

Aus dem Institut für Medizinische und Marine Biotechnologie  
An der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

*In Vitro* Analysen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen für ihre  
Anwendung in der peripheren Nervenregeneration

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Julia Maria Klemens  
aus Kiel

Lübeck 2016

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Charli Kruse

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Habermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2016

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 26.10.2017

## Inhalt

<b>I. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>II. Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>II.1. Das periphere Nervensystem</b>	<b>2</b>
II.1.1. Aufbau	2
II.1.2. Periphere Nervenläsion	6
II.1.3. Periphere Nervenregeneration	8
<b>II.2. Nervenleitschienen</b>	<b>11</b>
II.2.1. Materialien für die Herstellung von Nervenleitschienen	12
II.2.2. Unterstützende Faktoren	14
II.2.3. Unterstützende Zellen	15
<b>II.3. Adulte Stammzellen und ihre Anwendungsmöglichkeiten</b>	<b>15</b>
II.3.1. Quellen adulter Stammzellen	17
II.3.2. Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen	19
II.3.3. Anwendungsmöglichkeiten	19
<b>II.4. Modelle für die periphere Nervenregeneration</b>	<b>21</b>
<b>II.5. Ziel dieser Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>III.1. Material</b>	<b>25</b>
III.1.1. Reagenzien und Chemikalien	25
III.1.2. Kits	26
III.1.3. Verbrauchsmaterialien	27
III.1.4. Geräte	27
III.1.5. Software	28
III.1.6. Primer	29
III.1.7. Antikörper	30
III.1.8. Puffer, Lösungen und Medien	31
<b>III.2. Zellpräparation</b>	<b>33</b>
III.2.1. Isolation von peripheren Neuronen aus der adulten Ratte	33
III.2.2. Isolation von peripheren Neuronen aus pränatalen Ratten	34
<b>III.3. Zellkultur</b>	<b>35</b>

III.3.1.	Kultivierung von adulten und pränatalen peripheren Neuronen	35
III.3.2.	Kultivierung von humanen Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen (hSGSCs)	36
III.3.3.	Besiedlung von Kollagen-basierten Hydrogel-Scheiben	37
III.3.4.	Besiedlung von NeuraGen <sup>®</sup> Nervenleitschienen mit hSGSCs	38
III.3.5.	Ko-Kultur Systeme	38
III.3.6.	MTT-Test	40
III.3.7.	FDA-PI-Färbung von hSGSCs und DRG Neuronen	40
III.3.8.	FDA-Färbung und DAPI-Färbung von hSGSCs auf Hydrogel-Scheiben	41
<b>III.4.</b>	<b>Molekularbiologische Analysen</b>	<b>41</b>
III.4.1.	RNA-Isolation	41
III.4.2.	Bestimmung der RNA Konzentration	42
III.4.3.	Reverse Transkription	42
III.4.4.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	42
<b>III.5.</b>	<b>Proteinbiochemische Analysen</b>	<b>44</b>
III.5.1.	Immunzytochemie	44
III.5.2.	Membranbasierte Zytokin-Arrays	45
III.5.3.	Neuriten-Auswuchs Analyse	46
<b>III.6.</b>	<b>Statistik</b>	<b>47</b>
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<hr/>		
<b>IV.1.</b>	<b>Etablierung peripherer Neurokulturen aus adulten und pränatalen Ratten</b>	<b>48</b>
IV.1.1.	Optimierung der Isolation peripherer Neurone aus adulten und pränatalen Ratten	49
IV.1.2.	Optimierung der Kultur peripherer DRG Neurone aus adulten und pränatalen Ratten	53
<b>IV.2.</b>	<b>Etablierung von Ko-Kultur Systemen</b>	<b>54</b>
IV.2.1.	Das Medium als Grundlage für Ko-Kulturen	55
IV.2.2.	Zellkultur-Inserts als Wachstumsoberfläche für Ko-Kulturen	58
<b>IV.3.</b>	<b>Indirekte Ko-Kulturen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen und peripheren Neuronen</b>	<b>61</b>
IV.3.1.	Analyse des Auswachsens von Neuriten	61
IV.3.2.	Differenzierungsanalysen von hSGSCs nach Ko-Kultur mit DRG Neuronen	64
IV.3.3.	Analyse von Zellkulturüberständen nach Ko-Kultur von hSGSCs und DRG Neuronen	68
<b>IV.4.</b>	<b>Analysen zur Serum- und Serumersatz-freien Kultivierung von hSGSCs</b>	<b>72</b>
IV.4.1.	Differenzierungsanalysen von hSGSCs nach Serum- und Serumersatz-freier Kultivierung	73
IV.4.2.	Morphologische Zellveränderungen durch Serum- und Serumersatz-freie Kultivierung	75

IV.4.3.	Analyse von Zellkulturüberständen nach Serum- und Serumersatz- freier Kultivierung	81
IV.4.4.	Proteinnachweis nach Serum- und Serumersatz-freier Kultivierung	84
<b>IV.5.</b>	<b>Direkte Ko-Kulturen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen und peripheren Neuronen</b>	<b>87</b>
<b>IV.6.</b>	<b>Nervenleitschienen als Matrix für die Besiedlung mit hSGSCs</b>	<b>89</b>
<u>V.</u>	<u>Diskussion</u>	<u>94</u>
<b>V.1.</b>	<b>Peripherere Neurokulturen für <i>in vitro</i> Studien zur Nervenregeneration</b>	<b>94</b>
<b>V.2.</b>	<b>Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen für die zelluläre Unterstützung in der peripheren Nervenregeneration</b>	<b>99</b>
V.2.1.	Potential Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen für die periphere Nervenregeneration	99
V.2.2.	Mögliche Wirkmechanismen Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen in der peripheren Nervenregeneration über Differenzierungsvorgänge oder parakrine Effekte	102
V.2.3.	Vergleich des Potentials Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen mit anderen adulten Zelltypen	107
<b>V.3.</b>	<b>Serum- und Serumersatz-freie Kultivierung von hSGSCs</b>	<b>109</b>
<b>V.4.</b>	<b>Besiedelte Nervenleitschienen für die periphere Nervenregeneration</b>	<b>114</b>
<b>V.5.</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>117</b>
<u>VI.</u>	<u>Literatur</u>	<u>119</u>
<u>VII.</u>	<u>Anhang</u>	<u>i</u>
<b>VII.1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>VII.2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>VII.3.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>VII.4.</b>	<b>Ergänzendes Material</b>	<b>vi</b>
VII.4.1.	Membranen der Zytokin-Arrays	vi
VII.4.2.	Zytokin-Listen der Zytokin-Arrays	viii
VII.4.3.	Zusammensetzung von B-27	ix
VII.4.4.	Detektierte Zytokine	x
VII.4.5.	Ergänzende Aufnahmen von hSGSCs	xiii
VII.4.6.	Ergänzende Daten der qPCR Analysen	xiv
<b>VII.5.</b>	<b>Video der Zeitraffermikroskopie</b>	<b>xv</b>
<b>VII.6.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>xvi</b>
		III

<b>VII.7. Wissenschaftliche Publikationen</b>	<b>xvii</b>
<b>VII.8. Lebenslauf</b>	<b>xix</b>
<b>VII.9. Danksagung</b>	<b>xx</b>

## I. Zusammenfassung

Die Regeneration peripherer Nervenläsionen stellt sowohl für die Klinik als auch für die Wissenschaft eine große Herausforderung dar. Viele neue Konzepte zur Unterstützung der Regenerationsvorgänge verletzter Nerven existieren bereits. Neben der Entwicklung neuartiger Biomaterialien für Nervenleitschienen, der Zugabe von Molekülen der extrazellulären Matrix und neurotrophen Faktoren stellt die zelluläre Unterstützung eine attraktive Möglichkeit dar. Besonders die Applikation autologer Stammzellen bietet eine vielversprechende Therapieform um letztlich den bisherigen Goldstandard, das autologe Nervenransplantat, zu ersetzen.

Humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (hSGSCs) können minimal-invasiv gewonnen werden (Petschnik et al., 2010). Sie weisen *in vitro* ein gutes Proliferationspotential und eine spontane Differenzierung in Zellen der drei Keimblätter auf. In verschiedenen Ko-Kultur Modellen wurde die Interaktion von hSGSC und peripheren Nervenzellen untersucht. Als Modellsystem dienten dazu primäre DRG (dorsales Hinterwurzelganglion = *dorsal root ganglion*) Neurone aus der adulten und pränatalen Ratte.

