wird dahingegen eine Strukturveränderung am Selektivitätsfilter sowie der Außenwand der Kanalpore vermutet, was zu einem Schluss der Pore sowie zu einem Abfallen der Leitfähigkeit für Kalium führt (Kiss und Korn 1998; Ogielska et al. 1995). Zu einer C-Typ-Inaktivierung kommt es beispielsweise dann, wenn dem Kanal der Mechanismus der N-Typ-Inaktivierung aufgrund von Elimination nicht mehr zur Verfügung steht (Hoshi et al. 1991).

Eine Besonderheit der K_v1 besteht in ihrer Fähigkeit Heterotetramere zu bilden. Das bedeutet, dass ein solcher heterotetramerer Kanal aus Untereinheiten verschiedener K_v1 -Mitglieder zusammengesetzt ist, welche ebenso homotetramer exprimiert werden könnten, und in seiner Funktion letztendlich die Eigenschaften der beteiligten Isoformen vereint (Hopkins et al. 1994; Isacoff et al. 1990; Ruppersberg et al. 1990). So stellen die α -Untereinheiten der Kanäle $K_v1.1$, $K_v1.2$ und $K_v1.4$, welche vornehmlich in Axonen und Nervenzellendigungen (Trimmer und Rhodes 2004) von Neuronen des Gehirns lokalisiert sind, in Kombination mit β -Untereinheiten ein Beispiel für die Heteromultimerisation dar (Rhodes et al. 1997).

Weitere Ursachen für die Vielfalt der K_v -Kanäle liegen in der Existenz modifizierender Unterfamilien (K_v5 , 6, 8 und 9), akzessorischer Proteine, inklusive der β -Untereinheiten, alternativer Splicingvorgänge und posttranslationaler Modifikationen (Gutman 2005), wie Phosphorylierungen (Jerng et al. 2004), Ubiquitinylierungen (Henke et al. 2004) und Palmitoylierungen (Gubitosi-Klug et al. 2005).

Die Mitglieder der K_v1 -Familie, deren Verbreitung und Funktion im Folgenden besprochen wird, werden v.a. im ZNS exprimiert, wobei ihr Verteilungsmuster regional variiert (Veh et al. 1995) und sich hauptsächlich auf die Axone und synaptischen Endigungen zentraler Neurone konzentriert (Monaghan et al. 2001; Sheng et al. 1993; Trimmer und Rhodes 2004). Darüber hinaus wurden sie zudem, wie die Abbildung 7 zeigt, in den juxtapanodalen Regionen myelinisierter Axone sowohl im ZNS als auch im PNS gefunden (Rasband et al. 1998; Wang et al. 1993).

Die Funktion der Kaliumkanäle in den juxtapanodalen Regionen besteht in der Steigerung der Genauigkeit von Aktionspotenzialen im Bereich der Schnürringe sowie in der Membranstabilisierung und der Reduktion der Erregbarkeit während

Remyelinisierungs- und Entwicklungsprozessen (Chiu und Ritchie 1981; Rasband et al. 1998).

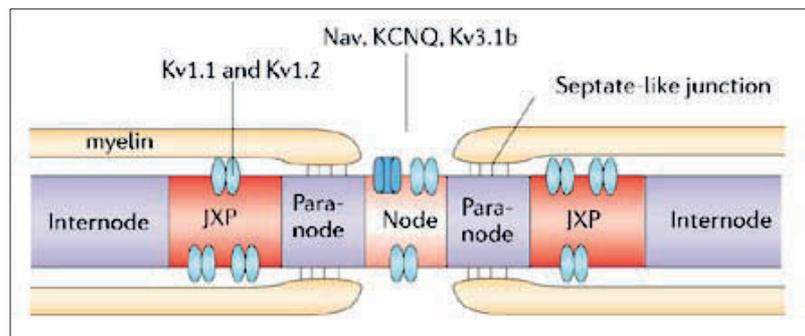


Abbildung 7:

Lokalisation spannungsabhängiger Kaliumkanäle am myelinisierten Axon (Abb. aus Lai & Jan 2006). JXP: Juxtaparanodale Region

Bezogen auf oben genannte Lokalisationen kontrollieren die Kaliumkanäle die Auslösung von Aktionspotenzialen (Debanne et al. 1997) und nehmen eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmittern, wie beispielsweise dem exzitatorisch wirkenden Glutamat (Lambe und Aghajanian 2001), ein.

Zudem zeigen $K_v1.1$ und $K_v1.2$ zusätzlich eine Expression in den Somata und Dendriten zentraler Neurone, wie denen des Hippocampus (Wang et al. 1994). $K_v1.2$ ist weiterhin in Zellen der Spinalganglien (DRG) lokalisiert, in welchen dem Kanal eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung und der Entstehung neuropathischer Schmerzen zukommt (Ishikawa et al. 1999; Yang et al. 2004). $K_v1.1$ wirkt hauptsächlich limitierend auf die Generierung von Aktionspotenzialen, was Smart und Mitarbeiter im Rahmen einer Epilepsiestudie mit Hilfe von Knock-out Mäusen nachweisen konnten (Smart et al. 1998). Zusammen mit $K_v1.6$, konnte $K_v1.1$ außerdem in zentralen Interneuronen nachgewiesen werden (Rhodes et al. 1997). Weiterhin findet sich $K_v1.3$ sehr spezialisiert in Neuronen des hippocampalen Gyrus dentatus sowie in Körnerzellen des Bulbus olfactorius (Kues und Wunder 1992).

1.2.2.1.3 Spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_v)

Kalziumkanäle vom spannungsabhängigen Typ übernehmen zahlreiche Funktionen auf zellulärer Ebene. So reagieren sie im Rahmen der Depolarisation von Nervenzellen

durch Öffnung mit nachfolgendem Kalziumeinstrom. Auch intrazelluläre Prozesse, wie Kontraktion, Sekretion, Neurotransmission oder Genexpression, werden durch die Aktivität der Kalziumkanäle kontrolliert. (Catterall et al. 2005)

Die Nomenklatur der Ca_v -Kanäle, welche bisher drei Subfamilien (Ca_v1-3) umfassen (Catterall et al. 2005), folgt derer der spannungsabhängigen Kaliumkanäle nach Chandy (1991).

Ähnlich wie die Na_v -Kanäle, bestehen auch die Kalziumkanäle aus 4-5 Untereinheiten, wobei die α_1 -Untereinheit den größten Baustein repräsentiert (190-250 kDa) und die Kanalpore beherbergt (Catterall et al. 2005) (siehe Abbildung 8).

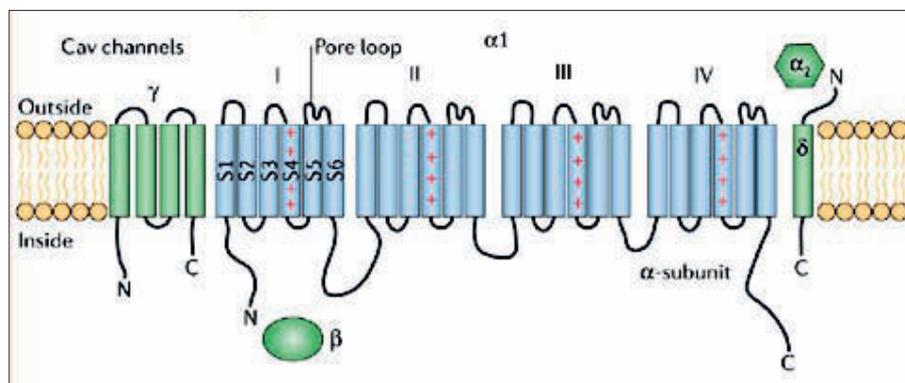


Abbildung 8:

Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kalziumkanals (Ca_v) (Abb. aus Lai, & Jan 2006).

Auch die Diversität der Ca_v -Kanäle wird durch die verschiedenen α_1 -Untereinheiten bestimmt (Hofmann et al. 1994).

Die α_1 -Untereinheit gliedert sich in 4 Domänen (I-IV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6). Die wichtigsten strukturellen Elemente umfassen das Segment S4, welches als Spannungssensor fungiert, sowie die P-loop zwischen den Segmenten S5 und S6 jeder Domäne, welche Einfluss auf die Leitung der Ionen und die Selektivität des Kanals nimmt. (Catterall et al. 2005)

Zudem können den α -Untereinheiten unterstützend zytosolische β -, Disulfid-verkettete $\alpha_2\delta$ - oder γ -Untereinheiten, bestehend aus vier Transmembransegmenten, angegliedert sein, welche wiederum modulierenden Einfluss auf die Kanaleigenschaften nehmen (Catterall 2000b; Catterall et al. 2005; Lai und Jan 2006; Trimmer und Rhodes 2004).

Nach ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheidet man die den Kanal durchfließenden Kalziumströme in L-, N-, P-/Q- und R-Typen (Bean 1989; Hess 1990; Llinás et al. 1992; Tsien et al. 1988), wobei L-Typ-Ströme (engl. für long lasting) u.a. in Neuronen, endokrinen Zellen und Zellen des kardialen Reizleitungssystems von großer Bedeutung sind (Catterall et al. 2005). Beispiele für L-Typ-Kalziumkanäle stellen die $Ca_v1.1-1.4$ dar (Catterall et al. 2005; Klinke et al. 2010). Das Charakteristikum der L-Typ-Kalziumströme besteht darin, dass sie in der Regel einen starken Depolarisationsreiz zur Aktivierung benötigen, welcher daraufhin über eine längere Dauer anhält und dem eine langsame spannungsabhängige Inaktivierung folgt (Catterall et al. 2005). Darüber hinaus können diese Kanäle durch organische L-Typ-Kalziumkanal-Antagonisten, wie Dihydropyridine, Phenylalkylamine oder Benzothiazepine, geblockt werden (Catterall et al. 2005). Reguliert werden diese Mechanismen über cAMP-abhängige Phosphorylierungen. (Hess 1990; Reuter 1983) In Neuronen sind die L-Typ-Kalziumkanäle v.a. an der Expression von Genen sowie der Integration synaptischer Signale beteiligt (Bean 1989; Catterall 2000b).

Ca_v -Kanäle werden zu einem großen Teil in Somata, Dendriten und Terminalen von Nervenzellen exprimiert (Lai und Jan 2006).

Obwohl Ca_v1 -Kanäle vor allen Dingen in kardialen Geweben lokalisiert sind, zeigt sich zudem die Expression einiger Isoformen in den Zellkörpern sowie den proximalen Dendriten hippocampaler Neurone (Hell et al. 1993), wobei ihre Dichte zum Soma hin zunimmt (Hell et al. 1993), was wohl möglich zu einer Integration elektrischer und kalziumvermittelter Signale beitragen könnte (Magee et al. 1996; Magee et al. 1998). Moosmang und Mitarbeiter vermuteten sogar eine Beteiligung des Kanals $Ca_v1.2$ an der Ausbildung synaptischer Plastizität sowie an Prozessen der Gedächtnisformung (Moosmang et al. 2005). Auch Striessnig et al. (2006) konnten den Kanälen $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ eine Bedeutung im Rahmen neuronaler Aktivität und Plastizität zusprechen.

Darüber hinaus scheint die Familie der spannungsabhängigen Kalziumkanäle und insbesondere die kalziumabhängige Signalübertragung auch an der Regulation der Transkription neuronaler Gene beteiligt zu sein, welche sowohl für die synaptische Plastizität als auch für das neuronale Überleben eine gewisse Relevanz besitzen (Bading et al. 1993; Bito et al. 1997; West et al. 2002).

1.2.3 Die neuronale Entwicklung im adulten ZNS

Den Anstoß zu weiterer Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Neurogenese im entwickelten ZNS gab im Jahr 1962 die Arbeit von Altman, in dessen Rahmen erstmals Vermutungen über die Existenz neu entwickelter Neurone im Gehirn von adulten Säugetieren angestellt wurden (Altman 1962).

Mittlerweile sind im ZNS sogenannte neurogene Regionen bekannt, in welchen es im Laufe der adulten Neurogenese zur Ausdifferenzierung neuronaler Progenitoren in mature Neurone kommt. Hierzu zählt sowohl die subgranuläre Zone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus, in welcher Körnerzellen ausdifferenziert werden, als auch die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel im Vorderhirn, von der aus Vorläuferzellen über den rostra-migratorischen Pfad in den olfaktorischen Bulbus einwandern und dort Interneurone formen (Alvarez-Buylla und Lim 2004; Ming und Song 2005; Zhao et al. 2008). Darüber hinaus konnten neuronale Vorläuferzellen auch in weiteren Arealen, wie der Retina (Tropepe 2000) oder dem Rückenmark (Horner et al. 2000), ausfindig gemacht werden. Weiterhin wurde auch der Nachweis über die Existenz adulter Neurogenese im vegetativen Nervensystem (VNS) erbracht. So konnten entsprechende multipotente Stammzellen beispielsweise auch im Glomus caroticum gefunden werden (Pardal et al. 2007).

Es wird davon ausgegangen, dass diese neu entstandenen Neurone ihren Ursprung in NSC's nehmen. NSC's besitzen u.a. die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage Zellen verschiedener Linien auszdifferenzieren, wie beispielsweise Neurone oder Gliazellen. (Ming und Song 2005)

So bilden NSC's bereits während der Embryogenese ventrikel epithelähnliche Zellen, die das Neuralrohr innen überziehen (Sauer 1935). Diese Stammzellen scheinen auch im adulten ZNS fortzubestehen. Dabei wird vermutet, dass neben Ependym- (Johansson et al. 1999) und subependymalen Zellen (Morshead et al. 1994) auch Astrozyten (Doetsch et al. 1999) die Charakteristiken solcher Stammzellen besitzen könnten. Seri und Mitarbeiter (Seri et al. 2004) konnten herausfinden, dass Astrozyten der subgranulären Zone in nestartiger Anordnung als primäre Progenitoren der Neurogenese fungieren, indem sie zusammen mit der extrazellulären Matrix eine Art Stammzellnische bilden. Durch Teilung differenzieren sie sich innerhalb der Nische über die Zwischenstufen D1-D3 zu neuen Körnerzellen, welche anschließend in die Körnerzellschicht auswandern (siehe Abbildung 9), um sich im Sinne einer funktionellen Integration neben älteren Neuronen anzusiedeln (Seri et al. 2004).

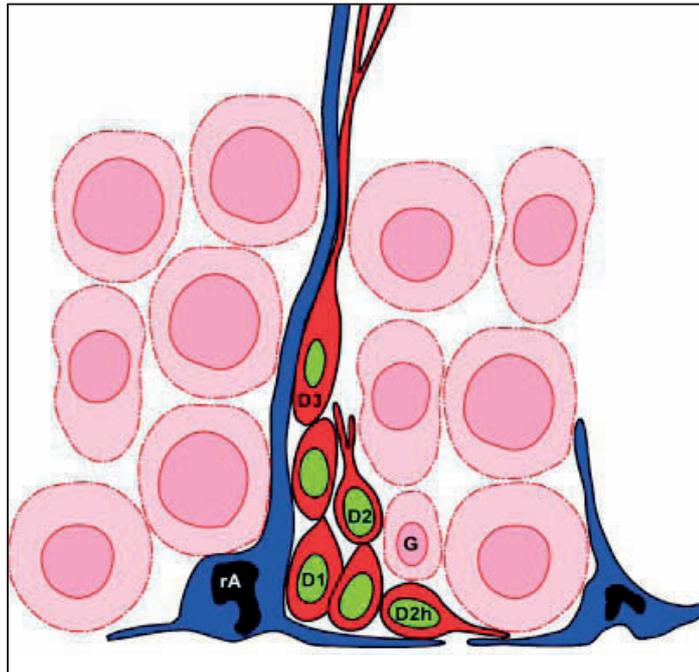


Abbildung 9:

Anordnung von Stammzellnischen in der subgranulären Zone (SGZ) als Orte adulten Neurogenese. Radiäre Astrozyten (rA) fungieren als neuronale Progenitoren, die sich über die Zwischenstufen D1-D3, in neue Körnerzellen (G) differenzieren (Abb. aus Seri et al. 2004).

Obwohl Faktoren und Mechanismen, welche Proliferation und Differenzierung im Rahmen der adulten Neurogenese regulieren, einer abschließenden Forschung bedürfen, sind einige bereits bekannt (siehe Abbildung 10).

Eine Vermehrung adulter neuraler Progenitorzellen *in vitro* konnte beispielsweise durch die als Mitogene wirkenden Vertreter aus der Gruppe der Fibroblasten- (FGF) und epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) erreicht werden (Lie et al. 2004). Als wichtig für die Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie, konnten Vertreter des Wachstumsfaktors bone morphogenetic protein (BMP) sowie deren Antagonisten, Noggin und Neurogenin-1, identifiziert werden. Während sich neurale Vorläuferzellen unter Anwesenheit von BMPs in Richtung glialer Zellen differenzierten (Lim et al. 2000), führte die Präsenz von Noggin, welches *in vivo* von Ependymzellen der subventrikulären Zone gebildet wird, bzw. von Neurogenin-1, produziert durch Astrozyten der subgranulären Zone, in den jeweiligen Stammzellnischen zu Entwicklungen in Richtung der neuronalen Zelllinie (Lim et al. 2000; Ueki et al. 2003).

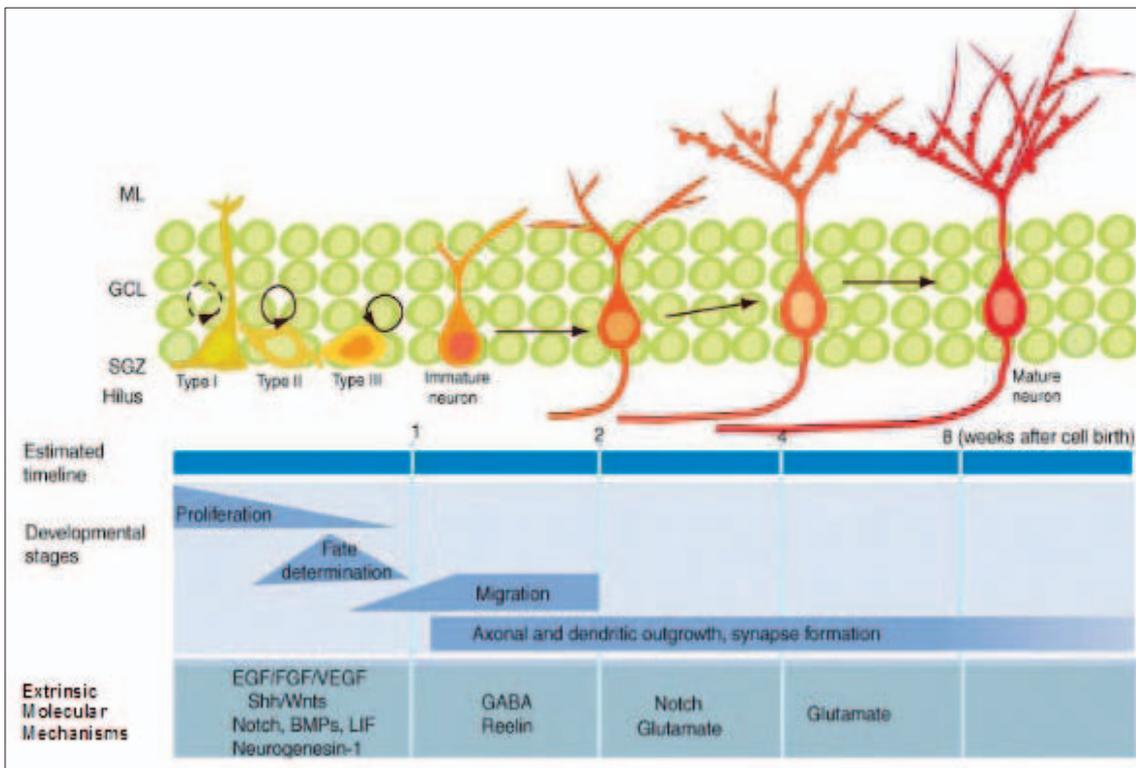


Abbildung 10:

Entwicklungsschritte der adulten hippocampalen Neurogenese *in vivo* unter Auführung von Zeitspanne, Entwicklungsstadien und möglichen molekularen Einflussfaktoren. ML: Molecular Layer, GCL: Granule Cell Layer, SGZ: Subgranuläre Zone (Abb. modifiziert aus Duan et al. 2008).

Ebenfalls relevant im Rahmen der Regulation und Differenzierung von NSC's scheint der Wnt-Signalweg zu sein (Ille und Sommer 2005). Bedeutsam dabei ist seine Kontrolle über epigenetische Mechanismen auf zellulärer Ebene. Beispiele für diese Mechanismen bestehen in der Interaktion zwischen Enzymen im Rahmen des „Chromatin Remodellings“ mit anderen neurogenen Transkriptionsfaktoren sowie in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von Neuronen oder auch in der Beteiligung nicht-codierender Ribonukleinsäure (RNA) im Rahmen der neuronalen Differenzierung (Hsieh und Gage 2004).

Darüber hinaus sind auch Faktoren bekannt, welche einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben können. Wachs und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation neuronaler Stamm- und Progenitorzellen führt und damit auch die Neurogenese drosseln kann (Wachs et al. 2006).

Auch das Zytokin Interleukin-6 (IL-6), welches im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen von Mikrogliazellen ausgeschüttet wird, soll sich negativ auf die Neurogenese auswirken. So ist es nicht verwunderlich, dass im Tierversuch eine

Erholung der Neurogenese bei Blockade der Entzündungskaskade durch Indometacin nachgewiesen werden konnte. (Monje et al. 2003)

Auch die Pathophysiologie kann Einfluss auf die Neurogenese im adulten ZNS nehmen.

So zeigten Arvidsson und Mitarbeiter, dass nach einer akuten Ischämie, wie beispielsweise im Rahmen eines Schlaganfalls, die Neurogenese deutlich angekurbelt werden kann. Dabei konnte eine signifikante Steigerung der Zellproliferation in der subventrikulären Zone beobachtet werden. Auch wurde eine Migration der neu entstandenen Neurone in die entsprechend geschädigten striatalen Gebiete mit nachfolgendem Ersatz der zerstörten Zellen nachgewiesen. Die neuen Neurone zeigten dabei dasselbe Expressionsmuster für die Marker Meis2 (engl. myeloid ecotropic viral integration site 2), Neuronal Nuclei (NeuN) und DARPP-32 (engl. dopamine- and cAMP-regulated Phosphoprotein-32 kDa) wie mature Neurone des Striatums. In der Folge eines Schlaganfalls besteht also die Möglichkeit des Ersatzes geschädigter durch neu entstandene Neurone, was die große Kapazität des adulten ZNS bezüglich seiner Selbsterneuerung unterstreicht. (Arvidsson et al. 2002)

Ebenfalls förderlich auf die adulte Neurogenese, insbesondere im seneszenten Gehirn, wirkt sich eine an Reizen reiche Umgebung aus, wie im Tierversuch festgestellt werden konnte (Kempermann et al. 1998). Dahingegen können chronisch degenerative Erkrankungen des Gehirns, die Neurogenese durch Einschlüsse von α -Synuclein, wie beim Morbus Alzheimer, deutlich reduzieren (Winner et al. 2004).

Im Vergleich zur embryonalen Neurogenese lassen sich, trotz zahlreicher Ähnlichkeiten, dennoch Unterschiede im Rahmen der adulten Neurogenese feststellen. Zum Einen besteht ein wichtiger Steuerungsfaktor der adulten Neurogenese in Stimuli und Mediatoren, welche aus dem Verbund vorbestehender Nervenzellen abgegeben werden und ebenso auf diese wirken (Duan et al. 2008). Eine solche Umgebung kann somit auch Gefahren bergen, da die Neurogenese im adulten Gehirn bereits als weitgehend abgeschlossen gilt. Ein Fortbestand der Neurogenese ist somit nur in speziellen Nischen möglich, welche Schutz vor anti-neurogenen Einflüssen durch die Umgebung bieten (Kempermann et al. 2004). Des Weiteren nimmt der Prozess der neuronalen Reifung hier im Allgemeinen einen längeren Zeitraum von bis zu vier Wochen oder mehr in Anspruch, als derselbe Vorgang vergleichend in der Embryonalentwicklung benötigen würde (Zhao et al. 2006). Hinzu kommt, dass der

Vorgang der adulten Neurogenese einen individuellen Prozess darstellt, so sind beispielsweise mehrere neuronale Zwischenstufen der Entwicklung zum selben Zeitpunkt anzutreffen. Im Gegensatz zur embryonalen Neurogenese verläuft die Progression der einzelnen Entwicklungsschritte also nicht parallel. (Kempermann et al. 2004)

1.3 Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

In den letzten Jahren beschäftigt sich die Stammzellforschung intensiver mit der *in vitro* Differenzierung menschlicher MSC's in funktionsfähige reife Neurone. Das Ziel der Forschung besteht darin, die differenzierten Zellen als autologe Quelle, im Rahmen der *in vivo*-Reimplantation, für die Behandlung akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen oder Traumata nutzbar zu machen.

In Anlehnung an die spezifischen und anspruchsvollen Bedürfnisse der Stammzellen an ihre unmittelbare Umgebung *in vitro*, besteht das Interesse vieler Forschungsgruppen in der Optimierung von Kulturbedingungen zur Steigerung von Plastizität und Proliferationsverhalten der Stammzellen. So konnten Qu und Mitarbeiter (Qu et al. 2004) beispielsweise eine Verbesserung der Multipotenz von MSC's durch deren Behandlung mit 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) erreichen. Zusätzlich wurden verschiedene Oberflächenbeschichtungen ausgetestet, um den Prozess des Anwachsens der Zellen an die Kulturflasche sowie deren Proliferation und Differenzierung zu unterstützen. Kim und Mitarbeiter (Kim et al. 2002a) fanden heraus, dass die Kombination aus einer Beschichtung mit Fibronectin (extrazelluläres Matrixprotein) und speziellen Differenzierungsmedien förderlich auf die Entwicklung von MSC's in Richtung der neuronalen Linie sein kann. Ebenfalls vielversprechend bezüglich der Zelladhäsion erschien die Beschichtung von Kulturplatten mit Poly-L-Lysin (Hermann et al. 2004; Long et al. 2005c) bzw. Poly-D-Lysin (Zeng et al. 2011).

Den Hauptanteil an der neuronalen Differenzierung machen jedoch die jeweiligen Differenzierungsmedien aus, welche sehr variabel zusammengesetzt sein können. Im Großen und Ganzen lassen sich hierbei drei verschiedene Arten der Herangehensweise unterscheiden. Neben dem Ansatz der chemischen Induktion, existiert die Möglichkeit die Zellen mithilfe von Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen und speziellen Nährmedien in die neuronale Richtung zu differenzieren. Die dritte Variante besteht in der Kombination der ersten beiden Ansätze. Darüber hinaus lassen

sich mithilfe von Ko-Kultur-Systemen oder genetischer Manipulation (engl. genetic engineering) ähnliche Resultate erzielen.

1.3.1 Differenzierung mittels chemischer Induktion

Woodbury und Kollegen (Woodbury et al. 2000) gelang es im Jahre 2000 ein Differenzierungsprotokoll auszuarbeiten, durch welches sowohl humane als auch MSC's von der Ratte nach chemischer Induktion neuronienähnliche Morphologien aufwiesen. Hierfür verwendeten sie zunächst ein Präinduktionsprotokoll für die Dauer von 24 Stunden, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 20% fetalem Kälberserum (FBS), 1 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF). In der sich anschließenden Induktionsphase wurden die Zellen mit einem Differenzierungsprotokoll, bestehend aus DMEM, 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 200 μ M Butylhydroxyanisol (BHA), behandelt. Innerhalb kürzester Zeit zeigten die Zellen so eine optische Transformation hin zu einem neuronalen Phänotyp. Die Zellen zeichneten sich vor allen Dingen über die von einem refraktilen Zellkörper ausgehenden langen Fortsätze aus, an deren Endigungen sich Wachstumskegel (engl. growth cones) sowie Filopodien ausmachen ließen. Darüber hinaus konnten neuronenspezifische Proteine, wie Neuronenspezifische Enolase (NSE), NeuN, Neurofilament-Medium (NF-M) und Tau-Protein (Tau), in der Immunzytochemie nachgewiesen werden. (Woodbury et al. 2000)

Einen weiteren Ansatz trieben Deng und Mitarbeiter (Deng et al. 2001) voran, indem sie postulierten, dass eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) förderlich auf die neuronale Differenzierung wirken würde. Das ausgearbeitete Protokoll beinhaltete Minimum Essential Medium Eagle α (α -MEM), 20% FBS und 0,5 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX) / 1 mM Bucladesin (dbcAMP) für 6 Tage. Im Ergebnis zeigten ca. 25% der Zellen nach der chemischen Behandlung eine neuronienähnliche Morphologie sowie ein erhöhtes Expressionsmuster für NSE und Vimentin, wie der Western Blot bestätigte. Deng und Kollegen vermuteten, dass sich die MSC's *in vitro* durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel in frühe Progenitoren neuraler Zellen differenziert haben mussten. (Deng et al. 2001)

Im direkten Vergleich beider zuvor beschriebenen Studien durch Rismanchi und Mitarbeiter (Rismanchi et al. 2003), konnte gezeigt werden, dass aus der

Zelldifferenzierung nach Woodbury (Woodbury et al. 2000) zwar deutlich mehr Zellen mit neuronenähnlicher Morphologie (51%) hervorgingen, dabei aber auch eine höhere Rate toter Zellen (53%) in Kauf genommen wurde. Dagegen zeigten sich bei der Differenzierung nach Deng (Deng et al. 2001) wiederum weniger Zellen neuronalen Phänotyps (13%), wobei die Zellverluste aber signifikant niedrig blieben (< 5%) (Rismanchi et al. 2003).

Eine weitere Variante zur neuronalen Differenzierung zeigten Hung und Mitarbeiter (Hung et al. 2002b) auf, indem sie, durch die Zugabe der Antioxidanzien β -ME und/oder Retinolsäure (RA), neuronenähnliche Zellen aus MSC's *in vitro* anzüchten konnten. Darüber hinaus zeigten diese Zellen positive Ergebnisse für Nestin, NSE, NeuN und Neuronenspezifisches Klasse III Beta-Tubulin (TuJ-1) in der Immunfluoreszenz (Hung et al. 2002b).

Muñoz-Elias und Mitarbeiter (Muñoz-Elias et al. 2003) konnten durch Modifikation des Woodbury-Protokolls, indem sie diesem 10 μ M Forskolin, N-2-Supplement bzw. 5 μ g/ml Insulin, 2 mM Valproinsäure (VPA), 5 nM des Tyrosinkinaseblockers K252A und 10 mM Kaliumchlorid (KCl) zufügten, eine Transformation von über 70% der undifferenzierten MSC's hin zu Zellen mit neuronenähnlicher Morphologie erreichen. Weiterhin zeigten die differenzierten Zellen innerhalb von 24 Stunden die Expression neuronaler Proteine wie Tau, NeuN, NSE und Toad/Ulip/CRMP-4-Protein (TUC-4), ohne vorher das Stadium der Mitose durchlaufen zu haben, was in der Immunzytochemie bestätigt werden konnte. Aus diesen Beobachtungen konnte der Schluss gezogen werden, dass die Entwicklung von MSC's zu Neuronen auf direktem Wege geschehen musste, also ohne eine vorherige Kernteilung. Die Forscher schlussfolgerten daher, dass ein fließender Übergang zwischen Stammzellen, Progenitoren und Präkursoren bestehen könnte. (Muñoz-Elias et al. 2003)

Greco et al. (2008) gelang es innerhalb von 12 Tagen aus humanen MSC's mit Hilfe eines speziellen Protokolls, bestehend aus Ham's DMEM/F12, 2% FBS, B27-Supplement, 20 mM RA und 12,5 ng/ml bFGF, neurotransmitterproduzierende Neurone zu differenzieren, wobei 25% dieser Zellen durch exogene Transmitterstimulation mit Glutamat und GABA elektrisch erregt werden konnten. Mithilfe von Microarray-Analysen konnten drei Arten von transmitterproduzierenden Zellen, nämlich peptiderge, GABAerge und cholinerge Neurone, nachgewiesen werden (Greco et al. 2008).

Trotz der scheinbaren Erfolge auf dem Gebiet der neuronalen Differenzierung, wurden zuletzt Stimmen laut, die sich gegen die Möglichkeit einer solchen Differenzierung durch chemische Induktion aussprachen. Dabei wurde eine Transdifferenzierung von MSC's in reife Neurone zunehmend infrage gestellt. Vielmehr wurden andere Phänomene, wie Zellfusionen, als Ursache der vermeintlichen „Differenzierungen“ angesehen. Gestützt wurden diese Vermutungen einerseits auf das Fehlen wichtiger morphologischer Charakteristika, wie beispielsweise dem Wachstumskegel am aussprossenden Axon, andererseits auch auf den vermehrten Zelltod während der chemischen Induktion sowie auf die sehr kurze Zeitspanne von wenigen Stunden, in der die neuronale Differenzierung von statten gehen sollte (Khoo 2009).

Neuhuber und Mitarbeiter (Neuhuber et al. 2004) konnten vielmehr oben beschriebene Beobachtungen zur neuronalen Differenzierung von Zellen auch an dermalen Fibroblasten machen, welche nach chemischer Induktion mit DMSO und BHA morphologisch neuronale Charakteristika, wie beispielsweise lange dünne Zellfortsätze, zeigten und ebenfalls mit der Expression neuraler sowie glialer Markerproteinen reagierten. Zudem konnte durch Proteomanalyse und DNA-Microarray gezeigt werden, dass MSC's nach neuronaler Differenzierung mittels chemischer Induktion weder einen veränderten Proteinbesatz, noch eine Hochregulation von neuronenspezifischen Genen, sondern vielmehr eine Herunterregulation dieser, aufwiesen (Choi et al. 2006).

Einige Autoren stellten zudem die Hypothese auf, dass die chemischen Komponenten der Protokolle aufgrund ihrer möglichen Toxizität zu einem Zusammenschrumpfen der Zellen (engl. cell shrinkage) führen würden, welches durch Schädigung ihrer Aktinfilamentgerüste und die Retraktion ihrer Zellkörper bedingt sein könnte. Sodass im Endeffekt nicht die Differenzierung selbst zu einer neuronähnlichen Morphologie der Zellen und der damit einhergehenden vermehrten Expression neuronaler Proteine führe, sondern vielmehr der toxische Stress auf zellulärer Ebene Morphologie und Expressionsmuster bedinge (Choi et al. 2006; Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004; Suon et al. 2004). Vor allen Dingen bei Protokollen, welche eine Kombination aus DMSO und BHA bzw. IBMX verwendeten (wie in den Protokollen von Woodbury et al. (2000) und Deng et al. (2001)), konnten keine mit denen der Originalstudien übereinstimmenden Ergebnisse festgestellt werden (Choi et al. 2006; Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004; Suon et al. 2004).

1.3.2 Differenzierung mittels Induktion durch Zytokine und Signalmoleküle

Um die physiologischen Bedingungen *in vivo* für die neuronale Entwicklung *in vitro* besser zu imitieren, arbeiteten Sanchez-Ramos et al. (2000) ein Protokoll zur neuronalen Differenzierung von MSC's aus, welches sich vorwiegend auf die Faktoren EGF (10 ng/ml), RA (0,5 μ M) und BDNF (10 ng/ml) stützte. Die so induzierten MSC's zeigten schnell neuronähnliche Morphologien mit kleineren, spindelförmigen Zellkörpern. In der Immunzytochemie exprimierten die auf diese Weise differenzierten Zellen zudem neuronale Marker, wie Nestin und NeuN, aber auch Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), bei gleichzeitigem Verlust des MSC-typischen Markers Fibronectin. (Sanchez-Ramos et al. 2000)

Daran Anschluss nehmend behandelten Kim und Mitarbeiter (Kim et al. 2002a) undifferenzierte humane MSC's mit einer Kombination aus FGF und RA auf mit Fibronectin beschichteten Kulturplatten und konnten so eine neuronale Entwicklung dieser initiieren. Diese wurde durch den Anstieg des neuronalen Markerproteins NF-M in der Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) auf Werte von bis zu 40% in den behandelten Zellen belegt. Allerdings reagierten die differenzierten Zellen in den elektrophysiologischen Untersuchungen nicht mit aktionspotenzialähnlichen Änderung des Membranpotenzials, sodass die Forscher davon ausgingen, dass es sich bei den gezüchteten Zellen um unreife Progenitoren neuraler Zellen handeln musste. (Kim et al. 2002a)

Erste Langzeiterfolge konnten Tao und Mitarbeiter (Tao et al. 2005) mit einem Differenzierungsprotokoll, welche u.a. die Wachstumsfaktoren bFGF, EGF und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) beinhaltete, beobachten. Auch diese Arbeitsgruppe verwendete mit Fibronectin beschichtete Kulturplatten für die Anzucht. Die so ausdifferenzierten MSC's behielten ihren neuronalen Phänotyp für eine Zeitspanne von bis zu drei Monaten. Zudem konnten neuronähnliche Zellen in der Immunfluoreszenz positiv auf Neurotransmitter oder zumindest auf neurotransmitterassoziierte Proteine, wie GABA, Tyrosinhydroxylase (TH) oder Serotonin, angefärbt werden. Des Weiteren konnte die Forschungsgruppe zeigen, dass chemische Induktionsprotokolle, die BHA und DMSO enthielten, nicht in der Lage waren neuronale Differenzierungen ähnlichen Umfangs zu initiieren. Vielmehr zeigte sich auch hier die Toxizität der verwendeten Chemikalien, sodass die veränderte Morphologie der behandelten MSC's auf Schädigungen im Zytoskelett zurückgeführt wurden. (Tao et al. 2005)

In weiteren Studien konnte, im Zusammenhang mit der neuronalen Differenzierung von MSC's, die Bildung von neurosphärenartigen Clustern, wie sie bereits im Rahmen der *in vitro* Differenzierung von NSC's bekannt sind, beobachtet werden. Ein Auftreten solcher Aggregate, welche vermutlich neuralen Progenitoren entsprechen, zeigte sich v.a. bei der Behandlung von MSC's mit bFGF und EGF. (Hermann et al. 2004; Suon et al. 2006)

Zur weiteren Untersuchung kultivierten Suon et al. (2006) die neurosphärenartigen Gebilde für 3 Stunden auf poly-Ornithin- bzw. lamininbeschichteten Kulturplatten unter Zugabe von serumfreiem Medium, angereichert mit 250 µM IBMX, 50 µM Forskolin und 200 nM Tetradecanoylphorbol-acetat (TPA), einem Proteinkinase-C-Aktivator. Anschließend wurde der Kultur für 7 Tage dbcAMP zugesetzt. Im Ergebnis zeigten sich neuronartige Zellen, die Eigenschaften dopaminerger und GABAerger Neurone aufwiesen. (Suon et al. 2006)

Auch Tropel et al. (2006) konnten nachweisen, dass die alleinige Induktion mit 25 ng/ml bFGF, in DMEM-low glucose, 2 nM Glutamin und 10% FBS zu einer Veränderung von Nagetier-MSC's hin zu Zellen mit neuronaler Gestalt führte. Außerdem kam es in diesen Zellen zu einem signifikanten zytosolischen Kalziumanstieg nach Zugabe von Neuroaktivatoren, wie Glutamat, Veratridin und Dopamin. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die differenzierten Zellen neuronentypische Rezeptoren sowie spannungsabhängige Ionenkanäle besitzen mussten. (Tropel et al. 2006)

Überblickend scheint die Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren den größten Effekt auf die neuronale Differenzierung von MSC's zu haben, wie auch Choong und Kollegen (Choong et al. 2007) feststellen konnten. Nach 10 Tagen unter einem Differenzierungsmedium, bestehend aus jeweils 10 ng/ml BDNF, EGF und NGF, zeigten die Zellen, neben der zunehmend neuronartigen Morphologie, auch positive Resultate in der Immunfärbung bezüglich neuronaler Marker, wie Neurofilament-Heavy (NF-H), GAP-43 (engl. Growth Associated Protein 43) sowie NeuN. Zusätzlich konnte die Bildung von Netzwerken zwischen den zum Teil reich verzweigten Zellfortsätzen beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass sich die undifferenzierten MSC's *in vitro* über die Stufe unreifer neuronartiger Zellen in reife Neurone entwickelt haben mussten. (Choong et al. 2007)

1.3.3 Differenzierung mithilfe von Ko-Kulturen

Neben den Ergebnissen, die Sanchez-Ramos und Mitarbeiter (Sanchez-Ramos et al. 2000) auf dem Gebiet der neuronalen Induktion mittels Zytokinen und Signalmolekülen erbrachten, konnte die Forschungsgruppe zudem den positiven Effekt der Ko-Kultivierung von MSC's mit fetalen mesenzephalen bzw. striatalen Zellen der Ratte herausstellen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von NeuN und GFAP in diesen Zellen nach Ko-Kultivierung gesteigert werden konnte. Die Forscher bestärkten somit die Hypothese, dass neben der Induktion mittels trophischer Faktoren und Zytokinen, auch direkte Zell-zu-Zell-Kontakte für die neuronale Differenzierung von MSC's grundlegend zu sein scheinen. (Sanchez-Ramos et al. 2000)

Ebenso führte die Ko-Kultivierung von MSC's mit Astroblasten zu einer vermehrten neuro-glialen Markerexpression, wie Bossolasco et al. (2005) zeigen konnten.

Dieses Ergebnis unterstützt auch die Resultate von Song und Mitarbeitern (Song et al. 2002a; Song et al. 2002b), welche die Bedeutung von hippocampalen Astrozyten auf die neuronale Reifung von NSC's sowie auf deren Ausbildung von funktionalen Synapsen herausstellen konnten.

Darüber hinaus konnten Jiang und Mitarbeiter (Jiang et al. 2003) beobachten, dass die Ko-Kultivierung von Nagetier-MAPC's mit Astrozyten zu einem verlängerten Überleben der Zellen *in vitro* führte. Zusätzlich nahmen diese Zellen vermehrt die Optik reifer Neurone an, da beispielsweise vermehrt Axonaussprossungen gesehen werden konnten. Neben den morphologischen Veränderungen, zeigten die Zellen auch vermehrt die Expression von dopaminergen, GABAergen und serotoninergen Markern. Zudem waren elektrophysiologische Charakteristiken maturer Neuronen an den ko-kultivierten Zellen nachweisbar. (Jiang et al. 2003)

Krampera und Mitarbeiter (Krampera et al. 2007) verglichen neuronal differenzierte Zellen, die zum Einen durch chemische Induktion, zum Anderen durch Ko-Kultivierung mit humanen Schwann-Zellen des Nervus cochlearis gewonnen werden konnten, auf ihre Langlebigkeit. Das chemischen Induktionsprotokoll beinhaltete, in Anlehnung an das Woodbury-Protokoll (Woodbury et al. 2000), in modifizierter Form DMEM, N2-Supplement, BHA, KCl, VPA und Forskolin für 2-16 Stunden. Nach stattgehabter Differenzierung entwickelte die Mehrheit der behandelten MSC's neuronale, gliale oder oligodendrozytäre Phänotypen. Darüber hinaus konnte in den Zellen eine generelle Hochregulation neuronaler Markerproteine festgestellt werden, welche aber nicht zwingend mit den morphologischen Veränderung korrelierte.

Bedauerlicherweise stellten sich jedoch sowohl die strukturellen, als auch die molekularbiologischen Veränderungen als reversibel heraus, da die Zellen nach Abschluss der Differenzierung ihre ursprüngliche MSC-typische Gestalt sowie ihr multipotentes Entwicklungspotenzial zurückerlangten. Dagegen zeigten MSC's, welche mit Schwann-Zellen ko-kultiviert wurden langanhaltende schwannzellähnliche Morphologien sowie die Expression schwannzelltypischer Myelinproteine über eine Dauer von bis zu 12 Tagen. Die Forschungsergebnisse demonstrieren, dass die Ko-Kultivierung mit Schwann-Zellen *in vitro* dem Milieu innerhalb des Nervs *in vivo* ähnlich sein könnte. Damit bestünde auch eine Möglichkeit zur *in vivo*-Differenzierung von Schwann-Zellen aus MSC's, welche zuvor ins zentrale bzw. periphere Nervensystem eingebracht wurden, sodass sich der regenerative Effekt einer solchen Differenzierung, beispielsweise in der Folge traumatischer Läsionen, ausnutzen ließe. (Krampera et al. 2007)

Insgesamt erscheint damit die Ko-Kultivierung von MSC's mit den unterschiedlichsten neuronalen bzw. glialen Zelltypen, auch in Kombination mit den geeigneten Differenzierungsprotokollen, als ein vielversprechender Ansatz zur Differenzierung reifer Neurone.

1.3.4 Differenzierung mittels „Genetic Engineering“

Das Interesse an der Manipulation des genetischen Pools der MSC's liegt derzeit in der Überexpression von Genen, welche für die neuronale Entwicklung und Funktion relevant sind. Diese bieten somit einen Angriffspunkt für zahlreiche Forschungsprojekte. Die wohl wichtigsten Beispiele für eine durch Transfektion herbeigeführte Überexpression von Genen sollen im Folgenden besprochen werden.

