

Christine Dictus
Dr. med.

**Adulte neurale Progenitorzellen der Ratte und des Menschen:
Isolation, Optimierung von *in vitro* Bedingungen und differentielle Genexpression**

Geboren am 4. März 1977 in München
3. Staatsexamen am 11. Juni 2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurochirurgie
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Adulte neurale Progenitorzellen (ANPC) sind gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ihr pluripotentes Differenzierungspotential und die Fähigkeit, zielgerichtet in ZNS-Läsionen einzuwandern und sich dort funktionell zu integrieren. Daher ist ihr Einsatz eine viel versprechende Option in der Therapie neurodegenerativer, neurotraumatologischer, neuroonkologischer und zerebrovaskulärer Erkrankungen.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden ANPC aus der Ratte und aus dem Menschen aus zwei neurogenen Regionen des adulten ZNS, dem Bulbus olfactorius (BO) und dem Gyrus dentatus (DG), isoliert und über mehrere Monate als adhärenzte Monolayer *in vitro* expandiert, ohne den typischen morphologischen Aspekt adhärent wachsender ANPC zu verlieren, konnten aber auch als Neurosphären kultiviert werden. Unabhängig von Ursprungslokalisierung und Spezies wiesen die Primärkulturen eine Ko-Expression von Nestin als Marker neuraler Progenitorzellen und neuronalen, astroglialen und oligodendroglialen Differenzierungsmarkern auf. Einige Zellen mit der typischen Morphologie von Astroglia bzw. Oligodendroglia exprimierten überwiegend das astrogliale Filamentprotein GFAP bzw. das oligodendrogliale Membranprotein NG2. In den humanen Primärkulturen fanden sich außerdem einige Zellen mit dem morphologischen Aspekt bipolarer Neurone und einer sehr kräftigen Expression des neuronalen Filamentproteins NFP 160 kDa. Die beschriebenen Beobachtungen waren dabei jeweils unabhängig von der Passagezahl, so dass die von uns isolierten ANPC-Kulturen im Verlauf der Kultivierung über mehrere Monate keinem offensichtlichen spontanen Differenzierungsprozess unterworfen waren. In Wachstumskurven, mit denen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bestimmt wurde, zeigten Ratten-ANPC unabhängig von der Ursprungslokalisierung lediglich in den frühesten Passagen eine im Vergleich zu den fortgeschrittenen Passagen gesteigerte Proliferationsrate. Dagegen konnten ANPC aus dem humanen DG im Gegensatz zu Zellen aus dem humanen BO ihre Proliferationsrate in der fortgeschrittenen Passage signifikant steigern. In Kooperationsprojekten wurden außerdem für die von uns isolierten Ratten-ANPC in

Differenzierungsexperimenten das pluripotente Differenzierungspotential sowie in einem Tiermodell des M. Parkinson die Funktionalität der Zellen nachgewiesen.

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf eine effiziente Expansion von ANPC aus raren humanen Gewebeproben wurde das Standardmedium A mit fünf weiteren Medienzusammensetzungen B - F verglichen, die sich in der Wahl von Serum-freien Zusätzen, FCS und Wachstumsfaktoren voneinander unterscheiden. Zur Kultivierung von ANPC aus dem Ratten-DG als *adhärente Monolayer* erschien das Medium B (Standardmedium + LIF) nicht geeignet, weil die Zellen in dessen Gegenwart Neurosphären ausbildeten. Das FCS-haltige und nicht Zytokin-substituierte Medium E war aufgrund einer signifikant verminderten Proliferationsrate nicht zur Expansion von Ratten-ANPC unabhängig von deren Ursprungslokalisation geeignet. In Bezug auf die Migrationsfähigkeit fanden sich für Ratten-ANPC keine signifikanten Unterschiede zwischen den sechs untersuchten Medienzusammensetzungen. ANPC aus dem humanen BO zeigten zwar in Gegenwart der Medienzusammensetzungen A - F keine morphologischen Veränderungen, im Hinblick auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit *in vitro* kam es in Gegenwart des Mediums D (B27, bFGF, EGF) aber zu signifikant gesteigerten Proliferationsraten und Migrationsdistanzen. Diese Ergebnisse widersprechen Beobachtungen aus der Zellkultur, dass ANPC aus dem humanen BO, die unmittelbar nach ihrer Isolation in Medium D als adhärente Monolayer kultiviert wurden, nur unzureichend expandiert werden konnten und zur Bildung von Neurosphären neigten. Damit ist im Vergleich der sechs untersuchten Medienzusammensetzungen A - F das Medium D zur Expansion von ANPC aus dem humanen BO am besten geeignet; zur Isolation und frühen Kultivierung dieser Zellen eignet es sich allerdings nur, wenn eine Neurosphären-Suspensionskultur als Zellkultur-System gewählt wird. Das in Gegenwart des Standardmediums A beobachtete Expressionsmuster von ausgewählten Differenzierungsmarkern änderte sich unabhängig von Ursprungslokalisation und Spezies auch unter dem Einfluss der Medienzusammensetzungen B - F nicht. In semiquantitativen Analysen der Expression von Nestin auf mRNA-Ebene konnte bestätigt werden, dass die Wahl des Kulturmediums keinen offensichtlichen Einfluss auf den Differenzierungszustand der ANPC hat.

Mit Hilfe einer cDNA-Microarray-Analyse wurden im Vergleich von ANPC-Kulturen aus dem humanen BO und DG durch differentielle Genexpressions-Profile Unterschiede detektiert, die über die mit zellbiologischen Methoden beobachteten hinausgehen. Dabei waren Gene, die mit einer erhöhten Proliferationsfähigkeit, der Regulation von Zellzyklus und Apoptose, Zellmotilität, dem Aussprossen von Neuriten und entwicklungsbiologischen

Signalen assoziiert sind, in ANPC aus dem humanen BO insbesondere in der frühen Passage im Vergleich zu ANPC aus dem humanen DG überexprimiert. Gene, die mit einer erhöhten Proliferationsfähigkeit, Apoptose-, DNA-Reparatur- und neuroprotektiven Mechanismen einhergehen, waren in frühen Passagen von ANPC-Kulturen beider Lokalisationen im Vergleich mit fortgeschrittenen Passagen überexprimiert. Darüber hinaus waren in frühen Passagen von ANPC insbesondere aus dem humanen BO Gene überexprimiert, deren Funktion darin besteht, neurale Progenitorzellen in einem undifferenzierten, hochproliferativen Zustand erhalten (IGFBP 4, Notch 3, Connexin 43). Mit neuronalen, astroglialen und oligodendroglialen Differenzierungsprozessen assoziierte Gene waren in BO- und DG-Kulturen gleichermaßen exprimiert. Damit lieferte die cDNA-Microarray-Analyse wertvolle Hinweise auf das lokalisationspezifische Aktivitätsniveau und den Differenzierungszustand unserer ANPC-Kulturen.