In der indirekten Ko-Kultur wurde der Einfluss von hSGSCs auf das Auswachsen von Neuriten untersucht. Nach 24-stündiger Ko-Kultivierung führten hSGSCs zu einer signifikant erhöhten Neuriten-Gesamtlänge. Die Neurone hingegen zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression und Zytokinproduktion der hSGSCs. Stattdessen beeinflusste das verwendete Kultivierungsmedium für die Ko-Kulturen die Genexpression und die Zytokinproduktion der hSGSCs. Die Änderungen der Genexpression waren in weiteren Analysen zu Serum- und Serumersatz-freier Kultivierung zusätzlich verstärkt. Diese Umgebung simuliert eine *in vivo* Situation innerhalb einer Nervenleitschiene, in der keine Zellkultur-Konditionen mit optimaler Versorgung durch zusätzliche Wachstumsfaktoren herrschen können. Es wurde die Expression einiger Markergene, insbesondere die des Schwannzellmarkers *Myelin Basic Protein* stark hochreguliert. Die Produktion der untersuchten Zytokine hingegen wurde herunterreguliert.

In der direkten Ko-Kultur wurden DRG Neurone auf einem *Feeder Layer* aus hSGSCs kultiviert. Die Neuronen zeigten eine sehr gute Adhäsion und ein Auswachsen von Neuriten. Die Orientierung der Neuriten war dabei oft dieselbe wie die Orientierung der hSGSCs in Kultur. Für die zukünftige Anwendbarkeit im Hinblick auf eine Therapieform wurden erste Versuche zur Besiedlung von Nervenleitschienen bzw. deren Material durchgeführt.

## II. Einleitung

### II.1. Das periphere Nervensystem

#### II.1.1. Aufbau

Das Nervensystem übernimmt im menschlichen Organismus die Wahrnehmung und Verarbeitung von Reizen und die Steuerung von Reaktionen. Das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus allen im Gehirn und Rückenmark liegenden Nervenstrukturen, und das periphere Nervensystem (PNS), bestehend aus den Hirn- und Spinalnerven, arbeiten aufeinander abgestimmt als effizientes Steuerungssystem (Lukowiak und Peretz, 1977). Die Aufgaben des ZNS sind die Verarbeitung von sensiblen Reizen, die aus der Peripherie eingehen, und die Steuerung der Motorik für eine bewusste und gezielte Reaktion auf diverse Umweltbedingungen (Seal und Commenges, 1986). Das PNS verbindet das ZNS mit allen Effektororganen, die für die Ausführung von Reaktionen verantwortlich sind, es kann als „Rezeptions- und Ausführungsorgan des ZNS“ bezeichnet werden (Trepel, 2012). Die Trennung von ZNS und PNS kann nur grob topographisch erfolgen. Funktionell sind die beiden Systeme direkt miteinander verbunden und auch ihre Lage lässt sich nicht komplett voneinander trennen; die Nervenzellkörper motorischer Nerven liegen im Rückenmark, während ihre Axone in die Peripherie reichen.

Das PNS lässt sich weiter unterteilen in das somatische Nervensystem, welches willkürlich die Motorik der Skelettmuskulatur steuert, und das vegetative oder auch als autonom bezeichnete Nervensystem, das für nicht willkürlich ausgeführte Funktionen wie Atmung, Verdauung und Blutdruckregulation verantwortlich ist. Das vegetative Nervensystem wird in das sympathische, das parasympathische und das enterische Nervensystem unterteilt (Trepel, 2012). Das sympathische Nervensystem steuert Körperfunktionen, die zu erhöhter Leistungsbereitschaft und Energiebereitstellung führen, wohingegen das parasympathische Nervensystem antagonistisch dazu wirkt und durch seine Funktionen dem Körper zur Regeneration und zum Aufbau von Energiereserven verhilft. Das enterische Nervensystem steuert den gesamten Gastrointestinaltrakt und somit alle Verdauungsprozesse (Birbaumer und Schmidt, 2006).

Das somatische Nervensystem erhält seine Reize über afferente Nervenfasern (somatosensibel) und von ihm ausgehende, willkürlich gesteuerte Reize werden über



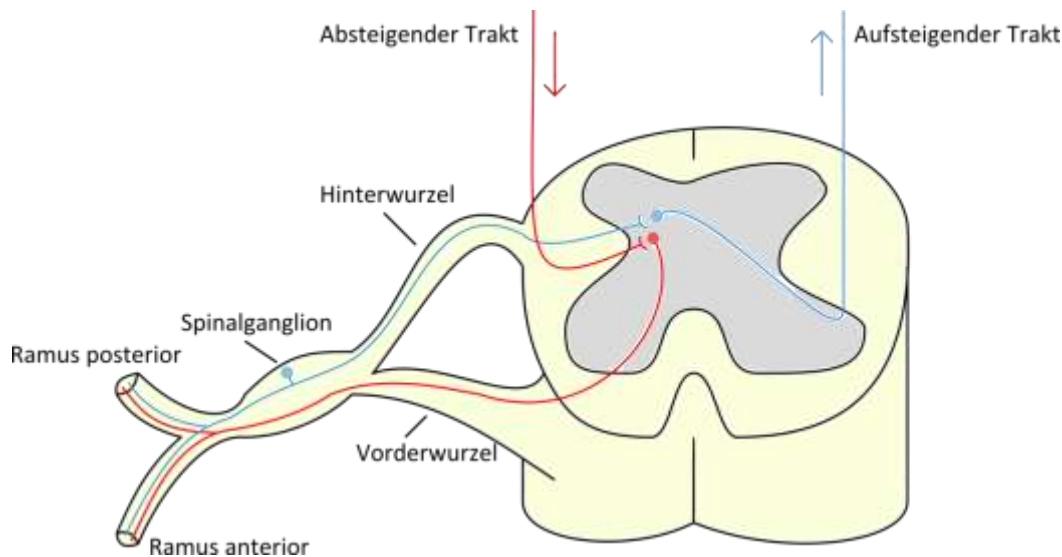
efferente Nervenfasern an die Skelettmuskulatur transportiert (somatomotorisch) (Kammermeier, 2012).

Auch das vegetative Nervensystem kann sensible Reize empfangen und motorische Reize aussenden. Die Nervenfasern des vegetativen Nervensystems, die sensible Reize in Richtung Rückenmark senden, werden als viserosensibel bezeichnet. Hierzu zählen unbewusste Empfindungen des Körpers. Nervenfasern, welche im vegetativen Nervensystem motorische, unwillkürliche Reize zu den Effektororganen leiten, werden als viszeromotorisch bezeichnet. Ein Beispiel ist die unbewusste Steuerung der glatten Muskulatur innerer Organe und die Drüsentätigkeit (Trepel, 2012).

Die Hirnnerven, welche auch zum PNS zählen, entspringen aus den Hirnnervenkernen, speziellen Ansammlungen von Nervenzellkörpern, die im Hirnstamm und im zervikalen Rückenmark liegen (Wilson-Pauwels et al., 2002).

Die Spinalnerven des PNS entspringen jeweils paarweise seitlich aus dem Rückenmark und stellen die Leitungsbahnen zur Informationsübertragung zwischen Rückenmark und peripheren Organen dar. Sie bilden sich aus den vorderen und hinteren Nervenwurzeln, die in das Rückenmark ein- und austreten (Abb. 1). Die Gliederung in zwei Wurzeln unterteilt auch den Informationsfluss: Die Vorderwurzel enthält motorische Nervenfasern, die Informationen Richtung Zielorgan aussenden, die Hinterwurzel hingegen enthält sensible Nervenfasern, die empfangene Informationen Richtung Rückenmark weiterleiten. In der Hinterwurzel ist jeweils ein **Spinalganglion** integriert, auch als **dorsales Hinterwurzelganglion** (*dorsal root ganglion = DRG*) bezeichnet. Die Spinalganglien beinhalten Zellkörper von Neuronen, die Signale über sensible Nervenfasern in Richtung Rückenmark leiten. Von dort werden die Informationen auf ein zweites Neuron im Rückenmark in Richtung Gehirn umgeschaltet. Spinalganglien sind als deutliche Verdickung in der aus dem Rückenmark austretenden Hinterwurzel erkennbar. Die Vorderwurzel besitzt keine solche Verdickung, hier liegen die motorischen Nervenzellkörper im Rückenmark (Nix, 1987).