► Kohyama et al. (2001) transfizierten MSC's mit dem Noggin-Gen. Diese Transfektion führte dazu, dass die Zellen *in vitro* Aggregate formten und sich in der Folge vom Boden der Kulturschale abhoben, um neurosphärenähnliche Cluster zu bilden. Diese Aggregate wurden daraufhin auf poly-l-Ornithin- bzw. fibronectinbeschichteten Kulturplatten angezüchtet und erhielten zusätzlich ein zytokinbasiertes Differenzierungsmedium. Im Laufe des Experimentes zeigten die Zellen, von welchen immunzytochemisch mehr als 50% den Marker Microtubuli-assoziiertes Protein-2 (MAP-2) exprimierten, zunehmend eine neuronähnliche

Morphologie mit refraktilen, runden Zellkörpern und charakteristischem Axonwachstum. Darüber hinaus reagierten diese Zellen auf einen depolarisierenden Stimulus mit dem Einstrom von Kalziumionen. (Kohyama et al. 2001)

► Dezawa und Mitarbeiter (Dezawa et al. 2004) hingegen führten an humanen sowie an MSC's der Ratte eine Gentransfektion an der Notch Intracellular Domain (NICD) durch und behandelten die transfizierten Zellen zusätzlich mit Differenzierungsmedien, bestehend aus bFGF, Forskolin und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) sowie Glial cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF) oder BDNF/NGF. Daraufhin reagierten die transfizierten differenzierten Zellen sowohl mit einer neuronalen Optik als auch mit der Expression einiger spezifischer NSC-Marker. Zudem generierten einige Zellen eine gewisse elektrophysiologische Aktivität, in Form von Aktionspotenzialen, durch das Vorhandensein spannungsabhängiger Natrium- sowie „delayed rectifier“-Kaliumströme. Zusätzlich konnten die Zellen auch in Tiermodellen zum Morbus Parkinson entsprechende Funktionen zeigen, sodass diese Methode im Rahmen neurorekonstruktiver Ansätze erhöhte Relevanz besitzt. (Dezawa et al. 2004)

► Derweil brachten Zhao et al. (2004) das BDNF-Gen, mittels Transduktion durch retrovirale Vektoren, in humane MSC's ein und behandelten die Zellen zusätzlich mit RA, was zu einer Differenzierung der Zellen in Richtung der neuronalen Linie, unter vermehrter Expression der entsprechenden Marker NeuN, Oberflächenantigen 4 (O4) und GFAP, führte. Im Rahmen von patch-clamp-Versuchen konnten außerdem spannungsabhängige Kalium- und Kalziumströme in diesen Zellen festgestellt werden. (Zhao et al. 2004)

1.3.5 Kombinierte Differenzierungsansätze

Einige Forschungsgruppen stellten ihre Differenzierungsprotokolle auch durch Kombination der einzelnen Ansätze zusammen. Solche Protokolle enthalten bisher v.a. Elemente aus der zytokinbasierten sowie der chemischen Induktion. Hierbei seien insbesondere Faktoren zur Steigerung des cAMP-Spiegels oder Antioxidanzien, wie beispielsweise Edaravone, genannt (Long et al. 2005c; Suon et al. 2006; Tondreau et al. 2008; Zeng et al. 2011).

Scintu und Kollegen (Scintu et al. 2006) untersuchten verschiedene Protokolle auf ihre Effektivität bezüglich der neuronalen Differenzierung von Stammzellen. Dabei verglichen sie ein rein chemisches Protokoll mit einer kombinierten Variante aus chemischer und zytokinbasierter Induktion. So wurden zum Zwecke der chemischen Induktion lediglich RA und β -ME eingesetzt, während das Alternativprotokoll, neben TPA, Forskolin und IBMX auch Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1 (FGF-1) enthielt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Induktion mit dem kombinierten Protokoll schneller, also innerhalb von 24 Stunden, neuronenähnliche Morphologien ausbildeten, welche sich zudem prägnanter darstellten als nach rein chemischer Induktion. Hingegen konnte die Expression neuronaler und glialer Marker, wie die von NF, GFAP, TUJ-1 und NSE, sowie die verstärkte Transkription des neurogeneserelevanten Transkriptionsfaktors Hes I (engl. hairy and enhancer of split-1) in den differenzierten Zellen beider Protokolle in gleichem Maße festgestellt werden. Damit konnte auch erstmals die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der neuronalen Induktion von MSC's festgestellt werden. (Scintu et al. 2006)

Eine besondere Variante arbeiteten Tatard et al. (2007) aus, indem sie in mehreren Schritten sogenannte MIAMI-Zellen (engl. Marrow-isolated adult multilineage inducible) *in vitro* neuronal ausdifferenzierten. Das entsprechende Protokoll umfasste drei Stufen, in denen Zytokine und Signalstoffe, wie bFGF, NGF und BDNF, sowie chemische Induktoren, u.a. BHA und β -ME, mit pharmakologischen Faktoren, wie Forskolin, VPA, Humaninsulin und Hydrocortison, kombiniert wurden. Die auf diese Weise differenzierten Zellen entwickelten neuronähnliche Morphologien unter Ausbildung eines komplex verzweigten Neuritenwachstums. Neben den molekularbiologischen Untersuchungen, in denen eine positive Expression neuronaler Markerproteine nachgewiesen werden konnte, wurden die Zellen außerdem elektrophysiologischen Experimenten zugeführt, welche diesen Charakteristiken ähnlich zu denen reifer Neurone zuschreiben konnten. (Tatard et al. 2007)

Andere wiederum kombinierten auch Ko-Kultur-Systeme mit der zytokinbasierten Induktion (Jiang et al. 2003).

Wie Dezawa und Kollegen zeigten, ist zusätzlich zum „genetic engineering“ der Zellen auch eine Induktion mittels Zytokinen möglich (Dezawa et al. 2004).

1.4 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

1.4.1 Neurotrophine

Die Neurotrophine gehören zu den basischen Proteinen und besitzen eine Molekülmasse von 13 kDa (Allendoerfer et al. 1994; Lewin und Barde 1996; Lindsay et al. 1994). Ihre Gruppe umfasst im Großen und Ganzen sechs verschiedene Typen, nämlich die Faktoren NGF, BDNF, Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) sowie Neurotrophin-6 (NT-6) und Neurotrophin-7 (NT-7) (Huang und Reichardt 2001; Lewin und Barde 1996), wobei die beiden Letzteren bisher nur in Fischen nachgewiesen werden konnten und wohl möglich nur eine geringe bis gar keine Bedeutung in Säugetieren und Vögeln besitzen (Götz et al. 1994; Nilsson et al. 1998). Neurotrophine sind Signalstoffe des Körpers, welche sowohl an Differenzierung und Wachstum, als auch an Überleben, Plastizität und Apoptose von Nervenzellen beteiligt sind (Eide et al. 1993; Kaplan und Miller 2000; Korsching 1993).

Hierbei konnte eine vermehrte Expression von NT-3 in eher unreifen Regionen des ZNS, welche im Rahmen von Proliferation, Migration und Differenzierung neuraler Präkursoren wichtig sind, festgestellt werden, während BDNF im Laufe des Reifungsprozesses dieser Regionen vermehrt exprimiert wird. Die Expression von NGF scheint dagegen keinem festen Schema zu folgen und konnte zu allen Zeitpunkten der Entwicklung in variierenden Mengen detektiert werden. (Maisonpierre et al. 1990)

Ihre Wirkung entfalten die Neurotrophine über zwei voneinander unabhängige Arten von Rezeptoren (siehe Abbildung 11). Zum Einen über den „low-affinity neurotrophin receptor“ (p75 NTR), zum Anderen über die „high-affinity tyrosine kinases receptors“ (Trk-Rezeptoren), welche aus den drei Mitgliedern TrkA, TrkB und TrkC bestehen (Bothwell 1991; McAllister 2001; McAllister et al. 1999; Lindsay et al. 1994; Segal und Greenberg 1996).

Während NGF v.a. TrkA aktiviert, bindet BDNF vornehmlich an TrkB. NT-3 hat die Fähigkeit, unter speziellen Bedingungen, an alle Rezeptoren der Trk-Familie zu binden, aktiviert jedoch TrkC am stärksten. (McAllister 2001; McAllister et al. 1999)

Durch Bindung der Neurotrophine an ihre Rezeptoren können die verschiedensten Signalwege, darunter auch die Kaskaden der MAP-, Phosphoinositid-3 (PI-3) - und Jun-Kinasen, aktiviert werden (Huang und Reichardt 2001). Über den Trk-Signalweg werden v.a. das Überleben und die Differenzierung neuronaler Populationen unterstützt

(Allsopp et al. 1994; Chao 2003; Huang und Reichardt 2001). Dahingegen kommt es durch die Bindung von Neurotrophinen an den p75 NTR, welcher ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie repräsentiert, zusätzlich zur Induktion des neuronalen Zelltods durch Apoptose v.a. in späteren Stadien der Zellentwicklung (Barrett und Bartlett 1994; Chao 2003; Frade und Barde 1999). Bei Abwesenheit des Rezeptors zeigen sich jedoch Störungen im Axonwachstum *in vitro* sowie *in vivo* und eine gestörte Zielinnervation im Tierversuch (Bentley und Lee 2000; Lee et al. 1994). Die Interaktion der Neurotrophine mit ihren Rezeptoren spielt vor allen Dingen im Rahmen der neuronalen Entwicklung, insbesondere zu Zeiten von Differenzierung und Wachstum der Nervenzellen, eine wichtige Rolle (Davies 1994), sodass auch die Ausschüttung der Neurotrophine sowie die Expression ihrer Rezeptoren in diesen Phasen am größten sind (McAllister et al. 1999).

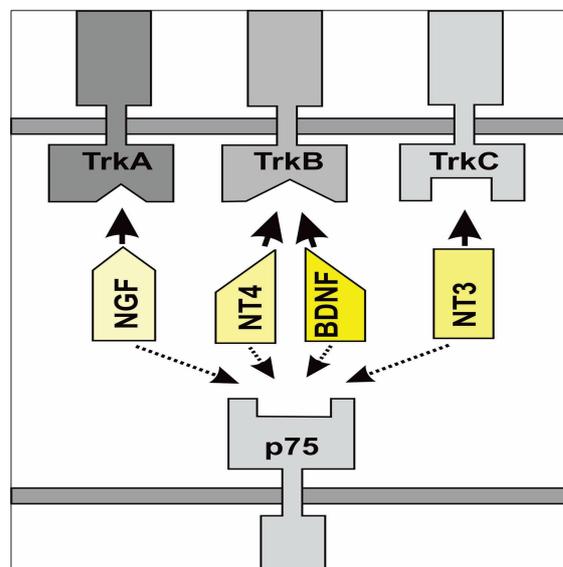


Abbildung 11:

Bindungen der Mitglieder der Neurotrophin-Familie an ihre Rezeptoren (Abb. aus von Bohlen und Halbach, 2010). Die Trk-Rezeptoren gehören zu den „high affinity tyrosine kinases receptors“. Während NGF v.a. TrkA aktiviert, binden BDNF sowie NT-4 an TrkB. NT-3 bindet hauptsächlich an den TrkC-Rezeptor..

Auch in der Zellkultur konnte der positive Effekt von NGF auf die Proliferation und Differenzierung neuronaler Präkursoren nachgewiesen werden (Cattaneo und McKay 1990). Als sogenannte „target-derived trophic factors“ haben die Neurotrophine zudem Bedeutung in Bezug auf das Überleben bestimmter Typen peripherer Neurone (McAllister 2001). Besonders dem Faktor NGF wird eine spezielle Funktion in der

Erhaltung der Viabilität sensorischer und sympathischer Neurone *in vitro* und *in vivo* zugeschrieben (Levi-Montalcini 1987).

Doupe und Mitarbeiter (Doupe et al. 1985) stellten in ihrem Experiment u.a. die Wirkung von NGF auf chromaffine Zellen des Nebennierenmarks der Ratte der von Glukokortikoiden, wie Dexamethason, gegenüber. Die Wissenschaftler fanden heraus, dass Glukokortikoide zwar relevant für Überleben und Differenzierung der Zellen waren, diese Wirkungen jedoch bei Fehlen der Steroide genauso von NGF übernommen werden konnten. Darüber hinaus waren die Zellen nach NGF-Behandlung, durch die Induktion des Neuritenwachstums, optisch nicht mehr eindeutig von reifen sympathischen Neuronen zu unterscheiden (Doupe et al. 1985).

Die Verfügbarkeit von Neurotrophinen hat zudem Einfluss auf die funktionelle Identität der Neurone (Lewin und Barde 1996). Eine limitierte Sekretion von Neurotrophinen scheint dabei mit der Zahl der innervierenden Neurone und der Größe der Zielzellpopulation zusammenzuhängen (Huang und Reichardt 2001). Darüber hinaus haben die Neurotrophine, insbesondere NGF, auch Einfluss auf das Neuriten- bzw. Dendritenwachstum im PNS (Snider et al. 1988; Lindsay et al. 1994) und ZNS (McAllister et al. 1999) sowie auf die elektrische Erregbarkeit der Neurone (McAllister et al. 1999). So konnten Lu und Mitarbeiter (Lu et al. 2005) beobachten, dass BDNF-transfizierte MSC's zu einer Steigerung des Axonwachstums im Rahmen von Rückenmarksverletzungen beitragen konnten.

Zudem konnte für NGF und weitere neurotrophe Vertreter eine maßgebliche Beteiligung an der Expression spannungsabhängiger Natrium- (Toledo-Aral et al. 1997), Kalium- (Adamson et al. 2002; Sharma et al. 1993) und Kalziumkanäle (Levine et al. 1995) festgestellt werden. Die einzelnen Neurotrophine zeigen dabei unterschiedliche Wirkungen. So trägt NGF zu einer Dichteerhöhung aller spannungsabhängigen Ionenkanäle bei. BDNF und NT-3 hingegen zeigen zueinander gegensätzliche Effekte. Durch die selektive Erhöhung der Expression von Natrium- und Kalziumkanälen, steigert BDNF die Erregbarkeit der Zellen. Im Unterschied dazu mindert NT-3 deren Erregbarkeit durch vermehrte Expression von Kaliumkanälen. (McAllister et al. 1999)

Außerdem wurde vermutet, dass Neurotrophine auch als Regulatoren der strukturellen und synaptischen Plastizität fungieren könnten, was durch weitere Forschungsarbeit noch genauer herausgearbeitet werden sollte (Bonhoeffer 1996; Snider und Lichtman 1996).

1.4.2 Die GDNF-Familie

Als erster Vertreter dieser Gruppe konnte GDNF im Jahre 1993 als trophischer Faktor, sezerniert von einer Gliazelllinie der Ratte, identifiziert werden (Lin et al. 1993).

Lin und Mitarbeiter (Lin et al. 1993) zeigten daraufhin, dass GDNF die Fähigkeit besitzen musste das Überleben von dopaminergen Nervenzellen im embryonalen ventralen Mittelhirn zu fördern, was auch am Tiermodell zum Morbus Parkinson bestätigt werden konnte (Hoffer et al. 1994). Grondin und Gash (1998) kamen zu dem Schluss, dass GDNF den neurotoxininduzierten Zelltod von dopaminergen Neuronen des nigrostriatalen Systems verhindern und zudem zu deren funktioneller Erholung beitragen kann. Ähnliche Wirkungen ließen sich zudem an spinalen Motoneuronen (Henderson et al. 1994) und zentralen noradrenergen Nervenzellen (Arenas et al. 1995) reproduzieren.

Weitere Liganden der GDNF-Familie (GFL), welche im weiteren Sinne der Superfamilie des Transforming Growth Factor- β (TGF- β) unterzuordnen sind (Airaksinen et al. 1999), konnten in der Folge ausgemacht werden. Dazu zählen Neurturin (NRTN) (Kotzbauer et al. 1996), Persephin (PSPN) (Milbrandt et al. 1998) sowie Artemin (ARTN) (Baloh et al. 1998), die ebenfalls im Rahmen des Überlebens von neuronalen Populationen des ZNS (Baloh et al. 1998; Horger et al. 1998; Milbrandt et al. 1998) eine Rolle spielen. Darüber hinaus zeigen GDNF, ARTN und NRTN, ähnlich wie die Neurotrophine, einen zusätzlichen Effekt auf das PNS (Baloh et al. 1998; Kotzbauer et al. 1996).

Alle GFL übertragen ihre Signale durch Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RET) (Takahashi 2001). Allerdings kann der Rezeptor nur durch vorherige Bindung des GFL an einen Vertreter einer Proteinklasse von GDNF-family receptor- α (GFR α) aktiviert werden. Der GFR α steht mit der Plasmamembran über eine Art Glycosyl-Phosphatidylinositol- oder kurz GPI-Anker in Verbindung. Insgesamt lassen sich vier verschiedene GFR α Rezeptoren (GFR α 1-4) unterscheiden, welche die Ligandenspezifität des GFR α -RET-Komplexes vorgeben. So bindet GDNF beispielsweise an GFR α 1, bevor es mit der RET einen Gesamtkomplex bilden kann. (Airaksinen et al. 1999; Baloh et al. 2000; Takahashi 2001). Unabhängig von der RET, kann die Signaltransduktion aber auch, insbesondere bei Fehlen der Ersteren, über ein Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) erfolgen (Sariola und Saarma 2003).

Die ausgelösten Signalkaskaden entsprechen zu einem großen Teil denen der Neurotrophine (Takahashi 2001). So wurden beispielsweise in zentralen sensorischen Neuronen Kooperationen zwischen GDNF und BDNF nachgewiesen, wobei diese als „target-derived neurotrophic factors“ durch simultanes Wirken am Überleben der Nervenzellen teilhaben (Erickson et al. 2001). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich die GDNF-Familie sowie die Neurotrophine in ihren Wirkungen auf die neuronale Entwicklung überlappen (Baloh et al. 2000).

1.4.3 Das Neurokin CNTF

CNTF wurde erstmals durch mehrere Forschergruppen als löslicher Faktor mit trophischer Aktivität, isoliert aus Geweben embryonaler Hühneraugen, beschrieben (Adler et al. 1979; Manthorpe et al. 1980).

Zusammen mit den Zytokinen Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Gearing et al. 1987), IL-6 (Kishimoto et al. 1992), Interleukin-11 (IL-11) (Yang 1993), Cardiotrophin-1 (CT-1) (Pennica et al. 1995), Oncostatin-M (OSM) (Rose und Bruce 1991), Cardiotrophin-Like Cytokine (CLC) (Shi et al. 1999) und Neuropoietin (Derouet et al. 2004), gehört CNTF zur Familie der Neurokine, welche vielfältige Funktionen ausüben.

So unterstützen sie beispielsweise die Differenzierung von Gliazellen des ZNS bei gleichzeitiger Inhibition der neuronalen Differenzierung über die Januskinase-(JAK)/Signal Transducers and Activators of Transcription-(STAT)-Signalkaskade (Bonni et al. 1997). Hughes und Mitarbeiter erkannten beispielsweise den induzierenden Effekt von CNTF auf die *in vitro* Differenzierung der oligodendrozytären Vorläuferzellen O-2A in Typ-2-Astrozyten (Hughes et al. 1988). Auch Marmur et al. (1998) konnten bestätigen, dass CNTF sowie LIF mit großer Wahrscheinlichkeit als Promotoren zur Differenzierung von oligodendroglären Progenitoren beitragen.

Darüber hinaus sind die Neurokine an anderer Stelle aber auch für das Überleben von Nervenzellen und deren Reparatur *in vitro* sowie *in vivo* zuständig. So wirkt CNTF protektiv auf Neurone des Striatums und verhindert deren Apoptose, wie durch Saudou und Mitarbeiter in einem Tiermodell zu der Erbkrankheit Chorea Huntington (HD) gezeigt werden konnte (Saudou et al. 1998).

Weiterhin beobachteten Ye und Houle (1997), dass CNTF die axonale Regeneration sowie das Überleben von supraspinalen Nervenzellen nach Rückenmarksverletzungen fördern kann. Außerdem konnten CNTF, LIF und IL-6 in der Traumaforschung als

sogenannte „Überlebensfaktoren“ identifiziert werden, da sie das Überleben spinaler Motoneurone nach Axotomie sicherstellen konnten (Helgren et al. 1994; Ikeda et al. 1996; Sendtner et al. 1990). Zudem konnten LIF und CNTF als wichtige Faktoren für den Erhalt der Pluripotenz von ESC's identifiziert werden (Conover et al. 1993; Metcalf 2003). Insgesamt wirkt insbesondere CNTF als sog. „lesion factor“ und weniger als „target-derived neurotrophic factor“ (Sendtner et al. 1990).

Im Zusammenspiel mit NGF und bFGF fördert CNTF außerdem die Differenzierung von sympathoadrenalen Progenitorzelllinien, wie Ip und Mitarbeiter herausstellen konnten (Ip et al. 1994).

Ihre Wirkung entfalten die Neurokine durch gemeinschaftliche Bindung an Untereinheiten des Glykoprotein-130-Rezeptors (gp130-Rezeptor) bzw. an Leukemia-Inhibitory-Factor-Receptor β (LIFR- β), welche als Rezeptor-Tyrosinkinase die Signaltransduktion sowohl über die JAK/STAT- als auch die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-(MAPK)-Kaskade auslösen können (Heinrich et al. 1998; Ihara et al. 1997; Taga und Kishimoto 1997).

CNTF hingegen bindet zuerst spezifisch an CNTF-Rezeptor- α (CNTR- α), welcher mit den Transmembranuntereinheiten von gp130 und LIFR- β zwecks Signaltransduktion einen Komplex bildet (Davis et al. 1993; Ip et al. 1992; Stahl et al. 1993). Auf die gleiche Weise binden auch CLC und Neuropeptin (Derouet et al. 2004).

Im Gegensatz zu den Neurotrophinen ist das CNTF ein eher zytosolisches und kein sekretorisches Molekül (Sendtner et al. 1991). So wird CNTF v.a. postnatal durch Schwann-Zellen und Typ-1-Astrozyten des PNS und ZNS sowie durch Neuronen des Sehnerven und des Bulbus olfactorius sezerniert, und weniger durch die verschiedenen Zielgewebe (engl. target tissues) selbst (Sendtner et al. 1991; Stöckli et al. 1991). Darüber hinaus ist der Faktor CNTF weniger stark im Rahmen der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung des ZNS, mittels Northern Blot bzw. PCR-Analyse, als CLC oder Neuropeptin detektierbar. (Derouet et al. 2004; Sendtner et al. 1991; Sendtner et al. 1994; Uemura et al. 2002).

Zusammenfassend stellen die Neurokine eine Gruppe mit großem therapeutischen Potenzial im Rahmen degenerativer Nervenerkrankungen dar, wobei sich v.a. ihr positiver Einfluss auf das Überleben von Motoneuronen als besonders relevant erweist.

1.4.4 Wachstumsfaktoren

1.4.4.1 Die FGF-Familie

Das Polypeptid FGF-2 oder bFGF stellt einen der prominentesten Vertreter aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren dar. Der erste FGF, welcher aus dem Gehirn und der Hypophyse von Rindern isoliert wurde, konnte im Jahr 1974 durch Gospodarowicz beschrieben werden. Dem Forscher gelang es die mitogene Wirkung des Faktors auf die DNA-Synthese der Fibroblastenzelllinie 3T3 nachzuweisen. (Gospodarowicz 1974)

In weiteren Experimenten wurde der mitogene Effekt dieser Faktoren auf weitere Zellen der meso- sowie der neuroektodermalen Zelllinie verdeutlicht (Gospodarowicz et al. 1987; Rifkin und Moscatelli 1989).

Insgesamt existieren 22 verschiedene Vertreter (17-34 kDa) innerhalb dieser Familie, welche in den verschiedensten Organismen, von Fadenwürmern bis hin zum Menschen, ausgemacht werden konnten (Ornitz und Itoh 2001). Die Familie der FGF zeigt ein ubiquitäres Verteilungsmuster, so lassen sie sich sowohl in gesundem, als auch in malignem Gewebe *in vitro* sowie *in vivo* nachweisen, wobei die Verteilungsmuster hier nicht übereinstimmen müssen (Lobb 1988). Quellen von FGF's in gesundem Gewebe sind u.a. neuronaler Natur, aber auch in Knorpel (Lobb 1988), Knochen (Hauschka et al. 1986), Muskel (Kardami et al. 1985), Niere und Plazenta (Gospodarowicz et al. 1987) lassen sich die Faktoren finden. Zudem konnten FGF's *in vitro* beispielsweise in Fibroblasten (Moscatelli et al. 1986), Makrophagen (Baird et al. 1985) und Granulosazellen (Neufeld et al. 1987) nachgewiesen werden.

Während bFGF im postnatalen und adulten Nervensystem eine starke Verbreitung (Emoto et al. 1989; Ernfors et al. 1990; Grothe und Unsicker 1990; Grothe et al. 1991a; Riva und Mocchetti 1991; Weise et al. 1992) zeigt, unterliegt der Faktor in der Embryonalentwicklung des Nervensystems Schwankungen in der Expression (Weise et al. 1993). bFGF lässt sich vor allen Dingen mit Abschluss der neuronalen Proliferationsphase im PNS sowie im ZNS nachweisen, sodass der Faktor während der Embryonalentwicklung eher noch als trophischer bzw. Differenzierungsfaktor anstelle eines mitogenen Faktors angesehen werden kann (Weise et al. 1993).

Die Fibroblastenwachstumsfaktoren gehören zu den Signalproteinen, welche, wie oben angedeutet, zahlreiche Funktionen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus ausüben.

So übernehmen FGF's im Rahmen der embryonalen Entwicklung wichtige Aufgaben bezüglich Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -überleben und beeinflussen maßgeblich die zelluläre Morphogenese. Dagegen besitzen die Faktoren im adulten Organismus Effekte auf die Kontrolle des Nervensystems, die Wundheilung und die Angiogenese. (Eswarakumar et al. 2005; Ornitz und Itoh 2001; Schnettler et al. 2003)

Besonders auf die Wirkung von bFGF auf Zellen des Nervensystems soll im Folgenden vertieft eingegangen werden.

So gelang es Togari et al. (1983) den positiven Effekt von bFGF auf das Wachstum von Neuriten an PC12 Zellen *in vitro* nachzuweisen. In weiteren Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass bFGF auch am Überleben und der Differenzierung von Neuronen aus Hippocampus (Walicke et al. 1986) und Kortex (Morrison et al. 1986) sowie von Motoneuronen des Rückenmarks (Grothe et al. 1991b) maßgeblich beteiligt ist. Auch Murphy und Mitarbeiter (Murphy et al. 1990) bestätigten den positiven Effekt von bFGF auf die Proliferation und die Differenzierung neuronaler Präkursoren *in vitro*. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass bFGF *in vivo* womöglich den ontogenetischen Untergang von Nervenzellen des Ganglion ciliare verhindert (Dreyer et al. 1989). Weiterhin ist bFGF in der Lage die Aktivität der Cholinacetyltransferase (ChAT) in Neuronen des Rückenmarks zu steigern, wie Grothe et al. (1991b) herausfanden. Anderson und Mitarbeiter (Anderson et al. 1988) stellten den Beweis an, dass bFGF, ähnlich wie NGF, dazu in der Lage ist den Zelltod von cholinergen Neuronen nach Axotomie zu reduzieren. Des Weiteren wurde eine Förderung von Proliferation und Differenzierung durch FGF auch an Astrozyten (Morrison und de Vellis 1981) sowie Oligodendrozyten (Eccleston und Silberberg 1985) des ZNS beschrieben.

Ihre Wirkung vermitteln die FGF's durch Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK's), welche somit aktiviert werden. Diese Rezeptoren werden als „high-affinity FGF-receptors“ (FGFR1-FGFR4) bezeichnet (Givol und Yayon 1992; Jaye et al. 1992; Lee et al. 1989) und binden die verschiedenen Vertreter der FGF's mit unterschiedlich hoher Affinität (Mansukhani et al. 1992; Ornitz und Leder 1992; Partanen et al. 1991).

Dabei reguliert u.a. die Spezifität, mit der die FGF's an den Rezeptor binden, die Aktivität des jeweiligen Faktors (Ornitz et al. 1996).

Die vier RTK's bestehen typischerweise aus einer extrazellulären Domäne, welche wiederum die drei immunglobulinähnlichen Domänen D1-3 umfasst und an der die Bindung der Liganden stattfindet. Hinzu kommen eine Transmembrandomäne und eine zyttoplasmatische Domäne, welche die Tyrosinkinase als katalysierendes Enzym beherbergt. (Hunter 2000; Schlessinger 2000)

Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es in der Folge zur Phosphorylierung von Signalproteinen, wie beispielsweise von SH containing protein (Shc), Phospholipase-Cy (PLCy), STAT1, Gab1 (engl. GRB2-associated-binding protein 1) sowie FRS2 α (FGF-Rezeptor Substrat 2 α), und damit zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden. Diese Kaskaden können sowohl Einfluss auf die Zellproliferation und -differenzierung, als auch auf die Migration der Zellen und ihr Überleben haben (Eswarakumar et al. 2005).

Darüber hinaus binden FGF's aber auch an sogenannte „low-affinity-receptors“, wie Heparin oder Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), welche jedoch kein intrazelluläres Signal übertragen. Sie sind als Hilfsmoleküle beispielsweise an der Bindung von FGF's an den Rezeptor sowie dessen Aktivierung beteiligt (Lin et al. 1999; Ornitz et al. 1992; Pantoliano et al. 1994; Spivak-Kroizman et al. 1994; Yayon et al. 1991).

1.4.4.2 Die EGF-Familie

EGF konnte erstmals durch Cohen und Mitarbeiter aus der Speicheldrüse der Maus isoliert werden. In ihrem Experiment stellten die Forscher einen positiven Effekt von EGF auf den epidermalen Verhornungsprozess im Rahmen der Wundheilung fest. (Cohen und Elliott 1963)

Weitere Vertreter der EGF-Familie sind der Transforming Growth Factor- α (TGF- α) (Derynck et al. 1984; Lee et al. 1985), der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF) (Higashiyama et al. 1991; Higashiyama et al. 1992), Amphiregulin (AR) (Shoyab et al. 1988), Betacellulin (BTC) (Shing et al. 1993), Epiregulin (EPR) (Toyoda et al. 1995) sowie Epigen (Strachan et al. 2001). Durch Bindung an ihren Rezeptor zeigen die Faktoren eine Beteiligung am Überleben der jeweiligen Zielgewebe sowie an Prozessen der zellulären Proliferation und Differenzierung (Herbst 2004).

Der EGF-Rezeptor (EGFR/ErbB-1) repräsentiert einen Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (RPTK), wie er in vielen Zellen mesenchymaler und epithelialer Herkunft exprimiert wird (Wells 1999). Durch Bindung einer der oben genannten Liganden kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase mit nachfolgender Autophosphorylierung des Rezeptors sowie möglicher Effektormoleküle, was wiederum zur Einleitung intrazellulärer Signalkaskaden, wie beispielsweise über PLC γ , MAPK und STAT, führt (Tamama et al. 2006; Wells 1999; Wells et al. 1999).

Die biologischen Antworten, welche aus der Signalübertragung über den Rezeptor entstehen, können als pleiotrop bezeichnet werden. Das heißt sie können sowohl mitogen als auch apoptotisch wirken, genauso wie differenzierend und dedifferenzierend, und somit an Motilität und Proteinsekretion der Zellen beteiligt sein. (Wells 1999)

Durch die Expression von EGFR/ErbB-1 sind beispielsweise humane MSC's für den mitogenen Effekt von EGF sehr empfänglich, sodass dieser folglich für die *ex vivo* Expansion von MSC's genutzt wird (Tamama et al. 2006). Allerdings fanden Tamama und Kollegen heraus, dass EGF allein, also in Abwesenheit anderer Faktoren, nicht in der Lage war eine Differenzierung von MSC's in die osteogene, adipozytäre oder chondrogene Zelllinie zu induzieren (Tamama et al. 2006). Sodass ihre Ergebnisse denen von Kratchmarova et al. (2005) entgegenstehen, welche im Rahmen von *in vitro* Versuchen zeigen konnten, dass nach Zugabe von EGF die Differenzierung humaner MSC's in Richtung der osteogenen Zelllinie gefördert werden konnte.

In Hinblick auf die Entwicklung neuronaler Zellen werden die Ergebnisse von Tamama et al. (2006) durch andere Arbeitsgruppen unterstützt (Anchan et al. 1991; Lillien und Cepko 1992), welche einen positiven Effekt von EGF auf die *in vitro* Proliferation neuroepithelialer Zellen der Retina auch nur in Kombination des Faktors mit TGF- α bzw. FGF aufdecken konnten. Auch Richards und Mitarbeiter (Richards et al. 1992) konnten der Kombination aus bFGF und EGF eine Rolle in der *in vitro* Proliferation und Differenzierung neuraler Progenitoren zusprechen, wohingegen es unter EGF-Zugabe allein zu weniger eindeutigen Ergebnissen kam, wie die Fluoreszenzmikroskopie bzgl. der Expression von Neurofilament zeigte. Aber auch hier existieren kontroverse Ergebnisse.

So fanden Tropepe et al. (1999) heraus, dass sowohl bFGF als auch EGF alleine die Proliferation von NSC's mit nachfolgender Bildung von Neurosphären auslösen können. Ähnliche Resultate lieferten außerdem Angénieux und Mitarbeiter (Angénieux

et al. 2006), indem sie EGF, ähnlich wie bFGF, als potenten neuronalen Differenzierungsfaktor für retinale Stammzellen *in vitro* identifizieren konnten.

Unabhängig davon konnte der EGF-Familie und ihren Rezeptoren auch eine Rolle in der Differenzierung und Migration von Astrozyten im Rahmen der Hirnentwicklung nachgewiesen werden (Burrows et al. 2000).

Insgesamt erscheint eine weitere Erforschung der EGF-Familie als notwendig, um die Wirkungen der Faktoren auf einzelne Zellpopulationen genauer zu evaluieren.

1.4.5 Antioxidative Substanzen

1.4.5.1 Edaravone

In der Folge ischämischer Hirnschäden entstehen freie Radikale durch verstärkten Kalziuminflux in neuronale Zellen, welche zuvor im Rahmen der Schädigung den induzierenden Transmitter Glutamat ausgeschüttet haben (Choi 1988; Olney 1969). Durch die Bindung des Glutamats an seine Rezeptoren kommt es zu dem beschriebenen Kalziumeinstrom und zur vermehrten Bildung von ROS, welche zu Degeneration und Zelltod beitragen (Choi 1988). Dabei geht die Gefahr freier Radikale von ihrer Fähigkeit der Lipidperoxidation aus, im Rahmen derer sie mehrfach ungesättigte Fettsäuren von Lipidmembranen angreifen und diese oxidativ schädigen (Horton und Fairhurst 1987).

Edaravone (Syn. MCI-186, 3-Methyl-1-Phenyl-Pyrazolin-5-one) ist ein Radikalfänger, der im Rahmen von Hirnschämien die neuronale Schädigung reduzieren soll, indem er mit freien Radikalen aus der Gruppe der ROS, wie Hydroperoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) oder Hydroxyl-Radikalen ($\cdot OH$), interagiert und Elektronen auf diese überträgt, um sie in ihre stabilen chemischen Formen zu überführen (Yamamoto et al. 1997; Yoshida et al. 2006). Innerhalb dieses Vorgangs transformiert sich Edaravone selbst über mehrere Zwischenschritte zu der stabileren Form OPB (engl. 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid) (Kawai et al. 1997; Yamamoto et al. 1996; Yoshida et al. 2006). Die Wirkung von Edaravone ist hierbei vergleichbar mit der von Vitamin C und E, sodass eine Kombination dieser Substanzen protektiv gegen aerobe Oxidationen eingesetzt werden kann (Yamamoto et al. 1996; Yoshida et al. 2006).

Neuroprotektive Wirkung entfaltet das Edaravone außerdem durch Regulation von Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthasen. So führt Edaravone bei einer Hirnschädigung zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche protektiv den Blutfluss erhält, sowie zu einer Senkung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), welche im Rahmen inflammatorischer Stimuli durch Makrophagen, Neutrophile oder Mikroglia gebildet wird und zu einer Gewebsverletzung beiträgt. (Andrew und Mayer 1999; Otani et al. 2005; Yoshida et al. 2006)

Weiterhin konnte in einem Tiermodell zum ischämischen Insult gezeigt werden, dass Edaravone in der Lage ist sowohl die Produktion von $O_2^{\bullet-}$ und $\bullet OH$ zu inhibieren, als auch die Möglichkeit bietet das entstehende Hirnödeme nach Insult zu reduzieren (Nishi et al. 1989).

Weitere Arbeitsgruppen konnten im Rahmen von *in vivo* Versuchen zeigen, dass Edaravone zudem den zeitlich verzögerten neuronalen Zelltod in Hippocampus und Cortex, induziert durch $O_2^{\bullet-}$ und $\bullet OH$ im Rahmen der zerebralen Ischämie, unterdrücken kann und somit auch den zerebralen Schaden insgesamt reduziert (Mizuno et al. 1998; Yamamoto et al. 1997). Außerdem beobachteten Yasuoka und Mitarbeiter (Yasuoka et al. 2004), dass, nach ischämischen Ereignissen, Edaravone in der Lage ist zum Einen die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c und zum Anderen die Aktivierung der Caspase-3, als wichtige Faktoren der Apoptose, in Cortex und Hippocampus zu inhibieren.

Zudem kann auch die Aktivierung weiterer proapoptotischer Proteine bzw. Signalwege, wie die der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) (Wen et al. 2006) oder die des P38-Proteins (p38) (Niyaz et al. 2007; Wen et al. 2006), durch Edaravone geblockt werden. Insgesamt konnten die Forscher so herausstellen, dass Edaravone den Untergang von Nerven- und Gliazellen nach einer Ischämie verhindern kann (Yasuoka et al. 2004). Ishii et al. (2007) beobachteten außerdem den protektiven Effekt von Edaravone bezüglich des Überlebens und der Differenzierung von NSC's *in vitro* nach Bestrahlung.

Zeng und Mitarbeiter (Zeng et al. 2009) konnten in *in vitro* Experimenten nachweisen, dass mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks der Ratte (rBMSC's), welche mit Edaravone behandelt wurden, nicht nur neuronähnliche Gestalt annehmen, sondern auch elektrophysiologische Charakteristiken reifer Neurone, insbesondere Ströme spannungsabhängiger Kaliumkanäle, aufzeigten. Diese Ergebnisse konnten später auch durch die Kombination von Edaravone mit Zytokinen bestätigt werden (Zeng et al. 2011).

Durch seinen neuroprotektiven Effekt bieten sich für Edaravone zahlreiche Anwendungsgebiete, wie die Behandlung von akuten zerebralen Infarkten (Wu et al. 2006), traumatischen Hirnverletzungen (Itoh et al. 2009), Rückenmarksischämien (Takahashi et al. 2004) oder des Morbus Parkinson (Yuan et al. 2008).

1.4.5.2 β -Mercaptoethanol

β -ME ist eine chemische Verbindung, die sowohl eine Hydroxyl- (-OH) als auch eine Mercapto- oder Thiolgruppe (-SH) enthält, und, ähnlich wie das Edaravone, als Radikalfänger wirken kann (Salnikow et al. 2000).

Ishii und Mitarbeiter konnten im Rahmen von Zellkulturversuchen zeigen, dass β -ME in einer Konzentration von 10-50 μ M Viabilität und Differenzierung sowie das Wachstum von Neuriten fetaler Neurone aus dem Hirn der Maus unterstützt. Die Forscher sprachen β -ME sogar eine trophische Aktivität zu. (Ishii et al. 1993)

Bereits in anderen Experimenten konnte die Kontrolle von β -ME und anderen Thiolen über proliferative und wachstumsfördernde Prozesse in Lymphozyten und lymphoiden Geweben festgestellt werden (Broome und Jeng 1973; Ishii et al. 1981a; Ishii et al. 1981b).

Darüber hinaus zeigten Grill und Pixley durch short-term *in vitro* Versuche an ORN's (engl. olfactory receptor neurons) sowie embryonalen Neuronen des Hippocampus und des Cortex, dass das Überleben dieser Zelltypen durch das Wachstum dieser in β -ME-haltigem Medium unterstützt werden konnte, was sie als thiol-spezifischen Effekt ausmachten. Weiterhin stellten sie die Hypothese auf, dass β -ME an der Aufnahme von Cystein bzw. Cystin und damit akzessorisch am antioxidativen System von Neuronen beteiligt sein könnte oder sogar als Reduzent auf direktem Wege oxidativen Stress vermeidet. (Grill und Pixley 1993)

Auch Woodbury et al. (2000) konnten beobachten, dass mesenchymale Zellen des Knochenmarks (BMSC's) in Anwesenheit von β -ME bzw. DMSO neuronenähnliche Morphologien annahmen und mit der Expression neuronaler Markerproteine, wie NSE und Neurofilament, reagierten. In der Folge nutzten auch andere Forschungsgruppen, wie Tatard und Mitarbeiter (Tatard et al. 2007), β -ME in Kombination mit weiteren Differenzierungsfaktoren erfolgreich im Rahmen der neuronalen Differenzierung von MSC's.

1.4.6 Pharmaka

1.4.6.1 Valproinsäure

Im Allgemeinen wird die VPA als ein Medikament zur Langzeitbehandlung von Epilepsien genutzt (Blaheta und Cinatl 2002; Carraz et al. 1964; Chapman et al. 1982). Darüber hinaus gehört VPA auch zur Gruppe der Histondeacetylase-(HDAC)-Inhibitoren, deren Aktivierung folglich zur Hyperacetylierung von Histonen führt (Göttlicher et al. 2001), welche neben der DNA einen weiteren Bestandteil des Chromatins darstellen. Diese Funktion der VPA konnte in verschiedenen Zelllinien, wie beispielsweise HEK293T, Neuro2A und F9 Zellen, nachgewiesen werden (Phiel et al. 2001). In den verschiedensten Tumorzelllinien zeigte sich zudem ein supprimierender Effekt von VPA auf das Wachstum und das Metastasierungsverhalten sowie ein aktivierender Einfluss auf die Differenzierung der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* (Blaheta und Cinatl 2002; Ciantl et al. 1997; Göttlicher et al. 2001).

Weiterhin wird der VPA durch die Aktivierung der extrazellulären signal-regulierten Kinase (ERK) (Yuan et al. 2001) sowie durch die Inhibition proapoptotischer Faktoren bzw. Proteine (Chen et al. 1999) eine neuroprotektive Wirkung zugesagt.

Darauf Bezug nehmend konnten Hsieh und Mitarbeiter (Hsieh et al. 2004) mithilfe von *in vitro* sowie *in vivo* Experimenten zeigen, dass VPA in der Lage ist die Differenzierung neuraler Progenitoren des adulten Hippocampus zu induzieren. Gleichzeitig beobachteten sie, dass die Differenzierung von Astro- und Oligodendrozyten durch VPA verhindert werden konnte. Die Forscher vermuteten, dass VPA diese Fähigkeiten über eine Induktion und eine damit verbundene Hochregulation neuronaler Transkriptionsfaktoren, wie NeuroD (engl. Neurogenic Differentiation), ausübt. (Hsieh et al. 2004)

Laeng und Mitarbeiter (Laeng et al. 2004) arbeiteten zudem das Gen Cyclin D2, welches an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, als weiteren Angriffspunkt von HDAC-Inhibitoren heraus.

Auch Siebzehnruhl et al. (2007) konnten im Rahmen von *in vitro* Versuchen mit adulten Präkursoren, welche der Subventrikularzone entstammten, eine Induktion der Zellen in Richtung der neuronalen Linie durch deren Behandlung mit HDAC-Inhibitoren beobachten.

Darüber hinaus fand VPA auch im Differenzierungsprotokoll von Tatard und Mitarbeitern Verwendung (Tatard et al. 2007). Der Forschungsgruppe gelang es unter dem Einfluss von VPA sowie einer Reihe weiterer Faktoren, aus MSC's neuronenähnliche Zellen zu differenzieren, welche zudem dopaminerge Eigenschaften zeigten (Tatard et al. 2007).

Insgesamt scheint die modulierende Wirkung der VPA auf die neuronale Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen ein vielversprechender Ansatz im Rahmen der Krebsforschung aber auch des „tissue engineering“ zu sein.

1.4.6.2 Forskolin

Das Diterpen Forskolin lässt sich aus den Wurzeln der Pflanze *Coleus forskohlii* extrahieren (Bhat et al. 1977). Der Stoff wird im Rahmen von Zellkulturversuchen zur Steigerung des intrazellulären Spiegels an cAMP, durch Aktivierung der Adenylzyklase (AC), verwendet (Metzger und Lindner 1981; Seamon et al. 1981). Stoffe mit ähnlicher Wirkung sind beispielsweise IBMX oder dbcAMP (Deng et al. 2001).

Im Jahr 1981 identifizierten Seamon und Mitarbeiter (Seamon et al. 1981) Forskolin als ubiquitären Aktivator eukaryotischer AC's. Durch intrazelluläre Bindung von cAMP an regulatorische Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) und der damit verbundenen Aktivierung dieser, können zahlreiche Prozesse auf zellulärer Ebene vermittelt werden (Brindle und Montminy 1992; Harootunian et al. 1993). Explizit auf Nervenzellen bezogen seien hier exemplarisch das Wachstum neuronaler Fortsätze (Hernandez et al. 1995) sowie die Entstehung neuer Synapsen genannt (Poser und Storm 2001; Weisskopf et al. 1994).

Im Rahmen des MAPK-Signalwegs phosphoryliert die PKA das Rap1 (engl. Ras-related protein 1), welches dadurch einen Komplex mit dem B-Raf (engl. rapidly accelerated fibrosarcoma B-Protein) bildet, um wiederum über die Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinasen 1/2 (MEK1/2), die ERK 1/2 oder MAPK zu aktivieren, was schlussendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern in Gang setzt (Cobb 1999; Kim et al. 2005). Ein solcher Ablauf der Kaskade konnte beispielsweise in PC12-Zellen nachgewiesen werden (Burgering et al. 1993).

Darüber hinaus zeigt Forskolin, neben seiner Fähigkeit der AC-Aktivierung mit nachfolgender Auslösung der Kaskade, auch Wechselwirkungen mit Glukosetransportern (Wadzinski et al. 1987) und bestimmten Ionenkanälen (Ono et al. 1995).

Auf der Grundlage zahlreicher Experimente konnte Forskolin auch eine Rolle in der neuronalen Differenzierung von MSC's zugeschrieben werden.

So beobachteten Kim et al. (2005), dass Forskolin das Potenzial hat durch Aktivierung des MAPK-Signalwegs in humanen MSC's sowohl eine neuronale Morphologie als auch die Expression neuronaler Marker, wie die von NSE und Neurofilament 200 (NF200), zu induzieren. Um ihre Ergebnisse zu verifizieren nutzten die Forscher PD98059 (Syn. 2'-amino-3'-methoxyflavone), einen MAPK-Inhibitor mit dem Potenzial die ERK zu blockieren. PD98059 führte in den behandelten Zellen zu einer Blockade, der durch Forskolin induzierten Effekte bezüglich Zellmorphologie und Proteinexpression. Die Forscher konnten damit zeigen, dass der ERK eine bedeutende Rolle im Rahmen der neuronalen Differenzierung von MSC's zukommen muss. (Kim et al. 2005)

Ähnliche Ergebnisse lieferten zuvor auch Deng et al. (2001), die den MSC's nach *in vitro* Behandlung mit IBMX und dbcAMP ebenfalls eine neuronenähnliche Gestalt sowie eine erhöhte Expression von NSE und Vimentin zuschreiben konnten. Sie vermuteten dabei eine Differenzierung der MSC's in frühe neuronale Progenitoren, da die Expression von Markerproteinen reifer Neurone, wie die von MAP-2, ausblieb (Deng et al. 2001).

Jang und Mitarbeiter (Jang et al. 2010) nutzten für ihre *in vitro* Experimente humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (hADSC's), welche sie in der Folge mit bFGF und Forskolin behandelten. Auch mit diesem Differenzierungsprotokoll ließ sich eine neuronale Induktion der Stammzellen einleiten. Die differenzierten Zellen zeigten verschiedene Typen neuronaler und glialer Morphologien. Zudem kam es in den behandelten hADSC's zu einem Anstieg sowohl von stammzelltypischen (Nestin) und neuronalen (TuJ-1, MAP-2, Neurofilament-Light (NF-L), NF-M, NSE, NeuN), als auch von astro- (GFAP) und oligodendrozytären Markerproteinen (2',3'-Cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase, (CNPase)), wie immunozytochemische Untersuchungen zeigen konnten. Darüber hinaus ließen sich in den Zellen nach Differenzierung spannungsabhängige TTX-sensitive Natrium- und auswärtsgerichtete Kaliumströme sowie ein negatives Ruhemembranpotential in der whole-cell patch-clamp-Untersuchung nachweisen. Diese Ergebnisse konnten die Wissenschaftler mittels RT-

PCR bestätigen, in welcher eine erhöhte Expression von Genen, die für Natrium- (SCN5A), Kalium- (Large-conductance calcium-activated potassium channel (MaxiK), Kv4.2, eather-a-go-go Kanaltyp 2 (EAG2)) und Kalziumkanäle (CACNA1C und CACNA1G) codieren, festgestellt werden konnte. Außerdem konnten mithilfe des Differenzierungsprotokolls drei Ionenkanal-codierende Gene, dazu zählen Nav1.7, Kv4.3 sowie Eag1, ganz neu induziert werden, was eine Differenzierung der Stammzellen in Richtung der neuronalen Linie wahrscheinlich machte. Jang und Kollegen stellten im Rahmen dieses Versuches zum Einen die Fähigkeiten von hADSC´s bezüglich ihrer Selbsterneuerungskapazität sowie Multipotenz und zum Anderen die Möglichkeit, mithilfe eines forskolinhaltigen Differenzierungsprotokolls, die Entwicklung funktionsfähiger Neuronen aus Stammzellen zu fördern, heraus. (Jang et al. 2010)

1.4.6.3 JAK-Inhibitoren

Die Gruppe der JAK-Inhibitoren ist in der Lage durch Blockade der entsprechenden Janus-Kinasen (JAK1-3, TYK2) den JAK-STAT-Signalweg zu unterbrechen, welcher einen wichtigen Baustein im Rahmen von Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -apoptose darstellt (Rawlings et al. 2004).

Normalerweise kommt es durch Bindung, beispielsweise von Zytokinen, an ihren Rezeptor durch Transphosphorylierung zu einer Aktivierung zytoplasmatischer Proteine der JAK-Familie. Durch diesen Vorgang entstehen am Rezeptor Bindungsstellen für das STAT-Protein, dessen Familie 7 Gene umfasst (STAT1-4, 5A, 5B, 6). Durch Bindung kommt es zur Phosphorylierung dieser durch die JAK-Kinasen. In der Folge schließen sich immer zwei STAT´s zu einem Dimer zusammen, um im Anschluss im Zellkern die Transkription bestimmter Gene zu induzieren. (Aaronson und Horvath 2002)

Während die Janus-Kinasen JAK1, JAK2 und die Tyrosinkinase TYK2 ein nahezu ubiquitäres Vorkommen zeigen, wird JAK3 v.a. in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Kawamura et al. 1994).

Nach heutigem Kenntnisstand könnten die Inhibitoren der JAK, vordergründig sei hier der JAK3-Inhibitor genannt, durch ihren immunsuppressiven Effekt im Rahmen von Krebs- oder inflammatorischen Erkrankungen (Kontzias et al. 2012; Kremer et al. 2009;

Pesu et al. 2008) sowie im Nachgang an Transplantationen (Busque et al. 2009; Changelian 2003; Kudlacz et al. 2004) genutzt werden.

Dezawa und Mitarbeiter (Dezawa et al. 2004) nutzten den JAK3-Inhibitor I (Syn. 4-(4'-Hydroxyphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline; WHI-P131) erstmals in einem *in vitro* Experiment zur neuronalen Differenzierung von MSC's. Sie beobachteten, dass die Behandlung von MSC's mit dem JAK-Inhibitor zu einer Herunterregulation von STATs führte, was zudem eng mit der neuronalen Induktion der Zellen verknüpft war (Dezawa et al. 2004).

Darüber hinaus stellten Androutsellis-Theotokis et al. (2006) fest, dass die Behandlung von NSC's, aus dem ZNS embryonaler Mäuse, mit JAK-Inhibitoren, welche v.a. modulierend auf den Notch-Signalweg der Stammzellen wirkten, das Überleben der Zellen unterstützte.

Bekräftigend wirken zudem die Versuchsergebnisse von Kim und Mitarbeitern (Kim et al. 2011). Das Ziel der Wissenschaftler bestand darin Fibroblasten der Maus über eine Reprogrammierung durch die Induktion von Oct4 (engl. Octamer binding transcription factor 4), SRY-box 2 (Sox2), Kruppel-like factor 4 (Klf4) und c-Myc (Myelocytomatose-Protein c), in funktionsfähige neurale Stamm- bzw. Progenitorzellen (NPC's) transzudifferenzieren. Im Rahmen dessen nutzten sie den JAK1-Inhibitor zur Blockierung des Signalwegs von JAK/STAT3, da dem STAT 3 ein limitierender Effekt auf die pluripotente Reprogrammierung zugesprochen wird (Yang et al. 2010). Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit dem JAK-Inhibitor keine nachteiligen Auswirkungen auf die direkte Transdifferenzierung der Fibroblasten in NPC's nachgewiesen werden konnten. (Kim et al. 2011)

Eine genaue Charakterisierung der JAK-Inhibitoren sowie ihre Rolle in der neuronalen Differenzierung von Stammzellen bleibt insgesamt jedoch abzuwarten.

Im Folgenden werden die für unser Experiment relevanten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren inklusive ihrer Wirkungen noch einmal tabellarisch aufgelistet:

Faktoren/Substanzen/Pharmaka	Wirkungen/Effekte
NGF	<ul style="list-style-type: none"> -Proliferation und Differenzierung neuronaler Präkursoren -Steigerung der Viabilität nozizeptiver sensorischer und sympathischer Neurone -Förderung des Neuriten- und Dendritenwachstums -Förderung der elektrischen Erregbarkeit durch Steigerung der Natrium-, Kalium-, Kalziumkanalexpression
BDNF	<ul style="list-style-type: none"> -Förderung des Axonwachstums -Steigerung der elektrischen Erregbarkeit durch vermehrte Natrium- und Kalziumkanalexpression -Regulation der synaptischen Aktivität -Synergistische Wirkung mit GDNF
NT-3	<ul style="list-style-type: none"> -vermehrte Expression in unreifen ZNS-Regionen mit Beteiligung an Proliferation/Migration/Differenzierung -Minderung der elektrischen Erregbarkeit von Neuronen durch vermehrte Kaliumkanalexpression
GDNF	<ul style="list-style-type: none"> -Förderung des Überlebens von dopaminergen Neuronen -Verhinderung des neurotoxininduzierten Zelltods -Steigerung der funktionellen Erholung
CNTF	<ul style="list-style-type: none"> -Differenzierung von Gliazellen bei Inhibition der neuronalen Differenzierung -Bedeutung als „survival-“ und „lesion-factor“ von Neuronen -Erhalt der Pluripotenz von ESC's
bFGF	<ul style="list-style-type: none"> -mitogener sowie trophischer Faktor -Förderung von Neuritenwachstum -Steigerung von Überleben und Differenzierung von Neuronen/neuronalen Präkursoren -Verhinderung des ontogenetischen Zelluntergangs -Steigerung der neuronalen ChAT-Aktivität -Proliferation und Differenzierung von Gliazellen

Faktoren/Substanzen/Pharmaka	Wirkungen/Effekte
EGF	<ul style="list-style-type: none"> -mitogene Wirkung auf MSC's -Proliferation neuroepithelialer Retinazellen in Kombination mit FGF -Proliferation von NSC's und Neurosphärenbildung -Differenzierung/Migration von Astrozyten
Edaravone	<ul style="list-style-type: none"> -neuroprotektive Wirkung als „Radikalfänger“ -Inhibition des neuronalen Zelltods sowie des Untergangs von Stammzellen nach schädigendem Ereignis -Inhibition der Freisetzung proapoptotischer Faktoren
β-Mercaptoethanol	<ul style="list-style-type: none"> -„Radikalfänger“/Antioxidans -Förderung von Viabilität und Differenzierung von Neuronen -Förderung des Neuritenwachstums
VPA	<ul style="list-style-type: none"> -Histondeacetylaseinhibitor mit neuroprotektiver Wirkung -Blockierung der Freisetzung proapoptotischer Faktoren -Induktion der Differenzierung neuronaler Progenitoren -neuronale Differenzierung von MSC's (v.a. in dopaminerge Nervenzellen) -Verhinderung der glialen Differenzierung
Forskolin	<ul style="list-style-type: none"> -Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels -Induktion neuronaler Differenzierung von MSC's
JAK-Inhibitor	<ul style="list-style-type: none"> -Förderung der neuronalen Induktion von MSC's -Förderung des Überlebens von NSC's

Tabelle 1:

Übersicht wichtiger neuronaler Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und Pharmaka mit den zugehörigen Wirkungen (zur ausführlichen Beschreibung inklusive Literaturnachweisen siehe Kapitel 1.4 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren)

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, in wie weit es möglich ist humane MSC's *in vitro*, welche zuvor aus Bohrmehl gewonnen werden konnten, mithilfe neuronaler Induktionsmedien in Richtung der neuronalen Zelllinie zu differenzieren. Wurde der Nachweis einer möglichen neuronalen Ausdifferenzierung von MSC's in anderen Arbeiten vorwiegend durch die immunhistochemische Darstellung neuronaler Markerproteine erbracht, soll in dieser Arbeit vor allen Dingen auf die Funktionalität der differenzierten Zellen durch die Untersuchung neuronenspezifischer spannungsabhängiger Ionenkanäle eingegangen werden. Hierbei sollen die folgenden Fragen Berücksichtigung finden:

- ▶ 1) Lassen sich nach erfolgter Differenzierung neuronentypische Ionenkanäle nachweisen, welche als ein Kriterium der potenziellen elektrischen Funktionalität der Zellen angenommen werden können?
- ▶ 2) In wie weit hat sich das Expressionsmuster für diese Kanäle in den differenzierten Zellen, im Vergleich zu den undifferenzierten MSC's, verändert?
- ▶ 3) Gibt es Unterschiede in der Kanalexpression zwischen den unterschiedlich ausdifferenzierten Zellen?
- ▶ 4) Stimmen morphologische und molekularbiologische Ergebnisse miteinander überein?

Für die Differenzierung der MSC's werden drei verschiedene Protokolle eingesetzt, welche sich durch ihre unterschiedliche Zusammensetzung an biologischen und chemischen Differenzierungsfaktoren auszeichnen. Dabei fiel die Wahl, nach gründlicher Literaturrecherche und Sammlung von Erfahrungswerten durch Mitarbeiter des Labors für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen), auf die Protokolle von Tatard et al. (2007), Dezawa et al. (2004) und Zeng et al. (2011), wobei Letztere durch uns modifizierte wurden. Bezüglich der unterschiedlichen Differenzierungsmöglichkeiten sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- ▶ 1) Lassen sich die Ergebnisse der Originalversuche in unserem Experiment reproduzieren?

- ▶ 2) Ergeben sich durch den Vergleich der drei Protokolle Vor- bzw. Nachteile für eine oder mehrere Vorgehensweisen? Lässt sich also ein Protokoll für weitere Differenzierungen bevorzugen oder ausschließen? Lässt sich eine Art „Idealprotokoll“ für die neuronale Ausdifferenzierung von MSC´s finden?

- ▶ 3) Welchen Einfluss nehmen die einzelnen Differenzierungsfaktoren auf die Morphologie der Zellen?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen die Forschung im Bereich des „tissue engineering“ von MSC´s voranzubringen und damit eine Möglichkeit für die Behandlung akuter und chronisch neurodegenerativer Erkrankungen sowie nervaler Traumata durch autologe Transplantation von *in vitro* ausdifferenzierten MSC´s zu schaffen. Von besonderem Interesse, im Sinne unfallchirurgischer Anwendungsgebiete, stellt sich dabei die Therapie peripherer Nervenläsionen dar. Bisher konnte zwar eine *in vitro*-Differenzierung von MSC´s in gliale Zellen erreicht werden, welche das Axonwachstum von Neuronen im Bereich von Nervenläsionen auch *in vivo* stimulieren konnten (Dezawa et al. 2001; Keilhoff et al. 2006; Mimura et al. 2004), eine direkte Implantation neuronal ausdifferenzierter Zellen in nervale Läsionen, im Sinne einer Defektfüllung, wurde bisher jedoch nicht erprobt. Eine grundsätzliche Voraussetzung für eine solche *in vivo* Anwendung könnten die Ergebnisse dieser Arbeit liefern.

2. Material

2.1 Geräte, Glas-, Plastik- und Verbrauchsware, Chemikalien, Positivkontrollen

Eine detaillierte Auflistung über verwendete Materialien findet sich im Anhang ab S.196 ff.

2.2 Primer

In Form von einzelsträngigen Oligonukleotiden sind Primer dazu in der Lage mit der Einzelstrang-DNA zu hybridisieren, um in der Folge der DNA-Polymerase als Angriffspunkt für die Synthese eines komplementären neuen DNA-Stranges zu dienen. Demnach fungieren Primer gewissermaßen als Bausteine auf molekularer Ebene. Die Synthese des Komplementärstranges beginnt stets am 3'-OH-Ende des Primers und folgt dann der Richtung des Matrizenstranges (3' → 5'). Aufgrund dieser Eigenschaft stellt die Anwesenheit von Primern beispielsweise ein notwendiges Kriterium im Rahmen der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR dar, indem Primerpaare gezielt dazu genutzt werden die zu amplifizierenden Bereiche auf der DNA einzugrenzen.

Die Synthese der Primer wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt.

Primer-bezeichnung	Sequenz	Länge des Produkts	Annealing Temperatur	Acc.No
Mikroglobulin sense antisense	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG CAACTTCAATGTCGGATGGA	135 Basenpaare (bp)	59°C	NM_004048.2
Nav1.1 sense antisense	GACAGCATCAGGAGGAAAGG GTTCTGCTATTTGCCTTGG	137 bp	58°C	NM_001202435.1
Nav1.2 sense antisense	AGGTTTCCGTTTTTCCTTGG CTTTGCTGCACCTCTGAAGC	151 bp	54°C	NM_001040142.1
Nav1.6 sense antisense	CGCCTTATGACCCAGGACTA TTTGTCTGCCTCCTCCAGT	190 bp	58°C	NM_014191.3
Nav1.7 sense antisense	TTCGGATAGTGAATACAGC ATGAGAACCTCCGTACAC	167 bp	50°C	NM_002977.3

Primer-bezeichnung	Sequenz	Länge des Produkts	Annealing Temperatur	Acc.No.
Na_v1.8 sense antisense	TATTTATTACGGTCACTATTTTG AAAATCCTCTTGCCAGTATC	132 bp	55°C	NM_006514.2
Na_v1.9 sense antisense	AAAAGTCAATGTGAAAGTGG AGTGAATTGCTCTCAAACCTC	182 bp	50°C	NM_014139.2
K_v1.2 sense antisense	TCCGGGATGAGAATGAAGAC GGGTCTGTGAAGGAAGTGG	100 bp	58°C	NM_004974.3
K_v1.3 sense antisense	TTCTCCTTCGAACTGCTGGT CTCAGGATGCCAGAGACAT	176 bp	59°C	NM_002232.4
Ca_v1.2 sense antisense	AGGACCCTACAGCAAACGGG CCCCGCTCCCTTCTCAAAT	122 bp	56°C	NM_001167625.1

Tabelle 2:

Übersicht über verwendete Primer inklusive Primerbezeichnung, -orientierung und -sequenz, Produktlänge, Annealing Temperatur und Accession Number (Acc.No.)

2.3 Zellen

2.3.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Die verwendeten humanen Stammzellen wurden aus „reaming debris“ gewonnen, wie es im Rahmen intramedullärer Marknagelungen oder während des Fräsvorganges bei der Implantation von Totalendoprothesen (TEP) anfällt. Im Einklang mit dem Ethikvotum vom 13.01.2011/AZ.:02/11 durch die Ethikkommission am Fachbereich Medizin in Gießen, wurden im Zuge der jeweiligen Operationen entsprechende Proben durch das Operationsteam der Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Gießen-Marburg, Standort Gießen, entnommen und anschließend dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie zur Verfügung gestellt. Die Spender wurden vor dem Eingriff umfassend über die Entnahme aufgeklärt und stimmten dieser im Vorfeld zu. Zur Verschlüsselung der Identität der Spender, erhielten diese in der Folge die Ziffern der ihnen zugeordneten Zellkultur (ZK).

ZK	Geburtsjahr	Geschlecht	Entnahmeort	Diagnosen & Medikamente
57	1993	Männlich	Humerus	- Humerus-Fraktur
60	1937	Männlich	Hüfte	- Primäre Coxarthrose - Diabetes mellitus Typ 2 - Nikotinabusus - Arterielle Hypertonie - Koronare Herzkrankheit (KHK) mit Zustand nach (Z.n.) Myokardinfarkt - Asthma bronchiale - Morbus Crohn - MRSA-Infektion
68	1937	Männlich	Linke Hüfte	- Coxarthrose links
78	1929	Männlich	Linke Hüfte	- Luxation der Hüft-TEP links - Hypothyreose (Medikation: L-Thyroxin) - Arterielle Hypertonie (Medikation: Bisoprolol)
82	1970	Männlich	Rechte Hüfte	- Coxarthrose rechts

Tabelle 3

Spenderdaten in der Übersicht – ZK, Geburtsjahr, Geschlecht, Entnahmeort, Diagnosen & Medikamente

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von MSC's

Nach der intraoperativen Gewinnung des Bohrmehls wurde dieses in ein Tube mit Bohrmehlzellmedium, bestehend aus Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F-12K), 20% FBS E/S und Penicillin-Streptomycin, überführt. Das Bohrmehl wurde in der Folge mit 25 ml 1x Phosphat gepufferter Saline (PBS) gespült. Der Waschvorgang wurde solange wiederholt bis das PBS optisch klar blieb. Im Anschluss wurde das Tube erneut mit 20 ml Bohrmehlzellmedium aufgefüllt und das Gemisch in eine 100 mm-Gewebeschale (Wachstumsfläche: 78,5 cm²) ausgesät.

Das Bohrmehl wurde daraufhin 1-2 Wochen bei 37°C und 6% Kohlenstoffdioxid (CO₂) im Brutschrank inkubiert bis eine 100%ige Konfluenz der Zellen erreicht wurde. Ein Wechsel des Mediums musste dabei alle 7 Tage erfolgen.



Abbildung 12:

Frisches Bohrmehl in 100 mm-Gewebesohle (Quelle: Laborinterne Fotografie).

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Gewebesohle abgelöst und in eine T-75 Zellkulturflasche (Füllvolumen: 20-30 ml, Wachstumsfläche: 75 cm²), welche 25 ml Bohrmehlzellmedium enthielt, ausgesät.

3.1.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

1. Einfrieren:

Um die Zellen einzufrieren und damit für spätere Versuche nutzbar zu machen, wurden diese zuerst mit Hilfe von 3 ml Trypsin vom Boden ihrer Zellkulturflasche abgelöst, das Gemisch aus Zellen und Trypsin anschließend in 3 ml Bohrmehlzellmedium überführt und der Trypsinierungsvorgang somit abgestoppt. Es folgte eine Zentrifugation des Gemischs (1200 rounds per minute (rpm), 5 Minuten), in deren Folge der Überstand dekantiert und die Zellen in 1 ml Einfriermedium, welches aus 90% FBS/ES und 10% DMSO bestand, resuspendiert wurden. Daraufhin wurden die im Einfriermedium befindlichen Zellen in ein Kryoröhrchen überführt und dieses über Nacht bei -80°C in einer Gefrierbox gelagert. Nach 24 Stunden kam es zur Überführung des Kryoröhrchens in den Stickstoffbehälter zur längerfristigen Lagerung.

2. Auftauen:

Nach der Herausnahme der Zellprobe aus dem Stickstoff, wurde das Aliquot 2 Minuten in 37°C warmem Wasser aufgetaut. Danach wurden die Zellen in eine entsprechende Zellkulturflasche mit 15 ml Bohrmehlzellmedium (37°C) überführt und bei 37°C und 6%

CO₂ inkubiert. Bei einer möglichen Konfluenz der Zellen wurden diese vor Versuchsbeginn noch einmal gesplittet.

3.1.2 Zellaussaat

Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden auf Petrischalen der Firma Thermo Scientific Nunc, mit einem Durchmesser von 35 mm und in einer Dichte von 2500 Zellen/cm², ausgesät. Die Wachstumsfläche dieser Schalen wurde mit 9,6 cm² angegeben.

1. Trypsinierung:

Nach dem Abschütten des Mediums aus der Gewebekulturflasche, wurde diese mit 25 ml 1x PBS gespült. Um die Zellen vom Boden der Flasche abzulösen, wurden anschließend 2 ml Trypsin hinzugefügt und die Flasche für ca. 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Der Erfolg des Ablöseprozesses wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops optisch sichergestellt. Zum Abstoppen des Trypsins wurden 2 ml FBS Gold zugegeben und das Gemisch in ein frisches Falcon-Tube überführt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten. Nach Abpipettieren des Überstandes, wurde das Zellpellet mit 1 ml Bohrmehlzellmedium vermischt.

2. Zellquantifizierung:

Zur Zählung der Zellzahl wurde die CASY®-Technologie (CASY: Cell Counter and Analyser System) eingesetzt. Durch sein Mehrkanalsystem ist das Gerät in der Lage über Messung des Widerstandes und Pulsflächenanalyse sowohl die Zellzahl, als auch ihr Volumen zu bestimmen. Der Erfassungsbereich liegt dabei zwischen 1000 und 10.000 Zellen/ml, wobei die Zellzahl in 1×10^6 Zellen/ml angegeben wird. Zudem kann das Gerät zwischen vitalen und avitalen Zellen unterscheiden. Als notwendiges Kriterium wird sich dabei die Membranintegrität der Zellen zu Nutze gemacht. Während die intakte Membran lebender Zellen als elektrische Isolationsschicht wirkt, kann der Strom hingegen durch die defekte Membran toter Zellen fließen und diese so detektiert werden.

Im Rahmen des Versuchs wurde das CASY-Probenröhrchen mit der isotonen, isoosmotischen CASYTon-Lösung befüllt und 10 µl der Zellsuspension hinzugefügt. Die

Verdünnung der Suspension betrug dabei 1:1000. Im Anschluss konnte die Zellzahl direkt am Gerät abgelesen und notiert werden.

3. Aussaat:

Im Anschluss wurden jeweils drei 3 cm-Petrischalen pro ZK mit 2,5 ml Bohrmehlzellmedium befüllt und die Zellen aus der Suspension, nach Berechnung der Aussaatmenge in μl ($24.000/\text{Zellzahl}$), hinzugefügt.

Um ein optimales Anwachsen der Zellen an den Boden der Schalen zu gewährleisten, wurden diese für mindestens 24 Stunden bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.

3.1.3 Neuronale Differenzierung

Nachdem die Zellen adäquat an den Boden der Petrischalen angewachsen waren, konnte die neuronale Induktion der Stammzellen durchgeführt werden. Hierbei wurden drei verschiedene Differenzierungsmedien unterschiedlicher Zusammensetzung und Länge verwendet. Bei den Medien handelte es sich um Protokolle, wie sie bereits in ähnlicher Form im Rahmen der Experimente von Dezawa (Dezawa et al. 2004), Zeng (Zeng et al. 2011) sowie von Tatard (Tatard et al. 2007) und Mitarbeitern Verwendung fanden.

Wobei das Protokoll von Zeng und Kollegen (Zeng et al. 2011) unsererseits durch Zugabe von Forskolin ab dem zweiten Differenzierungsschritt ergänzt wurde.

Durch Erfahrungswerte, welche in unserem Labor aufgrund von Vorversuchen zur neuronalen Differenzierung gewonnen werden konnten, wurde auch das Dezawa-Protokoll (Dezawa et al. 2004) von uns insoweit modifiziert, als dass die Kultivierung der Zellen in GDNF, im Gegensatz zum Originalprotokoll, als zweiter Schritt vor der Induktion mit trophischen Faktoren vorgenommen wurde. Allerdings wurde hier keine Modifikation bezüglich der verwendeten Differenzierungsfaktoren oder deren Konzentrationen vorgenommen, sondern lediglich bezüglich der zeitlichen Abfolge der Differenzierungsschritte.

Nachfolgend werden die Differenzierungsprotokolle noch einmal überblickend zusammengestellt:

1. Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Dezawa:

Schritt	Komponenten	Zeitdauer
1)	DMEM hg	2 Tage
	10% FBS Gold	
	40 µg/ml JAK3-Inhibitor	
2)	DMEM hg	24 Stunden
	10% FBS Gold	
	50 ng/ml GDNF	
3)	DMEM hg	~7 Tage
	10% FBS Gold	
	5 µM Forskolin	
	10 ng/ml bFGF	
	10 ng/ml CNTF	
4)	DMEM hg	~7 Tage
	10% FBS	
	50 ng/ml NGF	
	50 ng/ml BDNF	

Tabelle 4:

Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Dezawa et al. (2004)

Modifikationen wurden **schwarz** markiert.

2. Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Zeng:

Schritt	Komponenten	Zeitdauer
1)	DMEM hg	24 Stunden
	20% FBS Gold	
	10 ng/ml bFGF	
2)	DMEM hg	48 Stunden
	20 µg/ml Edaravone	
	20 ng/ml EGF	
	20 ng/ml bFGF	
	4 µM Forskolin	

Schritt	Komponenten	Zeitdauer
3)	DMEM hg	~10 Tage
	20 ng/ml BDNF	
	20 ng/ml NGF	
	4 µM Forskolin	

Tabelle 5:

Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Zeng et al. (2011)

Modifikationen wurden **schwarz** markiert.

3. Differenzierungsprotokoll nach Tatard:

Schritt	Komponenten	Zeitdauer
1)	DMEM hg	24 Stunden
	20% FBS Gold	
	10 ng/ml bFGF	
2)	DMEM hg	48 Stunden
	1 mM β-ME	
	30 ng/ml NT-3	
3)	DMEM hg	3-7 Tage
	100-200 µM BHA	
	25 mM KCl	
	2 mM VPA	
	1 µM Hydrocortison	
	30 ng/ml NT-3	
	50 ng/ml BDNF	
	10 ng/ml NGF	
	4 µM Forskolin	
	5 µM Insulin	

Tabelle 6:

Differenzierungsprotokoll nach Tatard et al. (2007)

Die drei Protokolle wurden mit jeder der insgesamt fünf ZK's (57, 60, 68, 78, 82) durchgeführt, sodass insgesamt 15 verschiedene Versuchsreihen gestartet werden konnten. Als Kontrollen wurden undifferenzierte MSC's (plain) derselben fünf ZK's verwendet, welche für 48 Stunden in 3 cm-Gewebekulturschalen mit

Bohrmehlzellmedium kultiviert wurden. Im Rahmen der Versuche wurden nur Zellen mit den Passagen 1 (P1) oder 2 (P2) verwendet. Vor Beginn der eigentlichen Protokolle wurden die Proben, im Anschluss an ihre Aussaat, für 24 Stunden zunächst in Bohrmehlzellmedium kultiviert, um eine ausreichende Adhärenz zu gewährleisten.

Medienwechsel:

Je nach Protokoll erfolgte ein Medienwechsel alle 24-48 Stunden. Dabei wurde das entsprechende Medium, bestehend aus den oben genannten Einzelkomponenten, frisch angesetzt und den Zellen nach Absaugen des alten Mediums unter sterilen Bedingungen zugefügt.

Dokumentation:

Im Zuge der Medienwechsel fand zusätzlich eine Begutachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop statt. Die Zellen wurden dabei unter 4-, 10-, 20- und 32-facher Vergrößerung auf ihre Adhärenz, Vitalität und Morphologie hin beurteilt und die Ergebnisse im Verlauf notiert sowie fotografisch festgehalten.

Lagerung:

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 6% CO₂.

Ernten der Zellen:

Am Ende des jeweiligen Protokolls wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet und mittels Resuspension-Lysis-(RLT)-Puffer lysiert (s.u.). Das gewonnene Lysat wurde entweder direkt im Rahmen der RNA-Isolierung weiterverwendet oder bei -80°C zwischengelagert und auf diese Weise konserviert.

3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy® MiniKit der Firma QIAGEN durchgeführt. Im Rahmen dieses Verfahrens kommt es zunächst zur Bindung der RNA an die Membran der herstellereigenen Säule. In der Folge wird die RNA mithilfe der

Waschpuffer aufgereinigt und kann am Ende mittels Lösungspuffer aus der Membran gewonnen werden.

1. Zellernten:

Im Zuge des Erntens der Zellen, wurden diese, nach Waschen mit 1 ml 1x PBS, mit Hilfe von 0,5 ml Trypsin pro Schale und nachfolgender Inkubation im Brutschrank vom Boden der Petrischale abgelöst. Der Fortschritt des Ablöseprozesses wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops beurteilt. Nach vollständiger Ablösung der Zellen, wurde das Trypsin durch Überführung der Suspension in 5 ml Bohrmehlzellmedium abgestoppt. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation des Gemischs bei 900 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das so gewonnene Zellpellet mit 1 ml 1x PBS vermischt und anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 900 rpm für 5 Minuten mit nachfolgender Entfernung des PBS und Zugabe von 600 µl RLT-Puffer.

2. RNA-Isolierung:

Die Isolierung der RNA erfolgte gemäß der Arbeitsanweisung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen) zum RNeasy® Minikit (Qiagen) wie folgt:

Nach gründlicher Durchmischung wurde das zuvor gewonnene Lysat in eine QIASHredder Säule überführt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 14.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Lysat mit 600 µl 70%igem Ethanol (EtOH) vermischt. Anschließend wurden 600 µl des gefällten Lysats auf eine RNeasy spin column aufgetragen und die Säule bei RT und 8000 g für 15 Sekunden (s) zentrifugiert. Die RNA konnte durch diesen Vorgang an der Silikat-Gel-Membran der Säule absorbiert werden, während die durchgetretene Flüssigkeit als Durchfluss verworfen wurde. Im Anschluss wurde der Vorgang mit dem restlichen Volumen des gefällten Lysats (600 µl) wiederholt. Zum Waschen der Säule wurden im ersten Schritt 700 µl ethanolhaltiges RNA-Waschpuffer (RW1-Puffer) hinzugegeben und die Säule daraufhin erneut zentrifugiert (8000 g, 15 s, RT). Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, erfolgte in einem zweiten Schritt die Zugabe von 500 µl RNA-Precipitating-Elution-(RPE)-Puffer und wiederum die Zentrifugation (8000 g für 15 s, RT) mit anschließendem Verwerfen des Durchflusses. Dieser Schritt wurde in der Folge wiederholt. Nach Überführen der Säule in ein frisches 2 ml Tube, schloss sich erneut eine Zentrifugation (14.000 rpm, 1 Minute, RT) an, um die Säule von der

Restflüssigkeit zu befreien. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Tube überführt und zum Herauslösen der RNA aus der Säulenmembran 30 µl RNase-freies Wasser mittig aufgetragen. Nach erfolgter Zentrifugation (8000 g, 15 s, RT) wurde das Eluat erneut aufgetragen und zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.

3.2.2 Messung der RNA-Konzentration im Spektrophotometer

Zur Quantifizierung der RNA wurde ein Spektrophotometer vom Typ NanoDrop® (ND-1000) verwendet. Das Konzept dieser photometrischen RNA-Messung folgt dem Lambert-Beerschen-Gesetz.

Im Rahmen der Messung wurde 1 µl des zuvor gewonnenen RNA-Eluats auf den Messpunkt des NanoDrop aufgetragen und bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen einen Leerwert (Blank) gemessen. Als entsprechende Probe für den Leerwert diente 1 µl RNase-freies Wasser.

Abschließend wurden sowohl die RNA-Konzentration (ng/µl), als auch der Quotient A260/A280 notiert.

3.2.3 Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde das entsprechende Quantitect® Kit der Firma QIAGEN verwendet. Durch reverse Transkription wird die zuvor gewonnene RNA in cDNA umgeformt. Die cDNA dient nachfolgend in der qualitativen PCR als Vorlage (engl. template).

Im ersten Schritt wurden jeweils 14 µl der Mischung 1 in speziellen dünnwandigen RT-Gefäßen angesetzt. Dieser ist essenziell, um möglicherweise existente genomische DNA aus den Proben zu entfernen.

Dabei wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Komponenten	Mengenangabe
RNA (µl)	Variabel (bis zu 1 µg)
RNase-freies Wasser (µl)	Variabel
gDNA Wipeout Buffer (µl)	2 µl
Endvolumen (µl)	14 µl

Tabelle 7:

Pipettierschema der Komponenten zur Elimination genomischer DNA (Mischung 1). Quelle: Arbeitsanweisung zu Quantitect® Kit (Qiagen), Labor für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen), Stand: 16.07.2009

Nach der Inkubation der Mischungen (2 Minuten bei 42°C), erfolgte die sofortige Kühlung der Proben mittels Eis. Nachfolgend erfolgte der Ansatz der Mastermixe (RT + und RT -) für die reverse Transkription. Die Komponenten der Ansätze umfassten:

	RT + Mix	RT - Mix
Komponenten	1x	1x
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	-
Quantiscript RT Buffer (5x)	4 µl	4 µl
RT Primer Mix	1 µl	1 µl
RNase-freies Wasser	-	1 µl

Tabelle 8:

Pipettierschema der Komponenten der Mastermixe für die Transkriptionsreaktion. Quelle: Arbeitsanweisung zu Quantitect® Kit (Qiagen), Labor für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen), Stand: 16.07.2009

Die entsprechenden RT Mastermixe (je 6 µl) wurden in der Folge zu den jeweiligen Proben, welche zur Eliminierung genomischer DNA angefertigt wurden und die RNA-Vorlage enthielten (Mischung 1), hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte eine weitere Inkubation (95°C für 3 Minuten), um das Abstoppen der reversen Transkriptase zu erreichen.

3.2.4 Durchführung einer Qualitativen PCR (Konventionelle PCR)

In vitro lassen sich mit Hilfe der PCR spezifische DNA-Fragmente vervielfachen (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988).

Dabei wird der DNA-Doppelstrang im ersten Schritt zunächst durch Denaturierung aufgetrennt. Als Ausgangspunkt für die Synthese dienen im Rahmen der sogenannten Hybridisierung (Primer-Annealing) die Hydroxylgruppen sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer). Diese Primer finden zunächst die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen (Template) auf und lagern sich an ihre komplementären Enden an. Die Vermehrung derselben erfolgt durch eine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) im Zuge der Elongation (Amplifikation). Der Einzelstrang dient dem Enzym dabei als Matrize für die Synthese des komplementären neuen Stranges. Die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz wird im Endeffekt durch zyklisches Durchlaufen der einzelnen Schritte erreicht.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden mithilfe des PCR-Kits für AmpliTaq Gold® der Firma Applied Biosystems hergestellt und wie folgt pipettiert:

Konzentration	Komponenten
1 µl	cDNA
2,5 µl	PCR Puffer II (10x)
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,625 µl	dNTPs (10 mM)
0,125 µl	Amplitaq Gold Polymerase (5 U/µl)
0,625 µl	Primer forward+reverse (20 µM)
Ad 25 µl	Aqua ad iniectabilia (Aqua ad in.)

Tabelle 9:

Pipettierschema der PCR-Reaktionsansätze. Quelle: Arbeitsanweisung zu AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), Labor für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen), Stand: 10.07.2009

Anschließend wurde die PCR, unter Zuhilfenahme eines Thermocyclers mit Heizdeckel, mit dem folgendem Programm ausgeführt:

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95°C	12 Minuten	1
Denaturierung	95°C	25 s	40
Annealing/ Hybridisierung	variabel (primerspezifisch)	25 s	
Elongation/ Amplifikation	72°C	25 s	
Finale Elongation	72°C	7 Minuten	1
Evtl. Ruhephase	4°C	>	

Tabelle 10:

Verwendetes PCR-Programm. Quelle: Arbeitsanweisung zu AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), Labor für experimentelle Unfallchirurgie (Gießen), Stand: 10.07.2009

3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNA mittels Agarosegel

Die entstandenen DNA-Amplifikate lassen sich durch die Methode der Gelelektrophorese optisch nachweisen, in deren Rahmen sie durch ihre negativen Ladungen in einem elektrischen Feld wandern und so ihrer Größe nach zerlegt werden können. Als Trägersubstanz der Gele wird Agarose genutzt, ein Polysaccharid, das aus Rotalgen gewonnen wird. Im Einzelnen gliedert sich der Ablauf einer Gelelektrophorese wie folgt:

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden zunächst mit 4-5 µl Gelladepuffer (6x Gel Loading Dye) vermischt. Daraufhin wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt, indem 1,2 g Agarosepulver mit 60 ml TRIS-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer verkocht wurden. Nach seiner Polymerisierung, konnte das Gel in die mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresenkammer eingebracht werden. In die Geltaschen wurden in der Folge 6 µl PCR-Ansatz bzw. 8 µl 100-Basenpaare-Marker eingefüllt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 110 V für ca. 1,25 Stunden wurden die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurde das Gel für 30 Minuten in einem lichtgeschützten Gefäß angefärbt, welches eine Lösung aus 6 µl SyBr®-Green in 60 ml TAE enthielt. Die Bandenfärbung wurde mit Hilfe eines Ultraviolett-(UV)-Transluminators visualisiert.

4. Ergebnisse

4.1 Morphologische Beurteilung der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie

Im Rahmen der Phasenkontrastmikroskopie wurden die Zellen in Intervallen zwischen 24-48 Stunden, je nach Angaben des verwendeten Protokolls, optisch beurteilt. Kriterien, wie Adhärenz, Viabilität oder morphologische Veränderungen der Zellen in der Differenzierungsphase, aber auch die Beschaffenheit des Mediums und der Petrischalen, wurden im Verlauf beurteilt. Bei der Morphologie wurde besonderes Augenmerk auf die Veränderungen an Somata und Fortsätzen der Zellen gelegt. Auch der Kontakt der Zellen untereinander war Gegenstand der Beobachtungen. In Phasenkontrast wurden die Zellen unter 4-, 10-, 20- und 32-facher Vergrößerung begutachtet.

4.1.1 Undifferenzierte MSC's

Bei den Zellen, welche als Positivkontrolle dienten, handelte es sich um heterogene Kulturen von MSC's, welche zuvor aus Bohrmehl gewonnen werden konnten. Die entsprechenden Proben der ZK's 57 (P2), 60 (P2), 68 (P2), 78 (P2) und 82 (P1) wurden in je 3 Petrischalen pro ZK, angereichert mit Bohrmehlzellmedium, ausgesät und bei 37°C und 6% CO₂ für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit zeigten die Zellen eine gute Adhärenz an den Boden der Petrischalen. Das Medium war klar und wies nur wenig Sediment auf.

Morphologisch ließen sich drei verschiedene Zellarten unterscheiden:

- ▶ 1) Zum Einen zeigten sich fibroblastenartige Zellen mit dünnen, langgezogenen Zellkörpern (~25-50 µm, Abb. 13 A,C).
- ▶ 2) Andere Zellen wiesen dagegen eher flache und plumpe Zellkörper auf, welche zudem größere Durchmesser (~100 µm) maßen als die Zellkörper aus der ersten Zellpopulation (Abb. 13 B). In ihren Zytoplasmen ließen sich des öfteren mehrere Zellkerne ausmachen.
- ▶ 3) Darüber hinaus konnten auch kleine runde oder polygonale Zellen (Abb. 13 D) in der Kultur gefunden werden.

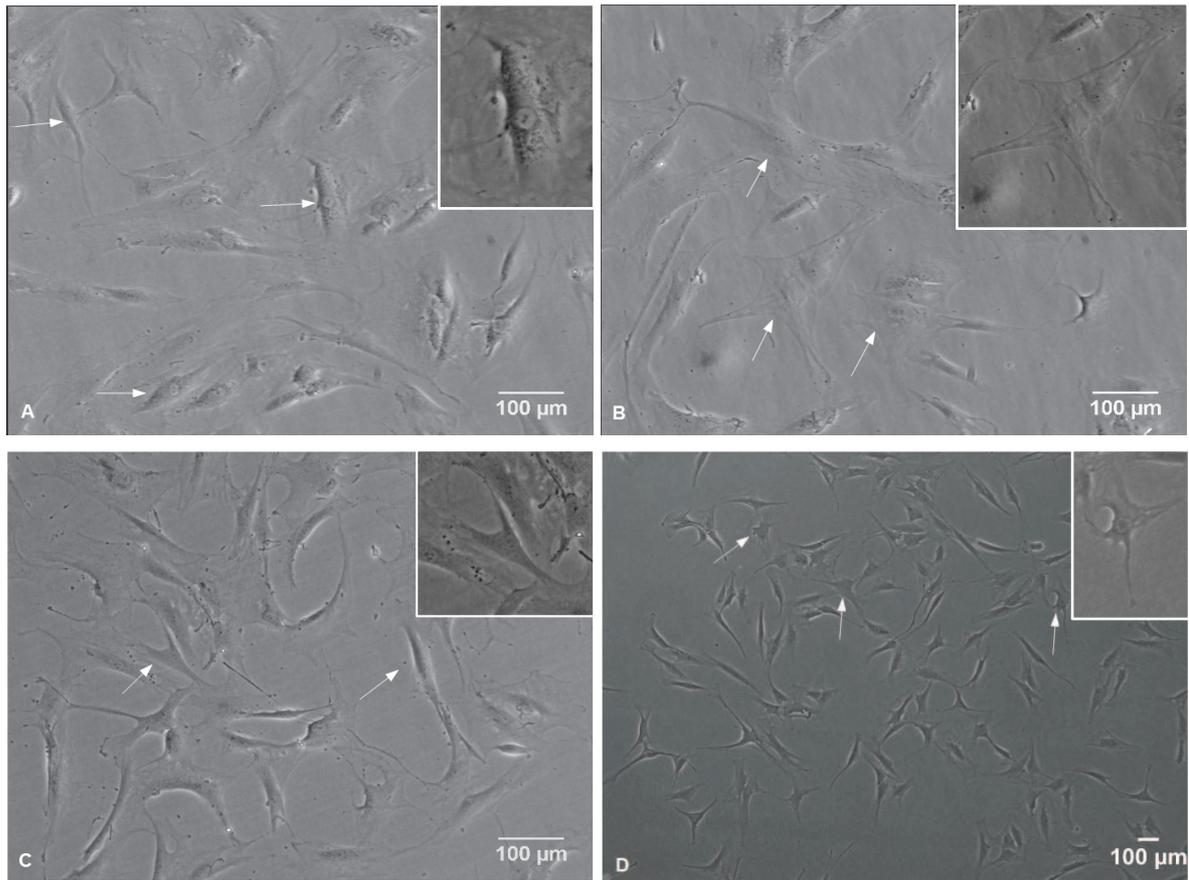


Abbildung 13:

Mesenchymale Stammzellen im undifferenzierten Zustand *in vitro*.