Das Spinalganglion beinhaltet pseudounipolare Nervenzellen (Abb. 2A). Ein einziger Nervenfortsatz entspringt aus dem Soma der Nervenzelle und spaltet sich erst danach in zwei Fortsätze auf, einer zieht in Richtung Peripherie, der andere durch die hintere Nervenwurzel in das Hinterhorn des Rückenmarks (Motavkin, 1963).

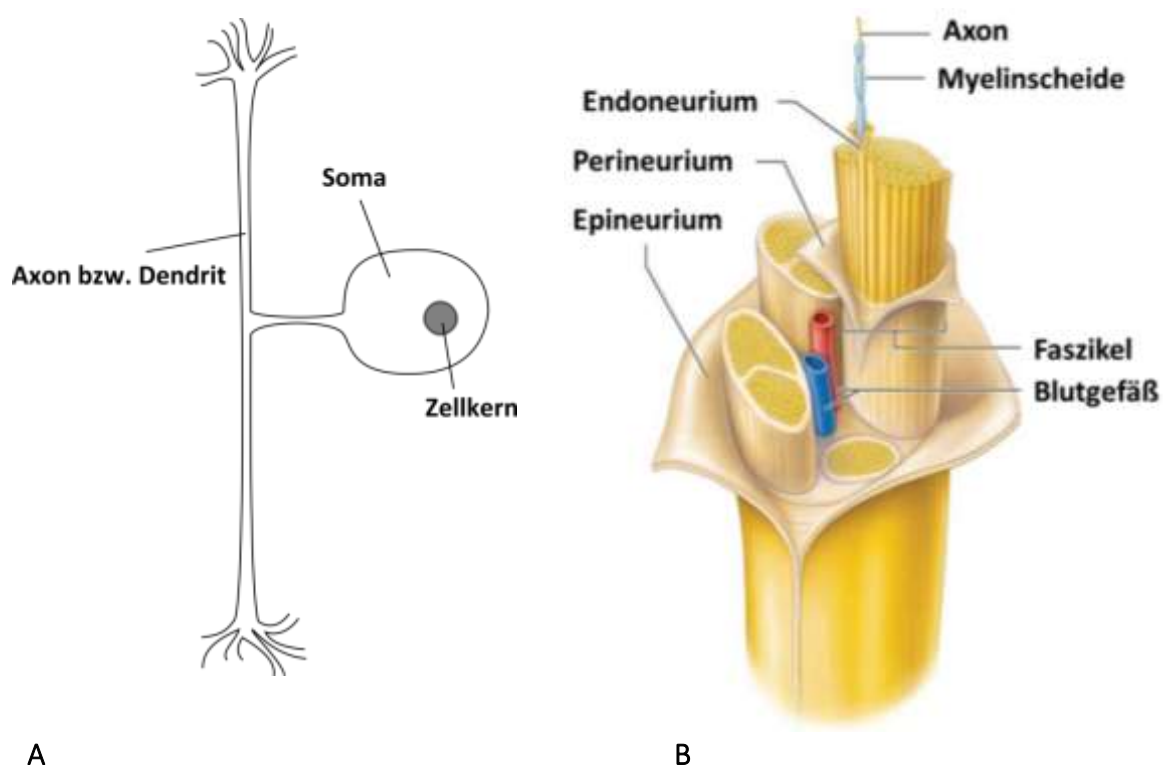


**Abbildung 1: Segment des Rückenmarks mit Vorder- und Hinterwurzel**

Die Spinalnerven des peripheren Nervensystems bilden sich aus der Vorder- und Hinterwurzel, die in das Rückenmark ein- und austreten. Die Nervenzellkörper der motorischen Nervenfasern liegen im Rückenmark und senden ihre Informationen in Richtung Zielorgan. Die sensiblen Informationen werden über die Hinterwurzel in Richtung Rückenmark geleitet, von wo sie auf ein zweites Neuron weiter in Richtung Gehirn umgeschaltet werden. Die Nervenzellkörper der sensiblen Fasern liegen in den Spinalganglien. Spinalnerven spalten sich in verschiedene Äste auf. In dieser Abbildung sind als Beispiele der Ramus posterior zur Versorgung der Rückenpartie und der Ramus anterior zur Versorgung der Vorder- und Seitenpartie dargestellt. Blau: Sensible Nervenfasern; Rot: Motorische Nervenfasern

Insgesamt treten beim Menschen 31 Spinalnerven paarweise aus dem Rückenmark aus: 8 zervikal (Halsnerven, C1-C8), 12 thorakal (Brustnerven, Th1-Th12), 5 lumbal (Lendennerven, L1-L5), 5 sakral (Kreuzbeinnerven, S1-S5), 1 kokzygeal (Steißnerv, Co1) (Gray, 1918). Bei der Ratte als häufig verwendetes Tiermodell für Degenerations- und Regenerationsvorgänge des peripheren Nervensystems (Bertelli und Mira, 1995; Kruspe et al., 2014; Varejão et al., 2001) sind insgesamt 34 Spinalnervenpaare gruppiert: 8 zervikal, 13 thorakal, 6 lumbal, 4 sakral und 3 kaudal (Schwanznerven) (Grant und Robertson, 2004; Greene, 1963). Jeder paarweise Austritt wird als ein Segment bezeichnet. Nerven der Vorderwurzel und der Hinterwurzel vereinen sich jeweils außerhalb des Wirbelkanals gemeinsam im Spinalnerven (Abb. 1). Dieser zweigt sich anschließend direkt in mehrere Hauptäste auf, die verschiedene Funktionen ausüben. Der vordere Ast, Ramus anterior, versorgt sensibel und motorisch die vordere und seitliche Haut und Muskulatur sowie die der Extremitäten. Der hintere Ast, Ramus posterior, dient der sensiblen und motorischen Versorgung von Haut und Muskulatur des Rückens. Der Ramus meningeus ist ein rückläufiger Ast, er tritt wieder in den Wirbelkanal ein und versorgt

sensibel die Rückenmarkshäute. Der vordere Ast organisiert sich in Richtung der Extremitäten neu. Es kommt zur Bildung von Nervengeflechten, zur sogenannten Plexusbildung. Die Spinalnerven treten segmental getrennt in den Plexus ein, durchflechten sich, tauschen Fasern aus und treten als gemischt-segmentale periphere Nerven wieder aus (McKinley, 1921; Pham et al., 2014). Periphere Nerven vereinen somatomotorische und somatosensible Nervenfasern sowie viszeromotorische und viszerosensible Nervenfasern. Die Fasern dieser gemischten peripheren Nerven enden in den Extremitäten wieder segmental geordnet (Trepel, 2012).



**Abbildung 2: Anatomie des peripheren Nerven**

**A)** Die pseudounipolare Nervenzelle, wie sie in einem Spinalganglion vorkommt, besitzt ein Soma mit dem Zellkern und einen einzigen Fortsatz, der sich in zwei einzelne Fortsätze aufspaltet. **B)** Das myelinisierte Axon ist von einer dünnen Bindegewebshülle, dem Endoneurium, umgeben und bildet somit die Nervenfaser. Mehrere Nervenfaseren werden von einer weiteren Bindegewebshülle, dem Perineurium, zu Faszikeln gebündelt. Das Epineurium umschließt mehrere Faszikel, wodurch der Nerv als größte Einheit gebildet wird. B: modifiziert nach Pearson Education (PearsonEducation, 2012).