A-D: Die Zellen wurden zuvor in Bohrmehlzellmedium kultiviert und nach erfolgter Adhärenz mikroskopisch begutachtet. Neben größeren flächigen (Abb. 13 B), fielen insbesondere auch fibroblastigenartige (Abb. 13 A+C) sowie polygonale Zellen auf (Abb.13 D).

Die Pfeile deuten auf die jeweils im Bildtext beschriebenen unterschiedlichen Zellmorphologien.

4.1.2 Zelldifferenzierung nach Dezawa (modifiziert)

4.1.2.1 Schritt 1: DMEM hg, 10% FBS, 40 µg/ml JAK3-Inhibitor

Nach Zugabe von Medium 1 wurden die Zellen in einem Abstand von 48 Stunden unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet.

Morphologisch zeigte der überwiegende Anteil der Zellen aller ZK's eine fibroblastenartige Gestalt. Darüber hinaus konnten in allen ZK's bereits Zellen mit neuronenhähnlicher Morphologie festgestellt werden (Abb. 14 A). Hierbei handelte es sich einerseits um Zellen mit sternförmig ausgezogenen Zellkörpern, von denen zum Teil lange Fortsätze ausgingen, wie etwa in den ZK's 60, 78 und 82 beobachtet werden

konnte. In anderen Fällen, wie beispielsweise bei Zellen der ZK 68, schien sich das Zytoplasma hingegen zusammenzuziehen, sodass die Zellkörper von ihrem Durchmesser her kleiner wirkten. Zudem wiesen diese kleinen Somata mehrere lange Fortsätze auf, welche sich in der Peripherie bereits teilweise reich verzweigten.

Ähnliche Gestalt zeigten auch die Zellen der ZK 57, deren Morphologie zwischen fibroblasten- und neuronartigen Zellen anzusiedeln war. Die Somata dieser Zellen wirkten hingegen eher plump, wobei ihre Fortsätze sowohl in der Form, als auch im Verzweigungsmuster einen diffusen und ungeordneten Eindruck machten.

Insgesamt konnten als Zeichen des vermehrten Zellumsatzes in allen untersuchten ZK´s größere Mengen an Sediment im klaren Medium ausgemacht werden.

Zudem fanden sich v.a. in den Petrischalen der ZK 82 mehrere Ansammlungen toter Zellen, welche sich vom Boden der Petrischale abgelöst hatten und in der Folge frei im Medium flottierten.

4.1.2.2 Schritt 2: DMEM hg, 10% FBS, 50 ng/ml GDNF

Nach 24 Stunden zeigten die Petrischalen aller ZK´s unter mikroskopischer Begutachtung klare Medien mit viel Sediment. Dazu konnten in der ZK 78 frei flottierende Komplexe toter Zellen beobachtet werden.

Im überwiegenden Anteil stellten sich die Zellen der ZK´s 57, 60, 68 und 78 mit diffus entwickelter Gestalt dar. Neben fibroblastenähnlichen Zellen, fanden sich zu einem kleinen Teil auch neuronal entwickelte Zellen mit flächigen, sternförmigen Perikarya (Abb. 14 B).

In der ZK 82 imponierten zudem Zellen mit makrophagenähnlicher Morphologie, welche durch breite, plumpe Zellkörper und pseudopodienartige Fortsätze gekennzeichnet waren.

4.1.2.3 Schritt 3: DMEM hg, 10% FBS, 5 µM Forskolin, 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml CNTF

Im Rahmen des dritten Schrittes des Protokolls erhielten alle ZK´s das entsprechende Differenzierungsmedium für eine Zeitdauer von insgesamt 7 Tagen. Nach Beendigung

dieses Abschnittes, zeigte der Großteil der Zellen eine deutlich neuronartige Morphologie.

In allen untersuchten ZK's fanden sich zu einem Großteil neuronal differenzierte Zellen in variabler Gestalt. Überwiegend waren dies große Zellen mit sternförmigen Somata und baumartig verzweigten Fortsätzen (Abb. 14 C).

Darüber hinaus ließen sich in den ZK's 68 und 78 zusätzlich Zellen mit pyramidenähnlichen Zellkörpern und zwei bis drei langen fragilen Ausläufern beobachten. Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie wurden deutlich weniger gesehen. Weiterhin fanden sich in der ZK 78 Zellen mit vesikelreichem Zytoplasma, vermutlich als Ausdruck exozytischer Aktivität.

In allen Proben erschien das Medium zu jedem Zeitpunkt klar und frei von Kontaminationen. Während sich am Boden der ZK 68 wenig Sediment sammelte, zeigten dies die übrigen ZK's (57, 60, 78, 82) umso mehr.

4.1.2.4 Schritt 4: DMEM hg, 10% FBS, 50 ng/ml NGF, 50 ng/ml BDNF

Nach durchschnittlich 5 Tagen zeigte der Großteil der Zellen aller ZK's unter dem letzten Differenzierungsmedium das optisch beste Ergebnis. Dabei wurden v.a. in den ZK's 60, 68, 78 und 82 vielgestaltig ausdifferenzierte Zellen neuronaler Morphologie beobachtet. In diesem Zusammenhang zeigte die Mehrheit der Zellen plumpe, flächige Somata mit sternförmigen Ausziehungen, von denen sich mehrere Fortsätze in der Peripherie baumartig verzweigten und mit den Fortsätzen ähnlicher Zellen netzwerkartige Strukturen ausbildeten (Abb. 14 D). Diese Verknüpfungen der Fortsätze verschiedener Zellen konnten hauptsächlich in der ZK 68 optisch nachgewiesen werden. Einen weiteren Typus ausdifferenzierter Zellen repräsentierten solche mit schlanker Gestalt. Diese Zellen zeichneten sich durch ein pyramidenförmiges Perikaryon aus, von welchem sich lange, dünne Fortsätze an den jeweils gegenüberliegenden Zellpolen abzweigten. Teilweise zeigten diese Zellen vergrößerte Zellkerne. Vermehrt waren diese Zellen in den ZK's 68 und 82 zu finden.

Zudem wurden auch Zellen mit diffuser Differenzierung in allen ZK's beobachtet.

Als charakteristisch für die ZK 57 konnten kleine rundliche, zum Teil sternförmige Zellen ausgemacht werden, deren fragile kurze Fortsätze dennoch reiche Verzweigungen aufwiesen.

Die Medien aller Proben wurden zu jedem Zeitpunkt als klar beurteilt. Im Gegensatz zu den anderen ZK's, fiel die ZK 78 unter Medium 4 durch ihren erhöhten Anteil an toten, vom Boden losgelösten Zellen auf.

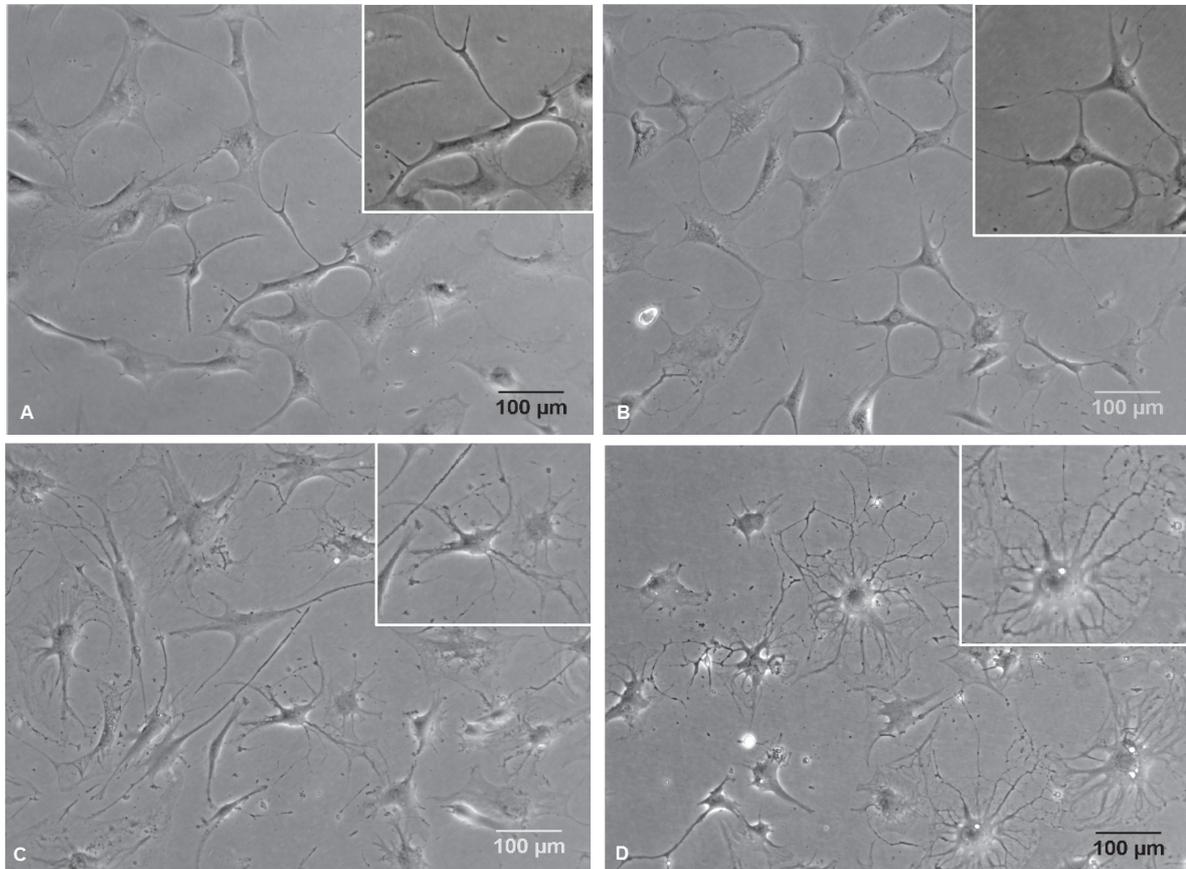


Abbildung 14:

Differenzierte MSC's nach modifiziertem Dezawa-Protokoll *in vitro*.

A: Nach 48 Stunden unter dem ersten Differenzierungsmedium zeigten die Zellen überwiegend noch fibroblastenartige bzw. mesenchymale Gestalt, dennoch konnten bereits Zellen mit schlanken Somata und dünnen Fortsätzen beobachtet werden. **B:** 24 Stunden nach Zugabe des zweiten Mediums kam es zu einer Zunahme von Zellen mit neuronaler Optik. **C:** Unter Medium 3 zeigten sich vermehrt Zellen mit flächigen sternförmigen Perikarya und reich verzweigten Fortsätzen. **D:** Die Zellen unter Medium 4 zeichneten sich durch kompakte Somata und eine komplexe Arborisation der dünnen Fortsätze aus.

4.1.3 Zelldifferenzierung nach Zeng (modifiziert)

4.1.3.1 Schritt 1: DMEM hg, 20% FBS, 10 ng/ml bFGF

Alle untersuchten Kulturen wiesen nach 24 Stunden unter Medium 1 eine gute Adhärenz an den Schalenboden auf.

In allen ZK's fanden sich überwiegend Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie. Dabei zeigte ein Teil der Zellen der ZK 78 eine Volumenzunahme ihrer Zellkörper mit Ausbildung von Fortsätzen. Eine Differenzierung der Zellen in Richtung einer bestimmten Zelllinie wurde jedoch nicht erkannt, da verschiedene Morphologien innerhalb dieser Kultur parallel auftraten. So konnten Zellen mit rundlichen oder länglichen Somata mit sowohl flächiger, als auch schlanker Silhouette ausgemacht werden, welche zum Teil Fortsätze mit peripherer Verzweigung ausbildeten.

In den ZK's 57, 60, 68 und 82 fanden sich bereits vereinzelt neuronähnliche Zellen, welche sich entweder durch ihre flächigen sternförmigen oder pyramidalen Zellkörper auszeichneten (Abb. 15 A). Auch hier konnten lange verzweigte Zellfortsätze, welche zumeist an den apikalen und basalen Zellpolen lokalisiert waren, gesehen werden.

In allen Proben fand sich nach Ablauf der 24 Stunden klares Medium und vermehrt Sediment am Schalenboden.

4.1.3.2 Schritt 2: DMEM hg, 20 µg/ml Edaravone, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 4 µM Forskolin

Nach 48 Stunden unter Medium 2 konnte in den Proben aller ZK's ein deutlicher Entwicklungsfortschritt gesehen werden.

Insgesamt fanden sich nur noch wenige Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie, wie beispielsweise in der ZK 68. Vielmehr befand sich der Großteil der Zellen (ZK 57, 60, 78, 82) optisch in einem Übergangsstadium zwischen fibroblastärem und neuronalem Aussehen oder zeigte bereits einen eindeutig neuronalen Phänotyp. Dabei traten zahlreiche Morphologien in Erscheinung (Abb. 15 B).

In der ZK 60 traten insbesondere zwei verschiedene Zelltypen auf. Zum Einen fanden sich Zellen mit großen, flächigen Perikarya und kurzen, aber kräftigen Fortsätzen. Zum Anderen wurden auch Zellen mit sternförmigen Zellkörpern und langen, fragil wirkenden Ausläufern beobachtet, welche durch ihre peripher netzwerkartige Verzweigung in Erscheinung traten. Darüber hinaus zeigten sich in dieser ZK aber auch dedifferenzierte Zellen ohne definierbare Form.

Der überwiegende Anteil in den ZK's 57, 78 und 82 wurde von Zellen mit pyramidalen Zellkörpern ausgemacht, von welchen in der Regel drei lange Fortsätze ausgingen. Außerdem wurden an diesen Fortsätzen sogenannte Wachstumskegel, als Zeichen aussprossender Axone, sichtbar (Abb. 15 C).

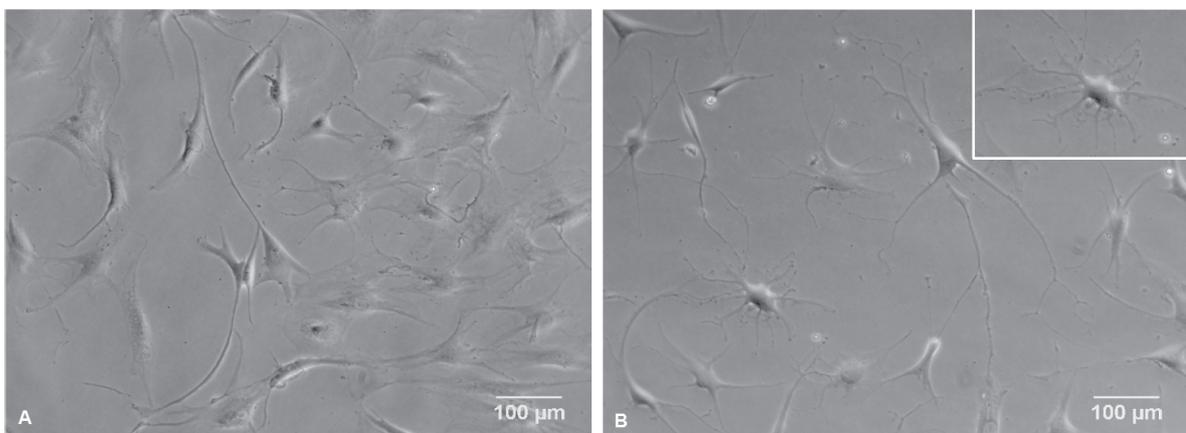
Am Boden aller Petrischalen fand sich am Ende des zweiten Schrittes nur wenig Sediment. Die Medien aller Proben waren stets als klar zu beschreiben.

4.1.3.3 Schritt 3: DMEM hg, 20 ng/ml BDNF, 20 ng/ml NGF, 4 μ M Forskolin

Durchschnittlich wurden die Proben aller ZK's für 8 Tage unter Medium 3 differenziert. Hierdurch konnte für einen Großteil der Zellen die Entwicklung hin zu einem neuronal aussehenden Zelltyp erreicht werden.

Das optisch beste Ergebnis konnte für die Zellen der ZK 78 erreicht werden, welche im Folgenden repräsentativ für alle ZK's beschrieben werden. Kennzeichnend für diese Zellen waren ihre fadenförmigen, schlanken Somata, von welchen lange, dünne Fortsätze ausgingen, die wiederum eine große Anzahl an Wachstumskegeln aufwiesen (Abb. 15 D, E, F). Darüber hinaus wurde auch die Bildung netzwerkartiger Strukturen beobachtet, an welchen mehrere Zellen eben genannter Art beteiligt waren. Solche Gebilde konnten auch in der ZK 60 gesehen werden. Einen weiteren, wenn auch in seiner Anzahl geringeren Zelltyp, stellten kleine sternförmige Zellen dar, welche teilweise reich verzweigte Fortsätze aufwiesen. Eine dreidimensionale Struktur wurde diesen Zellen durch die Retraktion ihres Zytoplasmas verliehen.

Auffällig für alle ZK's war die starke Konfluenz der sich differenzierenden Zellen gegen Ende des Protokolls. Bei klarem Medium konnten, als Zeichen vermehrten Zellumsatzes, größere Mengen an Sediment am Schalenboden aller ZK's gesehen werden.



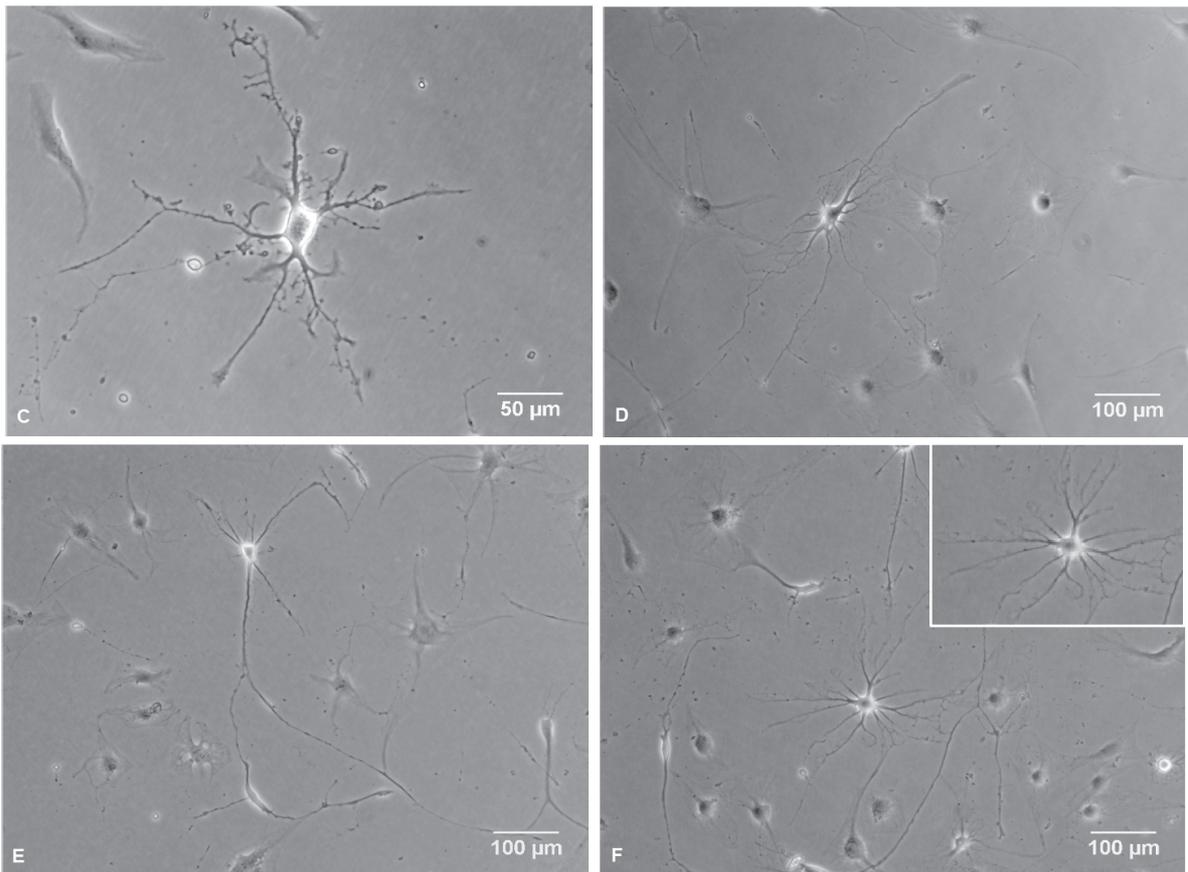


Abbildung 15:

Differenzierte MSC's nach modifiziertem Zeng-Protokoll *in vitro*.

A: Der Großteil der Zellen zeigte nach dem ersten Differenzierungsmedium unverändert eine fibroblastenähnliche oder mesenchymale Morphologie. Vereinzelt wurden schon Zellen mit pyramidalen Zellkörpern und längeren Fortsätzen beobachtet. **B:** Nach Medium 2 ließen sich vermehrt neuronal geformte Zellen finden, deren Somata pyramidal oder stellar konfiguriert waren. **C:** Die zum Teil bereits langen Zellfortsätze unter Medium 2 zeigten terminale Aufzweigungen sowie Wachstumskegel. **D, E, F:** Ausdifferenzierte Zellen zeichneten sich durch eindeutige neuronale Morphologien aus. Von den kleinen pyramidalen oder sternförmigen Zellkörpern zweigten sich lange Fortsätze ab, welche weitere Aufzweigungen in der Peripherie bildeten.

4.1.4 Zelldifferenzierung nach Tatard

4.1.4.1 Schritt 1: DMEM hg, 20% FBS, 10 ng/ml bFGF

Die Differenzierungsdauer unter Medium 1 betrug 24 Stunden. Zu jedem Zeitpunkt waren die Medien aller Proben klar und die Zellen zeigten eine adäquate Adhärenz. Während in den ZK's 57, 68, 78 und 82 viel Sediment am Schalenboden entfernt werden musste, war dies in der ZK 60 umso weniger vorhanden.

Der morphologisch vorherrschende Zelltyp konnte in allen ZK's als fibroblastenartig beschrieben werden. Die länglichen Zellkörper dieser Zellen zeigten nur wenige Zytoplasmaausziehungen (Abb. 16 A).

In den ZK's 68 und 78 präsentierten sich zudem Zellen diffuser Gestalt mit scharfkantig ausgezogenen Zellkörpern.

4.1.4.2 Schritt 2: DMEM hg, 1 mM β -ME, 30 ng/ml NT-3

Die mikroskopische Beurteilung der Proben erfolgte nach 48 Stunden unter dem zweiten Differenzierungsmedium.

Dabei fiel auf, dass die Zellen der ZK's 57, 60, 68 und 78 innerhalb dieser kurzen Zeitspanne ein homogenes Bild an bereits neuronähnlichen Zellen abgaben. Diese Zellen zeichneten sich durch ihre pyramidalen Zellkörper und die davon abzweigenden lang geschwungenen Fortsätze aus, die sich aber im Verlauf nicht weiter verzweigten (Abb. 16 B). In der ZK 78 traten zudem vereinzelt auch Zellen mit sternförmigen Zytoplasmaausziehungen auf, deren Ausläufer baumartige Verzweigungsmuster bildeten. Darüber hinaus kamen aber auch viele diffus differenzierte Zellen mit abnorm geformten Zellkörpern und diskontinuierlich verlaufenden Fortsätzen vor, wie beispielsweise in der ZK 57.

Eine Ausnahme bildete die ZK 82, in welcher die Zellen vermehrt ihre fibroblastäre Gestalt beibehielten. Die Petrischalen dieser ZK wiesen zudem vermehrt Sediment im klaren Medium auf, während sich nur wenig Sediment in den Schalen aller anderen ZK's fand.

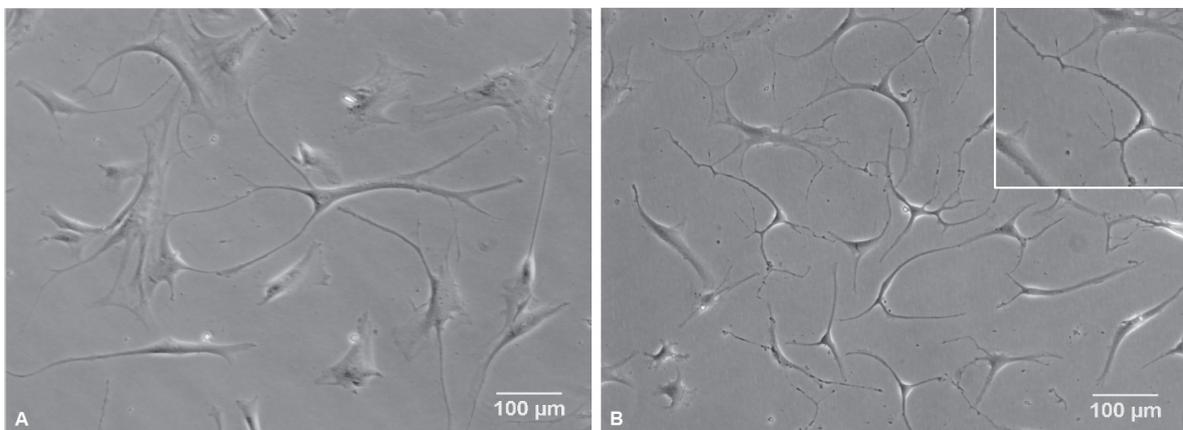
4.1.4.3 Schritt 3: DMEM hg, 100-200 μ M BHA, 25 mM KCl, 2 mM VPA, 1 μ M Hydrocortison, 30 ng/ml NT-3, 50 ng/ml BDNF, 10 ng/ml NGF, 4 μ M Forskolin, 5 μ M Insulin

Im Laufe der Zelldifferenzierung unter Schritt 3 wurde das toxische Potenzial des Differenzierungsmediums offensichtlich. Bereits nach 24 Stunden unter diesem Medium zeigten sich in den Proben aller ZK's apoptotische Zellen, welche sich im Verbund vom Boden der Petrischalen ablösten und als Ansammlungen kleiner kugelliger Zellen frei im Medium flottierten. Die Zellen, welche dem Boden der Schale

noch anhafteten imponierten mit unnatürlich geformten Somata und fragilen diskontinuierlichen Zellfortsätzen (Abb. 16 C, D). Es konnte im Rahmen von Verlaufsbeobachtungen festgestellt werden, dass der Zellschaden an Stellen ohne konfluenten Zellrasen am größten war.

Lediglich die ZK's 82 und 60 konnten, neben geschädigten Zellen, auch solche mit neuronähnlicher Morphologie aufweisen. Diese Zellen waren zumeist durch einen pyramidalen, seltener auch sternförmigen Zellkörper und lange reich verzweigte Fortsätze charakterisiert. In der ZK 60 zeigte sich optisch zudem die Bildung von Zellnetzwerken.

Im weiteren Versuchsverlauf wurde das Originalprotokoll nach Tataro insoweit modifiziert, als dass nach Ablauf der ersten 48 Stunden im Rahmen des Mediumwechsels auf die Zugabe von VPA sowie BHA verzichtet wurde. Die Konzentration der anderen Differenzierungsfaktoren wurde unverändert beibehalten. Nach dieser Modifizierung wurden die Zellen im Schnitt weitere 5 Tage kultiviert. Fand sich in den Medien zuvor vermehrt abgelöstes totes Zellmaterial, so konnte dies nach Modifikation reduziert werden. Die Medien aller Schalen waren dabei kontinuierlich klar. Des Weiteren führte die Abänderung des Protokolls zu einer raschen Regeneration der geschädigten und zu einer weiteren Differenzierung der bereits neuronähnlichen Zellen. Es konnte beobachtet werden, dass die Mehrheit der ausdifferenzierten Zellen aller ZK's durch pyramidale bis sternförmige Somata mit zusammengezogenem Zytoplasma charakterisiert war, von denen aus mehrere lange Fortsätze in der Peripherie reiche Verzweigungen bildeten (Abb. 16 E, F). Auch pyramidale Zellen mit kürzeren plumpen Ausläufern konnten beschrieben werden, wie beispielsweise in den ZK's 57 und 78. An Stellen mit konfluentem Zellrasen, wie in den ZK's 60 und 82, stellten dennoch die fibroblastenähnlichen Zellen gegen Ende den zahlenmäßig vorherrschenden Zelltyp dar.



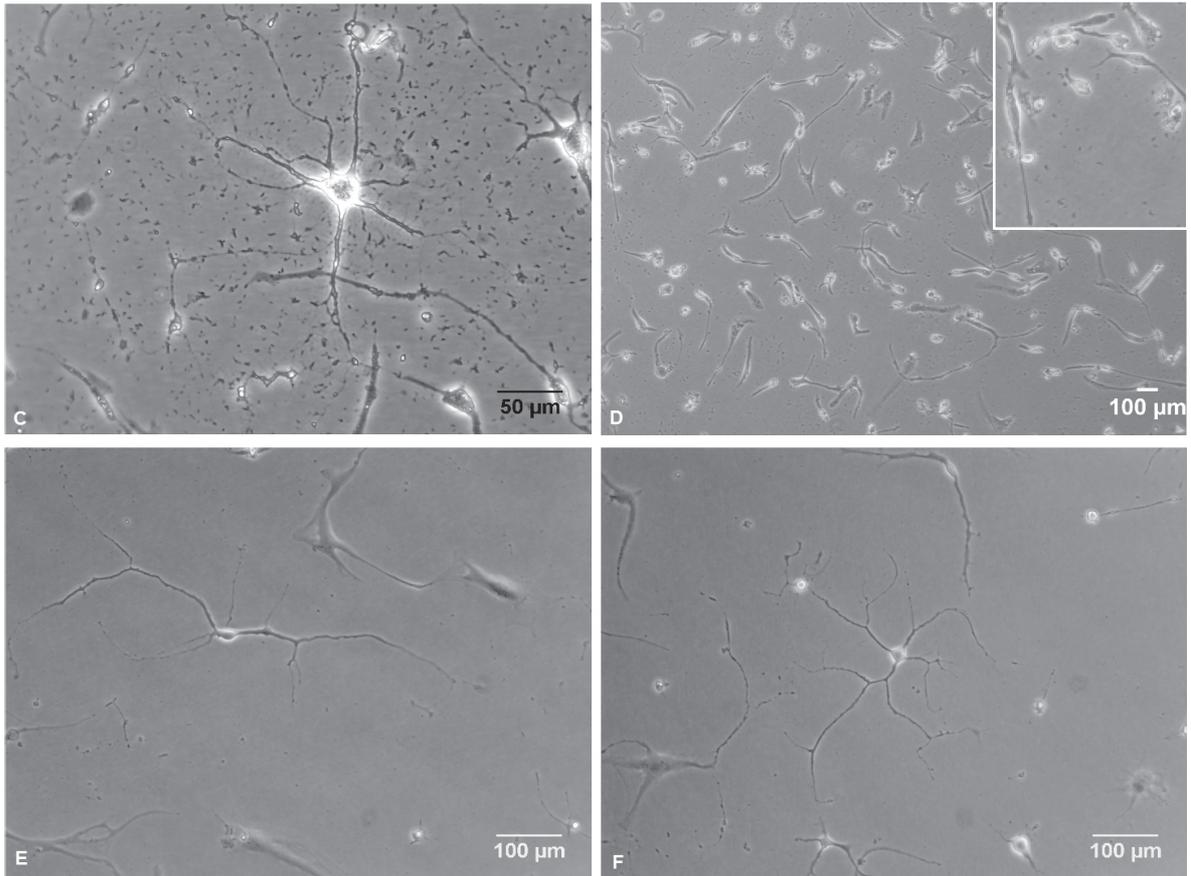


Abbildung 16:

Differenzierte MSC's nach dem Tataro-Protokoll *in vitro*.

A: Unter Medium 1 verblieb die Mehrheit der Zellen in ihrer ursprünglich fibroblastenähnlichen/mesenchymalen Gestalt. Teilweise konnte bereits eine Verschmälerung der Zellkörper und die Bildung von zytoplasmatischen Ausziehungen beobachtet werden. **B:** Nach Abschluss von Medium 2 fiel der Großteil der Zellen durch die Ausbildung einer neuronalen Morphologie auf. Die Somata dieser Zellen stellten sich zumeist pyramidal bis scharfkantig und mit geschwungenen Zellfortsätzen dar. **C, D:** Geschädigte Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Differenzierungsmedium 3. Auffällig erscheinen zudem die größeren Mengen an Sediment und totem Zellmaterial im Medium. **E, F:** Ausdifferenzierte Zellen nach Abschluss des dritten Differenzierungsmediums (nach Modifikation). Die Zellen zeichneten sich u.a. durch schlanke pyramidale Zellkörper und lange verzweigte Neuriten aus.

4.1.5 Überblickende Darstellung der morphologischen Ergebnisse

Insgesamt konnte mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie gezeigt werden, dass nach Abschluss aller drei Differenzierungsprotokolle Zellen neuronalen Phänotyps in allen ZK's in Erscheinung traten, deren Anzahl die der fibroblastenartigen bzw. undifferenzierten Zellen überstieg.

Vergleichend zu den Zellen, welche nach dem modifizierten Dezawa-Protokoll ausdifferenziert wurden (~50 µm), zeichneten sich die differenzierten Zellen nach

modifiziertem Zeng- und Tatard-Protokoll durch deutlich kleinere Durchmesser ihrer Zellkörper aus (~10-25 µm). Zudem erschienen die flächigen Zellen des modifizierten Dezawa-Protokolls vermehrt als plumpe sternförmige Zellen, deren Fortsätze zum Teil baumartige Verzweigungsmuster aufwiesen. Dahingegen waren die Zellen, welche nach dem modifizierten Zeng-Protokoll differenziert wurden, zumeist durch pyramidenförmige Zellkörper mit überwiegend drei langen geschwungenen Zellfortsätzen charakterisiert.

In ungefähr der gleichen Anzahl konnten die beiden oben genannten Zelltypen am Ende des Tatard-Protokolls nachgewiesen werden. Besonderes Augenmerk bei diesem Protokoll lag zudem auf seiner potenziell zellschädigenden Wirkung ab dem dritten Differenzierungsschritt, in dessen Verlauf sich die Zellen nach der „Alles-oder-Nichts-Regel“ entwickelten. Eine Regeneration der geschädigten Zellen konnte durch Elimination der Komponenten VPA und BHA aus Medium 3 erreicht werden.

Darüber hinaus scheint auch der JAK3-Inhibitor, wie er in Medium 1 nach Dezawa (modifiziert) enthalten ist, einen Stressfaktor für die sich entwickelnden Zellen darzustellen. So zeigten v.a. die Zellen der ZK 57 nach Beendigung des ersten Differenzierungsmediums diffuse Morphologien, welche nicht einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen waren und damit Ausdruck toxischen Stresses gewesen sein könnten.

1. Differenzierung nach Dezawa (modifiziert):

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Adhärenz	++	++	++	++
Proliferation	+	o	+	+
Neuronale Morphologie	(+)	(+)	+	++
Beschaffenheit des Mediums	(+)	(+)	(+)	+

Tabelle 11:

Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Dezawa (modifiziert)

Legende: **Adhärenz:** ++ (adäquat angewachsene Zellen), + (mäßig angewachsene Zellen), - (keine Adhärenz erfolgt). **Proliferation:** ++ (rege Zellproliferation), + (mäßige Zellproliferation), - (keine Proliferation), o (keine Veränderung bzgl. der Proliferation zum vorherigen Schritt). **Neuronale Morphologie:** ++ (stark ausgeprägte neuronale Gestalt), + (mäßig ausgeprägte neuronale Gestalt), (+) (wenig ausgeprägte neuronale Gestalt), - (keine neuronale Gestalt). **Beschaffenheit des Mediums:** ++ (klares Medium, wenig Sediment), + (klares Medium, vermehrt Sediment), (+) (klares Medium, vermehrt Sediment und tote Zellen), - (verunreinigtes Medium)

2. Differenzierung nach Zeng (modifiziert):

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Adhärenz	++	++	++
Proliferation	+	o	++
Neuronale Morphologie	-/(+)	+	++
Beschaffenheit des Mediums	+	++	+

Tabelle 12:

Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Zeng (modifiziert)

Legende: siehe Tabelle 11

3. Differenzierung nach Tataru:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 3 (Nach Modifikation)
Adhärenz	++	++	+	+
Proliferation	+	o	-	o
Neuronale Morphologie	-	++	(+)	+
Beschaffenheit des Mediums	+	+	(+)	+

Tabelle 13:

Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Tataru

Legende: siehe Tabelle 11

4.2 PCR und gelelektrophoretische Analyse

Die PCR für die entsprechenden Primerpaare wurde sowohl mit den undifferenzierten MSC's, welche als Kontrolle fungierten, als auch mit den nach den drei verschiedenen Protokollen ausdifferenzierten Zellen aller fünf ZK's (57, 60, 68, 78, 82) durchgeführt. Als Positivkontrolle der Primer diente cDNA der Zelllinie SH-SY5Y in einer Verdünnung mit Aqua ad in. von 1:10. Eine Ausnahme dabei stellte das Primerpaar von Nav1.8 dar, bei welchem cDNA aus Hodengewebe in einer Verdünnung von 1:2 mit Aqua ad in. als Positivkontrolle fungierte. Bei allen PCR's wurde reines Aqua ad in. als Negativkontrolle verwendet.

4.2.1 β 2-Mikroglobulin

Das Protein β 2-Mikroglobulin (Mg) ist Teil des Major-Histocompatibility-Complex (MHC) der Klasse I und zählt zu den sogenannten Haushaltsgenen, welche weder von der Art der Zelle oder deren Entwicklungsstadium noch von extrinsischen Faktoren beeinflusst werden. Aufgrund dieser Eigenschaft dient das Primerpaar von β 2-Mikroglobulin im Rahmen dieser PCR als Positivkontrolle.

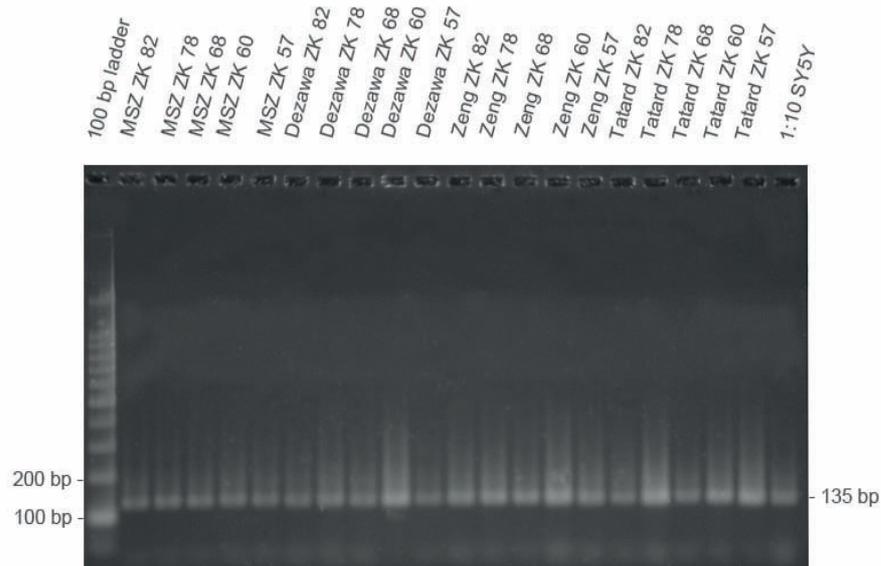


Abbildung 17:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Mg (135 bp)

Mg wurde sowohl von den undifferenzierten MSC's als auch von den differenzierten MSC's aller ZK's exprimiert.

Damit konnte die Grundvoraussetzung für die Durchführung der PCR mit spezifischen Primern, welche spannungsabhängige Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle markieren, gesetzt werden.

4.2.2 Nav1.1

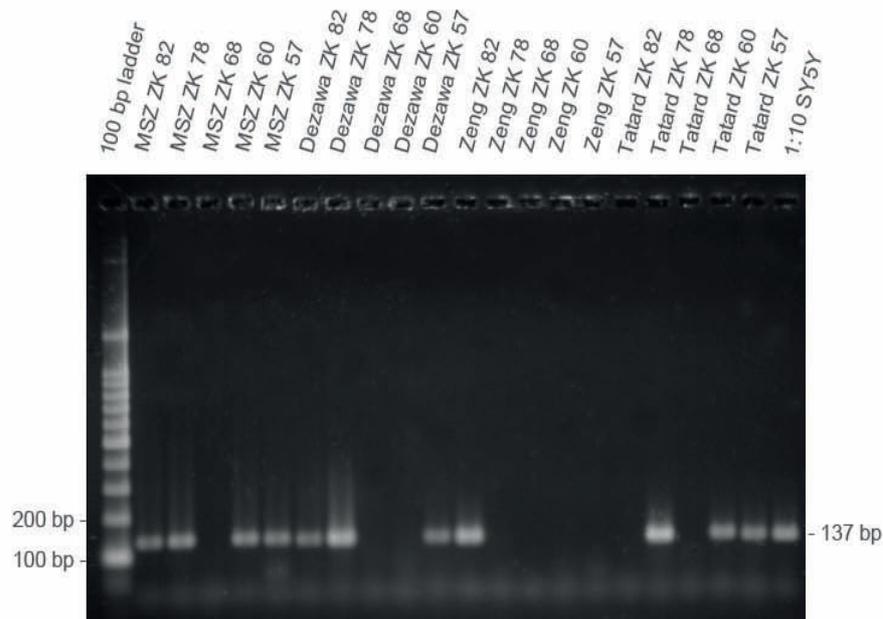


Abbildung 18:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav_v1.1 (137 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass Nav_v1.1 in den ZK's 57, 60, 78 und 82 exprimiert wurde. Lediglich die ZK 68 zeigte keine Expression von Nav_v1.1.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls, konnten in der PCR für die ZK's 57, 78 und 82 positive Banden für Nav_v1.1 festgestellt werden.

Der Kanal war hingegen in den Zellen der ZK 60 nicht mehr detektierbar, obwohl die undifferenzierten MSC's derselben ZK Nav_v1.1 zuvor exprimierten.

Auch in der ZK 68 konnte der Kanal mittels PCR nicht nachgewiesen werden, wobei die undifferenzierten MSC's dieser ZK den Kanal ebenso wenig zeigten.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Nach Ausdifferenzierung der Zellen wurde Nav_v1.1 lediglich in der ZK 82 exprimiert.

Alle anderen ZK's zeigten ein negatives Expressionsmuster für diesen Kanal, obwohl auch die Zellen der ZK's 57, 60 und 78 eine Expression des Kanals im undifferenzierten Zustand gezeigt hatten.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Nav1.1 konnte in den Zellen der ZK's 57, 60 und 78 durch positive Banden in der PCR nachgewiesen werden.

Wohingegen die ZK's 68 und 82 den Kanal nicht exprimierten. Undifferenzierte MSC's der ZK 82 waren zuvor positiv für Nav1.1 gewesen.

4.2.3 Nav1.2

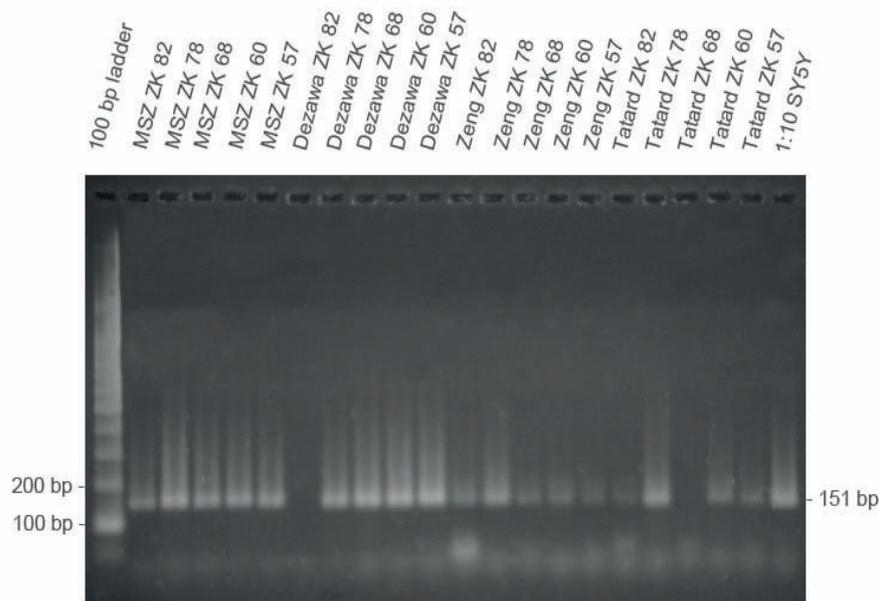


Abbildung 19:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.2 (151 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Die Expression von Nav1.2 konnte in allen ZK's nachgewiesen werden.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Für den Kanal Nav1.2 zeigten sich in der PCR Banden in den ZK's 57, 60, 68 und 78. Lediglich die Zellen der ZK 82 exprimierten den Kanal nicht, obwohl sie im undifferenzierten Zustand noch positiv für Nav1.2 waren.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Alle ZK's zeigten nach ihrer Ausdifferenzierung ein positives Expressionsmuster für Nav1.2.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Nach Beendigung des Tatard-Protokolls wiesen die ZK's 57, 60, 78 und 82 Nav1.2 in der PCR auf, wobei die ZK 82 eine eher schwach ausgeprägte Bande für diesen Kanal zeigte. Die Zellen der ZK 68 zeigten keine Expression des Kanals. Undifferenzierte MSC's der ZK 68 waren zuvor positiv auf Nav1.2 getestet worden.

4.2.4 Nav1.6

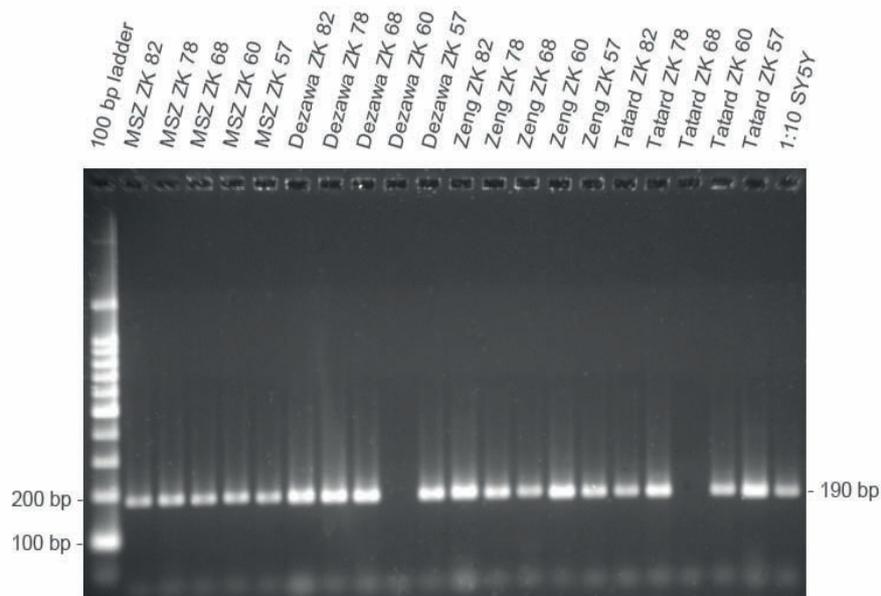


Abbildung 20:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.6 (190 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Alle Proben exprimierten Nav1.6 in der PCR.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Im Anschluss an das Differenzierungsprotokoll zeigten, mit Ausnahme der ZK 60, alle Proben ein positives Expressionsmuster für Nav1.6. Undifferenzierte Zellen der ZK 60 wiesen im Vorfeld ebenfalls eine positive Bande für diesen Kanal auf.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Genau wie bei den undifferenzierten MSC's fiel die PCR des Kanals nach Zelldifferenzierung ebenfalls positiv für alle Proben aus.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Die Zellen der ZK's 57, 60, 78 und 82 exprimierten Nav1.6 in gleicher Stärke. Die Zellen der ZK 68 waren gänzlich negativ für Nav1.6, obwohl die undifferenzierten MSC's dieser ZK den Kanal zuvor exprimierten.

4.2.5 Nav1.7

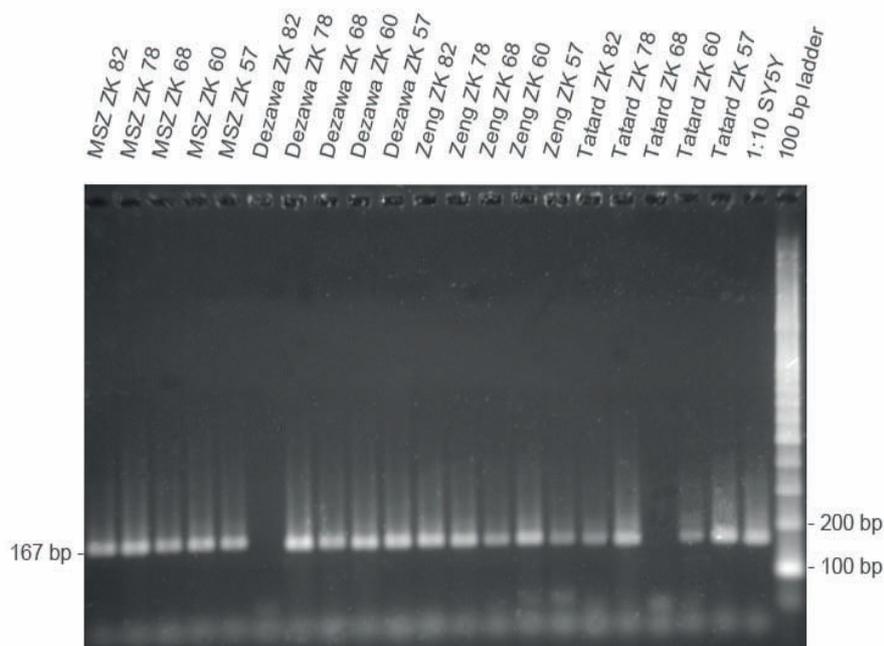


Abbildung 21:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.7 (167 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Alle ZK's exprimierten Nav1.7 in der PCR mit gleicher Stärke.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Bis auf die ZK 82, exprimierten alle Proben (ZK 57, 60, 68 und 78) Nav1.7 nach ihrer Ausdifferenzierung.

Anzumerken ist, dass auch die undifferenzierten MSC's der ZK 82 zuvor ein positives Expressionsmuster für diesen Kanal in der PCR zeigten.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Der Kanal $\text{Na}_v1.7$ konnte in allen ZK's mittels PCR nachgewiesen werden.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Eine positive Expression für $\text{Na}_v1.7$ zeigte sich in den Proben der ZK's 57, 60, 78 und 82. Lediglich in der ZK 68 konnte der Kanal nicht nachgewiesen werden, obwohl er zuvor im undifferenzierten Zustand vorhanden war.

4.2.6 $\text{Na}_v1.8$

Als Positivkontrolle für das Primerpaar von $\text{Na}_v1.8$ fungierte cDNA aus Hodengewebe mit einer Verdünnung von 1:2.

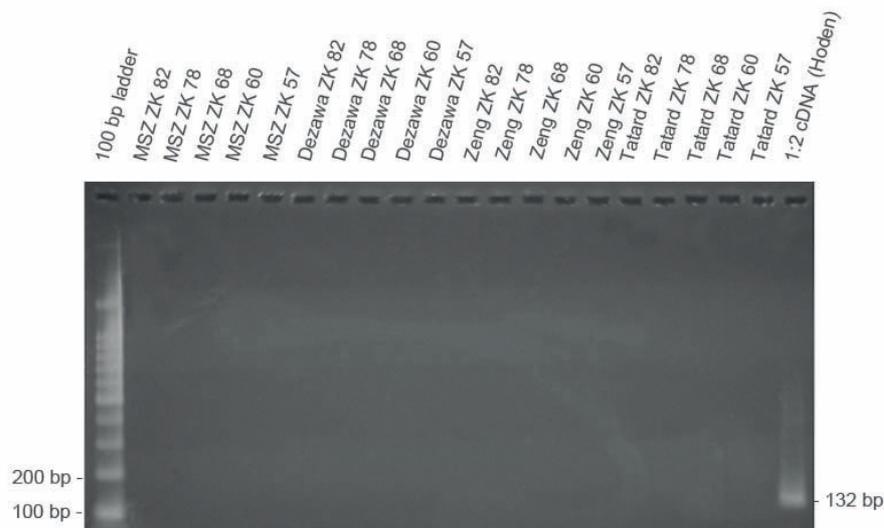


Abbildung 22:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von $\text{Na}_v1.8$ (132 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Keine der Proben zeigte eine positive Expression für $\text{Na}_v1.8$.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Auch nach Beendigung des Protokolls exprimierte keine Probe den Kanal $Na_v1.8$ in der PCR.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Das Differenzierungsprotokoll bewirkte keine Expression von $Na_v1.8$ in einer der untersuchten ZK's.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Keine der untersuchten ZK's exprimierte den Kanal $Na_v1.8$.

4.2.7 $Na_v1.9$

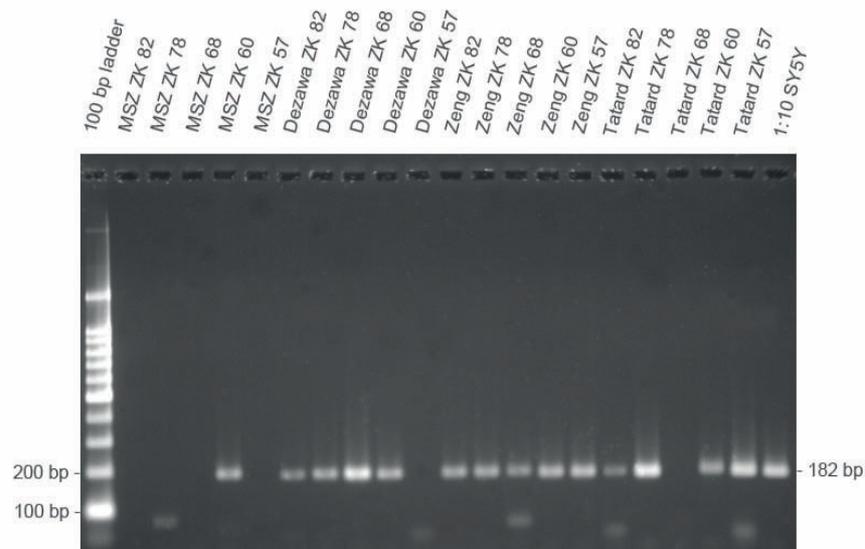


Abbildung 23:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von $Na_v1.9$ (182 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Lediglich in der ZK 60 wurde $Na_v1.9$ exprimiert. Alle anderen Proben blieben in der PCR negativ auf diesen Kanal.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Bis auf die Zellen der ZK 57, zeigten alle anderen ZK's ein positives Expressionsmuster für Nav1.9. Wobei anzumerken ist, dass die ZK 57 bereits im undifferenzierten Zustand negative PCR-Ergebnisse für diesen Kanal zeigte.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Nach Ausdifferenzierung wurde Nav1.9 in allen ZK's exprimiert.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Die Proben der ZK's 57, 60, 78 und 82 waren in der PCR positiv für Nav1.9.

Wohingegen die ZK 68 keine Expression des Kanals zeigte, wobei diese aber bereits im undifferenzierten Zustand schon nicht bestand.

4.2.8 Kv1.2

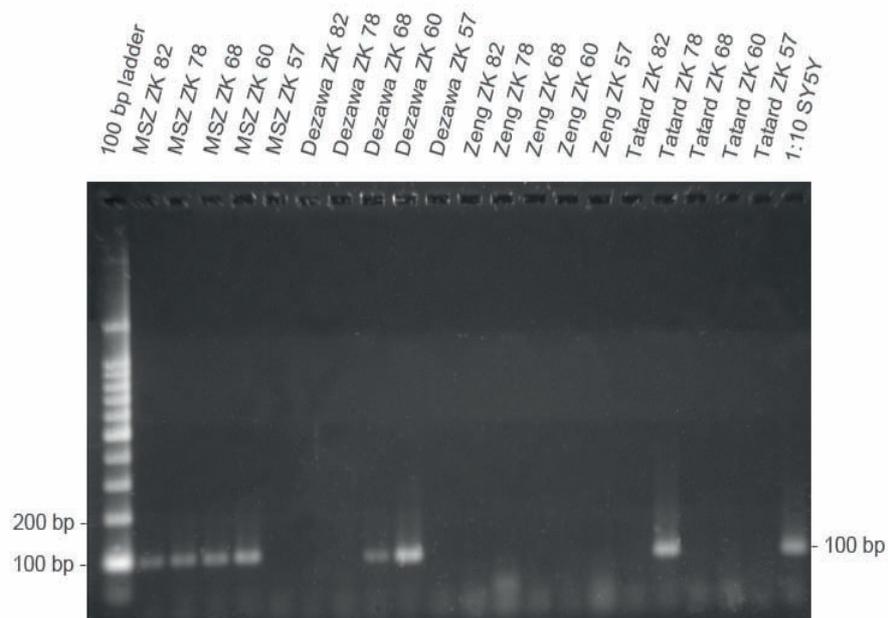


Abbildung 24:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Kv1.2 (100 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Bis auf die Zellen der ZK 57, zeigten alle anderen verwendeten Proben ein positives Expressionsmuster für diesen Kanal.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Nach Differenzierung erfolgte eine Expression von K_v1.2 in den Proben der ZK's 60 und 68, wohingegen alle anderen Proben in der PCR negativ für diesen Kanal blieben. Zu bemerken ist, dass, bis auf die ZK 57, alle anderen Proben zuvor ein positives Expressionsmuster für K_v1.2 im undifferenzierten Zustand aufwiesen.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Keine der untersuchten ZK's exprimierte den Kanal K_v1.2 im Rahmen der PCR.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

K_v1.2 wurde lediglich von der ZK 78 exprimiert. Alle anderen Proben waren in der PCR negativ auf diesen Kanal.

4.2.9 K_v1.3

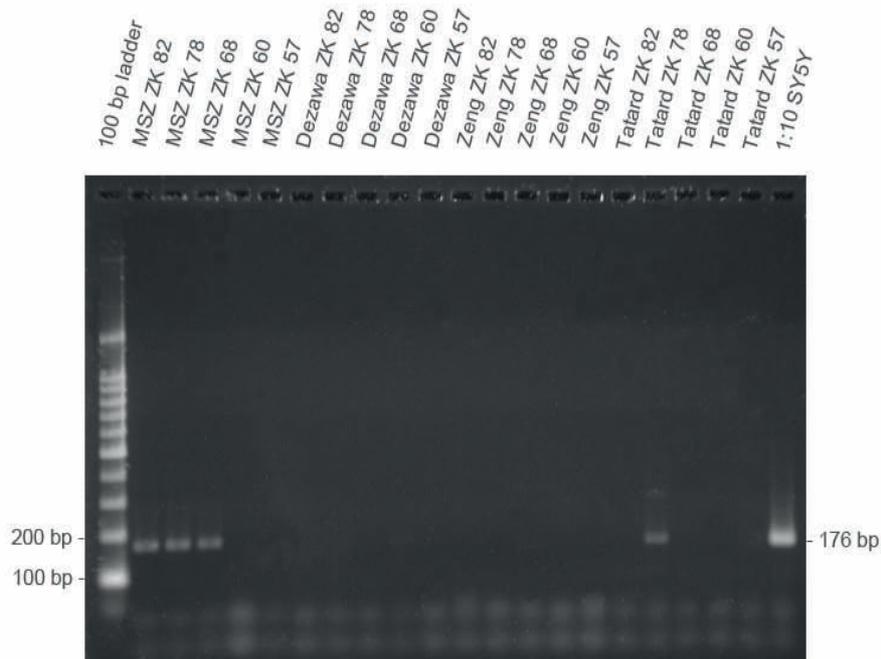


Abbildung 25:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von K_v1.3 (176 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

K_v1.3 wurde von den Proben ZK 68, 78 und 82 exprimiert. Dahingegen zeigten die ZK's 57 und 60 diese Expression nicht.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Die Expression von K_v1.3 war in allen untersuchten Proben negativ, obwohl undifferenzierte MSC's der ZK's 68, 78 und 82 zuvor positiv auf K_v1.3 getestet worden waren.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Alle Proben zeigten nach Differenzierung ein negatives Expressionsmuster für K_v1.3.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Nach Abschluss des Protokolls exprimierte lediglich die ZK 78 K_v1.3 in der PCR. Alle anderen Proben blieben hingegen negativ für diesen Kanal.

4.2.10 Ca_v1.2

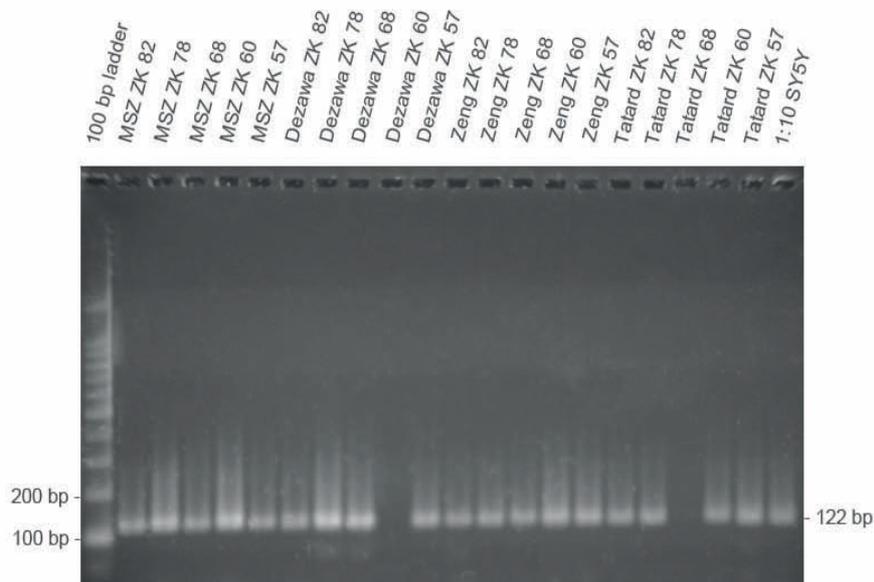


Abbildung 26:

Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Ca_v1.2 (122 bp)

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

Ca_v1.2 konnte in allen untersuchten ZK's mittels PCR detektiert werden.

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

Nach Beendigung des Protokolls reagierten alle Proben auf Ca_v1.2 mit positiven Banden in der PCR, mit Ausnahme der ZK 60. Ca_v1.2 hatte zuvor in den undifferenzierten MSC's der ZK 60 noch eine positive Expression gezeigt.

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

Im Rahmen der PCR wurde Ca_v1.2 von den Zellen aller ZK's exprimiert.

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

Während die Proben der ZK's 57, 60, 78 und 82 mit starken Banden in der PCR reagierten, blieb die Expression von Ca_v1.2 in den Zellen der ZK 68 aus, obwohl diese den Kanal im undifferenzierten Zustand noch exprimierten.

4.2.11 Überblickende Darstellung der molekularbiologischen Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese überblickend dargestellt:

1. Undifferenzierte MSC's (plain):

	Mg	Na _v 1.1	Na _v 1.2	Na _v 1.6	Na _v 1.7	Na _v 1.8	Na _v 1.9	K _v 1.2	K _v 1.3	Ca _v 1.2
ZK 82	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ZK 78	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ZK 68	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ZK 60	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
ZK 57	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Tabelle 14:

Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Undifferenzierte MSC's (plain)

2. Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert):

	Mg	Nav1.1	Nav1.2	Nav1.6	Nav1.7	Nav1.8	Nav1.9	Kv1.2	Kv1.3	Ca _v 1.2
ZK 82	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
ZK 78	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 68	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
ZK 60	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
ZK 57	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Tabelle 15:

Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert)

3. Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert):

	Mg	Nav1.1	Nav1.2	Nav1.6	Nav1.7	Nav1.8	Nav1.9	Kv1.2	Kv1.3	Ca _v 1.2
ZK 82	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 78	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 68	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 60	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 57	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+

Tabelle 16:

Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert)

4. Differenzierte MSC's nach Tatard:

	Mg	Nav1.1	Nav1.2	Nav1.6	Nav1.7	Nav1.8	Nav1.9	Kv1.2	Kv1.3	Ca _v 1.2
ZK 82	+	-	(+)	+	+	-	+	-	-	+
ZK 78	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ZK 68	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZK 60	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
ZK 57	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

Tabelle 17:

Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Tatard

5. Diskussion

5.1 Klinische Anwendungen neuronal differenzierter MSC's

Durch ihr hohes Differenzierungspotenzial stellen MSC's einen Zelltyp intensiver Forschung dar. Dies wird vor allen Dingen durch ihre Fähigkeit begründet sich aufgrund ihrer Multipotenz in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können (Wenisch et al. 2006; Wenisch et al. 2005). Damit sind sie auch im Rahmen des „tissue engineering“ vielseitig einsetzbar. In den vergangenen Jahren konnte, durch mehrere voneinander unabhängige Forschungsgruppen, offensichtlich auch eine *in vitro* Differenzierung der MSC's in Richtung der neuronalen Zelllinie erreicht werden. Damit könnten neuronal differenzierte MSC's Anwendung im Rahmen neurodegenerativer und akuter zerebraler Erkrankungen sowie von Traumata finden. So konnten diesbezüglich bereits in zahlreichen Tierversuchen Erfolge verzeichnet werden.

Im Rahmen von tierexperimentellen Studien zu zerebralen Ischämien bei der adulten Ratte, konnten Liu und Mitarbeiter (Liu et al. 2008), nach venöser Injektion von MSC's, einen positiven Effekt der Zellen auf die axonale Aussprossung von Neuronen des kontralateralen kortikospinalen Traktes beobachten, wodurch eine neuerliche nervale Versorgung geschädigter Areale erreicht werden konnte. Die Wissenschaftler konnten damit zeigen, dass MSC's möglicherweise an der funktionellen Regeneration ischämisch geschädigter Hirn- bzw. Rückenmarksgebiete beteiligt sein könnten (Liu et al. 2008).

Auch Esneault et al. (2008) beschrieben den Einfluss von MSC's in kombinierter Anwendung mit Erythropoietin auf die Neurogenese und Zellproliferation nach transientser fokaler Ischämie im Tiermodell der Ratte. Die neu in das geschädigte Gebiet eingewanderten MSC's reagierten zudem mit der Expression neuronaler und glialer Markerproteine (Esneault et al. 2008).

Auch in weiteren Studien zur Transplantation von MSC's nach zerebralen Ischämien, konnte zuvor ein deutlicher Benefit dieser Methode bezüglich der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Reduzierung von Apoptose nachgewiesen werden (Chen et al. 2000; Chen et al. 2003; Chen et al. 2001; Lee et al. 2003). Darüber hinaus wurden auch die Verbesserung neurologischer Defizite (Zhao et al. 2002) sowie die Wiederherstellung einer ausreichenden Blutversorgung mit Ausbildung einer funktionierenden Blut-Hirn-Schranke (Borlongan et al. 2004) beobachtet.

Bang und Kollegen (Bang et al. 2005) überprüften die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse erstmals an neurologischen Patienten mit zerebralem Insult im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media, indem sie für die intravenöse Zelltherapie autologe, in der Zellkultur expandierte MSC's verwendeten. Im Ergebnis zeigten Patienten, die mit MSC's behandelt wurden, im ersten Jahr nach dem ischämischen Ereignis eine leicht verbesserte funktionelle Regeneration als konventionell behandelte Patienten, sodass sich eine solche Therapie vorteilhaft auf den Heilungsprozess auswirken könnte (Bang et al. 2005).

Die regenerative Wirkung von MSC's wurde ebenso im Rahmen traumatischer Hirnschädigungen untersucht. Im Tiermodell kam es zunächst zur Proliferation und später auch zu einer Migration der venös eingebrachten MSC's in die geschädigten zerebralen Parenchymgebiete. In der Folge reagierten die Zellen zudem mit der Expression neuronaler und glialer Markerproteine, wie mit der von NeuN und GFAP. Weiterhin konnten durch den therapeutischen Einsatz von MSC's neurologische Defizite nach einem Trauma signifikant reduziert und somit das neurologische „outcome“ insgesamt verbessert werden. (Lu et al. 2001; Mahmood et al. 2004; Mahmood et al. 2001a; Mahmood et al. 2001b)

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Transplantationsversuchen von MSC's nach spinalen Traumata gemacht (Ankeny et al. 2004; Chopp et al. 2000; Deng et al. 2006; Hofstetter et al. 2002; Lee et al. 2003; Satake et al. 2004).

Von besonderem Interesse gilt außerdem die Entwicklung neuer Therapieansätze im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson. So konnten Li und Mitarbeiter (Li et al. 2001) in einem Parkinson-Modell der Maus zeigen, dass intrastriatal eingebrachte MSC's mit der Expression des dopaminergen Proteins TH reagierten und sich in der Folge auch positiv auf die Wiederherstellung der zerebralen Funktionalität auswirkten.

Levy et al. (2008) beobachteten jüngst durch die neuronale Ausdifferenzierung von humanen MSC's mit nachfolgender Einbringung der Zellen ins Striatum der Versuchstiere, ein verbessertes Rotationsverhalten der an Morbus Parkinson erkrankten Ratten. Dabei verwendeten die Forscher ein zweistufiges Differenzierungsprotokoll bestehend aus DMEM, 10% FBS, bFGF, 10 ng/ml EGF, 30 µM Docosahexaensäure (DHA) und N2 Supplement in der ersten Stufe, gefolgt von DMEM, N2 Supplement, 200 µM BHA, 1 mM dbcAMP, 0,5 mM IBMX, 100 µM Ascorbinsäure und 1-10 µM RA in Stufe 2. Ein Teil der auf diese Weise differenzierten MSC's zeigten außerdem Merkmale dopaminergere Präkursoren und reagierten mit der

Expression spezifischer dopaminergere Gene sowie mit der Produktion der Dopaminvorstufe 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA). (Levy et al. 2008)

Auch Offen und Mitarbeiter (Offen et al. 2007) fanden zuvor schon eine Verbesserung des motorischen Verhaltens der Tiere bei intrastriärer Transplantation von MSC's.

In klinischen Studien zum Morbus Parkinson am Menschen wurden bereits embryonale bzw. fetale dopaminerge Neurone ins Putamen erkrankter Patienten implantiert (Freed et al. 2001; Olanow et al. 2003). Dabei zeigte sich ein positiver Verlauf des Krankheitsbildes insbesondere bei jüngeren Patienten (≤ 60 Jahren). Bei älteren Patienten (> 60 Jahren) hingegen ergab sich aus dieser Methode kein Benefit. Allerdings kam es im Beobachtungszeitraum nach der Transplantation bei einigen der Patienten zum Auftreten später Dystonien und Dyskinesien. (Freed et al. 2001; Olanow et al. 2003)

Weitere Forschungsergebnisse bleiben diesbezüglich abzuwarten.

Dahingegen wurden bei der Implantation von fetalen neuronalen Zellen in das Striatum eines Patienten mit HD positive Ergebnisse erzielt. Die implantierten Zellen überlebten und zeigten darüber hinaus eine adäquate Entwicklung in dem erkrankten Gehirn. Auch 18 Monate nach Implantation zeigten die Zellen weder die huntingtontypische Neurodegeneration bzw. die Expression des mutierten Proteins Huntingtin, noch war eine Abstoßungsreaktion seitens des Empfängers nachweisbar. (Freeman et al. 2000) Zudem konnten Lescaudron und Dunbar (2003) am HD-Modell der Ratte eine Reduktion der kognitiven Schädigung nach der intrastriären Implantation von MSC's nachweisen.

Akiyama und Mitarbeiter (Akiyama et al. 2002a; Akiyama et al. 2002b) etablierten ein Tiermodell für demyelinisierende Erkrankungen, in welchem sie eine Remyelinisierung des Rückenmarks der Ratte durch Einbringung von MSC's beobachten konnten.

Slavin et al. (2008) überprüften die zelluläre Therapie mit MSC's für die Behandlung von Multipler Sklerose (MS) in präklinischen Studien. Die Sicherheit dieses Ansatzes zur Durchführung an einem Patientenkollektiv wurde in der Folge ausführlich evaluiert (Siatskas et al. 2010).

Eine Pilotstudie von Yamout und Kollegen konnte jüngst eine klinische, jedoch keine radiologische Verbesserung der MS, nach intrathekaler Injektion von MSC's in den zerebrospinalen Liquor der 10 teilnehmenden Patienten, feststellen. Obwohl einer der Patienten in der Folge eine transiente Enzephalopathie entwickelte, konnte dennoch die grundsätzliche Sicherheit dieser Methode bewiesen werden. (Yamout et al. 2010)

Mazzini und Mitarbeiter (Mazzini et al. 2010; Mazzini et al. 2012; Mazzini et al. 2008) konnten im Rahmen mehrerer Studien an Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) zeigen, dass sich die Therapie mit intraspinal eingebrachten autologen MSC's für die Langzeittherapie der ALS eignet.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Protokollen handelt es sich einerseits um Ansätze aus der Parkinson-Forschung, wie etwa bei den Differenzierungsversuchen von Dezawa (Dezawa et al. 2004) und Tatard (Tatard et al. 2007), und andererseits um einen Ansatz zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen (Zeng et al. 2011).

Neben der Anwendung differenzierter MSC's im ZNS, könnten die *in vitro* entwickelten Neurone künftig auch für die Regeneration von Nerven des PNS von Interesse sein. Bisher existieren zahlreiche Arbeiten, welche mit Hilfe spezieller Differenzierungsprotokolle eine Transdifferenzierung von MSC's in Schwann-Zellen erreichen konnten, die in der Folge aufgrund ihrer myelinisierenden Fähigkeit den erneuten Auswuchs von Nervenfasern unterstützten und so zur Regeneration von Nervenschäden an peripheren Nerven, wie beispielsweise dem Nervus ischiadicus, beitrugen (Dezawa et al. 2001; Keilhoff et al. 2006; Mimura et al. 2004). Dezawa et al. (2001) konnten zudem zeigen, dass die differenzierten MSC's nach Kultivierung in einem mehrstufigen Differenzierungsprotokoll, bestehend aus β -ME, 35 ng/ml RA, 5 μ M Forskolin, 10 ng/ml bFGF, 5 ng/ml PDGF und 200 ng/ml humanem Heregulin-Beta 1 (HRG), zudem Schwann-Zell-spezifische Marker, wie p75, Protein-S-100 (S-100), GFAP und O4, exprimierten. Matthes und Mitarbeiter (Matthes et al. 2013) wiesen nach, dass sogar undifferenzierte MSC's, welche intravenös in die Femoralvene von Ratten eingebracht worden waren, in der Lage waren, im Bereich von peripheren Nervenläsionen zu überleben und das funktionelle „outcome“ nach einer Schädigung zu verbessern.

Eine Arbeit, welche MSC's jedoch direkt in neuronale Zellen ausdifferenziert, um diese für die Implantation in periphere Nervenläsionen nutzbar zu machen und somit die Regeneration der geschädigten Nervenfasern durch Überbrückung der Läsion zu unterstützen, existiert bisher jedoch nicht. Eine Verfolgung dieses Ansatzes könnte eine weitere Methode im Sinne der autologen Zelltherapie darstellen. Eine Grundlage dazu könnten somit die Ergebnisse dieser Arbeit bilden.

5.2 Anforderungen an undifferenzierte MSC's

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden MSC's männlicher Spender verschiedenen Alters (Jahrgänge 1929-1993) aus Bohrmehl gewonnen. Ohne vorherige Oberflächenmarkierung mit den stammzelltypischen Markern CD73, 90 und 105 in der FACS (Dominici et al. 2006) und nachfolgender Selektion, wurden die zu untersuchenden MSC's allein mittels ihrer Plastikadhärenz isoliert. Dabei ergaben sich zu Beginn unserer Zellkulturversuche Proben heterogener Kulturen. Diese Populationen könnten neben MSC's somit auch einen gewissen Anteil an fibroblastenähnlichen Zellen (Vogel et al. 2003) und HSC's sowie an endothelialen und neuronalen Progenitoren enthalten haben (Herzog 2003; Hess et al. 2004; Vogel et al. 2003).

Tondreau et al. (2004a) fanden heraus, dass mit Hilfe dieser Methode der Plastikadhärenz bereits nach drei Passagen homogene Kulturen von MSC's gewonnen werden konnten. Zudem beschrieben sie aber auch einen Verlust der multipotenten Eigenschaften der MSC's nach Passage 8. Dies machten sie daran fest, dass Zellen nach der achten Passage im Rahmen ihrer Experimente nicht mehr in der Lage dazu waren sich in Osteozyten zu differenzieren. (Tondreau et al. 2004a)

Das Phänomen des Verlustes der Multipotenz nach mehrmaliger Passagierung wurde zuvor bereits durch DiGirolamo und Kollegen (DiGirolamo et al. 1999) beschrieben. Auch Wagner und Mitarbeiter (Wagner et al. 2008) beobachteten zwischen der 7. und 12. Passage einen Häufigkeitsanstieg von Zellen mit abnormer Morphologie, dabei waren als Zeichen des Alterungsprozesses v.a. große, flache Zellen auszumachen. Auch eine Herunterregulation von Genen, welche u.a. an der Steuerung von Zellzyklus, DNA-Replikation und -Reparatur involviert sind, konnte von den Wissenschaftlern beobachtet werden (Wagner et al. 2008).

In unseren Versuchen wurden ausschließlich Zellen der Passagen 1 und 2 verwendet, um den multipotenten Charakter unserer MSC's zu bewahren. Außerdem konnten, durch vorherige Versuchsreihen unseres Labores und aufgrund unserer Erfahrung im Umgang mit MSC's, bei Zellen höherer Passagen (≥ 3) ein Verlust der Adhärenz mit Beginn der Differenzierung sowie vermehrt apoptotische Zellen beobachtet werden. Zellen, welche trotz dieser Makel ausdifferenziert werden konnten, zeigten gegen Ende des Protokolls, wie zu erwarten, größtenteils schlechte Morphologien mit Beschädigungen im Zytoskelett und Vakuolenbildung des Zytoplasmas. Aus diesem

Grund wurde in unseren Versuchen eine niedrigere Passage, zur Erhaltung von Multipotenz und Fitness der Zellen, einer homogenen MSC-Population vorgezogen.

Darüber hinaus existiert, neben der Heterogenität der Zellen innerhalb einer Kultur, auch eine gewisse Heterogenität von MSC's verschiedener Spender, was sich in einem unterschiedlichen Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen äußern kann. Montzka und Kollegen (Montzka et al. 2009) konnten erstmals eine Variabilität in der Expression neuronaler Marker unterschiedlicher noch undifferenzierter Spender-MSCs nachweisen. Diese Heterogenität kann eine Erklärung für die mangelnde Reproduzierbarkeit diverser neuronaler Transdifferenzierungsprotokolle darstellen.

Auch in unseren Versuchen konnte eine solche Heterogenität der einzelnen ZK's, bezüglich ihrer Expression spannungsabhängiger Ionenkanäle, festgestellt werden. Durch zahlreiche Untersuchungen an MSC's ist bekannt, dass diese bereits im undifferenzierten Zustand $Na_v1.1$, 1.2 (Mareschi et al. 2009), $Na_v1.6$ (Zeng et al. 2011), $Na_v1.7$ (Park et al. 2007) sowie $K_v1.2$ (Wang et al. 2008; Zeng et al. 2011), $K_v1.3$ (Li et al. 2005; Zeng et al. 2011) und $Ca_v1.2$ (Balana et al. 2006; Zeng et al. 2011) exprimieren. In unserer PCR konnten wir ein solches Expressionsmuster für die ZK's 78 und 82 bestätigen. Dahingegen fielen bei den ZK's 57, 60 und 68 deutliche Abweichungen von diesem Muster auf. So zeigten die MSC's der ZK 57 (*1993) keine Expression von $K_v1.2$ sowie $K_v1.3$ und die ZK 68 (*1937) war negativ für $Na_v1.1$. Auffällig erschien das Expressionsmuster der ZK 60 (*1937), welches sich durch eine zusätzliche Expression von $Na_v1.9$ und negativer Expression von $K_v1.3$ auszeichnete.

Die Gründe für eine solche Heterogenität können zahlreich sein. Beispielsweise könnte das Vorhandensein neuraler Progenitoren in der ZK 60 für die Expression des Kanals $Na_v1.9$ verantwortlich sein. Die Negativität für $K_v1.3$ in derselben ZK ließe sich hingegen durch das fortgeschrittene Alter des Spenders erklären. Denn Stolzing et al. (2008) fanden einen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Verlust von Fitness und Anzahl von MSC's im Knochenmark. Dabei vermuteten die Wissenschaftler oxidativen Stress, aufgrund einer verringerten Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) mit der vermehrten Anhäufung von ROS, als die Ursache dieses Phänomens (Stolzing et al. 2008). Auch Muschler und Mitarbeiter (Muschler et al. 2001) beobachteten zuvor, dass die Zahl an osteoblastären Progenitoren des Knochenmarks mit steigendem Alter abnahm. Ursächlich für eine veränderte Genexpression in alternden MSC's könnten zudem epigenetische Dysregulationen, wie z.B DNA-Methylierungen (Bork et al. 2010;

Schellenberg et al. 2011) oder H3-Acetylierungen (Li et al. 2011), sein. Die genannten Faktoren könnten so auch für die fehlende Expression von Nav1.1 in der ZK 68 verantwortlich sein.

Auch die individuellen Vorerkrankungen der Spender könnten ursächlich für die differierende Kanalexpression innerhalb der einzelnen ZK's sein. Bereits Muschler et al. (2001) beobachteten einen Einfluss bestimmter Faktoren, wie beispielsweise lokaler oder systemischer Knochenerkrankungen, Pharmaka oder Nikotin, auf die Zusammensetzung des Knochens und des Knochenmarks. So konnte innerhalb unserer Versuche eine fehlende Expression von Kv1.3 in MSC's der ZK 60 festgestellt werden, wobei anamnestisch ein Nikotinabusus seitens des Spenders bekannt war, was die Theorie von Muschler und Kollegen unterstützten würde. Zudem bestanden bei demselben Spender zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Knochenstoffwechselstörung, wie ein Diabetes mellitus Typ 2 (Goodman und Hori 1984; Hofbauer et al. 2007; Schwartz 2003) sowie ein Morbus Crohn (Compston et al. 1987; Gasché 1998), welche neben der primären Schädigung des Knochens auch sekundär zu einer Quanti- und Qualitätsminderung von MSC's geführt haben könnten. Auch eine bereits bestehende Coxarthrose des Spenders kann diese Annahme zusätzlich untermauern.

Dagegen scheinen bestimmte Vorerkrankungen und Medikationen aber nicht allein zu einer veränderten Genexpression zu führen, denn auch bei MSC's der ZK 57, welche von einem jungen Spender ohne Vorerkrankungen stammten, konnte ein Fehlen der Kanäle Kv1.2 sowie Kv1.3 in der PCR festgestellt werden. Gegen einen alleinigen Einfluss einer Erkrankung auf die Genexpression spricht auch, dass Nav1.1 zwar in MSC's der ZK 68 nicht exprimiert wurde, aber dafür sowohl die ZK 78 als auch die ZK 82 einen kompletten MSC-typischen Kanalbesatz zeigten. Dabei litten alle drei Spender unter einer Coxarthrose, welche den Einsatz einer TEP erforderlich machte. Hinzu kommt, dass der Spender der ZK 78 trotz seines hohen Alters sowie weiterer Vorerkrankungen, wie einer Hypothyreose und einer arteriellen Hypertonie, einen vollständigen Kanalbesatz zeigte.

Festzuhalten ist, dass Vorerkrankungen und entsprechende Medikationen wohl einen individuell sehr unterschiedlichen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und damit auch auf die Anzahl vorhandener MSC's im Knochenmark sowie deren Multipotenz haben könnten, was vor allen Dingen bei multimorbiden Patienten die Genexpression maßgeblich bestimmen kann, wie in der ZK 60 gesehen werden konnte. Eine feste Regel lies sich im Rahmen unserer Versuche jedoch nicht ableiten. Da es sich bei der

ZK 57 um Zellen eines jungen Spenders handelt, können oben genannte Alterungsprozesse die fehlende Expression von $K_v1.2$ und $K_v1.3$ nicht erklären. In diesem Fall kommt womöglich die Heterogenität der Zellkultur an sich zum Tragen.

5.3 Reproduzierbarkeit der Originalprotokolle

Im Rahmen dieses Experimentes galt ein Teil unseres Interesses dem Umstand, in wie weit die von uns ausdifferenzierten MSC's ähnliche morphologische sowie molekularbiologische Ergebnisse nach dem Vorbild der Originalprotokolle erbringen konnten. Darüber hinaus wurden die ausdifferenzierten Zellen von unserer Arbeitsgruppe zusätzlich auf weitere neuronenspezifische Ionenkanäle untersucht.

Anzumerken ist, dass sich die von uns verwendeten MSC's sowohl in ihrer Herkunft, so entstammten die untersuchten Proben einem kleinen Patientenkollektiv von fünf männlichen Spendern unterschiedlichen Alters, als auch in der Methodik ihrer Gewinnung von den Zellen der Originalprotokolle unterschieden. Darüber hinaus wurden von vornherein die Differenzierungsprotokolle von Zeng und Dezawa durch Modifikationen an unseren Versuchsablauf angepasst. Der Begriff der „Reproduzierbarkeit“ beschreibt hier also die Übertragbarkeit der in den Originalversuchen gewonnenen Erkenntnisse auf die Ergebnisse unseres Experimentes, wobei die interindividuellen Zellunterschiede sowie die Protokollmodifikationen jedoch unbedingt Berücksichtigung finden müssen.

5.3.1 Diskussion der morphologischen Ergebnisse

5.3.1.1 Differenzierte Zellen nach Dezawa (modifiziert)

In Anlehnung an das Differenzierungsprotokoll von Dezawa und Mitarbeitern (Dezawa et al. 2004), kultivierten wir in unserem Experiment undifferenzierte MSC's mit dem bekannten vierstufigen Protokoll, welches sich in der Reihenfolge seiner einzelnen Differenzierungsschritte vom Originalprotokoll unterschied. Die Abwandlung vom Originalprotokoll erfolgte auf der Basis von unseren positiven Erfahrungen im Rahmen von Vorversuchen, in welchen MSC's, die in veränderter Reihenfolge mit den

entsprechenden Medien kultiviert wurden, optisch deutlichere neuronentypische Morphologien aufwiesen, als Zellen, die nach der Reihenfolge des Originalprotokolls differenziert wurden. Im Gegensatz zu Dezawa et al. (2004) wurde im Rahmen unserer Versuche auch auf eine Transfektion der NICD verzichtet, um den alleinigen Einfluss der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf die Differenzierung der MSC's greifbarer zu machen. Als Bestandteil eines Transmembranproteins nimmt die NICD Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung von Nerven- und Gliazellen (Baker 2000; Gaiano and Fishell 2002). Mithilfe dieser transfizierten und im Anschluss differenzierten MSC's konnte die Forschungsgruppe um Dezawa (Dezawa et al. 2004) nicht nur die vermehrte Expression des neuronalen Markers NeuroD nachweisen, sondern erreichte zudem eine Messung von Natrium- und Kaliumströmen im Rahmen ihrer patch-clamp-Versuche. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass durch die Gabe von GDNF der Anteil an Tyrosinhydroxylase-positiven und dopaminproduzierenden Zellen gesteigert werden konnte (Dezawa et al. 2004).

Im Laufe der Differenzierung unter dem modifizierten Dezawa-Protokoll konnten wir in unserem Experiment folgende Beobachtungen unter dem Phasenkontrastmikroskop machen:

- ▶ 1) Nach 48 Stunden unter Medium 1 zeigte sich ein potenziell toxischer Einfluss von JAK3-Inhibitor. Die Zellen zeigten dabei überwiegend eine fibroblastenähnliche Gestalt. Die wenigen Zellen mit neuronaler Morphologie machten in Form und Verzweigungsmuster einen diffusen, ungeordneten Eindruck, was v.a. in der ZK 57 deutlich wurde. Die Somata dieser Zellen stellten sich überwiegend flach und scharfkantig dar, während sich die Fortsätze sehr dünn und fragil vom Zellkörper abzweigten. Zudem fanden sich mit Abschluss dieses Differenzierungsschrittes vermehrt tote Zellen und Sediment am Boden der Zellkulturschale.