Die anatomische Struktur eines peripheren Nerven ist in Abbildung 2B dargestellt. Die funktionelle Einheit ist das Neuron, die Nervenzelle. Sie besteht aus einem Nervenzellkörper und Neuriten, die mit den Effektororganen in Verbindung stehen. In Abbildung 2A ist eine pseudounipolare Nervenzelle dargestellt, wie sie in Spinalganglien vorkommt. Einzelne

Neuriten sind von einer Myelinscheide umhüllt. Myelin ist eine modifizierte Plasmamembran der Schwannzellen, die spiralförmig um Neuriten gewickelt ist (Raine, 1984). Diese Einheit wird als Axon bezeichnet. Schwannzellen sind die Gliazellen des peripheren Nervensystems und übernehmen eine strukturell und funktionell wichtige Rolle. Neben der essentiellen Funktion bei der Erregungsweiterleitung sind sie für die strukturelle Aufrechterhaltung der peripheren Nerven zuständig. Jede Myelin-produzierende Schwannzelle umkleidet und isoliert nur eine bestimmte Strecke eines Axons. Periodische Unterbrechungen des Myelins führen zu freiliegenden Bereichen des Axons, den Ranvierschen Schnürringen, an denen ein lokal begrenzter Ionenstrom stattfindet und die für eine saltatorische Reizweiterleitung eine entscheidende Rolle spielen (Huxley und Stämpeli, 1949). Das myelinisierte Axon wird von einer dünnen Bindegewebshülle, dem Endoneurium, umgeben und bildet so die Nervenfasern, die kleinste Einheit des Nerven. Im Endoneurium befinden sich zahlreiche kleine Blut- und Lymphgefäße zur Versorgung der Schwannzellen und der von ihnen umhüllten Axone. Mehrere Nervenfasern werden in Bündeln von einer weiteren, etwas festeren Bindegewebsschicht umgeben, dem Perineurium. Diese gebündelten Nervenfasern werden als Faszikel bezeichnet. Das Epineurium, ebenso eine von Blutgefäßen durchzogene Bindegewebsschicht, umschließt mehrere Faszikel und bildet so die größte zusammengesetzte Einheit, den Nerven (Thomas, 1963).

### II.1.2. Periphere Nervenläsion

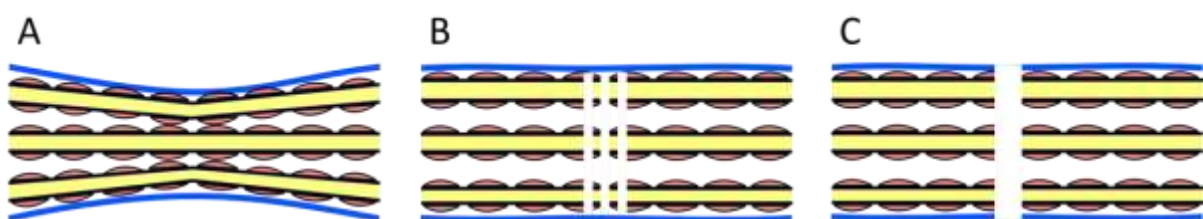
Der Begriff „periphere Nervenläsion“ beschreibt die Verletzung oder Durchtrennung eines peripheren Nerven. Jährlich werden etwa 300.000 Fälle peripherer Nervenverletzungen innerhalb Europas geschätzt (Ciardelli und Chiono, 2006). Im Jahr 2013 wurde ein Report für den US-Amerikanischen Markt verfasst, in welchem für die Reparatur von peripheren Nervenläsionen ein Marktwert von über 1,68 Billionen US Dollar pro Jahr geschätzt (Brattain, 2013). Solche Nervenschädigungen werden meist durch eine Überdehnung, Schnittverletzung oder Stauchung verursacht. Verkehrsunfälle sind die häufigste Ursache für Nervenverletzungen und *Nervus ulnaris*, *Nervus radialis* und *Nervus medianus* einschließlich der Fingernerven sind am häufigsten betroffen (Leitlinienreport, 2013). Es kommt zu einer Unterbrechung der Reizweiterleitung und unmittelbar zu entsprechenden Reaktionen im proximalen (Richtung Rückenmark) und distalen (Richtung Extremitäten) Teil des Nerven sowie im umliegenden Gewebe. Nervenläsionen werden klinisch nach Seddon und

Sunderland klassifiziert, wobei Seddon in drei große Kategorien (Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis) einteilte und Sunderland diese drei Kategorien noch weiter in Schweregrade unterteilte. (Burnett und Zager, 2004; Seddon, 1943; Sunderland, 1978).

**Neurapraxie** (Abb. 3A) ist die leichteste Verletzungs-Kategorie ohne Verlust der Nervenkontinuität. Es besteht meist keine Operationsindikation, da nur ein transienter lokaler Leitungsblock und eine lokale Demyelinisierung vorliegen und sowohl Axon als auch Bindegewebsstrukturen erhalten bleiben. Eine Neurapraxie entsteht häufig durch Quetschung oder Dehnung des Nerven.

**Axonotmesis** (Abb. 3B) beschreibt als traumatischer Schaden eine komplette Kontinuitätsunterbrechung des Axons, wobei umgebendes Perineurium und Epineurium erhalten bleiben. Eine Degeneration von Axon und Myelin findet distal zum Verletzungsort statt. Die Heilungsaussichten einer solchen Verletzung sind dennoch sehr gut, da die unverletzte Bindegewebshülle als Leitschiene für nachspassende Axone bis hin zum Zielorgan vorliegt. Eine Operation ist meist nicht nötig, wobei sich allerdings die klinische Unterscheidung der verschiedenen Typen oft nicht als eindeutig darstellt (Seddon, 1942; Weise und Schiltenswolf, 2014).

Der schwerste Verletzungsgrad **Neurotmesis** (Abb. 3C) bedeutet eine traumatische Verletzung mit Kontinuitätsunterbrechung des Nerven mitsamt der Bindegewebsstrukturen. Eine Neurotmesis bedarf häufig einer operativen Maßnahme, eine Wiederherstellung der Funktion findet kaum eigenständig statt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung peripherer Nervenverletzungen: Neurapraxie (A), Axonotmesis (B) und Neurotmesis (C)**

**A)** Bei einer Neurapraxie findet keine Kontinuitätsunterbrechung des Nerven statt. Axone und Bindegewebsstrukturen bleiben erhalten. **B)** Eine Axonotmesis bedeutet eine Kontinuitätsunterbrechung von Axonen, wobei Perineurium und Epineurium erhalten bleiben. **C)** Bei einer Neurotmesis sind sowohl Axone als auch die Bindegewebsstrukturen durchtrennt. Blau: Epineurium, Gelb: Axon, Rot: Schwannzellen. Keine Darstellung von Perineurium und Endoneurium.

### II.1.3. Periphere Nervenregeneration

Das PNS besitzt im Vergleich zum ZNS die Fähigkeit zur spontanen Regeneration. Im ZNS stellt das fehlende Regenerationspotential die Grundlage für diverse schwerwiegende Krankheiten dar. Pionierarbeit auf dem Gebiet der Regenerationsfähigkeit peripherer Nerven wurde von Aguayo und seinen Kollegen geleistet. Sie konnten eine Regeneration von ZNS Neuronen nachweisen, nachdem sie ein peripheres Nervensegment als „Brücke“ einsetzten (Benfey und Aguayo, 1982; David und Aguayo, 1981; Richardson et al., 1980). Diese Studien zeigen, dass die unmittelbare Umgebung ein kritischer Faktor für das Wiederauswachsen von Axonen darstellt. Schwannzellen des PNS haben eine unterstützende Funktion bei Regenerationsvorgängen. Oligodendrozyten, die myelinisierenden Zellen des ZNS, wirken hingegen inhibierend auf die Regeneration (Bomze et al., 2001). Neurone des PNS regulieren nach einer Schädigung die Expression einer Vielzahl Regenerations-assoziiierter Gene hoch, welche Axonen das Aussprossen ermöglichen (RAGS = *regeneration-associated genes*) (Bomze et al., 2001; Bonilla et al., 2002; Jankowski et al., 2009; Raivich et al., 2004; Seiffers et al., 2006). ZNS Neurone exprimieren nach einer Schädigung keine dieser intrinsischen, Wachstums-assoziierten Faktoren. Zusätzlich inhibieren bestimmte Moleküle im ZNS, die von Oligodendrozyten und Astrozyten produziert werden, die Regeneration (Benson et al., 2005; Chen et al., 2000; Kottis et al., 2002; McKerracher et al., 1994; Moreau-Fauvarque et al., 2003).

Die Fähigkeit zur Regeneration von Nervenfasern des PNS basiert stark auf komplexen Umstrukturierungen und geht mit degenerativen und regenerativen Prozessen auf beiden Seiten der Läsion einher.

#### **Veränderungen der proximalen Nervenendigung**

Veränderungen im Nervenzellkörper sind abhängig von der Stärke der Verletzung sowie von der Nähe des beschädigten Segmentes zum Soma. Je näher am Soma, desto wahrscheinlicher ist eine erfolgreiche Regeneration (Lucas et al., 1985). Aufgrund sehr langer Distanzen, die zwischen Soma und Läsionsstelle bestehen können, ist eine effiziente Kommunikation zum Soma erforderlich, die durch retrograde Signalweiterleitung erreicht wird (Rishal und Fainzilber, 2014). Die Regeneration wird an der proximalen Nervenendigung innerhalb eines Tages nach Verletzung durch die Chromatolyse eingeleitet (Mackey et al., 1964). Bei diesem Vorgang löst sich raues endoplasmatisches Retikulum (Nissl-Substanz) auf und der Nukleus verlagert sich innerhalb des Zellkörpers in Richtung Peripherie. Gleichzeitig wird die

Proteinsynthese des Neurons umgestellt, sodass vermehrt Strukturproteine wie Aktin, Tubulin und Peripherin für das Auswachsen der Axone produziert werden (Snider et al., 2002). Neue Axone wachsen mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 1 mm pro Tag in das distale Ende ein (Burnett und Zager, 2004). An der Spitze eines neu auswachsenden Axons bildet sich ein Wachstumskegel, der fächerförmig in vielen dünnen Filopodien die Umgebung wahrnimmt und auf diese reagiert (Purves et al., 2001). Neurotrophe Moleküle werden von Rezeptoren auf der Membranoberfläche aufgenommen und über retrograden Transport durch das Axon zum Nervenzellkörper transportiert (Slack et al., 1983). Auf diese Weise wachsen Axone in Richtung von attraktiven Kontaktmolekülen und Wachstumsfaktoren und finden schließlich den Weg zum distalen Nervenstumpf und durch ihn hindurch zum Zielorgan.

### **Veränderungen der distalen Nervenendigung**

Der distale Nervenstumpf degeneriert innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung in einer Weise, die als Wallerische Degeneration bezeichnet wird (Waller, 1850). Dabei werden optimale Bedingungen für die entgegenwachsenden Axone gebildet. Zunächst degenerieren die nicht mehr mit dem Soma verbundenen Axonabschnitte, wobei die Bindegewebshüllen bestehen bleiben. Innerhalb von 2-3 Tagen nach der Verletzung beginnen Schwannzellen stark zu proliferieren und sich entlang der nun leeren Bindegewebshüllen in sogenannten Hanken-Büngner-Bändern (Büngner, 1891) kettenartig aneinander zu platzieren. Diese Formierung ergibt eine Leitstruktur für Axone, die während des Regenerationsprozesses nach einer Verletzung neu ausgewachsen sind und sich nun in Richtung des distalen Nervenstumpfes orientieren. Durch die zur Verfügung stehende Leitstruktur werden die Axone bis zu ihrem Zielorgan geführt (Pellegrino et al., 1986). Dadurch wird dieselbe Richtung vorgegeben, in der das Axon auch vor der Verletzung verlief. Schwannzellen schalten durch Suppression der Produktion bestimmter Proteine wie MBP (*myelin basic protein*) und P 0 (Protein 0), die für die Myelinisierung verantwortlich sind, von einem myelinisierenden in einen nicht-myelinisierenden Modus um (Fu und Gordon, 1997). Sie phagozytieren zusammen mit rekrutierten Makrophagen Myelin- und Zelldebris im Bereich zwischen proximaler Nervenendigung und distalem Nervenstumpf um einen Empfang von Wachstumskegeln der regenerierenden Axone zu erleichtern (Fairbairn et al., 2015; Stoll et al., 1989). Zusätzlich synthetisieren Schwannzellen vermehrt Zelloberflächenproteine (CAMs = *cell adhesion molecules*) wie N-CAM, Ng-CAM und N-Cadherin und steigern die Produktion

von neurotrophen Faktoren um die Axone in ihre Richtung zu leiten (Fu und Gordon, 1997). Fibroblasten beginnen ebenfalls in die Läsionsstelle einzuwandern und zu proliferieren; ein Prozess, welcher den Regenerationsvorgang durch eine verstärkte Narbenbildung behindern kann (Park et al., 2011).

Nach einer peripheren Nervenläsion arbeiten also die Nervenzellen in der proximalen Nervenendigung mit einer erhöhten Fähigkeit zum Axonwachstum und Schwannzellen im distalen Nervenstumpf mit einer erhöhten Bereitstellung anziehender Faktoren optimal zusammen um eine Regeneration des peripheren Nerven zu gewährleisten. Im besten Fall überbrücken die Axone die Läsionsstelle und finden ihren Weg entlang der leeren und mit Schwannzellen ausgekleideten Bindegewebshüllen bis hin zu ihrem Zielorgan, innervieren dieses und bewirken einen Funktionswiedergewinn.

### **Chirurgische Maßnahmen:**

Als mikrochirurgische Maßnahme kann eine Zusammenführung der beiden Nervenendigungen mit einer Nervennaht durchgeführt werden (Mennen, 1999). Hierfür darf die Lücke zwischen den Endigungen nicht größer als 5 mm sein um eine Spannung zu vermeiden. Die Durchführung dieser Maßnahme wird innerhalb von 8-24 Stunden nach der Verletzung empfohlen, in geeigneten Fällen bis maximal 10 Tage nach der Verletzung (Leitlinienreport, 2013). Ist die Strecke zwischen den Endigungen größer, wird als „Goldstandard“ ein autologes Nervenstransplantat eingenäht (Jiang et al., 2010). In diesem Fall wird ein funktionell weniger wichtiges Nervensegment, beispielsweise vom *Nervus suralis* am Unterschenkel, entnommen und als Verbindungssegment in die Nervenläsion eingenäht (Johnson und Soucacos, 2008). Dieses dient als Hüllstruktur und ermöglicht den neu auswachsenden Axonen von der proximalen zur distalen Nervenendigung zu gelangen. Eine weitere Möglichkeit ist der Gebrauch von dezellularisierten Leichennerven, die als Hüllstruktur dienen (Barbour et al., 2015). Mit einer Nervenstransplantation können lange Distanzen über die komplette obere Extremität überbrückt werden (Elkwood et al., 2011). Die Nervenendigungen müssen vor einer Naht oft getrimmt werden bis die normalen faszikulären Strukturen wieder gut erkennbar sind (Menovsky und Bartels, 1999). Es ist technisch möglich Nerven auf faszikulärer Ebene zu rekonstruieren, nicht jedoch auf axonaler Ebene (Grinsell und Keating, 2014). Für Läsionen < 3 cm können Nervenleitschienen als Alternative zum autologen Nervenstransplantat in Betracht gezogen werden (de Ruitter et al., 2009) (siehe II.2).



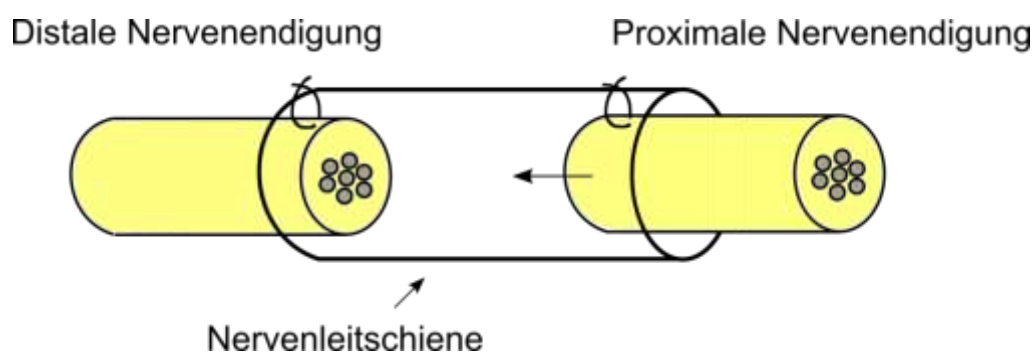
In den Leitlinien zur Versorgung peripherer Nervenverletzungen wird keine allgemeine Empfehlung zu Nervenersatz-Techniken gegeben, da sich diese überwiegend noch im experimentellen Stadium befinden. Allenfalls bei Verletzungen sensibler Nerven und kurzen Defektstrecken unter 2 cm kommen laut den Empfehlungen Leitschienen aus resorbierbaren Materialien in Frage (Leitlinienreport, 2013).

Findet nach einer Neurotmesis kein operativer Eingriff statt, wachsen neu aussprossende Axone ungerichtet aus der proximalen Endigung aus, verwachsen mit entstandenem Narbengewebe und es bildet sich eine geknäulte Struktur, die als Neurom bezeichnet wird (Fawcett und Keynes, 1990). Eine funktionelle Wiederherstellung ist unmöglich. Für den Patienten bedeutet das eine Störung von Motorik oder Sensibilität der betroffenen Extremität und eine allgemeine Minderung der Lebensqualität (Shen und Wang, 2014).