Die toxischen Eigenschaften von JAK3-Inhibitor auf die in der Differenzierung befindlichen MSC's werden aufgrund seines Wirkmechanismus verdeutlicht. Denn JAK3-Inhibitor verhindert die Transkription von Genen im Zellkern durch die Herunterregulierung der Phosphorylierung entsprechender STAT's (Dezawa et al. 2004). Der Signalweg wird also blockiert und gleichzeitig die neuronale Induktion angetrieben (Dezawa et al. 2004). Dennoch scheint die Inhibition des JAK-STAT-

Signalweges einen potenziellen Stressfaktor für die Zellen darzustellen, da über diesen normalerweise auch Vorgänge wie die Zellproliferation und -differenzierung vermittelt werden (Rawlings et al. 2004). Dieses Paradoxon wird dadurch aufgelöst, dass eine Blockade *in vitro* zugunsten der neuronalen Induktion für 48 Stunden in Kauf genommen werden kann. Demnach werden die Zellen bereits zu Beginn forciert in die neuronale Richtung differenziert. Nach Abschluss des ersten Differenzierungsschrittes nimmt der Signalweg wieder regelrecht an der Signalübertragung teil, da der JAK-Inhibitor reversible Bindungen eingeht (Mityushova et al. 2010; Sudbeck et al. 1999). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, zeigte sich im Originalversuch, nach der Behandlung mit JAK3-Inhibitor und anschließender Differenzierung mittels trophischer Faktoren, ein neuritenähnliches Auswachsen von Zellfortsätzen (Dezawa et al. 2004).

- ▶ 2) Die Behandlung mit GDNF führte zur Ausprägung einer makrophagenartigen Morphologie der Zellen, wie sie beispielsweise in der ZK 82 deutlich wurde. Diese Zellen fielen insbesondere durch große, flächige Zellkörper mit pseudopodienartigen Fortsätzen auf. Insgesamt konnten im Rahmen dieses Schrittes Zellen variabler Gestalt differenziert werden.

Innerhalb unseres Versuches zeigte GDNF seine regenerative Wirkung auf die durch JAK3-Inhibitor geschädigten bzw. gestressten Zellen der ZK's. Denn nachweislich unterstützt GDNF das Überleben von Nervenzellen (Arenas et al. 1995; Lin et al. 1993) sowie deren Erholung nach Schädigung, z.B durch Neurotoxine (Cass 1996; Kearns und Gash 1995) oder Axotomie (Beck et al. 1995; Henderson et al. 1994). Weiterhin konnten Dezawa und Mitarbeiter unter der Behandlung mit GDNF den Tyrosinhydroxylase-positiven und dopaminproduzierenden Anteil ihrer Zellen deutlich steigern und dem Faktor somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Differenzierung von Nervenzellen zuschreiben (Dezawa et al. 2004).

Die Zellen zeigten also nach Beendigung des zweiten Differenzierungsschrittes, neben fibroblastenähnlichen Morphologien, bereits variable neuronale Gestalten, wobei v.a. Zellen mit sternförmigen flächigen Zellkörpern und makrophagenartige Zellen auffielen.

- ▶ 3) Neuronenähnliche Zellen konnten vor allen Dingen unter Medium 3 differenziert werden. Dieses Ergebnis wurde in der Folge durch den vierten Differenzierungsschritt optimiert. Am Ende fanden sich, neben weiteren

Zelltypen, vermehrt große, flächige Zellen mit sternförmigen Perikarya und reicher baumartiger Verzweigung.

Die morphologischen Ergebnisse der letzten beiden Differenzierungsschritte stimmen mit den jeweiligen Funktionen der verwendeten Faktoren überein. So konnten bereits Kim und Mitarbeiter (Kim et al. 2005) unter Forskolingabe eine Verbesserung der neuronalen Morphologie beobachten. Auch am Wachstum neuronaler Fortsätze (Hernandez et al. 1995) sowie der Bildung von Synapsen (Poser und Storm 2001; Weisskopf et al. 1994) scheint das Forskolin maßgeblich beteiligt zu sein. Das Neurokin CNTF kam im Rahmen des dritten Schrittes vordergründig in seiner Rolle als Überlebensfaktor (Sendtner et al. 1991) zum Tragen.

Im Originalprotokoll wurden durch Dezawa und Kollegen (Dezawa et al. 2004) die Bildung von Neuriten sowie die Entwicklung von zahlreichen Varikositäten nach fünftägiger Induktion der transfizierten Zellen unter Medium 3 beschrieben, was sich auch im Rahmen unseres Experimentes manifestierte. Denn nach Abschluss des letzten Differenzierungsschrittes konnte *in vitro*, durch die Zugabe der Neurotrophine NGF und BDNF, ein breites Spektrum an morphologisch neuronal differenzierten Zellen beobachtet werden. Durch die Beteiligung der Faktoren an Differenzierung und Neuritenwachstum (McAllister et al. 1999) entstanden Zellen mit sternförmig ausgezogenen Zellkörpern, von denen kräftige Fortsätze entsprangen und in der Peripherie baumartige Verzweigungsmuster bildeten. Zudem konnte bereits die Ausbildung von netzwerkähnlichen Strukturen zwischen den Fortsätzen mehrerer solcher Zellen beobachtet werden.

5.3.1.2 Differenzierte Zellen nach Zeng (modifiziert)

Das Differenzierungsprotokoll von Zeng und Kollegen (Zeng et al. 2011) zeichnete sich durch eine Kombination von Zytokinen und Antioxidantien aus, welche in drei Stufen zu einer neuronalen Gestalt humaner MSC's führte. Sowohl undifferenzierte, als auch die ausdifferenzierten Zellen, wurden in der Folge mit Hilfe des Western blots auf die Expression der Ionenkanäle $Na_v1.6$, $K_v1.2$ und $K_v1.3$ sowie $Ca_v1.2$ hin untersucht. Im Ergebnis zeigten sich positive Expressionsmuster für diese Kanäle, wobei die Expressionen von $Na_v1.6$ und $K_v1.2/1.3$ nach erfolgter Differenzierung gesteigert

werden konnten. Auch die entsprechenden Kaliumströme konnten nachfolgend mit der patch-clamp-Methode sichtbar gemacht werden. (Zeng et al. 2011)

Aufgrund des positiven Effektes von Forskolin im Rahmen zahlreicher Vorversuche zur neuronalen Differenzierung innerhalb unseres Labores, modifizierten wir das Zeng-Protokoll für die Verwendung in diesem Experiment insoweit, als dass dem Protokoll ab dem zweiten Schritt zusätzlich Forskolin in einer Konzentration von 4 μM zugefügt wurde. Das modifizierte Protokoll erbrachte folgende Erkenntnisse in der Zellkultur:

- ▶ 1) Die Behandlung der Zellen mit bFGF führte zu einer adäquaten Adhärenz der fibroblastenähnlichen Zellpopulationen, welche überwiegend durch Zellen mit rundlichen oder länglichen Somata, schlanker und flächiger Silhouette, bestimmt wurden.

Es ist davon auszugehen, dass bFGF als mitogener Faktor die Zellteilung in den MSC's unserer Kulturen anregte und zudem Einfluss auf deren Proliferation und Differenzierung nahm (Gospodarowicz et al. 1987; Murphy et al. 1990). Auch am Überleben der Zellen scheint der Wachstumsfaktor maßgeblich beteiligt zu sein (Grothe et al. 1991b; Morrison et al. 1986; Walicke et al. 1986). So lassen sich in unseren Versuchen sowohl das gute Anwachsen der undifferenzierten Zellen an den Schalenböden, sowie auch die erkennbare Proliferation der Zellen nach dem ersten Differenzierungsmedium, hinreichend durch den Einfluss von bFGF erklären. Die Ergebnisse entsprechen dabei denen des Originalversuchs.

- ▶ 2) Durch die Kombination von Zytokinen mit Edoxon und Forskolin in Medium 2 konnten vermehrt differenzierte MSC's mit neuronaler Gestalt beobachtet werden. Der vorherrschende Zelltyp, wie er beispielsweise in den ZK's 57, 78 und 82 zu finden war, stellte sich mit pyramidalen Zellkörpern und maximal drei davon abzweigenden langen dünnen Fortsätzen dar, welche bereits Wachstumskegel aufwiesen und zudem periphere Verzweigungen bildeten.

In der ZK 60 waren hingegen auch viele optisch dedifferenzierte Zellen nachweisbar, deren Morphologie sich keiner bestimmten Zelllinie zuordnen ließ. Davon abgesehen machten sie einen wenig vitalen Eindruck mit vermehrter proapoptotischer Tendenz.

Durch den gemeinsamen Einsatz von bFGF und EGF versprachen wir uns eine Förderung der Proliferation und der neuronalen Induktion, wie sie bereits durch mehrere Forschungsgruppen zuvor beschrieben werden konnte (Anchan et al. 1991; Lillien und Cepko 1992; Richards et al. 1992). Vor allen Dingen die Induktion der Zellen in Richtung einer neuronalen Zelllinie konnte durch das zweite Differenzierungsmedium gefördert werden. Die Zellen zeigten, wie im Originalversuch von Zeng (Zeng et al. 2011), im Gegensatz zu ihrem Entwicklungsstand nach Medium 1, typische pyramidenförmige, refraktile Zellkörper mit langen Zellfortsätzen und progredienter Entwicklungstendenz, was durch das Vorhandensein von Wachstumskegeln untermauert wurde. Die Entwicklung der Zellen wurde vermutlich auch durch den neuroprotektiven Effekt der antioxidativ wirkenden Substanz Edaravone vorangetrieben. Wobei die Effekte des Antioxidans hauptsächlich über die Blockade der ROS-Produktion (Nishi et al. 1989; Yamamoto et al. 1997; Yoshida et al. 2006) sowie über die Inhibition proapoptotischer Signalwege (Niyaz et al. 2007; Wen et al. 2006) vermittelt werden.

In der ZK 60 zeigte sich, entgegen dieser Effekte, aber auch der potenziell schädigende Einfluss dieses Mediums, welcher aber nicht an einem einzigen Faktor festgemacht werden konnte, sondern sich womöglich aus der Kombination der verschiedenen Substanzgruppen und den individuellen Eigenschaften der Spender-MSCs ergab. Ein schädigender Einfluss von Edaravone allein konnte durch Vergleich mit den anderen untersuchten ZK's demnach nicht beobachtet werden.

- ▶ 3) Das Bild neuronienartig differenzierter Zellen zeigte sich nach Abschluss des dritten Differenzierungsmediums als besonders vielgestaltig. Dabei sei v.a. die ZK 78 genannt. Neben Zellen mit schlanken fadenförmigen Somata und langen dünnen Fortsätzen, die zum Teil Wachstumskegel aufwiesen, konnten auch kleine sternförmige Zellen mit reicher Verzweigung beobachtet werden. Vielerorts zeigten sich zudem netzwerkartig verbundene Zellgebilde. Auffällig nach diesem Medium waren die starke Konfluenz der Zellen, welche primär im Zentrum der Petrischale am stärksten ausgeprägt war, sowie die große Menge an angefallenem Sediment aufgrund der erhöhten Stoffwechselrate der Zellen.

Die zusätzliche Einbringung von Forskolin in das ursprüngliche, rein aus den Neurotrophinen NGF und BDNF bestehende Originalmedium, erbrachte insgesamt ein sehr gutes optisches Ergebnis, welches sich bezüglich der Zellform durch das Vorkommen schlanker neuronenhähnlicher Zellen von dem des Dezawa-Protokolls unterschied. Genau wie wir fanden auch Zeng und Mitarbeiter (Zeng et al. 2011) 10 Tage nach Beginn der neuronalen Differenzierung mit BDNF und NGF überwiegend schlanke Zellen neuronaler Gestalt mit kleinen Zellkörpern und einer starken Ausprägung von neuronalen Fortsätzen.

Insgesamt zu beachten ist die unterschiedliche Zielsetzung der Originalprotokolle, welche die Ausdifferenzierung verschiedener neuronaler Zelltypen anstrebte. Während die Forschungsgruppe um Zeng (Zeng et al. 2011) mit Hilfe neuronal ausdifferenzierter MSC's die Behandlung von Rückenmarksverletzungen anstrebte, machten sich Dezawa et al. (2004) zum Ziel, im Rahmen von tierexperimentellen Studien zum Morbus Parkinson, zentrale dopaminerge Neurone aus MSC's zu differenzieren.

5.3.1.3 Differenzierte Zellen nach Tatard

Durch die Kombination von Zytokinen und chemischen Substanzen in einem dreistufigen Protokoll erreichten Tatard et al. (2007) die Differenzierung neuronenhähnlicher Zellen aus MIAMI-Zellen, deren elektrophysiologischen Eigenschaften Parallelen zu denen reifer Neurone zeigten. Darüber hinaus konnte die Expression zahlreicher neuronaler Marker, wie die von NeuN, Neurofilament und Synaptophysin, in den differenzierten Zellen nachgewiesen werden (Tatard et al. 2007). Nach Anwendung des Protokolls auf unser Experiment, konnten folgende morphologische Veränderungen mittels der Phasenkontrastmikroskopie beobachtet werden:

- ▶ 1) Wie bereits im Rahmen des modifizierten Zeng-Protokolls beschrieben, dessen erster Differenzierungsschritt sich identisch mit dem des Tatard-Protokolls darstellt, konnten in allen ZK's proliferierende Populationen von rundlichen fibroblastenartigen Zellen beobachtet werden. Hierbei ergab sich in allen Schalen ein vermehrter Anfall von Sediment durch den erhöhten Zellstoffwechsel im Zuge der Differenzierung.

Es bleibt zu erwähnen, dass unsere Beobachtungen soweit mit denen des Originalprotokolls übereinstimmten.

- ▶ 2) Nach 48 Stunden unter Medium 2 fanden sich in den Proben aller ZK's homogene Populationen an morphologisch neuronal differenzierten Zellen, welche sich in drei verschiedene Typen einteilen ließen. Neben pyramidal geformten Zellen mit langen dünnen Fortsätzen, welche jedoch keine terminalen Verzweigungen aufwiesen, konnten auch Zellen mit sternförmigen Perikarya und reich verzweigten Neuriten identifiziert werden. Zudem fanden sich in der ZK 57 vermehrt abnorm geformte Zellen, deren Fortsätze durch Aussparungen, als Zeichen apoptotischer Aktivität, unterbrochen waren.

Unter Medium 2 zeigte sich demnach die rasche Entwicklung der MSC's von einer überwiegend fibroblastenähnlichen zu einer deutlich neuronalen Morphologie. Ursächlich für diese schnelle Entwicklung scheint die Kombination des antioxidativ wirkenden β -ME (Grill und Pixley 1993) mit dem Neurotrophin NT-3 zu sein. Unter dieser Kombination zeigten sich vermehrt pyramidale Zellen, von deren Somata in der Regel bis zu drei lange Fortsätze ausgingen.

Ishii und Mitarbeiter (Ishii et al. 1993) konnten in Zellkulturversuchen mit fetalen zerebralen Nervenzellen der Maus bereits den positiven Effekt von β -ME auf die Zellviabilität, -differenzierung und das Wachstum von Neuriten nachweisen. Sie mutmaßten, dass β -ME damit ebenso wie die Gruppe der Neurotrophine eine gewisse trophische Aktivität besitzen muss (Ishii et al. 1993). Verstärkt wird die Wirkung des β -MEs zusätzlich durch NT-3, welches ebenfalls Proliferation, Migration und Differenzierung unreifer ZNS-Regionen unterstützt (Maisonpierre et al. 1990).

Zellen vom bipolaren Typ, wie sie im Originalprotokoll auftraten (Tatard et al. 2007), wurden auch in unseren Versuchen gesehen. Somit konnten wir die Beobachtungen von Tatard et al. (2007) insoweit bestätigen, als dass die Zugabe von NT-3 u.a. mit einem verstärkten Neuritenwachstum verbunden war.

Bei den MSC's des jüngsten Spenders (*1993), der ZK 57, führte dieser Differenzierungsschritt jedoch zu einer erhöhten Zahl apoptotischer Zellen. Die verbliebenen noch adhärenen Zellen zeigten darüber hinaus teilweise abnorm geformte, scharfkantige Somata und diskontinuierliche Fortsätze. Eine Begründung könnte womöglich das erhöhte toxische Potenzial von β -ME darstellen, welches *in*

vitro, wie in diesem Beispiel, zu einer Denaturierung von Proteinen des Zytoskeletts der Zellen geführt haben könnte.

- ▶ 3) Bereits nach 24 Stunden unter dem dritten Differenzierungsmedium zeigten sich in den Schalen aller ZK's vermehrt Komplexe frei flottierender apoptotischer Zellen sowie größere Mengen an Sediment. Noch adhärenente Zellen, an zuvor dicht besiedelten Stellen, imponierten mit unnatürlich geformten Somata und fragil abzweigenden Neuriten. Ausnahmen stellten die ZK's 60 und 82 dar, in welchen noch vermehrt neuronal differenzierte Zellen gefunden werden konnten, die zudem netzwerkartige Strukturen mit anderen Zellen dieser Art auszubilden schienen.

Nach Zugabe des dritten Mediums trat demnach das toxische Potenzial dieses Protokolls deutlich zutage. Wir vermuteten die Ursache für den raschen Zelluntergang bei den synthetischen Substanzen VPA sowie BHA, wobei Letzteres als Antioxidationsmittel fungiert (Verhagen et al. 1991). Normalerweise wirkt die VPA über eine Hochregulation neuronaler Transkriptionsfaktoren, wie der von NeuroD, stimulierend auf die neuronale und gleichzeitig inhibierend auf die gliale Differenzierung (Hsieh et al. 2004). Dieser Wirkmechanismus wird durch die Blockade von Histondeacetylasen vermittelt, wodurch eine Hyperacetylierung der Histone erreicht wird (Göttlicher et al. 2001) und die Affinität dieser zum Phosphatgerüst der DNA aufgrund von Ladungsverschiebungen abnimmt. Die DNA wird auf diese Weise für Modifikationen leichter zugänglich gemacht. Zudem entfaltet die Substanz durch die Inhibition proapoptotischer Faktoren bzw. Proteine einen neuroprotektiven Effekt (Chen et al. 1999).

Diese Eigenschaften konnten, bezogen auf die ZK's 60 und 82, bestätigt werden. Im Originalprotokoll fanden sich bereits zu Beginn des dritten Differenzierungsschrittes homogene Populationen an neuronähnlichen Zellen mit langen verzweigten Neuriten, welche im Laufe der Differenzierung an Komplexität und Länge zunahm (Tatard et al. 2007).

Gegenteilige Beobachtungen, wie oben bereits angesprochen, konnten wir im Rahmen unserer Versuche an den ZK's 57, 68 und 78 machen, sodass nach 48 Stunden unter Medium 3 eine Modifikation dieses Schrittes durchgeführt werden musste, um einen Verlust aller Zellen und damit den Abbruch der Versuchsreihen zu vermeiden. Wobei die Unausweichlichkeit eines Versuchsabbruches unter den zuvor benannten

Bedingungen bereits im Rahmen früherer Experimente bestätigt werden konnte. Nach Elimination von VPA und BHA sowie unter Beibehaltung aller anderen Faktoren in gleichen Konzentrationen, ergab sich mit Abschluss des Protokolls eine Regeneration aller Zellkulturen. Die differenzierten Zellen erholten sich rasch und zeigten gegen Ende variable neuronale Morphologien. Neben Zellen mit sternförmig geformten Zytoplasmen und langen verzweigungsreichen Neuriten, ließen sich auch pyramidale Zellen mit kurzen, plumpen Zytoplasmaausziehungen beobachten. Die ausgeprägten Verzweigungsmuster sowie das Längenwachstum der Neuriten führten wir, wie schon im Originalprotokoll beschrieben, auf die Behandlung der Zellen mit NT-3 zurück. Insgesamt konnte die Zahl an apoptotischen Zellen nach Modifikation deutlich reduziert werden. Wir stellten dennoch die Vermutung an, dass die VPA zu Beginn des letzten Differenzierungsschrittes, also innerhalb der ersten 48 Stunden, von Bedeutung sein muss, da die DNA durch diese der neuronalen Differenzierung zugänglicher gemacht werden kann. In der Folge wurde aber aufgrund des toxischen Potenzials, nach Ablauf dieser ersten 48 Stunden, auf die Zugabe von VPA und BHA verzichtet und eine Differenzierung vorwiegend mithilfe der Zytokine und Wachstumsfaktoren präferiert. Die Zugabe von Insulin, Hydrocortison und KCl nach den Vorgaben des Originalprotokolls diente u.a. der Nährstoffversorgung, dem Aufbau und der Erhaltung des natürlichen Membranpotenzials der Zellen sowie, im Falle von Hydrocortison, der physiologischen Aktivierung von MSC's (Shipunova et al. 2013). Zudem stellt Insulin einen neurotrophen Faktor dar, welcher, ähnlich wie EGF, Einfluss auf die Zellproliferation nimmt (Dikic et al. 1994). Weiterhin wirken höhere Konzentrationen an extrazellulärem Kalium begünstigend auf die Entwicklung und das Überleben von neuronalen Zellen *in vitro* (D'Mello et al. 1993).

5.3.2 Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse der PCR

5.3.2.1 Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels modifiziertem Dezawa-Protokoll

Mittels der Untersuchung in der PCR und anschließender gelelektrophoretischer Markerauftrennung, konnte die spezifische Expression spannungsabhängiger Ionenkanäle auf der Genebene der ausdifferenzierten Zellen sichtbar gemacht werden.

Für die Expression von Mg und Na_v1.8 ergab sich kein Unterschied zu derer undifferenzierter MSC's. Veränderte Expressionsmuster ergaben sich dagegen für diverse andere Kanäle. Geordnet nach ZK's ergaben sich folgende Änderungen in der Kanalexpression:

► 1) Nach Ausdifferenzierung der Zellen der **ZK 82** (*1970) ergaben sich deutliche Änderungen im Expressionsmuster der untersuchten Kanäle. So kam es zu einem Verlust der Expression von Na_v1.2 und Na_v1.7 sowie der Kaliumkanäle K_v1.2 und K_v1.3, welche im Zustand der undifferenzierten MSC's noch regelrecht exprimiert worden waren. Morphologisch konnte ein Verlust von Kanälen jedoch nicht vermutet werden. Denn die ausdifferenzierten Zellen der ZK präsentierten sich mit unterschiedlichen neuronalen Morphologien. Dabei wurden v.a. Zellen mit schlanken Somata und langen dünnen Fortsätzen, aber auch solche mit sternförmiger Konfiguration und baumartigen Verzweigungsmustern beobachtet.

Darüber hinaus zeigten die Zellen nach Differenzierung die Expression des Ionenkanals Na_v1.9, welcher in den undifferenzierten MSC's zuvor nicht vorhanden war.

► 2) Die Zellen der **ZK 78** (*1929) reagierten auf das Differenzierungsprotokoll mit einem Verlust der Kanäle K_v1.2 sowie K_v1.3. Als morphologisches Korrelat dieses Verlustes fanden sich in dieser ZK gegen Ende der Differenzierung vermehrt tote Zellen, welche durch Ablösung vom Boden der Petrischalen frei im Medium flottierten.

Allerdings konnte auch hier der Natriumkanal Na_v1.9 durch die Differenzierung hinzugewonnen werden.

► 3) Die **ZK 68** (*1937) zeigte nach Differenzierung in der PCR einen Verlust von K_v1.3 sowie einen Zugewinn von Na_v1.9. Auch die Zellen dieser ZK zeigten morphologisch neuronale Optik, wobei sogar die Ausbildung netzwerkähnlicher Strukturen gesehen werden konnte.

► 4) Bei den ausdifferenzierten Zellen der **ZK 60** (*1937), konnten wir im Vergleich zum undifferenzierten Zustand eine fehlende Expression für Na_v1.1, Na_v1.6 und Ca_v1.2 beobachten. Auch hier wurden morphologisch

neuronenähnliche Zellen variabler Ausprägung gefunden, wodurch der Verlust der Natriumkanäle und des Kalziumkanals somit nicht erklärt werden kann.

► 5) Nach Ausdifferenzierung kam es im Expressionsmuster der **ZK 57** (*1993) zu keiner Veränderung verglichen mit den Zellen im undifferenzierten Zustand. Dieses PCR-Ergebnis deckt sich auch mit der Morphologie der Zellen vor der Zellerntung. Denn hierbei konnten wir vermehrt kleine rundliche bis sternförmige Zellen ausmachen, deren kurze Fortsätze eine gewisse Fragilität und Diskontinuität als Zeichen des toxischen Stresses und des Zelluntergangs aufwiesen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe ist der Zugewinn des Kanals $Na_v1.9$ in den ZK's 82, 78 und 68 insgesamt als positiv zu vermerken. Zu beachten ist jedoch, dass sowohl die ZK's 82 und 68, welche sich nach Ausdifferenzierung mit einer guten neuronähnlichen Morphologie auszeichneten, den Kanal ebenso neu exprimierten, wie die ZK 78, welche wiederum einen erhöhten Anteil toter Zellen nach erfolgter Differenzierung aufwies. Negativierend hinzu kommt der Verlust von Kaliumkanälen in eben genannten ZK's (ZK 82, 78, 68) sowie einiger Natriumkanäle (ZK 82, 60), wobei dieser Verlust keiner Regelmäßigkeit zu folgen scheint. So fand sich in der ZK 82 ein negatives Ergebnis für die Expression der Kanäle $Na_v1.2$ und $Na_v1.7$, während in der ZK 60 ein Verlust von $Na_v1.1$ und $Na_v1.6$ beobachtet werden konnte. Beide ZK's zeigten jedoch morphologisch neuronähnliche Zellen variabler Gestalt. Eine weitere Modifikation des Differenzierungsprotokolls und vorheriger Arbeitsschritte scheint angebracht, um u.a. interindividuelle Unterschiede der Spender-MSCs zu überbrücken.

5.3.2.2 Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels modifiziertem Zeng-Protokoll

Untersuchungen im Rahmen des Originalversuchs von Zeng und Mitarbeitern (Zeng et al. 2011) zeigten eine Expression der untersuchten Kanäle ($Na_v1.6$, $K_v1.2$ und $K_v1.3$, $Ca_v1.2$) sowohl in den undifferenzierten, als auch in den differenzierten Zellen. Darüber hinaus wurden die Kanäle $Na_v1.6$, $K_v1.2$ und $K_v1.3$ in den differenzierten Zellen in gesteigertem Maße exprimiert (Zeng et al. 2011).

Nach Abschluss unseres modifizierten Differenzierungsprotokolls und der Untersuchung der cDNA der ausdifferenzierten Zellen in der PCR, ergaben sich für die Kanäle Mg, Nav1.8 sowie Cav1.2 in allen ZK's dieselben Expressionsmuster wie in den undifferenzierten MSC's. Die Abweichungen werden in der Folge aufgeführt:

► 1) In der **ZK 82** (*1970) wurde nach Ausdifferenzierung der Verlust von Kv1.2 und Kv1.3 beobachtet. Dafür zeigten die Zellen in der PCR aber eine positive Bande für Nav1.9.

► 2) Die Expressionsmuster für die untersuchten Kanäle **aller anderen ZK's** (ZK 78, 68, 60, 57) stellten sich als identisch heraus. Auffällig erschien dabei ihre Negativität für Nav1.1 sowie die Kaliumkanäle Kv1.2 und Kv1.3. Obwohl Nav1.1 zuvor in den undifferenzierten MSC's der ZK's 57, 60 und 78 exprimiert worden war. Auch beide Kaliumkanäle hatten zuvor ein positives Expressionsmuster in den ZK's 68 und 78. In der ZK 60 wurde in den undifferenzierten MSC's zuvor zumindest Kv1.2 exprimiert.

Zudem konnte aber auch der Zugewinn von Nav1.9 in den ZK's 57, 68 und 78 beobachtet werden. Die ZK 60 war bereits im undifferenzierten Zustand positiv für Nav1.9 gewesen.

Trotz der fehlenden Kaliumkanäle, zeigten die Zellen aller ZK's am Ende der Ausdifferenzierung gute neuronartige Morphologien. Sogar die Ausbildung von Wachstumskegeln an den Terminalen von Neuriten konnte, besonders in der ZK 78, beobachtet werden. In der ZK 60 waren zudem netzwerkartige Strukturen erkennbar. Es fand sich in unseren Untersuchungen demnach keine Übereinstimmung zwischen einer neuronalen Morphologie und der Funktionalität der Zellen in Form einer entsprechenden Kanalexpression.

Insgesamt konnte das Ergebnis des Originalversuchs von Zeng et al. (2011) für die Kanäle Kv1.2 und Kv1.3, welche nach Ausdifferenzierung in allen ZK's verloren gingen, nicht bestätigt werden. Die Modifikation des Originalprotokolls unsererseits führte bezüglich der Kaliumkanalexpression demnach zu einem negativen Ergebnis.

5.3.2.3 Kanalexpression nach neuronaler Differenzierung mittels Tatard-Protokoll

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse ergab für die Zellen, welche nach dem Tatard-Protokoll ausdifferenziert wurden, identische Expressionsmuster zu denen undifferenzierter MSC's für die Primerpaare von Mg und Na_v1.8.

In keinem der anderen Protokolle divergierten die einzelnen Expressionsmuster zwischen den untersuchten ZK's so weit auseinander wie in diesem, sodass für die Differenzierung der Zellen unter diesem Protokoll die „Alles-oder-nichts-Regel“ angewendet werden kann. Wie zuvor in der Diskussion der morphologischen Ergebnisse beschrieben, trat auch im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen das toxische Potenzial dieses Protokolls zutage. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Folge aufgeführt:

- ▶ 1) Die **ZK 82** (*1970) war durch den Verlust von Na_v1.1, K_v1.2 und K_v1.3 geprägt. Ein schwächeres Expressionsmuster als im undifferenzierten Zustand fand sich zudem für den Kanal Na_v1.2. Lediglich Na_v1.9 wurde nach Differenzierung zusätzlich exprimiert.

- ▶ 2) Die Ausdifferenzierungen der **ZK's 57** (*1993) und **60** (*1937) ergaben im Ergebnis dieselben Expressionsmuster, welche durch die fehlende Expression beider Kaliumkanäle, K_v1.2 und K_v1.3, gekennzeichnet waren. Wobei die Zellen der ZK 60 K_v1.2 im undifferenzierten Zustand zuvor noch exprimierten. Hinzu kam das positive Expressionsmuster für Na_v1.9 in der ZK 57.

- ▶ 3) Eine erfolgreiche Differenzierung der **ZK 78** (*1929) konnte, neben den morphologischen Ergebnissen der Phasenkontrastmikroskopie, auch in der PCR nachgewiesen werden, da die Expression aller Kanäle des undifferenzierten Zustandes auch in den differenzierten Zellen positiv ausfiel. Hinzu kam außerdem eine positive Bande für Na_v1.9, sodass die Zellen, bis auf den Kanal Na_v1.8, alle Kanäle exprimierten.

- ▶ 4) Enttäuschende PCR-Ergebnisse lieferte die **ZK 68** (*1937), in welcher ein Verlust aller zuvor vorhandenen Natrium- und Kaliumkanäle sowie des Kalziumkanals Ca_v1.2 beobachtet werden konnte.

Obwohl am Ende der Differenzierungsphase alle ZK's Zellen mit neuronenähnlicher Morphologie zeigten, wurde durch die molekularbiologische Untersuchung das Ausmaß der jeweiligen Schädigungen deutlich. Ein eindrucksvolles Beispiel bietet hierbei die ZK 68, in welcher keiner der vorher detektierten Natrium-, Kalium- oder Kalziumkanäle mehr exprimiert wurde. Auch die ZK's 60 und 82 zeichneten sich v.a. durch ihren Verlust an Kaliumkanälen aus. Dagegen konnte die ZK 78 ein positives Beispiel für eine neuronale Differenzierung liefern, da hier die morphologischen mit den funktionellen Eigenschaften der Zellen übereinstimmten.

Die individuellen Eigenschaften der Spender-MSCs scheinen mitunter im Rahmen dieses Protokolls zum Tragen zu kommen.

5.4 Neuronale (Trans-)Differenzierung versus Artefakt

Im Rahmen unserer Untersuchungen erscheint die Diskrepanz zwischen morphologischen und molekularbiologischen Ergebnissen als offensichtlich, was besonders eindrucksvoll in der ZK 68 nach Tatard beobachtet werden konnte, in welcher nach Ausdifferenzierung trotz guter Zellmorphologie ein Verlust aller zuvor exprimierten Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle beobachtet wurde. Davon abgesehen konnte keine ZK, unabhängig vom verwendeten Differenzierungsprotokoll, alle von uns untersuchten Marker exprimieren.

Eine Ausnahme stellte die ZK 78 nach Tatard dar, welche bis auf den Kanal $Na_v1.9$ die Expression aller anderen Kanäle zeigte. In diesem Zusammenhang stellen sich die folgenden Fragen:

- ▶ Was kann als Ursache dieser Diskrepanz zwischen Morphologie und molekularbiologischen Ergebnissen angenommen werden?

- ▶ Weshalb kommt es im Rahmen der Differenzierung größtenteils zu einem Verlust von Natrium- und Kaliumkanälen?

- ▶ Konnte mithilfe der unterschiedlichen Protokolle eine (Trans-)Differenzierung der MSC's in funktionale Neurone erreicht werden oder stellt die morphologische Veränderung der Zellen lediglich einen Artefakt der Zellkultur dar?

- ▶ Welche Konsequenzen ergeben sich aus unseren Ergebnissen für die weitere Forschung und Klinik?

5.4.1 Der Verlust von Ionenkanälen in differenzierten Zellen

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf eine Herunterregulation von Ionenkanälen nach schädigenden Einflüssen.

So konnten Cummins und Waxman (1997) zeigen, dass sich die Dichte an TTX-resistenten Natriumkanälen nach Axotomie spinaler Neurone deutlich reduzierte. Diese Herunterregulation von TTX-resistenten Natriumkanälen, wie der von $Na_v1.9$, resultiert vermutlich aus der fehlenden Freisetzung von peripherem GDNF nach Axotomie (Dib-Hajj et al. 2002; Fjell et al. 1999). Dieser Vorgang scheint beispielsweise für die Neuprogrammierung und Übererregbarkeit von DRG-Neuronen in der Folge von Nervenverletzungen relevant zu sein und stellt einen wichtigen Mechanismus in der Schmerzwahrnehmung dar (Dib-Hajj et al. 2002).

In unseren Versuchen konnte hingegen eine Hochregulation von $Na_v1.9$ durch die verschiedenen Differenzierungsprotokolle erreicht werden, was einem schädigenden Einfluss der drei Protokolle zuwiderläuft. So zeigten die Zellen aller ZK's, welche nach dem modifizierten Zeng-Protokoll differenziert wurden, eine Expression von $Na_v1.9$. Ähnlich gute Erfolge zeigten sich aber auch im Rahmen der beiden anderen Protokolle. Auch der alleinige Einfluss von GDNF auf die Expression des Kanals, wie sie oben angesprochen wurde, konnte im Rahmen unserer Versuche nicht bestätigt werden, da dieser Faktor allein im modifizierten Dezawa-Protokoll zugegeben wurde.

Der Kanal $Na_v1.9$ konnte durch Blum et al. (2002) als BDNF-abhängiger Kanal in Neuronen des Hippocampus identifiziert werden. Sodass eine mögliche Erklärung für seine Expression in unseren Versuchen die Zugabe von BDNF im Rahmen der letzten Differenzierungsschritte sein könnte. Denn sowohl BDNF, als auch NGF, sind dafür bekannt die elektrische Aktivität durch vermehrte Expression von Natriumkanälen zu steigern (McAllister et al. 1999; Toledo-Aral et al. 1997).

Eine weitere Theorie zur Regulation von Natriumkanälen wurde durch Pérez-Pinzón et al. (1992) aufgestellt. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass es im isolierten Kleinhirn der Schildkröte unter anoxischen Bedingungen zu einer Herunterregulation von spannungsabhängigen Natriumkanälen kam (Pérez-Pinzón et al. 1992).

Zwar wurden unsere Proben in Brutschränken mit einem Anteil von 6% CO₂ inkubiert, anoxische Bedingungen wurden dabei jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht, sodass ein Mangel an Sauerstoff in unseren Experimenten nicht für den Verlust der Natriumkanäle verantwortlich sein kann.

Obwohl Fjell und Kollegen (Fjell et al. 1999) in ihren Versuchen mit DRG-Neuronen den Faktoren NGF und v.a. GDNF besondere Rollen in der Hochregulation und Wiederherstellung von Nav1.8 nach Nerven transektion zusprachen, konnten die Effekte dieser Faktoren auf die Expression von Nav1.8 in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden. Denn dieser Kanal wurde zu keinem Zeitpunkt von einer der untersuchten Proben exprimiert. Hierbei sollte allerdings die sehr spezialisierte Expression von Nav1.8 angemerkt werden. So konnte der Kanal lediglich in sensorischen Neuronen von Spinal- und Trigeminalganglien (Akopian et al. 1999; Djouhri et al. 2003) sowie in menschlichem Hoden-, Plazentagewebe und in Spermatozoen (Cejudo-Román et al. 2013; Pinto et al. 2009) nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit mithilfe der verwendeten Protokolle solch spezialisierte Zellen zu differenzieren, welche zusätzlich den Natriumkanal Nav1.8 exprimieren, erscheint somit verschwindend gering zu sein.

Ott und Mitarbeiter (Ott et al. 2004) beobachteten wiederum eine Herunterregulation, sowohl von Kalzium-, als auch von Natrium- und Kaliumkanälen, nach der Verpflanzung von Myoblasten der Skelettmuskulatur in infarzierte Myokardanteile der Ratte. Sie mutmaßten, dass sich der schädigende Einfluss der Umgebung negativ auf die Expression der Kanäle in den Myoblasten auswirkte. In der Zellkultur kam es nach maximal 6 Wochen zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes der Zellen mit erneuter Expression der Ionenkanäle. (Ott et al. 2004)

Damit könnte, bezogen auf unsere Versuche, der schädigende Einfluss der neuronalen Induktionsmedien wieder wahrscheinlicher werden. Demnach ist davon auszugehen, dass die Kombination der verschiedenen Faktoren der jeweiligen Medien nicht dem Milieu der natürlichen Nische der neuronalen Differenzierung *in vivo* entspräche, sodass die Zellen in unseren Versuchen auf diese, als Zeichen ihrer Schädigung, überwiegend mit einem Verlust von Natrium- und Kaliumkanälen reagierten.

Eine weitere Hypothese zur Herunterregulation transienter Kaliumkanäle in den distalen Dendriten pyramidaler Cornu ammonis Area 1-(CA1)-Neurone des Hippocampus geht davon aus, dass dieser Prozess mit der Aktivierung der PKA und

Proteinkinase C (PKC) sowie der nachfolgenden Steigerung der Zellerregbarkeit zusammenhängt (Hoffman und Johnston 1998). Auch in unseren Experimenten kam Forskolin zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration zum Einsatz. cAMP dient der Zelle als sog. „second messenger“ zur Aktivierung der PKA (Brindle und Montminy 1992; Harootunian et al. 1993; Seamon et al. 1981). Demnach führt ein vermehrtes Anfallen von cAMP auch zu einer gesteigerten Aktivierung der PKA. Vor allen Dingen in unserem modifizierten Zeng-Protokoll, welchem ab dem zweiten Differenzierungsmedium 4 μ M Forskolin zugegeben wurde, zeigte die PCR keinerlei Expression für die Kaliumkanäle $K_v1.2$ und $K_v1.3$, obwohl diese, ausgenommen in der ZK 57 bzw. von $K_v1.3$ in der ZK 60, im undifferenzierten Zustand vorhanden waren. Auch im Rahmen der beiden anderen Protokolle ließ sich in den Zellen der meisten ZK´s ein Verlust der Kaliumkanäle nach Forskolingabe nachweisen. Somit spricht der vollständige Verlust der Kaliumkanäle für einen schädigenden Einfluss der Protokolle, wohingegen Hoffman und Johnston (1998) lediglich eine Herunterregulierung dieser Kanäle mit nachfolgender Steigerung der Zellerregbarkeit beschrieben.

Auch im Originalversuch von Zeng und Kollegen (Zeng et al. 2011) konnte ein solcher Kanalverlust nicht beobachtet werden, welcher jedoch durch unsere Protokoll-Modifikation, also mit der Zugabe von Forskolin ab Medium 2, begründet sein könnte. Die übrigen Kanäle, in Form von $Na_v1.6$ und $Ca_v1.2$, wie sie auch durch Zeng et al. (2011) untersucht wurden, zeigten sich ebenso im Rahmen unserer PCR als positiv.

Auch Kim et al. (2002b) wiesen eine Herunterregulierung von u.a. $K_v1.2$ in DRG-Neuronen nach chronischer Nervenschädigung des Nervus ischiadicus der Ratte nach. Sie vermuteten, dass diese Reduktion der Kaliumströme zu einer (Über-)Erregung des geschädigten Nervs beitragen könnte (Kim et al. 2002b). Es kann gemutmaßt werden, dass die Eineingung des Nervs *in vivo* zur Ischämie mit nachfolgender Produktion und Freisetzung von ROS beigetragen haben könnte, welche die DRG-Neurone in der Folge schädigten und zu einer reflektorischen Herunterregulation der Kaliumkanäle führte. Übertragen auf unser Experiment könnte dies einer Schädigung der Kultur durch die zum Teil toxischen Elemente der Differenzierungsmedien entsprechen. Auch hier könnte es womöglich in der Folge zur Freisetzung von ROS und damit zur Schädigung der Zellen gekommen sein. Dabei bleibt jedoch die 1:1 Übertragung einer Schädigung *in vivo* auf die einer *in vitro*-Kultur fraglich.

Neben all den Argumenten, welche vordergründig für eine Schädigung unserer Zellen durch die Differenzierungsmedien sprechen, findet sich aber auch ein Beispiel einer erfolgreich differenzierten ZK im Rahmen unserer PCR.

So exprimierte die ZK 78 (*1929), nach erfolgter Ausdifferenzierung nach dem Tatard-Protokoll, alle von uns untersuchten Ionenkanäle. Eine Ausnahme stellt dabei der Kanal $Na_v1.8$ dar, welcher aufgrund seines spezialisierten Vorkommens jedoch vorerst vernachlässigt werden kann. Obwohl die MSC's dieser ZK von dem ältesten Spender innerhalb unseres Versuches stammten, konnte ein positives Ergebnis erzielt werden. Möglicherweise macht sich in diesem Zusammenhang der positive Effekt der VPA bemerkbar, welche als HDAC-Inhibitor eine Hyperacetylierung von Histonen erreicht (Göttlicher et al. 2001) und so durch die weniger eng gepackte DNA eine Modifikation derselben erleichtert. Dieser Mechanismus scheint v.a. bei MSC's älterer Spender von Vorteil zu sein. Leider konnte dieser Effekt im Rahmen unserer Tatard-Differenzierung bei der ZK 60 (*1937) nicht in vollem Umfang und bei der ZK 68 (*1937) in keinem Maße nachgewiesen werden.

Die ZK 68 imponierte, nach Ausdifferenzierung mit dem Tatard-Protokoll, sogar mit einem Verlust fast aller Kanäle, mit Ausnahme von Mg. Ursächlich für dieses Beispiel sowie für die fehlende Expression von Kalium- und Natriumkanälen in den MSC's älterer Spender (ZK 60, 68 und 78), welche nach den von uns verwendeten Protokollen ausdifferenziert wurden, könnte auch die schwindende Multipotenz und Fitness der Zellen selbst sein, welche folglich mit zunehmendem Alter abnehmen (Stolzinger et al. 2008).

Trotz der Eigenschaften von NGF, BDNF und NT-3, welche in unterschiedlichen Konstellationen den von uns verwendeten Protokollen zugesetzt wurden, um die Expression von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu steigern und damit auch die elektrische Erregbarkeit der Zellen zu verbessern, zeigte sich in unseren Versuchen zumeist ein gegenteiliger Effekt, was wiederum auf die potenzielle Toxizität der Substanzen hinweist. Denn abgesehen von der vermehrten Expression von $Na_v1.9$, kam es überwiegend zu einem Verlust von Natriumkanälen, wie z.B. dem $Na_v1.1$ in den Zellen, welche nach modifiziertem Zeng-Protokoll differenziert wurden, und vielmehr noch zu einem Verschwinden der Kaliumkanäle in der Mehrheit der ausdifferenzierten ZK's aller drei Protokolle.

Auch die bereits angesprochene Heterogenität der Spender-MSK's scheint an den voneinander abweichenden Kanal-Expressionsmustern der einzelnen ZK's innerhalb

eines Protokolls teilzuhaben. Darüber hinaus scheinen auch Vorerkrankungen, welche den Knochenstoffwechsel negativ beeinflussen, von individueller Relevanz zu sein.