## II.2. Nervenleitschienen

Nach einer Nervenläsion, die einen operativen Eingriff erfordert, gilt das autologe Nerventransplantat als Goldstandard (II.1.3). Es bietet als nicht immunogenes Material die Bereitstellung vitaler Schwannzellen und wichtiger neurotropher Faktoren für die Axonregeneration (Ray und Mackinnon, 2010). Eine autologe Nerven transplantation zieht aber stets auch Nachteile mit sich. Eine zweite Operation ist nötig um den Donor-Nerven zu entnehmen. Zudem können unerwünschte Nebeneffekte wie eine schmerzhafte Neurombildung an der Entnahmestelle auftreten (Ijpma et al., 2006; Schlosshauer et al., 2006). Zudem berichten Studien zwar vom Wiedergewinn der Funktion und Sensibilität nach einer autologen Nerven transplantation, die Ergebnisse sind jedoch noch weit von einer zufriedenstellenden Endlösung entfernt (Samardzić et al., 1998). Die Suche nach Alternativen führte zu diversen neuen Ideen für artifizielle Nervenleitschienen aus natürlichen oder synthetischen Biomaterialien. Versuche, die Nervenfunktion nach einer Verletzung wiederherzustellen, reichen bis ins Mittelalter zurück (of Bertapaglia, 1989; of Milan und von Fleischhacker, 1894). Eine generelle Akzeptanz der Idee, dass periphere Nerven zur Regeneration fähig sind, breitete sich aber erst im 19. Jahrhundert aus (Friedman et al., 2009). Seither wurden einige erfolgreiche Versuche mit biologischen Materialien wie Arterien, Venen und Muskelgewebe sowie mit synthetischen Materialien wie Silikonen und Polymeren als Leitschienen unternommen (Anderson und Turmaine, 1986; Chiu et al., 1988; Glasby et al., 1986; Schröder et al., 1993; Seckel et al., 1984). Durch innovative Materialien sowie durch

zusätzliche neuroattraktive Moleküle oder regenerationsfördernde Zellen können die Erfolge von Therapien mit Nervenleitschienen optimiert werden um letztlich das noch weit entfernte Ziel zu erreichen, das autologe Nervenransplantat, vor allem für lange Regenerationsstrecken, zu ersetzen. Eine Nervenleitschiene wird, wie in Abbildung 4 dargestellt, in die proximale und in die distale Nervenendigung eingenäht. Der geschädigte Bereich wird somit von der Leitschiene geschützt und neu auswachsende Axone werden bei der Regeneration in Richtung der distalen Nervenendigung unterstützt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Nervenleitschiene**

Eine Nervenleitschiene wird in die proximale und in die distale Nervenendigung eingenäht und umschließt den Bereich der Nervenläsion. Neu auswachsende Axone können in Richtung der distalen Nervenendigung wachsen und werden dabei von der Nervenleitschiene geschützt.

### II.2.1. Materialien für die Herstellung von Nervenleitschienen

Eine Vielzahl von Materialien wird für die Herstellung von Leitschienen für die periphere Nervenregeneration untersucht. Dabei müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden. Das Material muss in die definierte Struktur eines Nervenröhrchens gebracht werden können. Es muss kompatibel mit mikrochirurgischen Techniken sein um es in eine Nervenläsion einsetzen zu können. Zudem muss es biokompatibel und nach einer bestimmten Zeitspanne bioresorbierbar sein. Weitere Eigenschaften wie Elastizität, Flexibilität, Modifizierbarkeit mit funktionellen Gruppen, Einführung interner Strukturen und letztlich die Wirtschaftlichkeit erhöhen die Schwierigkeit eine ideale Nervenleitschiene herzustellen. Eine grobe Unterteilung möglicher Materialien erfolgt in biologische und synthetische Materialien.

**Biologische Materialien** auf Proteinbasis sind beispielsweise Kollagen, Elastin, Fibrin und Seide, auf Polysaccharidbasis Agarose, Alginat, Hyaluron und Chitosan (Baldwin und Kiick, 2010; Gagner et al., 2014). Ein entscheidender Vorteil biologischer Materialien ist ihre zuverlässige Bioresorbierbarkeit (Kalbermatten et al., 2009; Wolfe et al., 2012). Nachteilig wiederum stellt sich die Herkunft aus tierischen Quellen und das damit verbundene, wenn auch geringe, Risiko der Krankheitsübertragung und der Abstoßung aufgrund allergischer Reaktionen dar. Biologische Materialien sind meist teurer als ihre synthetischen Alternativen, zeigten aber in einigen Studien bereits sehr erfolgsversprechende Ergebnisse (Kalbermatten et al., 2009; Yang et al., 2007; Yoshii et al., 2002).

**Synthetische Materialien** sind meist Polymer-basiert. Polyglycolsäure (PGA = *polyglycolic acid*) oder Polymilchsäure (PLA = *polylactid acid*), aber auch Silikone, mit dem Nachteil der fehlenden Bioresorbierbarkeit, werden verwendet. Häufig finden auch Hydrogel-basierte Ansätze Einsatz, in die wiederum biologische Materialien wie Kollagen oder Laminin eingearbeitet sind (Labrador et al., 1998). Der große Vorteil synthetischer Materialien ist die gute Reproduzierbarkeit der chemischen Zusammensetzung, die Möglichkeit mechanische Eigenschaften gezielt und einfach zu modifizieren und der günstige Herstellungspreis. Dennoch haben es bisher nur wenige synthetische Nervenleitschienen bis zur Marktzulassung geschafft. Kommerziell erwerbliche Nervenleitschienen sind beispielsweise NeuraGen<sup>®</sup> (Integra, Typ I Kollagen), Neurotube<sup>®</sup> (Synovis, PGA), QiGel<sup>®</sup> (Medovent, Chitosan) und RevolNerve<sup>®</sup> (Orthomed, Typ I und Typ III Kollagen).

Die Weiterentwicklung von Leitschienen schreitet stetig voran. Die Basisform von Nervenleitschienen ist eine einzige hohle rohrähnliche Struktur, die eine geschützte Umgebung und mechanische Führung für die neu auswachsenden Neuriten bietet. Zusätzlich gibt es zahlreiche Fortschritte zu dieser einfachen Struktur, beispielsweise die Füllung des Lumens mit internen Strukturen (Gu et al., 2011). Anstelle einer rohrähnlichen Nervenleitschiene gibt es auch sogenannte *Nerve Wraps*, die vor allem bei Nervenkompressionen zum Schutz um die Läsion herumgewickelt werden (Masear, 2011; Soltani et al., 2014). Diese lassen sich wiederum nicht mit internen Strukturen versehen.

Genauso vielfältig wie die zu verwendenden Materialien sind die Herstellungsmöglichkeiten von Nervenleitschienen. Techniken reichen vom Aufrollen der Fasergeflechte über Präzipitation der Materialien auf einer rotierenden Spindel bis hin zu neuartigen 3D-Druckverfahren (Li et al., 1992; Molander et al., 1982; Zhu et al., 2014). Es lassen sich

topografische Modifizierungen wie Rillen oder Kanäle einarbeiten, die aufgrund der Ähnlichkeiten zur nativen Nervenstruktur mit ihren lammellenförmigen Bindegewebssträngen äußerst vielversprechend sind und einen direkten Einfluss auf Zelladhäsion oder Zellmigration nehmen können (Yang et al., 2009).

### II.2.2. Unterstützende Faktoren

Die Einarbeitung neurotropher Faktoren zur Unterstützung des Auswachsens von Neuriten ist eine effektive Optimierungsmöglichkeit von Nervenleitschienen. Die Idealvorstellung ist eine Leitschiene, in der ein oder mehrere Faktoren in einer exakt eingestellten Konzentration bzw. in einem Konzentrationsgradienten vorliegen und deren Freisetzung bei Bedarf an- oder abgeschaltet werden kann. Von besonderem Interesse ist NGF (*Nerve Growth Factor*) mit seinem stimulierenden und protektiven Effekt auf periphere Nervenzellen (Rich et al., 1987; Xu et al., 2003; Yip et al., 1984). Weitere bekannte neurotrophe Faktoren sind BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*) IGF-1/IGF-2 (*Insulin-like Growth Factor*), NT-3/NT-3/4 (*Neurotrophin*) (Fine et al., 2002; Fujimoto et al., 1997; Sjöberg und Kanje, 1989; Sterne et al., 1997). Die Wachstumsfaktoren können über verschiedene Wege in die Nervenleitschienen eingebracht werden. Die traditionelle Methode, eine exogene Zugabe durch Injektion, führt zu einem einzigen Konzentrations-Höhepunkt direkt nach der Applikation. Durch alternative Methoden wird versucht die jeweiligen Wachstumsfaktoren in einer definierten Konzentration über einen längeren Zeitraum in der Nervenleitschiene zu erhalten. Ein Beispiel ist die Degradation von Mikrosphären, in welche die Wachstumsfaktoren eingeschlossen sind und aus denen sie in definierter Menge freigegeben werden, oder die Inkorporation der Faktoren in synthetische *Scaffolds* (Goraltchouk et al., 2006; Whitaker et al., 2001). Auch hierbei kann die Degradationszeit stark variieren und es ist keine zeitliche Kontrolle der Dosierung möglich. Die kontrollierte Produktion der gewünschten Faktoren durch Plasmide oder virale Vektoren von Zellen, die in die Nervenleitschiene eingebracht wurden, ist ein Versuch diese Problematik zu umgehen. Jimenez *et al.* und McConnell *et al.* ist es mit transfizierten HEK-293 Zellen und einem induzierbarem Expressionssystem gelungen *in vitro* und *in vivo* eine regulierte NGF Sekretion zu erreichen (Jimenez et al., 2004; McConnell et al., 2004).

### II.2.3. Unterstützende Zellen

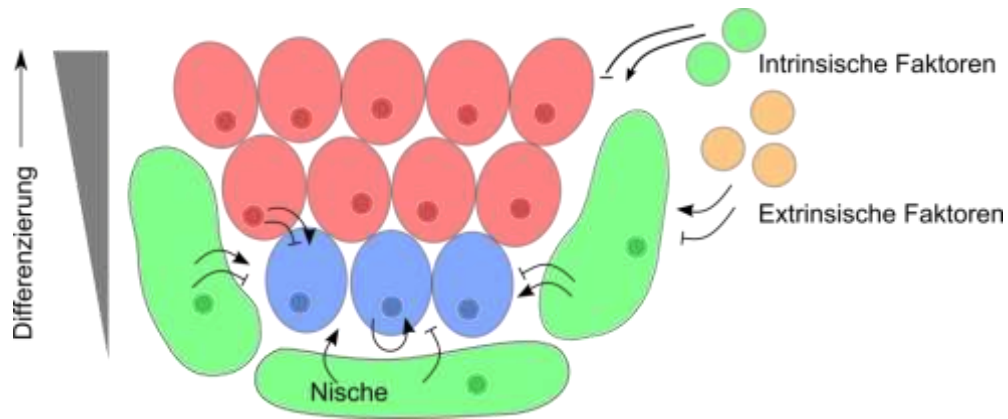
Die Rolle von Schwannzellen in der peripheren Nervenregeneration als Wachstumssubstrat und als Produzent wichtiger Wachstumsfaktoren ist bekannt (II.1.3). Die naheliegende Lösung, Schwannzellen in Nervenleitschienen zu applizieren ist zwar umsetzbar (Armstrong et al., 2007; Levi et al., 1994), löst aber nicht die Problemstellungen der Immunogenität bei allogenen Spendern, der Zellüberlebensrate nach Implantation, der Herkunft und *in vitro* Expansion der Zellen. Fortschritte in der Stammzellforschung zeigen neue Quellen für zelluläre Unterstützung in der peripheren Nervenregeneration auf. Neben Stammzellen aus dem Knochenmark (Chen et al., 2007; Cuevas et al., 2002, 2004) bewirkten auch Fett-abgeleitete Stammzellen (Liu et al., 2011; Radtke et al., 2009; di Summa et al., 2010) und Vollhaut-abgeleitete Stammzellen (Biernaskie und Miller, 2010; McKenzie et al., 2006) eine verbesserte Regeneration von peripheren Nervenläsionen.

Zellbasierte Systeme stellen eine Alternative zu zellfreien Systemen dar und bieten ein großes Potential für weitere Forschung auf diesem Gebiet. Neben diversen noch zu untersuchenden Zell-Zell und Zell-Matrix Wechselwirkungen bleibt aber auch die praktische Umsetzbarkeit für eine potentielle klinische Anwendung noch eine große Herausforderung und es ist anzunehmen, dass es noch viele Jahre dauern wird bis mit autologen Zellen besiedelte Nervenleitschienen klinische Routine sind (Bell und Haycock, 2012).

### II.3. Adulte Stammzellen und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Adulte Stammzellen sind gewebespezifische Stammzellen. Sie sind undifferenziert und befinden sich mit anderen differenzierten Zellen in einem Gewebe oder Organ. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, aber auch zur Differenzierung in die spezialisierten funktionellen Zelltypen des Gewebes oder Organs. Im erwachsenen Organismus halten adulte Stammzellen die Homöostase aufrecht und tragen zur Regeneration von Geweben bei (Marshak et al., 2001). Sie befinden sich in sogenannten Stammzell-Nischen in einem Ruhezustand. Die Nische beschreibt das umgebende Mikromilieu. Durch spezifische externe Signale der Nische und durch intrinsische genetische Faktoren innerhalb der Zelle kann ihre Funktion in Richtung Selbsterneuerung oder Differenzierung angeregt werden. (Jones und Wagers, 2008; Li und Xie, 2005). Adulte Stammzellen sind multipotent, können also der Definition nach keinen kompletten Organismus bilden, sondern nur in Zelltypen ihrer eigenen

Abstammungslinie differenzieren. Studien haben diese strikte Linien-Spezialisierung jedoch in Frage gestellt. Unter bestimmten Bedingungen können adulte Stammzellen transdifferenzieren und zu einem viel größeren Spektrum an differenzierten Abkömmlingen beitragen als zuvor angenommen (Bjornson et al., 1999; Ferrari et al., 1998). Bei der Transdifferenzierung differenziert eine Stammzelle einer spezifischen Abstammungslinie in eine Zelle einer anderen Linie und verliert dabei ihre ursprünglichen gewebespezifischen Marker und Funktionen, während sie jene des transdifferenzierten Zelltyps annimmt (Wagers und Weissman, 2004). Das Konzept dieser Plastizität adulter Stammzellen bedeutet ein flexibleres Differenzierungspotential und somit eine mögliche Reaktion auf eine Vielzahl regenerativer Signale aus der Mikroumgebung der Stammzellen (Blau et al., 2001). Verschiedene zelluläre Komponenten innerhalb einer Stammzellnische nehmen Einfluss auf das Gleichgewicht der Stammzellen: 1) Die Stammzellen selbst durch autokrine Signale und ihre direkten Abkömmlinge durch parakrine Signale 2) Benachbarte mesenchymale oder stromale Zellen durch parakrine Signale 3) Komponenten der extrazelluläre Matrix durch Zell-Zell Kontakte 4) Externe Signale von Blutgefäßen, Neuronen oder Immunzellen außerhalb des Gewebes (Abb. 5). Die Aktivität der Stammzellen wird durch ein Zusammenspiel dieser Faktoren strikt moduliert (Rezza et al., 2014). Genauso essentiell wie ein regulierter Ruhestatus und eine stetige Selbsterneuerung von Stammzellen ist eine Aktivierung zur Geweberegeneration. Dieser Mechanismus wird ausschließlich durch externe Signale aktiviert. Eine Vielzahl von Signalwegen steuert zum Ruhestatus, zu Selbsterneuerung und zur Aktivierung von Stammzellen in ihrer Nische bei, wobei Signale der TGF beta Superfamilie, der Wnt Signalweg und der Notch Signalweg als die wichtigsten Signalwege beschrieben sind (Rezza et al., 2014). Ein Verständnis der Vorgänge innerhalb der Stammzellnische und der Funktionen der verschiedenen Komponenten ermöglicht es diese *in vitro* gezielt zu manipulieren. Stammzellen bei verschiedenen physiologischen Konditionen und Erkrankungen gezielt zu (trans)differenzieren, zu erneuern oder ruhigzustellen bedeutet ausschlaggebende Fortschritte für zukünftige klinische Anwendungsfelder.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung einer adulten Stammzellnische**

Eine Vielzahl von Signalen aktiviert oder inhibiert die Differenzierung von Stammzellen. In einer Stammzellnische wirken intrinsische Faktoren wie benachbarte Zellen oder Komponenten der extrazellulären Matrix und extrinsische Signale von Blutgefäßen, Nervenzellen oder Immunzellen auf die Stammzellen. Auch die Stammzellen selbst (blau) oder ihre direkten Abkömmlinge (rot) nehmen durch autokrine bzw. parakrine Faktoren Einfluss auf Differenzierungsvorgänge. † = Inhibierende Wirkung, ← = Aktivierende Wirkung. Abbildung nach Mihaylova (Mihaylova et al., 2014).