Neben dem positiven Ergebnis bezüglich des Neuauftretens des Natriumkanals $Na_v1.9$ in der Mehrheit der nach den drei Protokollen ausdifferenzierten ZK's, überwiegt im Ergebnis dennoch der Verlust der Kaliumkanäle $K_v1.2$ und $K_v1.3$, ob in Kombination oder isoliert, sowie der teilweise Verlust von Kalzium- und unterschiedlichen Natriumkanälen. Wobei das negative Expressionsmuster von $Na_v1.1$ v.a. nach der Differenzierung im Rahmen des modifizierten Zeng- und Dezawa-Protokolls am auffälligsten erscheint.

Danach würde der schädigende Einfluss dieser Protokolle den positiven Effekt auf die neuronale Entwicklung von MSC's überwiegen.

5.4.2 Neuronale Differenzierung als Artefakt

Bereits seit einigen Jahren werden immer mehr Stimmen laut, die sich gegen die Möglichkeit einer (Trans-)Differenzierung von MSC's in funktionstüchtige Nervenzellen aussprechen (Barnabé et al. 2009; Croft und Przyborski 2006; Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004; Zurita et al. 2008) und auch die Ergebnisse unserer Arbeit könnten auf eine mögliche artifizielle Differenzierung der MSC's in Zellen mit neuronaler Morphologie, jedoch ohne die entsprechende neuronentypische Kanalausstattung, hinweisen.

So verwendeten Neuhuber und Kollegen (Neuhuber et al. 2004) zur Kultivierung und neuronalen Differenzierung von MSC's der Ratte ein Protokoll von Woodbury et al. (2002), welches 2% DMSO, 100 μ M BHA, 10 μ M Forskolin, 2 mM VPA, 5 U/ml Heparin, 5 nM K252A, 25 mM KCl, 1x N2-Supplement, 10 ng/ml PDGF und 10 ng/ml bFGF beinhaltete. Nach der Behandlung zeigten die Zellen schnell eine neuronale Morphologie mit der Ausbildung neuritenartiger Fortsätze. Diese morphologischen Änderungen führten die Forscher aber nicht auf eine neuronale Differenzierung dieser Zellen zurück, sondern viel mehr auf die Schädigung ihres Aktin-Zytoskeletts auf dem Boden des chemischen Induktionsmediums. Danach wurde die Bildung neuritenartiger Fortsätze nicht etwa durch ein mikrotubuliassoziiertes aktives Auswachsen bedingt, sondern entstand durch Retraktion des Zytoplasmas aufgrund von F-Aktin-Depolymerisation. In den entsprechenden time-lapse Studien zeigten diese Fortsätze

im Verlauf weder eine gewisse Motilität, noch eine weitere Ausbreitung. Um ihre Hypothese weiter zu unterstützen behandelten die Forscher undifferenzierte MSC's mit DMSO und anderen Agenzien, wie Cytochalasin-D (Cyto-D) und Latrunculin-A (Lat-A), welche eine Depolymerisierung der Aktinfilamente fördern. In der Folge konnte auch hier die Ausbildung entsprechender neuritenartiger Fortsätze beobachtet werden. Darüber hinaus reagierten die Zellen rasch mit der Expression neuronaler (Nestin) und glialer Marker (GFAP). In der gleichen Weise reagierten aber auch Fibroblasten der Ratte auf oben genannte chemische Induktion zur neuronalen Differenzierung, sodass die Wissenschaftler die Förderung einer abnormen Genexpression aufgrund der chemischen Faktoren als Ursache der Markerexpression annehmen konnten. Schlussfolgernd sahen sie die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps als Ausdruck eines Artefakts durch die toxischen Eigenschaften der Differenzierungsfaktoren BHA und DMSO. (Neuhuber et al. 2004)

Auch in unserer Versuchsreihe mit dem Protokoll von Tatard et al. (2007) kam es zur Anwendung von BHA im letzten Differenzierungsmedium. Wie oben bereits beschrieben, kam es hierunter zur vermehrten Apoptose der Zellen, sodass in der Folge eine Modifizierung des Mediums mit Verzicht auf BHA und VPA erfolgen musste. Somit wurde von uns der schädigende Einfluss durch chemische Faktoren ebenfalls gesehen.

Bezugnehmend auf die Expression neuronaler Proteine nach stattgehabter Differenzierung zeigte sich, dass bereits MSC's im undifferenzierten Zustand ein positives Expressionsmuster für zahlreiche neuronale Marker aufweisen. So beobachteten Woodbury und Mitarbeiter (Woodbury et al. 2002; Woodbury et al. 2000) beispielsweise die Expression von GFAP, NeuroD und NSE in undifferenzierten MSC's. Und auch Nestin konnte in undifferenzierten MSC's nachgewiesen werden (Wislet-Gendebien et al. 2005).

Eindrucksvoll zeigten sich zudem die Ergebnisse von Tondreau und Kollegen (Tondreau et al. 2004b), welche mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen zeigen konnten, dass undifferenzierte MSC's bereits Proteine unreifer Nervenzellen, wie Nestin und TuJ-1, exprimieren. Nach weiteren fünf Passagen ohne spezifische Induktion zeigten die MSC's positive Expressionsmuster für weitere neuronale und gliale Marker, wie beispielsweise für TH, MAP-2 und GFAP. Die Forscher schlussfolgerten, dass die Expression neuronaler Marker in undifferenzierten MSC's als Zeichen ihrer Multipotenz verstanden werden kann, welche die Grundlage für eine neuronale Differenzierung darstellt. (Tondreau et al. 2004b)

Diese Untersuchungen zeigen aber auch, dass der Nachweis neuronaler oder glialer Proteine in differenzierten MSC's nicht allein als Indikator für eine erfolgreiche Differenzierung in Richtung der neuronalen Linie gesehen werden kann. Darüber hinaus erscheint auch das Zeitintervall von wenigen Tagen, in welchem die MSC's dem jeweiligen Differenzierungsmedium ausgesetzt sind, als zu kurz für die Induktion bzw. transkriptionelle Regulation von neuronenspezifischen Genen (Lu et al. 2004).

Auch in unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die undifferenzierten Spender-MSCs bereits ein breites Spektrum an spannungsabhängigen Ionenkanälen, welche im Rahmen der Entstehung von Aktionspotenzialen eine wichtige Rolle spielen, exprimierten. Obwohl den Zellen damit primär ihr multipotentes Potenzial nachgewiesen wurde, verloren sie jedoch, anders als erwartet, einige der Kanäle im Laufe der neuronalen Ausdifferenzierung. Die mangelnde Expression kann auch hier erneut das toxische Potenzial der Differenzierungsmedien unterstreichen. Darüber hinaus kann sie zudem einen Ausdruck interindividueller Anpassungsreaktionen der einzelnen Spender-MSCs auf die veränderten Kulturbedingungen darstellen. Auch die mangelnde Fitness sowie das Alter der Spender-MSCs scheinen hierbei tragende Rollen zu spielen.

Weitere Erkenntnisse wurden von Lu und Mitarbeitern (Lu et al. 2004) beschrieben. Auch diese Forschungsgruppe verwendete zur neuronalen Induktion von MSC's ein Differenzierungsprotokoll, welches zuvor durch Woodbury et al. (2000) etabliert wurde. Die auf diese Weise differenzierten Zellen imponierten zwar mit einer neuronalen Morphologie sowie mit der Expression neuronaler Marker, aber auch Lu und Kollegen führten diese Ergebnisse auf Veränderungen im Zytoskelett zurück, welche zum Schrumpfen der Zellen beitrugen und somit keine geregelten Schritte im zellulären Differenzierungsprozess darstellen konnten. Als ursächlich nahmen die Wissenschaftler das toxische Potenzial des Differenzierungsmediums an. Dafür sprach zum Einen, dass eine verlängerte Inkubation der Zellen in Medien, welche β -ME bzw. BHA/DMSO enthielten, zu einer erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen führte. Zum Anderen konnten die Wissenschaftler dieses Phänomen auch bei diversen anderen Zelltypen, wie an primären Fibroblasten der Ratte, HEK-293 und PC-12-Zellen, nachweisen. Um die Ursächlichkeit chemischer Agenzien für eine neuronale Morphologie nachzuweisen, inkubierten die Forscher MSC's mit verschiedenen chemischen Stressoren, wie Tween 20, Triton X-100 und Polybren. Bereits nach wenigen Stunden unter diesen Agenzien zeigten sich deutliche morphologische Veränderungen der MSC's hin zu einer pseudoneuronalen Gestalt. Die Zellen

zeichneten sich durch runde bis pyramidale Zellkörper und lange Fortsätze aus. Damit wurde gezeigt, dass die morphologischen Veränderungen der Zellen eine zelluläre Antwort auf chemischen Stress repräsentierten. (Lu et al. 2004)

Ebenfalls Zellen mit pyramidalen Zellkörpern und langen Fortsätzen konnten wir vermehrt nach Ausdifferenzierung mithilfe der Protokolle nach Zeng (modifiziert) und Tatard beobachten. Dabei könnte der kleine Zellkörper Ausdruck einer Retraktion des Zytoplasmas sein, bei welcher Teile des Zytoplasmas als Pseudofortsätze zurückbleiben und möglicherweise als Neuriten imponieren könnten. Denn sowohl im Protokoll nach Tatard, als auch nach der Differenzierung mittels modifiziertem Zeng-Protokoll, zeigten sich schädigende Einflüsse nach der Zugabe von β -ME/BHA bzw. durch die Kombination von Edaravone mit den übrigen Faktoren.

Auch Barnabé et al. (2009) sprachen sich nach chemischer Induktion ihrer MSC's, in Anlehnung an das Protokoll von Woodbury (Woodbury et al. 2000), gegen eine neuronale Transdifferenzierung und vielmehr für eine toxische Schädigung der Zellen aus. Was sie, ebenso wie Lu et al. (2004), auch an einer erhöhten Apoptoserate (> 50%) 24 Stunden nach Beginn der Induktion festmachten. Zudem stellten sie die Hypothese auf, dass die Veränderungen im Zytoskelett differenzierter MSC's durch Unterbrechungen im Redoxkreislauf der Zellen bedingt sein könnten. Diese Annahme konnte durch die Messung erhöhter Mengen an intrazellulärem Cystein nach chemischer Induktion belegt werden. Gegen eine Transdifferenzierung der Zellen sprachen weiterhin die negativen Ergebnisse in den elektrophysiologischen Untersuchungen. Hierbei konnten weder Kalium-, oder Natriumströme noch Aktionspotenziale gemessen werden. Auch ein Verlust von funktionellen spannungsabhängigen Ionenkanälen, verglichen mit denen in fetalen Neuronen der Ratte, wurde von den Wissenschaftlern im voltage-clamp beschrieben. (Barnabé et al. 2009)

Auch wir konnten in der PCR einen Verlust von spannungsabhängigen Ionenkanälen in den differenzierten Zellen beobachten. Eine Ausdifferenzierung von reifen, funktionsfähigen Neuronen aus MSC's mithilfe der von uns verwendeten Differenzierungsprotokolle ist damit zu verneinen, da eine neuronienähnliche Morphologie als alleiniges Merkmal für eine erfolgreiche Transdifferenzierung der Zellen nicht ausreicht.

Croft und Przyborski (2006) schlussfolgerten zudem, dass die Entwicklung eines neuronalen Phänotyps auf zellulären Stress zurückzuführen sei, welcher durch die

Entfernung der MSC's aus ihrer natürlichen Umgebung mit nachfolgender Kultivierung in einem fremden Milieu bedingt sein könnte. Hierfür wurden die MSC's in einem Medium, bestehend aus DMEM, N2-Supplement und 20 ng/ml bFGF, differenziert. Die Wissenschaftler konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Depolymerisierung des Aktins und der Expression neuronaler Proteine finden, welche nicht mit der Proteinexpression im Sinne einer neuronalen Entwicklung übereinstimmte. Im Ergebnis stellten sie heraus, dass morphologische Charakteristiken sowie die Expression neuronaler Marker nicht allein als Indikatoren der neuronalen Differenzierung ausreichen, sodass die Notwendigkeit zu weiteren funktionellen Untersuchungen ausdifferenzierter Zellen besteht. (Croft und Przyborski 2006)

Darüber hinaus beobachteten Roybon et al. (2006) bei ihren Untersuchungen an HSC's, welche sie mit RA behandelten, die Expression von Nestin als Marker neuronaler Progenitoren. Bei der Überprüfung ihrer Funktionalität mithilfe von elektrophysiologischen Aufzeichnungen zeigte sich jedoch, dass die differenzierten HSC's nicht in der Lage waren Aktionspotenziale zu generieren. Damit konnten die Wissenschaftler demonstrieren, dass auch HSC's nicht dazu fähig sind, sich mithilfe spezieller Induktionsmedien in Zellen der neuronalen Linie zu differenzieren. (Roybon et al. 2006)

Weiterhin konnten Zurita und Kollegen (Zurita et al. 2008) nachweisen, dass die vermeintliche Transdifferenzierung von MSC's der Ratte ein vorübergehendes und reversibles Phänomen ist. Dabei nutzen die Forscher das chemische Induktionsprotokoll von Woodbury et al. (2000). Bereits 72 Stunden nach Beginn der Induktion zeigten nahezu alle Zellen neuronale Morphologien. Zusätzlich konnte die Expression von Neurofilament-200 (NF-200) und β -III-Tubulin in der RT-PCR beobachtet werden. In der Folge wurde das Differenzierungs- durch ein Standardmedium, bestehend aus α -MEM und 10% FBS, ersetzt. Im Laufe von zwei Wochen verloren die Zellen sowohl ihre neuronale Gestalt als auch die entsprechende Expression neuronaler Marker und zeigten sich erneut immunopositiv für die mesenchymalen Oberflächenmarker CD73, 105 und 166. (Zurita et al. 2008)

Innerhalb unserer Versuchsreihen konnten wir ein ähnliches Phänomen bereits schon unter den letzten Differenzierungsmedien beobachten. Denn v.a. bei längerer Kultivierung der Zellen als ursprünglich vorgesehen, reagierten diese mit einer in der Entwicklung rückläufigen Morphologie und näherten sich damit ihrem undifferenzierten Zustand immer weiter an. Auch dieses Verhalten schließt darauf, dass keine

Transdifferenzierung der MSC's bei Beendigung der Protokolle stattgefunden haben kann.

Neben den zytotoxischen Eigenschaften der Differenzierungsmedien, kommen darüber hinaus noch weitere Faktoren, wie Zellfusionen, Kontaminationen durch andere Zelltypen oder Veränderungen in Ionenkonzentrationen oder dem pH-Wert, als Ursachen für das Auftreten neuronaler Morphologien in Zellkulturen in Frage (Krabbe et al. 2005; Lu et al. 2004).

Um eine abschließende Klärung der Frage nach einer erfolgten Transdifferenzierung unserer MSC's finden zu können, werden nachfolgend noch einmal Pro- und Kontra-Argumente gegeneinander aufgestellt:

(Trans-)Differenzierung	Artefakt
Neuronale Morphologie in der Phasenkontrastmikroskopie nach erfolgter Differenzierung der MSC's unter verschiedenen neuronalen Differenzierungsmedien	Neuronenähnliche Morphologie durch toxischen Stress und Schädigung des Aktinfilamentgerüsts
PCR: Expression von Nav1.9 nach Abschluss der neuronalen Differenzierung	PCR: Verlust von Kalium- und einzelnen Natriumkanälen nach erfolgter Differenzierung
MSC's besitzen bereits vor Differenzierung neuronentypische Kanäle → Multipotenz	Multipotenz aufgrund der mangelnden Kanalexpression in der PCR nach Differenzierung fraglich
-	Zeitspanne der Protokolle zu kurz für Induktion bzw. transkriptionelle Regulation neuronenspezifischer Gene

Tabelle 18:

Gegenüberstellung der Ergebnisse: (Trans-)Differenzierung versus Artefakt

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass eine (Trans-)Differenzierung humaner MSC's in funktionelle Nervenzellen aufgrund des multipotenten Charakters der Zellen grundsätzlich als möglich erscheint. Dennoch konnten wir mithilfe der verwendeten und stellenweise modifizierten Protokolle eine solche Differenzierung nicht nachweisen, sodass die Ergebnisse der Originalversuche durch uns nicht reproduzierbar waren. Vielmehr zeigte sich, dass die von uns beobachteten morphologischen Veränderungen auf einer Schädigung des Zytoskeletts der Zellen basieren mussten, da im Rahmen der PCR eine mögliche Funktionalität der Zellen nicht bewiesen werden konnte. Stattdessen stellte sich eindrucksvoll der toxische Charakter der

Differenzierungsprotokolle auf molekularer Ebene mit dem Verlust zuvor exprimierter Ionenkanäle dar. Besonders der Verlust von Natrium- und Kaliumkanälen macht die Möglichkeit einer elektrophysiologischen Funktionalität der ausdifferenzierten Zellen einschließlich der Ausbildung von Aktionspotenzialen unwahrscheinlich. Hoffnung gibt dennoch die *de novo* Expression von Nav1.9 in zahlreichen Proben sowie die Möglichkeit supprimierende Faktoren auf die Multipotenz der verwendeten Stammzellen, durch ihre vorherige Behandlung mit VPA, auszuschalten, wie im Rahmen der Tatard-Differenzierung der ZK 78 eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden konnte.

Um das Ziel einer Transdifferenzierung von MSC's in neuronale Zellen zu erreichen und dabei eine gewisse Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden durch Krabbe und Mitarbeiter (Krabbe et al. 2005) einige Kriterien zusammengefasst, welchen in diesem Rahmen Beachtung geschenkt werden sollte. Die wichtigsten Punkte umfassen dabei u.a.:

- ▶ den Gebrauch einer definierten homogenen Ausgangspopulation an MSC's,
- ▶ die Reproduzierbarkeit von Standardvorgängen in der Zellkultur sowie der Differenzierungsprotokolle, unabhängig vom durchführenden Labor, sowie
- ▶ eine einheitliche Definition von geno- und phänotypischen Biomarkern zur Untersuchung zellulärer Charakteristiken und Funktionen.

Abschließend bleibt die Möglichkeit einer (Trans-)Differenzierung humaner MSC's in funktionelle Nervenzellen aber durchaus bestehen, sodass weitergehende Untersuchungen unter Berücksichtigung oben genannter Standardkriterien sowie durch Anpassung der entsprechenden Differenzierungsprotokolle angestrebt werden sollten. Auch in Hinblick auf das Patientenkollektiv sowie die Anzahl der verwendeten Proben sollten entsprechende Modifizierungen, im Sinne einer Festlegung von Zulassungskriterien und einer Anhebung der Probenzahl, vorgenommen werden, um signifikante Regelmäßigkeiten feststellen zu können und somit Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Untersuchungen insgesamt zu steigern.

6. Zusammenfassung

Zahlreiche Forschungsergebnisse der letzten Jahre gaben Anhalt dazu, dass eine Transdifferenzierung von MSC's hin zu funktionsfähigen Nervenzellen mit nachfolgender autologer Transplantation einen erfolgversprechenden Ansatz zur Behandlung traumatischer Nervenverletzungen sowie akuter und chronischer zerebraler Erkrankungen darstellen könnte. Während v.a. auf dem Gebiet neurodegenerativer Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson, sowie im Bereich der Regeneration peripherer Nerven, durch die Implantation von Schwann-Zellen, geforscht wurde, war das Interesse an der Reparatur von Nervenschädigungen durch direkte Implantation neuronal ausdifferenzierter MSC's in eine Läsion eher gering.

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Funktionalität neuronal ausdifferenzierter humaner MSC's aus Bohrmehl, durch Nachweis neuronenspezifischer spannungsabhängiger Ionenkanäle auf der Genebene.

Im Rahmen unserer Untersuchungen kamen drei verschiedene Differenzierungsprotokolle zur Anwendung, welche sich durch ihre unterschiedlichen Kombinationen an biologischen und chemischen Faktoren auszeichneten. Nach erfolgter Ausdifferenzierung, zeigten nahezu alle Zellen variable neuronähnliche Morphologien mit typischen Perikarya und Zellfortsätzen, welche zum Teil bereits baumartige Verzweigungen entwickelten und vereinzelt mit den benachbarten Zellen netzwerkartige Verbindungen formten. Darüber hinaus zeigte sich aber auch der deutlich toxische Einfluss der Faktoren BHA, VPA und β -ME. Nach Kultivierung unter diesen Substanzen konnten unter Phasenkontrast vermehrt tote sowie abnormal geformte dedifferenzierte Zellen nachgewiesen werden. Im Anschluss wurden die differenzierten MSC's mit Hilfe der PCR auf das Vorhandensein spezifischer neuronaler Ionenkanäle hin untersucht. Obwohl ein Zugewinn des Kanals $Na_v1.9$ in der Mehrheit der untersuchten Zellen nachgewiesen werden konnte, kam es im Ergebnis größtenteils zu einem Verlust vorbestehender Kalium- sowie einzelner Natrium- und Kalziumkanäle nach erfolgter Differenzierung.

Die Untersuchungen geben Anhalt dazu, dass eine Transdifferenzierung humaner MSC's in funktionsfähige Neurone mithilfe der von uns verwendeten Differenzierungsprotokolle als nicht möglich erscheint, da diese aufgrund ihres toxischen Einflusses womöglich zu einer Zerstörung des Zytoskeletts durch Aktin-

Depolymerisierung sowie zu einer Herunterregulation von spannungsabhängigen Ionenkanälen führen. Dennoch schließt die *de novo* Expression des Kanals Na_v1.9 die generelle Möglichkeit einer Transdifferenzierung mithilfe modifizierter Differenzierungsmedien nicht aus. Weitere experimentelle Untersuchungen sollten angestrebt werden, um darüber abschließend Auskunft geben zu können.

7. Summary

In the last years numerous results of research have shown that a trans-differentiation of MSC's into functioning neurons followed by autologous transplantation represents a promising approach for the treatment of traumatic nervous injury as well as acute and chronic cerebral diseases. While research has been conducted especially in the field of neurodegenerative diseases, such as the Parkinson's disease, as well as in the field of peripheral nerve regeneration by implantation of Schwann-cells, the interest in the repair of nerve damage by implantation of neuronal differentiated MSC's directly into a lesion was rather low.

This experimental work deals with the investigation of the functionality of neuronal differentiated human MSC's from remaining debris by detection of neuron-specific voltage-gated ion channels at gene level.

As part of our investigations three varying differentiation protocols were used, which were characterized by different combinations of biological and chemical factors. After differentiation almost all cells showed variable neuron-like morphologies with typical perikarya and cell processes, which were partly characterized by rich arborization and in forming network-like connections with neighboring cells. In addition the significant toxic influence of the factors BHA, VPA and β -ME could be seen. After culturing under these substances an increasing number of dead and abnormally shaped dedifferentiated cells could be detected under the phase-contrast microscope. Subsequently, the differentiated MSC's were tested for the presence of neuronal ion channels by using PCR. Although a gain of channel $Na_v1.9$ could be detected in the majority of the cells examined, as a result it came to an extensive loss of pre-existing potassium and single sodium and calcium channels after differentiation.

The study gives evidence to the fact that a trans-differentiation of human MSC's into functional neurons seems to be impossible by making use of the differentiation protocols mentioned above. Because of their toxic potential these possibly lead to a destruction of cytoskeleton by depolymerization of actin, as well as, to a down-regulation of voltage-gated ion channels. However, the *de novo* expression of channel $Na_v1.9$ does not exclude the general possibility of trans-differentiation by using a modified differentiation media. Nevertheless, further experimental studies should be conducted to give an final answer.

8. Abkürzungsverzeichnis

*	Geburtsjahr
°C	Grad Celsius
-OH	Hydroxylgruppe
•OH	Hydroxyl-Radikal
3T3	Fibroblastenzelllinie
α	Alpha
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
Acc.No.	Accession Number
AIS	Axoninitialsegment
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
α-MEM	Minimum Essential Medium Eagle alpha
AR	Amphiregulin
ARTN	Artemin
Aqua ad in.	Aqua ad iniectabilia
β	Beta
Bcl2	B-cell-lymphoma 2
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BHA	Butylhydroxyanisol
BMC	Knochenmarkzelle
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
B-Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma B
BrdU	5-Brom-2-Desoxyuridin
BTC	Betacellulin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
CA1	Cornu Ammonis Area 1 des Hippocampus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASY	Cell Counter and Analyser System

Ca_v	spannungsabhängiger Kalziumkanal
CD 11b	Cluster of differentiation 11b
CD 13	Cluster of differentiation 13
CD 14	Cluster of differentiation 14
CD 19	Cluster of differentiation 19
CD 29	Cluster of differentiation 29
CD 34	Cluster of differentiation 34
CD 44	Cluster of differentiation 44
CD 45	Cluster of differentiation 45
CD 73	Cluster of differentiation 73
CD 79α	Cluster of differentiation 79α
CD 90	Cluster of differentiation 90
CD 105	Cluster of differentiation 105
CD 106	Cluster of differentiation 106
CD 146	Cluster of differentiation 146
CD 166	Cluster of differentiation 166
cDNA	komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CLC	Cardiotrophin-like Cytokine
c-Myc	Myelocytomatose-Protein c
CNPase	2',3'-Cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTR-α	CNTF-Rezeptor-alpha
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CT-1	Cardiotrophin-1
Cyto-D	Cytochalasin-D
DARPP-32	Dopamine- and cAMP-regulated Phosphoprotein-32 kDa
dbcAMP	Bucladesin
D	Domäne
DEPC	Diethyldicarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco's Modified Egel's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin

DPPX	Dipeptidyl-Peptidase-like Protein-6
DRG	Spinalganglion
EAG2	Eather-a-go-go Kanaltyp 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
e.g.	example given
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR/ErbB-1	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPR	Epiregulin
ERK	Extrazelluläre signal-regulierte Kinase
ESC	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
F9	Murine Testicular Teratoma Cell Line
F-12K	Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FGF-1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FRS2α	FGF-Rezeptor Substrat 2 alpha
γ	Gamma
g	Erdbeschleunigung / Gramm
Gab1	GRB2-associated-binding protein 1
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP-43	Growth Associated Protein 43
GCL	Granule Cell Layer
GDNF	Glial cell line-derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFL	GDNF family of ligands
GFRα	GDNF family receptor alpha
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
H3	Histon 3
H5	P-Schleife
hADSC	Humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor

HD	Chorea Huntington
HDAC	Histondeacetylase
HEK293(T)	Zelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (mit SV40 large T-Antigen-Expression)
Hes I	Transkriptionsfaktor hairy and enhancer of split-1
hg	high glucose
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRG	Humanes Heregulin-Beta 1
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IFM	Inaktivierungssequenz aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin
IL-6/-11	Interleukin-6/-11
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kalium
K252A	Tyrosinkinaserzeptorblocker
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Klf4	Kruppel-like factor 4
K_v	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
K_vβ	Beta-Untereinheit spannungsabhängiger Kaliumkanäle
KvCHIP	Kv-Kanal interagierendes Protein
L	Liter
L1 CAM	L1-Zelladhäsionsmolekül
Lat-A	Latrunculin-A
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR-β	Leukemia-Inhibitory-Factor-Receptor Beta
MAP-2	Microtubuli-assoziiertes Protein-2
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle
MAPK	Mitogen-Aktivierete-Protein-Kinase
MaxiK	Large-conductance calcium-activated potassium channel

MCI-186	3-Methyl-1-Phenyl-Pyrazolin-5-one
Meis2	Myeloid ecotropic viral integration site 2 (Homeobox protein)
MEK1/2	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1/2
Mg	Mikroglobulin
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MIAMI	Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible
MiRP	Major iron-regulated protein
ML	Molecular layer
ml	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
ms	Millisekunden
MSC/MSZ	Mesenchymale Stammzelle
mV	Millivolt
Na	Natrium
Nav	Spannungsabhängiger Natriumkanal
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NeuN	Neuronal Nuclei, Hexaribonucleotide Binding Protein-3
Neuro2A	Neuroblastoma-Zelllinie der Maus
NF-200	Neurofilament-200
NF-L/-M/-H	Neurofilament-Light/-Medium/-Heavy
ng	Nanogramm
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NICD	Notch Intracellular Domain
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPC	Neurale Progenitorzelle
NRTN	Neurturin
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NSC	Neurale Stammzelle
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
NT-6	Neurotrophin-6
NT-7	Neurotrophin-7
O₂^{•-}	Hyperoxid-Anion

O-2A	Oligodendrozytäre Vorläuferzellen
O4	Oberflächenantigen 4 oligodendrozytärer Progenitoren
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
OPB	2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid
ORN	Olfactory Receptor Neuron
OSM	Oncostatin-M
p21	P21-Protein, cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p38	P38-Protein
p53	P53-Protein
p75 NTR	p75-Neurotrophinrezeptor
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PC12	Phäochromozytom-Zelllinie
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD98059	2'-amino-3'-methoxyflavone
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
pH	potentia Hydrogenii
PI-3	Phosphoinositid-3
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLCγ	Phospholipase-C-gamma
PNS	Peripheres Nervensystem
PSPN	Persephin
RA	Retinolsäure
Rap1	Ras-related protein 1
rBMSC	Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks der Ratte
RET	Rezeptor-Tyrosinkinase
RLT-Puffer	Resuspension-Lysis-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE-Puffer	RNA-Precipitating-Elution-Puffer
rpm	rounds per minute
RPTK	Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase
RS-Zellen	„rapidly self-renewing“ - Zellen
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

RW1-Puffer	Ethanolhaltiges RNA-Waschpuffer
S	Transmembransegment
s	Sekunde
S-100	Protein-S 100
SCN	Bezeichnung der Genfamilie spannungsabhängiger Natriumkanäle
SGZ	Subgranuläre Zone
Shc	SH containing protein
SH-SY5Y	Humane Neuroblastom-Zelllinie
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt(er/e/es)
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
s.u.	siehe unten
SyBr Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
T	Temperatur
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tau	Tau-Protein
TEP	Totalendoprothese
TGF-α/-β/-β1	Transforming Growth Factor- α /- β /- β 1
TH	Tyrosinhydroxylase
TPA	Tetradecanoylphorbol-Acetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA/B/C	Tyrosinkinaserzeptor A/B/C
TTX	Tetrodotoxin
TUC-4	Toad/Ulip/CRMP-4-Protein
TuJ-1	Neuronenspezifisches Klasse III Beta-Tubulin
TYK	Tyrosinkinase
U	Maßzahl für die Enzymaktivität (Units)
u	Atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

μM	Mikromolar
v	voltage
v.a.	vor allem
VGSC	Voltage-Gated Sodium Channel
VNS	Vegetatives Nervensystem
VPA	Valproinsäure
WHI-P131	4-(4'-Hydroxyphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline
Wnt	Akronym aus dem Wachstumsfaktor Wingless und dem Int-Gen
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
Z.n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Für die ausführliche Quellenangabe siehe 11. Literaturverzeichnis.

Abbildung 1:	Übersicht möglicher Plastizitätsmechanismen (aus Neuß-Stein, 2004; Nutzungsgenehmigung erteilt am 05.09.2016)	S.4
Abbildung 2:	Isolierung und Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen (MSC's) (aus Kuhn & Tuan, 2010; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.6
Abbildung 3:	Schematischer Aufbau klassischer Nervenzellen (aus Swanson & Bota 2010; Nutzungsgenehmigung erteilt 13.09.2016)	S.9
Abbildung 3a:	Mikroskopische Abbildung neuronentypiger Zellen in Toluidinblaufärbung im Verlauf ihrer Differenzierung aus multipotenten Stammzellen (aus Wenisch et al. 2005; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.10
Abbildung 4:	Verlauf von Aktionspotenzialen in den verschiedenen Abschnitten eines Motoneurons (aus Lüscher & Larkum 1998; Nutzungsgenehmigung erteilt am 04.09.2016)	S.12
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Natriumkanals (Na_v) (aus Lai & Jan 2006; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.15
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (K_v) (aus Barros et al. 2012; Nutzungsgenehmigung erteilt am 13.09.2016)	S.18
Abbildung 7:	Lokalisation spannungsabhängiger Kaliumkanäle am myelinisierten Axon (aus Lai & Jan 2006; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.21
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kalziumkanals (Ca_v) (aus Lai & Jan 2006; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.22

Abbildung 9:	Anordnung von Stammzellnischen in der subgranulären Zone (SGZ) als Orte adulter Neurogenese (aus Seri et al. 2004; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.25
Abbildung 10:	Entwicklungsschritte der adulten hippocampalen Neurogenese <i>in vivo</i> unter Aufführung von Zeitspanne, Entwicklungsstadien und möglichen molekularen Einflussfaktoren (modifiziert aus Duan et al. 2008; Nutzungsgenehmigung erteilt am 12.09.2016)	S.26
Abbildung 11:	Bindungen der Mitglieder der Neurotrophin-Familie an ihre Rezeptoren (aus von Bohlen und Halbach, 2010; Nutzungsgenehmigung erteilt am 05.09.2016)	S.39
Abbildung 12:	Frisches Bohrmehl in 100 mm-Gewebeschale (Quelle: Laborinterne Fotografie)	S.63
Abbildung 13:	Mesenchymale Stammzellen im undifferenzierten Zustand <i>in vitro</i>	S.75
Abbildung 14:	Differenzierte MSC's nach modifiziertem Dezawa-Protokoll <i>in vitro</i>	S.78
Abbildung 15:	Differenzierte MSC's nach modifiziertem Zeng-Protokoll <i>in vitro</i>	S.80-81
Abbildung 16:	Differenzierte MSC's nach dem Tatard-Protokoll <i>in vitro</i>	S.83-84
Abbildung 17:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Mg (135 bp)	S.87
Abbildung 18:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.1 (137 bp)	S.88
Abbildung 19:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.2 (151 bp)	S.89
Abbildung 20:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.6 (190 bp)	S.90

Abbildung 21:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.7 (167 bp)	S.91
Abbildung 22:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.8 (132 bp)	S.92
Abbildung 23:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Nav1.9 (182 bp)	S.93
Abbildung 24:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Kv1.2 (100 bp)	S.94
Abbildung 25:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Kv1.3 (176 bp)	S.95
Abbildung 26:	Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von Cav1.2 (122 bp)	S.96

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht wichtiger neuronaler Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und Pharmaka mit den zugehörigen Wirkungen	S.56-57
Tabelle 2:	Übersicht über verwendete Primer inklusive Primerbezeichnung, -orientierung und -sequenz, Produktlänge, Annealing Temperatur und Accession Number (Acc.No.)	S.60-61
Tabelle 3:	Spenderdaten in der Übersicht – ZK, Geburtsjahr, Geschlecht, Entnahmeort, Diagnosen & Medikamente	S.62
Tabelle 4:	Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Dezawa et al. (2004)	S.66
Tabelle 5:	Modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Zeng et al. (2011)	S.66-67
Tabelle 6:	Differenzierungsprotokoll nach Tatard et al. (2007)	S.67
Tabelle 7:	Pipettierschema der Komponenten zur Elimination genomischer DNA (Mischung 1)	S.71
Tabelle 8:	Pipettierschema der Komponenten der Mastermixe für die Transkriptionsreaktion	S.71
Tabelle 9:	Pipettierschema der PCR-Reaktionsansätze	S.72
Tabelle 10:	Verwendetes PCR-Programm	S.73
Tabelle 11:	Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Dezawa (modifiziert)	S.85
Tabelle 12:	Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Zeng (modifiziert)	S.86
Tabelle 13:	Auswertung des Differenzierungsprotokolls nach Tatard	S.86

Tabelle 14:	Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Undifferenzierte MSC's (plain)	S.97
Tabelle 15:	Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Dezawa (modifiziert)	S.98
Tabelle 16:	Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Zeng (modifiziert)	S.98
Tabelle 17:	Ergebnisse von PCR und Gelelektrophorese – Differenzierte MSC's nach Tatard	S.98
Tabelle 18:	Gegenüberstellung der Ergebnisse: (Trans-)Differenzierung versus Artefakt	S.130

11. Literaturverzeichnis

- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 2002, 296:1653–1655
- Adamson CL, Reid MA, Davis RL. Opposite actions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons. *J Neurosci* 2002, 22:1385-1396
- Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factor: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 1979, 204:1434–1436
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999, 13:313–325
- Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *GLIA* 2002a, 39:229–236
- Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci* 2002b, 22:6623–6630
- Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 1999, 2:541-548
- Aldrich RW. Five years of inactivation. *Nature* 2001, 411:643–644
- Allendoerfer KL, Cabelli RJ, Escandón E, Kaplan DR, Nikolics K, Shatz CJ. Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J Neurosci* 1994, 14:1795–1811
- Allsopp TE, Robinson M, Wyatt S, Davies AM. Ectopic trkA expression mediates a NGF survival response in NGF-independent sensory neurons but not in parasympathic neurons. *J Cell Biol* 1993, 123:1555-1566
- Altman J. Are new neurons formed in the brain of adult mammals? *Science* 1962, 135:1127–1128

- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004, 41:683–686
- Anchan RM, Reh TA, Angello J, Balliet A, Walker M. EGF and TGF- α stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron* 1991, 6:923–936
- Anderson KJ, Dam D, Lee S, Cotman CW. Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature* 1988, 332:360–361
- Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999, 43:521-531
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 2006, 442:823–826
- Angénioux B, Schorderet DF, Arsenijevic Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2006, 24:696–706
- Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2004, 190:17–31
- Araki T, Otani T. Response of single motoneurons to direct stimulation in toad's spinal cord. *J Neurophysiol* 1955, 18:472–485
- Arenas E, Trupp M, Åkerud P, Ibáñez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 1995, 15:1465–1473
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002, 8:963–970
- Asakura A, Rudnicki MA, Komaki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001, 68:245–253

- Aveline PC, Bourseguin JL, Rochefort GY. Mesenchymal stem cells and acquisition of a bone phenotype: an ion channel overview. *J Dev Biol Tissue Eng* 2011, 3:103–118
- Bading H, Ginty DD, Greenberg ME. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 1993, 260:181–186
- Baird A, Mormède P, Böhlen P. Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 126:358-364
- Baker NE. Notch signalling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *BioEssays* 2000, 22:264-273
- Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, Ravens U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 2006, 16:949-960
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors — implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 2000, 10:103–110
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFR α 3-RET receptor complex. *Neuron* 1998, 21:1291–1302
- Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005, 57:874–882
- Barnabé GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, Motta FL, Martinez G, de Oliveira AC et al. Chemically-induced rat mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLOS ONE* 2009, 4:1-11
- Barrett GL, Bartlett PF. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994, 91:6501-6505

- Barros F, Domínguez P, de la Peña P. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol* 2012, 3:1-15
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989, 51:367–384
- Beck KD, Valverde J, Alexl T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 1995, 373:339-341
- Bentley CA, Lee K-F. p75 is important for axon growth and Schwann cell migration during development. *J Neurosci* 2000, 20:7706–7715
- Bhat SV, Bajwa BS, Dornauer H, de Sousa NJ, Fehlhaber H-W. Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *coleus forskohlii* briq. *Tetrahedron Lett* 1977, 19:1669-1672
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 1997, 7:419–429
- Black JA, Cummins TR, Plumpton C, Chen YH, Hormuzdiar W, Clare JJ, Waxman SG. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 1999, 82:2776–2785
- Blaheta RA, Cinatl J. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002, 22:492–511
- Blum R, Kafitz KW, Konnerth A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Nav1.9. *Nature* 2002, 419:687–693
- Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* 2001, 30:91–104
- Bonhoeffer T. Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6:119–126
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 1997, 278:477–483

- Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, Wagner W. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* 2010, 9:54–63
- Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C et al. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res* 2004, 1010:108–116
- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Lambertenghi Deliliers G et al. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005, 193:312–325
- Bothwell M. Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell* 1991, 65:915–918
- Bråten M, Terjesen T, Rossvoll I. Femoral shaft fractures treated by intramedullary nailing. A follow-up study focusing on problems related to the method. *Injury* 1995, 26:379–383
- Bråten M, Terjesen T, Svenningsen S, Kibsgaard L. Effects of medullary reaming on fracture healing: tibial osteotomies in rabbits. *Acta Orthop Belg* 1990, 51:327–329
- Brindle PK, Montminy MR. The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* 1992, 2:199-204
- Brockes JP. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* 1997, 276:81-87
- Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:566-574
- Broome JD, Jeng MW. Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides in vitro. *J Exp Med* 1973,138: 574–592
- Brumback RJ, Ellison PS, Poka A, Lakatos R, Bathon GH, Burgess AR. Intramedullary nailing of open fractures of the femoral shaft. *J Bone Joint Surg Am* 1989, 71:1324–1331
- Burgering BMT, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL. cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J* 1993, 12:4211-4220

- Burrows RC, Lillien L, Levitt P. Mechanisms of progenitor maturation are conserved in the striatum and cortex. *Dev Neurosci* 2000, 22:7–15
- Busque S, Leventhal J, Brennan DC, Steinberg S, Klintmalm G, Shah T et al. Calcineurin-inhibitor-free immunosuppression based on the JAK inhibitor CP-690,550: a pilot study in de novo kidney allograft recipients. *Am J Transplant* 2009, 9:1936-1945
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000, 97:5616–5620
- Callaway JC, Ross WN. Frequency-dependent propagation of sodium action potentials in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 1995, 74:1395–1403
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthopaed Res* 1991, 9:641–650
- Carraz G, Fau R, Chateau R, Bonnin J. First clinical trials of the antiepileptic activity of n-dipropylacetic acid. *Ann Med-Pyschol* 1964, 122:577-584
- Cass WA. GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of methamphetamine. *J Neurosci* 1996, 16:8132-8139
- Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 1990, 347:762–765
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000a, 26:13–25
- Catterall WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 1988, 242:50–61
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000b, 16-521–555
- Catterall WA. Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends Neurosci* 1986, 9:7–10

- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57:411–425
- Cejudo-Román A, Pinto FM, Subirán N, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Pérez-Hernández N et al. The voltage-gated sodium channel Nav1.8 is expressed in human sperm. *PLOS ONE* 2013, 8:1-13
- Chandy KG. Simplified gene nomenclature. *Nature* 1991, 352:26
- Changelian PS. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. *Science* 2003, 302:875–878
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4:299-309
- Chapman A, Keane PE, Meldrum BS, Simiand J, Vernieres JC. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol* 1982, 19:315-359
- Chen G, Huang L-D, Jiang Y-M, Manji HK. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem* 1999, 72:327–1330
- Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 2000, 39:711–716
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003, 73:778–786
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001, 32:1005–1011
- Chiu SY, Ritchie JM. Evidence for the presence of potassium channels in the paranodal region of acutely demyelinated mammalian single nerve fibres. *J Physiol* 1981, 313:415–437
- Choi CB, Cho YK, Bhanu Prakash KV, Jee BK, Han CW, Paik Y-K et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 350:138–146

- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988, 1:623-634
- Choong P-F, Mok P-L, Cheong S-K, Leong C-F, Then K-Y. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* 2007, 9:170–183
- Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport* 2000, 11:3001–3005
- Christie BR, Magee JC, Johnston D. The role of dendritic action potentials and Ca²⁺ influx in the induction of homosynaptic long-term depression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 1996, 3:160–169
- Christie J, Court-Brown C, Kinninmonth AWG, Howie CR. Intramedullary locking nails in the management of femoral shaft fractures. *J Bone Joint Surg (Br)* 1988, 70B:206–210
- Cinatl Jr J, Cinatl J, Hernáiz-Driever P, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe D. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anti-Cancer Drug* 1997, 8:958-963
- Clatworthy MG, Clark DI, Gray DH, Hardy AE. Reamed versus unreamed femoral nails. *J Bone Joint Surg (Br)* 1998, 80B:485–489
- Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Bio* 1999, 71:479–500
- Cohen S, Elliott GA. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 1963, 40:1–5
- Colbert CM, Johnston D. Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 1996, 16:6676–6686
- Colter DC, Reiner C, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000, 97:3213-3218

- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2001, 98:7841–7845
- Compston JE, Judd D, Crawley EO, Evans WD, Evans C, Church HA et al. Osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1987, 28:410-415
- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999, 181:67–73
- Conover JC, Ip NY, Poueymirou WT, Bates B, Goldfarb MP, DeChiara TM, Yancopoulos GD. Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Dev Biol* 1993, 119:559–565
- Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC. The generation of impulses in motoneuron. *J Physiol* 1957, 139:232–249
- Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 2003, 38:157–160
- Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells* 2006, 24:1841–1851
- Cummins TR, Waxman SG. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 1997, 17:3503–3514
- Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol* 1994, 25:1334-1348
- Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, et al. LIFR β and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 1993, 260:1805-1808
- Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM. Action-potential propagation gated by an axonal IA-like K⁺ conductance in hippocampus. *Nature* 1997, 389:286–289

- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001, 44:1928–1942
- Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 282:148–152
- Deng Y-B, Liu X-G, Liu Z-G, Liu X-L, Liu Y, Zhou G-Q. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy* 2006, 8:210-214
- Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F et al. Neuropeitin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004, 101:4827–4832
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV. Human transforming growth factor- α : precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 1984, 38:287-297
- Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004, 113:1701–1710
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001, 14:1771–1776
- Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, Waxman SG. Na_v1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci* 2002, 25:253–259
- Di Donna S, Mamchaoui K, Cooper RN, Seigneurin-Venin S, Tremblay J, Butler-Browne GS, Mouly V. Telomerase can extend the proliferative capacity of human myoblasts, but does not lead to their immortalization. *Mol Cancer Res* 2003, 1:643–653

- DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Brit J Haematol* 1999, 107:257–281
- Dikic I, Schlessinger J, Lax I. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* 1994, 4:702-708
- Djouhri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM, Lawson SN. The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol* 2003, 550:739–752
- D’Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993, 90:10989-10993
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999, 97:703–716
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8:315–317
- Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J Neurosci* 1985, 5:2119–2142
- Dreyer D, Lagrange A, Grothe C, Unsicker K. Basic fibroblast growth factor prevents ontogenetic neuron death in vivo. *Neurosci Lett* 1989, 99:35–38
- Duan X, Kang E, Liu CY, Ming G-I, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 2008, 18:108–115
- Eccleston PA, Silberberg DH. Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes in vitro. *Dev Brain Res* 1985, 21:315–318

- Eide FF, Lowenstein DH, Reichardt LF. Neurotrophins and their receptors - current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol* 1993, 121:200–214
- Emoto N, Gonzalez A-M, Walicke PA, Wada E, Simmons DM, Shimasaki S, Baird A. Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. *Growth Factors* 1989, 2:21–29
- Erices A, Conget P, Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Brit J Haematol* 2000, 109:235–242
- Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci* 2001, 21:581–589
- Ernfors P, Lönnerberg P, Ayer-LeLievre C, Persson H. Developmental and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 1990, 27:10–15
- Esneault E, Pacary E, Eddi D, Freret T, Tixier E, Toutain J et al. Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cerebr Blood F Met* 2008, 28:1552–1563
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth F R* 2005, 16:139–149
- Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Nav1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 2002, 22:7425–7433
- Fjell J, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Fried K, Black JA, Waxman SG. Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Mol Brain Res* 1999, 67:267–282
- Frade JM, Barde Y-A. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Dev Biol* 1999, 126:683–690

- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai W-Y, DuMouchel W, Kao R et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *New Engl J Med* 2001, 344:710–719
- Freeman TB, Cicchetti F, Hauser RA, Deacon TW, Li X-J, Hersch SM et al. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000, 97:13877–13882
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968, 6:230–247
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966, 16:381–390
- Frölke JPM, Bakker FC, Patka P, Haarman HJTM. Reaming debris in osteotomized sheep tibiae. *J Trauma* 2001, 50:65–70
- Frölke JPM, van de Krol H, Bakker FC, Patka P, Haarman HJTM. Destination of debris during intramedullary reaming an: experimental study on sheep femurs. *Acta Orthop Belg* 2000, 66:337–340
- Fuortes MGF, Frank K, Becker MC. Steps in the production of motoneuron spikes. *J Gen Physiol* 1957, 40:735–752
- Gaiano N, Fishell G. The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci* 2002, 25:471-490
- Gambardella L, Barrandon Y. The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15:771–777
- Gasché C. Extraintestinale Manifestationen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chir Gastroenterol* 1998, 14:120–125
- Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ et al. Molecular cloning and expressing of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987, 6:3995-4002
- Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992, 6:3362–3369

- Gogan P, Gueritaud JP, Tyc-Dumont S. Comparison of antidromic and orthodromic action potentials of identified motor axons in the cat's brain stem. *J Physiol* 1983, 335:205–220
- Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol* 2002, 205:575–584
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000, 28:365–368.
- Goodman WG, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* 1984, 33:825-831
- Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 1974, 249:123–127
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987, 8:95–114
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001, 20:6969–6978
- Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 1994, 372:266-269
- Greco SJ, Zhou C, Ye J-H, Rameshwar P. A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters. *Biol Proced Online* 2008, 10:90–101
- Grill RJ, Pixley SK. 2-Mercaptoethanol is a survival factor for olfactory, cortical and hippocampal neurons in short-term dissociated cell culture. *Brain Res* 1993, 613:168–172
- Grondin R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 1998, 245: 35–42

- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000, 97:13625–13630
- Grothe C, Unsicker K. Immunocytochemical mapping of basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat adrenal gland. *Histochemistry* 1990, 94:141–147
- Grothe C, Wewetzer K, Lagrange A, Unsicker K. Effects of basic fibroblast growth factor on survival and choline acetyltransferase development of spinal cord neurons. *Dev Brain Res* 1991b, 62:257–261
- Grothe C, Zachmann K, Unsicker K. Basic FGF-like immunoreactivity in the developing and adult rat brainstem. *J Comp Neurol* 1991a, 305:328–336
- Gubitosi-Klug RA, Mancuso DJ, Gross RW. The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005, 102:5964–5968
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. Structure of the cytoplasmic beta subunit -T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science* 2000, 289:123–127
- Gutman GA. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57:473–508
- Guy HR, Seetharamulu P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1986, 83:508–512
- Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 1993, 4:993-1002
- Hartshorne RP, Catterall WA. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981, 78:4620–4624
- Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical β subunits. *J Biol Chem* 1982, 257:13888–13891

- Hauschka PV, Mavrakos AE, lafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix - Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J Biol Chem* 1986, 261:12665-12674
- Häusser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B. Action initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 1995, 15:637–647
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway. *Biochem J* 1998, 334:297-314
- Helgren ME, Squinto SP, Davis HL, Parry DJ, Boulton TG, Heck CS et al. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 1994, 76:493–504
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM et al. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel $\alpha 1$ subunits. *J Cell Biol* 1993, 123:949–962
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lerneulle C, Armanini M et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 1994, 266:1062–1064
- Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F. Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J Cell Physiol* 2004, 199:194–199
- Henry SL, Adcock RA, von Fraunhofer JA, Seligson D. Heat of intramedullary reaming. *South Med J* 1987, 80:173–176.
- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol* 2004, 59:21-26
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004, 117:4411–4422
- Hernandez A, Kimball B, Romanchuk G, Mulholland MW. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide stimulates neurite growth in PC12 cells. *Peptides* 1995, 16:927-932

- Herzog EL. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003, 102:3483–3493
- Hess DC, Hill WD, Carroll JE, Borlongan CV. Do bone marrow cells generate neurons? *Arch Neurol* 2004, 61:483–485
- Hess P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci* 1990, 13:337–356
- Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991, 251:936-939
- Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature proteins. *J Biol Chem* 1992, 267:6205–6212
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952, 117:500–544
- Hoegel F, Mueller CA, Peter R, Pfister U, Suedkamp NP. Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. *J Trauma* 2004, 56:363–367
- Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007, 22:1317–1328
- Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett* 1994, 182:107-111
- Hoffman DA, Johnston D. Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 1998, 18:3521–3528
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994, 17:399–418
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002, 99:2199–2204

- Hopkins WF, Allen ML, Houamed KM, Tempel BL. Properties of voltage-gated K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 1994, 428:382–390
- Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang L-C, Poulsen KT, Rosenblad C et al. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 1998, 18:4929-4937
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult spinal cord. *J Neurosci* 2000, 20:2218–2228
- Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Cr Rev Toxicol* 1987, 18:27–79
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990, 250:533–538
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 1991, 7:547–556
- Hsieh J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 2004, 14:461–469
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Meija E, Gage FH. Histone-deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004, 101:16659–16664
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:677–736
- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 1988, 335:70–73
- Hung S-C, Chen N-J, Hsieh S-L, Li H, Ma H-L, Lo W-H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002a, 20:249–258

- Hung S-C, Cheng H, Pan C-Y, Tsai MJ, Kao L-S, Ma H-L. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* 2002b, 20:522–529
- Hunter T. Signaling - 2000 and beyond. *Cell* 2000, 100:113–127
- Ihara S, Nakajima K, Fukada T, Hibi M, Nagata S, Hirano T, Fukui Y. Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin 6. *EMBO J* 1997, 16:5345–5352
- Ikeda K, Iwasaki Y, Shiojima T, Kinoshita M. Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy. *J Neurol Sci* 1996, 135:109–113
- Ille F, Sommer L. Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62:1100–1108
- in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003, 102:1548–1549
- Ip NY, Boulton TG, Li Y, Verdi JM, Birren SJ, Anderson DJ, Yancopoulos GD. CNTF, FGF, and NGF collaborate to drive the terminal differentiation of MAH cells into postmitotic neurons. *Neuron* 1994, 13:443–455
- Ip NY, Nys SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y et al. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 1992, 89:1121–1132
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1990, 345:530–534
- Ishii K, Katayama M, Hori K, Yodoi J, Nakanishi T. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci Lett* 1993, 163:159–162
- Ishii J, Natsume A, Wakabayashi T, Takeuchi H, Hasegawa H, Kim SU, Yoshida J. The free-radical scavenger edaravone restores the differentiation of human neural precursor cells after radiation-induced oxidative stress. *Neurosci Lett* 2007, 423:225–230

- Ishii T, Bannai S, Sugita Y. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. *J Biol Chem* 1981a, 256:12387–12392
- Ishii T, Hishinuma I, Bannai S, Sugita Y. Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J Cell Physiol* 1981b, 107:283–293
- Ishikawa K, Tanaka M, Black JA, Waxman SG. Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* 1999, 22:502–507
- Isom LL. Sodium channel subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001, 7:42–54
- Isom LL, Catterall WA. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996, 383:307–308
- Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M. Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. *Exp Nephrol* 2001, 9:444–450.
- Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury. *Neurotox Res* 2009, 16:378–389
- Jan LY, Jan YN. Tracing the roots of ion channels. *Cell* 1992, 69:715–718
- Jang S, Cho H-H, Cho Y-B, Park J-S, Jeong H-S. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol* 2010, 11:25
- Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1992, 1135:185-199
- Jefferys JGR. Initiation and spread of action potentials in granule cells maintained in vitro in slices of guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 1979, 289:375–388
- Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 2004, 27:343–369

- Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003, 100:11854–11860
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002a, 418:41–49
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002b, 30:896–904
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999, 96:25–34
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000, 10:381–391
- Kaplan MR, Cho M-H, Ullian EM, Isom LL, Rock Levinson S, Barres BA. Differential control of clustering of the sodium channels Nav1.2 and Nav1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* 2001, 30:105–119
- Kardami E, Spector D, Strohman RC. Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985, 82:8044-8047
- Kawai H, Nakai H, Suga M, Yuki S, Watanabe T, Saito K-I. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 281:921-927
- Kawamura M, McVicar DW, Johnston JA, Blake TB, Chen Y-Q, Lal BK et al. Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994, 91:6374–6378
- Kearns CM, Gash DM. GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res* 1995, 672:104-111

- Keilhoff G, Gohl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol* 2006, 85:11–24
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004, 27:447–452
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 1998, 18:3206–3212
- Khoo, MLM. In vitro and in vivo neuronal differentiation capacity of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Dissertation 2009. The University of New South Wales, New South Wales. Faculty of Medicine. S.43 ff
- Kim BJ, Seo JH, Buben JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *NeuroReport* 2002a, 13:1185–1188
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ. Downregulation of voltage-gated potassium channel α gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Mol Brain Res* 2002b, 105:146–152
- Kim J, Efe JA, Zhu S, Talantova M, Yuan X, Wang S et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2011, 108:7838–7843
- Kim S-S, Choi J-M, Kim J-W, Ham D-S, Ghil S-H, Kim M-K et al. cAMP induces neuronal differentiation of mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK. *J Mol Neurosci* 2005, 16:1357–1361
- Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992, 258:593-597
- Kiss L, Korn SJ. Modulation of C-Type inactivation by K⁺ at the potassium channel selectivity filter. *Biophys J* 1998, 74:1840–1849
- Klinke R, Silbernagl S, Pape H-C, Kurtz A. *Physiologie*. 6. vollst. überarb. Aufl., Stuttgart 2010, G. Thieme, S.60 ff
- Koestenbauer S, Zech NH, Dohr G. Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen - Ist eine Veränderung in Richtung naiverer Zellen möglich? *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006, 5:324–330

- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Okano H, Hata J et al. Brain from bone: efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001, 68:235–244
- Kontzias A, Kotlyar A, Laurence A, Changelian P, O'Shea JJ. Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Curr Opin Pharmacol* 2012, 12:464–470
- Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993, 13:2739–2748
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson Jr EM, Milbrandt J. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 1996, 384:467–470
- Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells - a critical review. *APMIS* 2005, 113:831–844
- Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galiè M, Rigotti G, Mosna F et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 2007, 40:382–390
- Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005, 308:1472–1477
- Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D et al. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum* 2009, 60:1895–1905
- Kudlacz E, Perry B, Sawyer P, Conklyn M, McCurdy S, Brissette W et al. The novel JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent immunosuppressive agent in various murine models. *Am J Transplant* 2004, 4:51–57
- Kues WA, Wunder F. Heterogeneous expression patterns of mammalian potassium channel genes in developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci* 1992, 4:1296–1308

- Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 2010, 222:268-277
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Blanco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001, 153:1133–1139
- Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H et al. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J Neurochem* 2004, 91:238–251
- Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 2006, 7:548–562
- Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 2005, 19: 29–38
- Lambe EK, Aghajanian GK. The role of Kv1.2-containing potassium channels in serotonin-induced glutamate release from thalamocortical terminals in rat frontal cortex. *J Neurosci* 2001, 21:9955–9963
- Larkum ME, Rioult MC, Lüscher H-R. Propagation of action potentials in the dendrites of neuron from rat spinal cord slice cultures. *J Neurophysiol* 1996, 75:154–170
- Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- α . *Nature* 1985, 313:489-491
- Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropharmacology* 2003, 23:169–180
- Lee K-F, Bachman K, Landis S, Jaenisch R. Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science* 1994, 263:1447–1449
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 1989, 245:57–60

- Lescaudron L, Dunbar DUGL. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *Int J Neurosci* 2003, 113:945–956
- Leunig M, Hertel R. Thermal necrosis after tibial reaming for intramedullary nail fixation. A report of three cases. *J Bone Joint Surg Br* 1996, 78B:584–587
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *Bioscience Rep* 1987, 7:681–699
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR. Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic basal forebrain neurons. *J Neurosci* 1995, 15:3084-3091
- Levy YS, Bahat-Stroomza M, Barzilay R, Burshtein A, Bulvik S, Barhum Y et al. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy* 2008, 10:340–352
- Lewin GR, Barde Y-A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19:289–317
- Li G-R, Sun, H, Deng X, Lau C-P. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* 2005, 23:371-382
- Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001, 316:67–70
- Li Z, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RCH, Guo L et al. Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLOS ONE* 2011, 6:1–9
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming G, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, 44:399–421
- Lillien L, Cepko C. Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF α . *Dev Biol* 1992, 115:253–266

- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000, 28:713–726
- Lin L-FH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993, 260:1130–1132
- Lin X, Buff EM, Perrimon N, Michelson AM. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 1999, 126:3715-3723
- Lindsay RM, Wiegand SJ, Anthony AC, DiStefano PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 1994, 17:182–190
- Liu Z, Li Y, Zhang X, Savant-Bhonsale S, Chopp M. Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke* 2008, 39:2571–2577
- Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 1992, 15:351–355
- Lobb RR. Clinical applications of heparin-binding growth factors. *Eur J Clin Invest* 1988, 18:321–336
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 2005a, 309:897–903
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b, 309:903–908
- Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2005c, 14:65–69
- Lu D, Mahmood A, Wang L, Lu YLM, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *NeuroReport* 2001, 12:559–563

- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004, 77:174–191
- Lu P, Jones L, Tuszynski M. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005, 191:344–360
- Lüscher H-R, Larkum ME. Modeling action potential initiation and back-propagation in dendrites of cultured rat motoneurons. *J Neurophysiol* 1998, 80:715-729
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998, 4:415–428
- Magee J, Avery RB, Christie BR, Johnston D. Dihydropyridine-sensitive, voltage-gated Ca²⁺ channels contribute to the resting intracellular Ca²⁺ concentration of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 1996, 76:3460–3470
- Magee J, Hoffman D, Colbert C, Johnston D. Electrical and calcium signaling in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Annu Rev Physiol* 1998, 60:327–346
- Magee JC, Johnston D. Synaptically controlled, associative signal for hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 1997, 275:209–213
- Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004, 55:1185-1193
- Mahmood A, Lu D, Li Y, Chen JL, Chopp M. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 2001a, 94:589–595
- Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2001b, 49:1196–1204

- Mainen ZF, Joerges J, Huguenard JR, Sejnowski TJ. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* 1995, 15:1427–1439
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990, 5:501–509
- Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthopaed Res* 1997, 15:546–557
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999, 103:697–705
- Mansukhani A, Dell'Era P, Moscatelli D, Kornbluth S, Hanafusa H, Basilico C. Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992, 89:3305–3309
- Manthorpe M, Skaper S, Adler R, Landa K, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. *J Neurochem* 1980, 34:69–75
- Mareschi K, Rustichelli D, Comunanza V, De Fazio R, Cravero C, Morterra G et al. Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. *Cytotherapy* 2009, 11:534-547
- Markram H, Helm PJ, Sakmann B. Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 1995, 485:1–20
- Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 1997, 275:213–215
- Marmur R, Kessler JA, Zhu G, Gokhan S, Mehler MF. Differentiation of oligodendroglial progenitors derived from cortical multipotent cells requires extrinsic signals including activation of gp130/LIF β receptors. *J Neurosci* 1998, 18:9800–9811

- Massagué J. Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 1990, 265:21393–21396
- Matthes SM, Reimers K, Janssen I, Liebsch C, Kocsis JD, Vogt PM, Radtke C. Intravenous transplantation of mesenchymal stromal cells to enhance peripheral nerve regeneration. *BioMed Res Int* 2013, 2013:1–6
- Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961, 9:493–495
- Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010, 223:229–237
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Miglioretti M, Stecco A, Servo S et al. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy* 2012, 14:56–60
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N et al. Stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2008, 265:78–83
- McAllister AK. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2001, 58:1054-1060
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999, 22:295–318
- McCrossan ZA, Lewis A, Panaghie G, Jordan PN, Christini DJ, Lerner DJ, Abbott GW. MinK-related peptide 2 modulates Kv2.1 and Kv3.1 potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci* 2003, 23:8077–8091
- McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002, 99:1341–1346
- Metcalf D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 2003, 21:5–14
- Metzger H, Lindner E. The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Arznei-Forschung* 1981, 31:1248-1250

- Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and Neurturin. *Neuron* 1998, 20:245–253
- Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg* 2004, 101:806-812
- Ming G-I, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005, 28: 223–250
- Mityushova EV, Aksenov ND, Marakhova II. STAT5 in regulation of chronic leukemia K562 cell proliferation: inhibitory effect of WHI-P131. *Cell Tiss Biol* 2010, 4:63-69
- Mizuno A, Umemura K, Nakashima M. Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen Pharmacol-Vasc S* 1998, 30:575–578
- Monaghan MM, Trimmer JS, Rhodes KJ. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K⁺ channel α and β subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci* 2001, 21:5973–5983
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003, 302:1760–1765
- Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci* 2009, 10:16
- Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Müller J et al. Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 2005, 25:9883–9892
- Morrison RS, de Vellis J. Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981, 78:7205-7209
- Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, Bradshaw RA. Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1986, 83:7537–7541

- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006, 441:1068–1074
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994, 13:1071–1082
- Moscatelli D, Presta M, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB. Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1986, 129:273-276
- Mullis K, Faloona F, Scharf F, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, 51:263-273
- Muñoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells* 2003, 21:437–448
- Murphy M, Drago J, Bartlett PF. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J Neurosci Res* 1990, 25:463–475
- Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthopaed Res* 2001, 19:117–125
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W et al. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 2003, 37:449–461
- Neufeld G, Ferrara N, Schweigerer L, Mitchell R, Gospodarowicz D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987, 121:597-603
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 2004, 77:192–204

- Neuß-Stein S. Untersuchungen zur Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Geweberegeneration. Dissertation 2004. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. S.9
- Nilsson A-S, Fainzilber M, Falck P, Ibáñez CF. Neurotrophin-7: a novel member of neurotrophin family from the zebrafish. FEBS Lett 1998, 424:285-290
- Nishi H, Watanabe T, Sakurai H, Yuki S, Ishibashi A. Effect of MCI-186 on brain edema in rats. Stroke 1989, 20:1236–1240
- Niyaz M, Numakawa T, Matsuki Y, Kumamaru E, Adachi N, Kitazawa H et al. MCI-186 prevents brain tissue from neuronal damage in cerebral infarction through the activation of intracellular signaling. J Neurosci Res 2007, 85:2933–2942
- Offen D, Barhum Y, Levy Y-S, Burshtein A, Panet H, Cherlow T, Melamed E. Intrastratial transplantation of mouse bone marrow-derived stem cells improves motor behavior in a mouse model of Parkinson's disease. J Neural Transm 2007, 72:133–143
- Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. Biophys J 1995, 69:2449–2457
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. Ann Neurol 2003, 54:403–414
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science 1969, 164:719-721.
- Ono K, Fozzard HA, Hanck DA. A direct effect of forskolin on sodium channel bursting. Pflügers Arch - Eur J Physiol 1995, 429:561–569
- Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. Genome Biol 2001, 2:1–12
- Ornitz DM, Leder P. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. J Biol Chem 1992, 267:16305–16311

- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996, 271:15292–15297
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 1992, 12:240–247
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004, 22:377–384
- Otani H, Togashi H, Jesmin S, Sakuma I, Yamaguchi T, Matsumoto M et al. Temporal effects of edaravone, a free radical scavenger, on transient ischemia-induced neuronal dysfunction in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2005, 512:129-137
- Ott HC, Berjukow S, Marksteiner R, Margreiter E, Bock G, Laufer G, Hering S. On the fate of skeletal myoblasts in a cardiac environment: down-regulation of voltage-gated ion channels. *J Physiol* 2004, 558:793–805
- Pantoliano MW, Horlick RA, Springer BA, van Dyk DE, Tobery T, Wetmore DR et al. Multivalent ligand-receptor binding interaction in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry* 1994, 33:10229-10248
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991, 349:305–310
- Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 2007, 131:364–377
- Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, Chai YG. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* 2007, 25:2044-2052

- Partanen J, Makela TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J* 1991, 10:1347–1354
- Pell ACH, Christie J, Keating JF, Sutherland GR. The detection of fat embolism by transoesophageal echocardiography during reamed intramedullary nailing. *J Bone Joint Surg Br* 1993, 75B:921–925
- Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh S-M et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92:1142-1146
- Pérez-Pinzón MA, Rosenthal M, Sick TJ, Lutz PL, Pablo J, Mash D. Downregulation of sodium channels during anoxia: a putative survival strategy of turtle brain. *Am J Physiol* 1992, 262:R712-R715
- Pesu M, Laurence A, Kishore N, Zwillich SH, Chan G, O’Shea JJ. Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev* 2008, 223:132–142
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001, 276:36734–36741
- Pinto FM, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Gallardo-Castro M, Cejudo-Román A, Candenás L. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reprod Biol Endocrin* 2009, 7:71
- Pittenger MF. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284:143–147
- Pongs O. Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1992, 13:359–365
- Poser S, Storm DR. Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *Int J Dev Neurosci* 2001, 19:387–394
- Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003, 100:11917–11923

- Qu TY, Dong XJ, Sugaya I, Vaghani A, Pulido J, Sugaya K. Bromodeoxyuridine increases multipotency of human bone marrow-derived stem cells. *Restor Neurol Neuros* 2004, 22:459–468
- Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003, 19:1-22
- Rall W, Shepherd GM. Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. *J Neurophysiol* 1968, 31:884–915
- Rasband MN, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Ellisman MH, Schachner M, Shrager P. Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *J Neurosci* 1998, 18:36–47
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004, 117:1281–1283
- Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Nav1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 2001, 86:629-640
- Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 1983, 301:569–574
- Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2001, 938:231-233
- Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Trimmer JS. Association and colocalization of Kv β 1 and Kv β 2 β -subunits with Kv1 α -subunits in mammalian brain K⁺ channel complexes. *J Neurosci* 1997, 17:8246–8258
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992, 89:8591–8595
- Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989, 109:1–6
- Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res* 2003, 991:46–55

- Riva MA, Mocchetti I. Developmental expression of the basic fibroblast growth factor gene in rat brain. *Dev Brain Res* 1991, 62:45–50
- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2005, 3:158–163
- Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991, 88:8641-8645
- Roybon L, Ma Z, Asztely F, Fossum A, Jacobsen SEW, Brundin P, Li J-Y. Failure of transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells into neurons. *Stem Cells* 2006, 24:1594–1604
- Rugiero F, Mistry M, Sage D, Black JA, Waxman SG, Crest M et al. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and Nav1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *J Neurosci* 2003, 23:S. 2715–2725
- Ruppertsberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990, 345:535–537
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239:487-491
- Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, Costa M. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res* 2000, 60:3375-3378
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000, 164:247–256
- Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003, 116:3855–3862
- Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 2004, 29:1971–1979

- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998, 95:55–66
- Sauer FC. Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol* 1935, 62:377-405
- Scannevin RH, Wang K, Jow F, Megules J, Kopsco DC, Edris W et al. Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 2004, 41:587–598
- Schellenberg A, Lin Q, Schüler H, Koch CM, Joussem S, Denecke B et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *AGING* 2011, 3:873–888
- Schiller J, Helmchen F, Sakmann B. Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 1995, 487:583–600
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103:211–225
- Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle H-J, Kilian O, Meyer C et al. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials* 2003, 24:4603-4608
- Schwartz AV. Diabetes mellitus: does it affect bone? *Calcified Tissue Int* 2003, 73:515-519
- Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna M, Argiolu F et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci* 2006, 7:1-12
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981, 78:3363–3367
- Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neuropathic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19:463–489

- Sendtner M, Arakawa Y, Stöckli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci* 1991, 15:103–109
- Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 1994, 25:1436-1453
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990, 345:440–441
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2004, 478:359–378
- Sharma N, D'Arcangelo G, Kleinklaus A, Haleboua S, Trimmer JS. Nerve growth factor regulates the abundance and distribution of K⁺ channels in PC12 cells. *J Cell Biol* 1993, 123:1835-1843
- Sheets MF, Kyle JW, Kallen RG, Hanck DA. The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charge residues of domain IV, S4. *Biophys J* 1999, 77:747-757
- Sheng M, Liao YJ, Jan YN, Jan LY. Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature* 1993, 365:72–75
- Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 262:132-138
- Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J. Betacellulin: a mitogen from pancreatic β cell tumors. *Science* 1993, 259:1604–1607
- Shipunova NN, Petinati NA, Drize NI. Effect of hydrocortisone on multipotent human mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med* 2013, 155:159-163
- Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro G. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988, 85:6528–6532

- Siatskas C, Payne NL, Short MA, Bernard CCA . A consensus statement addressing mesenchymal stem cell transplantation for multiple sclerosis: it's time! *Stem Cell Rev and Rep* 2010, 6:500–506
- Siebzehnruhl FA, Buslei R, Eyupoglu IY, Seufert S, Hahnen E, Blumcke I. Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Exp Brain Res* 2007, 176:672–678
- Slavin S, Kurkalli BGS, Karussis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosur* 2008, 110:943–946
- Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY et al. Deletion of the Kv1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* 1998, 20:809–819
- Snider WD. Nerve growth factor enhances dendritic arborization of sympathetic ganglion cells in developing mammals. *J Neurosci* 1988, 8:2628–2634
- Snider WD, Lichtman JW. Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol Cell Neurosci* 1996, 7:433-442
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002a, 417:39–44
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002b, 5:438–445
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang L et al. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994, 79:1015–1024
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B. Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 1995, 268:297–300
- Stahl N, Davis S, Wong V, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. Cross-linking identifies leukemia inhibitory factor-binding protein as a ciliary neurotrophic factor receptor component. *J Biol Chem* 1993, 268:7628–7631

- Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Thoenen H, Sendtner M. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 1991, 115:447–459
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008, 129:163–173
- Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* 2001, 276:18265–18271
- Striessnig J, Koschak A, Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Nguyen NK, Busquet P et al. Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans* 2006, 34:903–909
- Stuart GJ, Sakmann B. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 1994, 367:69–72
- Sudbeck EA, Liu X-P, Narla RK, Mahajan S, Ghosh S, Mao C, Uckun FM. Structure-based design of specific inhibitors of Janus Kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin Cancer Res* 1999, 5:1569-1582.
- Suon S, Jin H, Donaldson AE, Caterson EJ, Tuan RS, Deschennes G et al. Transient differentiation of adult human bone marrow cells into neuron-like cells in culture: development of morphological and biochemical traits is mediated by different molecular mechanisms. *Stem Cells Dev* 2004, 13:625–635
- Suon S, Yang M, Iacovitti L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2006, 1106:46–51
- Swanson LW, Bota M. Foundational model of structural connectivity in the nervous system with a schema for wiring diagrams, connectome, and basic plan architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107:20610-20617
- Taga T, Kishimoto T. GP130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:797-819

- Takahashi G, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K. MCI-186 reduces oxidative cellular damage and increases DNA repair function in the rabbit spinal cord after transient ischemia. *Ann Thorac Surg* 2004, 78:602–607
- Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth F R* 2001, 12:361–373
- Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, 24:686–695
- Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 2001, 291:868–871
- Tao H, Rao R, Ma DDF. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev Growth Differ* 2005, 47:423–433
- Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M et al. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone* 2007, 40:360–373
- Terzuolo CA, Araki T. An analysis of intra versus extracellular potential changes associated with activity of single spinal motoneurons. *Ann NY Acad Sci* 1961, 94:547–558
- Togari A, Baker D, Dickens G, Guroff G. The neurite-promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochem Bioph Res Co* 1983, 114:1189–1193
- Toledo-Aral JJ, Moss BL, He Z-J, Koszowski AG, Whisenand T, Levinson SR et al. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997, 94:1527–1532
- Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P et al. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics* 2008, 9:1-11

- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, Bron D. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 2004a, 6:372–379
- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004b, 72:319–326
- Tong G, Shepherd D, Jahr CE. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* 1995, 267:1510–1512
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 1995, 270:7495–7500
- Trepel M. *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*. 4. neu bearb. Aufl., München 2008, Elsevier, Urban & Fischer, Jena, S.2 ff.
- Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Ann Rev Physiol* 2004, 66:477–519
- Trinkaus K, Wenisch S, Siemers C, Hose D, Schnettler R. Bohrmehl: Eine Quelle vitaler Zellen! *Unfallchirurg* 2005, 108:650–656
- Tropel P, Platet N, Platel J-C, Noël D, Albrieux M, Benabid A-L, Berger F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, 24:2868–2876
- Tropepe V. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000, 287:2032–2036
- Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 1999, 208:166–188
- Trueta J, Cavadias AX. Vascular changes by the Küntscher type of nailing. An experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1955, 37B:492–505
- Tsai RYL, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2002, 2:707–712

- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 1988, 11:431–438
- Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ et al. A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2003, 23:11732–11740
- Uemura A, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Nakashima K, Taga T. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 2002, 18:1–7
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 1988, 241:1658–1661
- Vaughn DE, Bjorkman PJ. The (greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 1996, 16:261–273
- Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the KV1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* 1995, 7:2189–2205
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology* 2002, 2002:369–391
- Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2003, 996:231–234
- Verhagen H, Schilderman PAEL, Kleinjans JCS. Butylated hydroxyanisole in perspective. *Chem-Biol Interact* 1991, 80:109-134
- Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring H-J. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003, 88:126–133
- von Bohlen und Halbach O. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Ag Neurosci* 2010, 2:1-11

- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J et al. Transforming growth factor- β 1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, 65:358–370
- Wadzinski BE, Shanahan MF, Ruoho AE. Derivatization of human erythrocyte glucose transporter using a novel forskolin photoaffinity label. *J Biol Chem* 1987, 262:17683–17689
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLOS ONE* 2008, 3:1–12
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995, 18:1417–1426
- Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1986, 83:3012–3016
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 1993, 365:75–79
- Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci* 1994, 14:4588–4599
- Wang S-P, Wang J-A, Luo R-H, Cui W-Y, Wang H. Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible role in cell proliferation. *Clin Exp Pharmacol P* 2008, 35:1077-1084
- Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000, 287:1427–1430
- Weise B, Janet T, Grothe C. Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J Neurosci Res* 1993, 34:442–453
- Weise B, Unsicker K, Grothe C. Localization of basic fibroblast growth factor in a subpopulation of rat sensory neurons. *Cell Tissue Res* 1992, 267:125–130

- Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 1994, 265:1878-1882
- Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell B* 1999, 31:637–643
- Wells A, Ware MF, Allen FD, Lauffenburger DA. Shaping up for shipping out: PLC γ signaling of morphology changes in EGF-stimulated fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskel* 1999, 44:227–233
- Welsch U, Sobotta J. *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. völlig überarb. Aufl. München 2006, Elsevier, Urban und Fischer, Jena, S.174 ff*
- Wen J, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats. *Biol Pharm Bull* 2006, 29:713–718
- Wensch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V et al. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone* 2006, 38:911-921
- Wensch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Herde K, Heiss C et al. Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone* 2005, 36:74–83
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 2002, 3:921–931
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992, 89:10910–10914
- Westenbroek RE, Merrick DK, Catterall WA. Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* 1989, 3:695–704
- Whitaker WRJ, Faull RLM, Waldvogel HJ, Plumpton CJ, Emson PC, Clare JJ. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Mol Brain Res* 2001, 88:37–53
- Winner B, Lie DC, Rockenstein E, Aigner R, Aigner L, Masliah E et al. Human wilde-type α -synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropath Exp Neur* 2004, 63:1155–1166

- Winqvist RA, Hansen ST, Clawson DK. Closed intramedullary nailing of femoral fractures. A report of five hundred and twenty cases. *J Bone Joint Surg Am* 1984, 66A:529–539
- Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull* 2005, 68:95–102
- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002, 69:908–917
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000, 61:364–370
- Wu T, Ding X-S, Wang W, Wu J. MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) attenuated simulated ischemia/reperfusion injury in cultured rat hippocampal cells. *Biol Pharm Bull* 2006, 29:1613–1617
- Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito K-I, Kogure K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1997, 762:240–242
- Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, Watanabe K. Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Rep* 1996, 2:333-338.
- Yamout B, Hourani R, Salti H, Barada W, El-Hajj T, Al-Kutoubi A et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neuroimmunol* 2010, 227:185–189
- Yang EK, Takimoto K, Hayashi Y, de Groat WC, Yoshimura N. Altered expression of potassium channel subunit mRNA and α -dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Neuroscience* 2004, 123:867–874
- Yang J, van Oosten AL, Theunissen TW, Guo G, Silva JCR, Smith A. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* 2010, 7:319–328
- Yang Y-C. Interleukin-11: an overview. *Stem Cells* 1993, 11:474-486

- Yasuoka N, Nakajima W, Ishida A, Takada G. Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Dev Brain Res* 2004, 151:129–139
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991, 64:841–848
- Ye J-H, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol* 1997, 143:70–81
- Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, Smith AC. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002, 416:545–547
- Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, Fukatsu-Sasaki K, Furutani N, Tada N. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug Rev* 2006, 12:9–20
- Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthopaed Res* 1998, 16:406–413
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003, 4:1-7 (Artikel 207)
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 2006, 9:1142–1149
- Yuan PX, Huang L-D, Jiang Y-M, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem* 2001, 276:31674-31683
- Yuan WJ, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Agari T, Kameda M et al. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons. *BMC Neurosci* 2008, 9:1-11
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990, 250:568–571

- Zech NH. Plasticity of stem cells: cell-fusion versus transdifferentiation. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2005, 2:239-245
- Zeng R, Hu Z-b, Guo W-t, Lin H, Sun X, Wei J-s, Wu S-k. Electrophysiological study on differentiation of rat bone marrow stromal stem cells into neuron-like cells in vitro by edaravone. *Chin J Traumatol* 2009, 12:167–172
- Zeng R, Wang L-W, Hu Z-b, Guo W-t, Wei J-s, Lin H et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Spine* 2011, 36:997–1005
- Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008, 132:645–660
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming G, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 2006, 26:3–11
- Zhao L-R, Duan W-M, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002, 174:11–20
- Zhao LX, Zhang J, Cao F, Meng L, Wang D-M, Li Y-H et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Exp Neurol* 2004, 190:396–406
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, 7:211–228
- Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res* 2008, 60:275–280

12. Anhang

12.1 Materialienliste

Im Folgenden findet sich eine Auflistung verwendeter Materialien:

12.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell/Art.-Nr.
Bildschirm	Dell, Round Rock, TX, USA	P190St
Computer	Dell, Round Rock, TX, USA	Optiplex 990
Elektrophorese- kammer	Biometra, Göttingen	020-300
Gefrierschränke	1) Robert Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe 2) Kendro Laboratory Products, Hanau	GSL12400 HFU 586 Basic
Inkubator	Heraeus, Hanau	51022391
Kamera	Allied Vision Technologies, Stadtroda	Stingray F-145B
Kühlschränke	1) gorenje, Velenje, SLO 2) Beko, Neu-Isenburg	545340 7225048714
Membran- Flüssigkeitspumpe	KNF FLODOS, Sursee, CH	NF 1.100 TT.18S
Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen	Axiovert-10
Mikrowellengerät	LG Electronics, Ratingen	MS-1915 HUW
PCR-Gerät	1) Clemens S, Waldbüttelbrunn 2) Techne Inc., Burlington, USA	13872-00S00033 FTC3/02
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA	1) F144801 2) F144802 3) F123600 4) F123615 5) F123601 6) F123602
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	9907200
Schwenktisch	Biosan, Riga, LVA	BS-010125-AAG
Spannungs- generator	Biometra, Göttingen	040-800

Bezeichnung	Hersteller	Modell/Art.-Nr.
Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	ND-1000UV/Vis
Sterilbank	1) Kendro Laboratory Products, Hanau 2) Heraeus, Hanau	HS 12 HB 2448 K GS
UV-Transluminator	Biometra, Göttingen	Biometra UVsolo
Video-Copy- Processor	Mitsubishi Electric Europe, Ratingen	P93E
Vortexer	1) Heidolph Instruments, Schwabach 2) Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA	REAX 2000 G560E
Waagen	SATORIUS, Göttingen	1) BA310P 2) BP211D
Wasser- aufreinigungssystem	MILLIPORE S.A., Molsheim, FRA	ZFMQ05001
Wasserbad	Grant Instruments Ltd., Royston, GBR	Typ PB1
Zellzählgerät	Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, CH	CASY Model TT
Zentrifugen	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen	1) Typ 2205 2) Typ 2004 3) Typ 4470

12.1.2 Glas-, Plastik- und Verbrauchsware

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
Bechergläser	Fisher Scientific, Schwerte	1) 10029100 2) 10779541
CASY-cups	Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, CH	05651794001
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen	121263
Einfriercontainer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	5100-0001
Einmalhandschuhe	Ansell Ltd, Tamworth, UK	700112
Einmaltücher	Brod Industriebedarf, Hanau	90663

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
Eppendorf- reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg	1) 72.695.400 2) 72.690.001 3) 72.699
Ethanol (70%ig) Glasflaschen	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn Fisher Scientific, Schwerte	Charge: 12766 1) FB33144 2) FB33146
Gewebe- kulturschalen	1) BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA 2) Thermo Scientific Nunc, Waltham, MA, USA	352003 153066
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	1) 2200175 2) 2200180 3) 2200193
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA	PM-996
PCR- Reaktionsgefäße	Nerbe plus, Winsen/Luhe	40.121.100
Pipettenspitzen	Gilson S.A.S, Villiers-le-Bel, FRA	1) F171201 2) F171301 3) F171501
Serologische Pipetten	Greiner Bio-one, Frickenhausen	1) 606180 2) 607180 3) 760180 4) 768180
Tubes	Sarstedt, Nürnberg	62.559.001
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, Frickenhausen	1) 658175

12.1.3 Chemikalien

12.1.3.1 Medien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
DMEM high glucose (hg) F-12K	Gibco Life Technologies, Paisley, UK Gibco Life Technologies, Paisley, UK	41965-039 21127022

12.1.3.2 Selbsthergestellte Pufferlösungen und Medien

1x PBS-Puffer:	900 ml Aqua + 100 ml 10x PBS
1x TAE-Puffer:	40 ml 50x TAE + 2 L Aqua bidest
6x Ladepuffer:	30 ml Glycerin + 3 ml 1M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) pH 8,0 + 0,6 ml 0,5M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0 + 30 mg Bromphenolblau + ad 50 ml Aqua
50x TAE-Puffer:	242 g Tris base + 57,1 ml Eisessig + 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 + ad 1 L Aqua bidest
Bohrmehlzellmedium:	500 ml F-12K + 100 ml FBS Gold + 6-7 ml P/S
EtOH (70%ig):	35 ml Ethanol absolut + 15 ml Diethyldicarbonat (DEPC)

12.1.3.3 Zytokine, Medienzusätze, Differenzierungsfaktoren und Pharmaka

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
BDNF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	B3795
β-ME	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	M6250
bFGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F0291

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
BHA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	B1253
CNTF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C 3710
EGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	E9644
FBS ES	PAN-Biotech, Aidenbach	P30-2602
FBS Gold	PAA Laboratories, Parsching, AUT	A15-151
Forskolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F6886
GDNF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	G1777
Humaninsulin	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main	08922880
Hydrocortison	Pfizer Manufacturing Belgium NV, Puurs, BE	01877030
Janex 1	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	10011246
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P5405
MCI-186	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	13320
NGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	N 1408
NT-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	N1905
Penicillin- Streptomycin	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA	15140-122
Valproinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P4543

12.1.3.4 Enzyme, Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
100 bp Ladder	5 PRIME, Hamburg	2500340
AmpliTaq Gold®	Applied Biosystems Life Technologies, Foster City, CA, USA	N8080243
dNTP Mix	Promega, Madison, WI, USA	U151B
QIAshredder	Qiagen, Venlo, NLD	79656
Quantitect® Kit	Qiagen, Venlo, NLD	205314
RNase-freies Wasser	Qiagen, Venlo, NLD	129112
RNeasy® MiniKit	Qiagen, Venlo, NLD	74106

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
SyBr® Green I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	S9430

12.1.3.5 Weitere Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-/Art.-Nr.
10x PBS	Gibco Life Technologies, Paisley, UK	70011-036
Agarosepulver	Carl Roth, Karlsruhe	2267.4
Aqua ad iniectabilia Bovines	B.Braun, Melsungen	2351744
Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	A2058
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	B5525
CasyClean	Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, CH	5651786001
CasyTon	Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, CH	5651808001
DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	D5758
DMSO	ATCC, Manassas, VA, USA	4-x
EDTA	Fluka Chemie, Buchs, CH	03609
Eisessig	Merck, Darmstadt	1000622511
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	32205
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe	7530.1
Tris	Carl Roth, Karlsruhe	4855.2
Tris-Pufferlösung pH 8,0	Behringwerke, Marburg	ORKM 44/45
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco Life Technologies, Paisley, UK	25300-054

12.1.4 Positivkontrollen

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
SH-SY5Y Hodengewebe (cDNA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA BioChain Institute, Inc., Newark, CA, USA	94030304 B1234260

12.1.5 Verwendete Software und Suchmaschinen

CASY-Software

Biometra Gel-Analysis-Software

Fiji-ImageJ-Software

NanoDrop ND-1000-Software

NCBI-Nucleotide

Primer3web version 4.0.0

NCBI-Primer-BLAST

The mfold Web Server

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 30.09.2016

Laura Elke Jutta Henny, geb. Strauß

14. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die freundliche Betreuung und die Ermöglichung der Nutzung des Labores für Experimentelle Unfallchirurgie danken.

Danken möchte ich ebenfalls Frau Prof. Dr. Katrin Lips, der Leiterin des Labores für Experimentelle Unfallchirurgie, die meine Arbeit im Labor stets mit wertvollen Ratschlägen unterstützte und als kritische und konstruktive Diskussionspartnerin entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit hatte. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihr für die Nutzung der Einrichtung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Katja Trinkaus, die mir als meine Betreuerin im Labor tatkräftig bei Literaturrecherchen und dem Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens zur Seite stand. Auch für das immer offene Ohr und die gemeinsamen Besprechungen, welche mich in meiner Arbeit stets vorangetrieben haben, möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Großer Dank gilt zudem dem gesamten Team des Labores für Experimentelle Unfallchirurgie für die freundliche Aufnahme und Integration in die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Frau Olga Dakischew und Frau Ivonne Bergen, die mir nicht nur während der Einarbeitung in die Zellkultur und die Molekularbiologie tatkräftig zur Seite standen, sondern mir auch in schwierigen Phasen stets große fachliche und emotionale Stützen waren.

Bedanken möchte ich mich auch beim RBI für Pharmakologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Kracht, sowie beim Institut für Molekulare Andrologie und Urologie für die freundliche Zurverfügungstellung von Zellmaterial.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit erst ermöglicht haben und mich in jeder Hinsicht fördern. Für die seelische Unterstützung in jeder Phase der Promotion möchte ich auch meiner Großmutter und meiner Schwester herzlich danken, deren Glaube an mich stets Hilfe und Ansporn war. Ein weiterer Dank geht an meine Freunde für ihre tröstenden sowie motivierenden Worte. Abschließend möchte ich meinem Lebensgefährten für seine Unterstützung, seine unerschütterliche Geduld und sein großes Verständnis danken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6672-7