### II.3.1. Quellen adulter Stammzellen

Adulte Stammzellen finden sich in verschiedenen Geweben und Organen. Die am besten untersuchten und klinisch genutzten adulten Stammzellen sind hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (Santos und Ventura-Juncá, 2012). Bereits in den 50er Jahren führte E.D. Thomas erste Experimente mit Stammzellen aus dem Knochenmark an Hunden durch und eröffnete nach der ersten erfolgreichen Knochenmarkstransplantation zur Behandlung eines Leukämie-Patienten 1957 neue Wege zur Geweberegeneration (Thomas, 2005; Thomas et al., 1957). Nach Thomas, der die Zellen aus dem eineiigen Zwilling des Patienten gewann, transplantierte Mathe 1959 erstmals Knochenmarksstammzellen aus einem allogenen Spender (Mathe et al., 1959).

Mesenchymale Stammzellen können ebenfalls aus Nabelschnur (Hayward et al., 2013) und Nabelschnurblut (Rao et al., 2012) und diversen anderen Geweben wie Fett, Skelettmuskel oder Dermis gewonnen werden (Bosch et al., 2000; Young et al., 2001; Zuk et al., 2001). Mesenchymale Stammzellen finden bereits Einsatz in verschiedenen regenerativen Ansätzen. Das Ziel ist, Patienten nach schweren Unfällen oder bei chronischen Krankheiten zu therapieren, bei denen die körpereigene Fähigkeit nicht ausreichend funktionelles Gewebe,

beispielsweise Herzgewebe, Haut oder Nervengewebe wiederherzustellen (Falanga et al., 2007; Orlic et al., 2001; Venkataramana et al., 2010).

Adulte neuronale Stammzellen existieren in einigen wenigen Regionen des Gehirns und sorgen strikt kontrolliert für die Neubildung von Zellen des zentralen Nervensystems (Bergström und Forsberg-Nilsson, 2012). Die Selbsterneuerung neuronaler Stammzellen ist sehr limitiert, ihre Regulation erfolgt aber ebenso wie für andere adulte Stammzellen in physiologischen und pathologischen Konditionen durch extrinsische und intrinsische Signale (Decimo et al., 2012).

Aus Drüsengeweben wie Pankreas und Speicheldrüse können ebenfalls adulte Stammzellen gewonnen werden (Gorjup et al., 2009; Kruse et al., 2004). Besonders interessant für Ansätze der regenerativen Medizin sind adulte Stammzellen, die leicht zugänglich sind und minimal-invasiv aus dem Patienten isoliert werden können. Damit stellt sich die Haut mit ihren Hautanhangsgebilden als optimale Stammzellquelle dar. Sowohl epidermale als auch mesenchymale Stammzellen lassen sich aus einer Hautbiopsie gewinnen. Als sehr vielversprechend stellen sich auch Stammzellen dar, die an Hautanhangsgebilde assoziiert sind und somit sehr spezifisch lokalisiert vorliegen. Etabliert sind Haarfollikelstammzellen aus der Verdickung des Haarbalgs (Amoh et al., 2009) oder des Haar-Außenschaftes (Savkovic et al., 2012), Talgdrüsen-assoziierte Stammzellen (Fuchs und Horsley, 2008) und Schweißdrüsen-assoziierte Stammzellen (II.3.2) (Nagel et al., 2013). An diese Hautanhangsdrüsen assoziiert befinden sich Stammzellpopulationen, die den Stammzellmarker Nestin exprimieren (Hoffman, 2007; Tiede et al., 2009). Nestin ist ein Intermediärfilament und ursprünglich als Marker für neuronale Stamm- oder Progenitorzellen während des sich entwickelnden ZNS bekannt (Lendahl et al., 1990). Es wurde später auch in proliferierenden endothelialen Progenitorzellen (Suzuki et al., 2010) und im Mesenchym von Haarfollikeln, Talgdrüsen und Schweißdrüsen detektiert (Tiede et al., 2009) und ist im Gegensatz zu embryonalen Geweben, wo es migrierende und proliferierende Zellen während der Embryogenese markiert, hauptsächlich in regenerierenden Gewebebereichen zu finden (Wiese et al., 2004).

Im Jahr 2007 ist es erstmals gelungen, adulte ausdifferenzierte Fibroblasten des Menschen in einen pluripotenten Status zurückzusetzen. Die so entstandenen iPS Zellen (induziert Pluripotente Stammzellen) weisen in Morphologie, Proliferationsvermögen, Oberflächenantigenen und Genexpressionsprofil Ähnlichkeiten zu embryonalen Stammzellen auf. Der Übergang in den pluripotenten Status kann durch die Transkriptionsfaktoren Oct3/4



(*Octamer-binding Transcription Factor 3/4*), Sox2 (*Sex determining Region Y-Box 2*), Klf4 (*Krüppel-like Factor 4*), und c-Myc retroviral induziert werden. Diese reprogrammierten Zellen können in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren. Somit ergibt sich die Möglichkeit patienten- und krankheitsspezifische Stammzellen zu generieren und diese für Medikamentenscreenings, Toxizitätstests und die Forschung nach Krankheitsursachen einzusetzen (Takahashi et al., 2007). Die Nutzung retroviraler Vektoren, die in das Genom integrieren, verhindert allerdings eine risikolose Nutzung für klinische Zwecke.

### II.3.2. Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen

Aus Schweißdrüsen lassen sich adulte Stammzellen isolieren und in Kultur bringen. Schweißdrüsen können aus einer Achselhautbiopsie gewonnen werden, aber auch aus anderen Hautarealen wie Bauch-, Brust- oder Oberschenkelhaut. In der Achselhaut sowie im Perigenitalbereich finden sich hauptsächlich apokrine Schweißdrüsen, welche in die Haarfollikel münden. Ekkrine Schweißdrüsen sind über die gesamte Körperoberfläche verteilt und münden direkt in die Hautoberfläche (Lüllmann-Rauch, 2003). Sowohl aus apokrinen als auch aus ekkrinen Schweißdrüsen lassen sich adulte Stammzellen gewinnen. In der Fraunhofer EMB konnten diese Stammzellen mit einem seit 2006 patentierten Verfahren (Kruse, 2006) isoliert, kultiviert und auf ihr multipotentes Differenzierungspotential charakterisiert werden. Die isolierten Stammzellen zeigten eine stabile Proliferation *in vitro* und exprimierten zu 80 % den adulten Stammzellmarker Nestin (Petschnik et al., 2010). Nestin-positive Stammzellen sind im Stroma apokriner und ekkriner Schweißdrüsen lokalisiert und werden im Folgenden als humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (hSGSCs, *human Sweat Gland Derived Stem Cells*) bezeichnet (Nagel et al., 2013). Das Regenerationspotential von hSGSCs konnte bereits in der dermalen Wundheilung nachgewiesen werden, wo durch hSGSCs eine verbesserte Vaskularisierung in einem Vollhaut-Defekt der Ratte erzielt werden konnte (Danner et al., 2012). In einem xenogenen Ko-Kultur Modell mit Rattenhirn-Biopsien wurde eine gerichtete Differenzierung in die neuronale Richtung induziert (Petschnik et al., 2011). Diese Erfolge zeigen eine mögliche klinische Relevanz von hSGSCs für zukünftige regenerative Therapieansätze auf.

### II.3.3. Anwendungsmöglichkeiten

In der modernen Medizin liegt ein Fokus auf der unterstützten Regeneration von Geweben. Der physiologische Prozess einer Wundheilung beim Menschen konzentriert sich in der Regel

auf den Wundverschluss mit damit einhergehender Vernarbung (Kawasumi et al., 2013). Die Fähigkeit zur Regeneration, also der Neubildung von Gewebe, ist bei einigen Organismen wie beispielsweise dem Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) stark ausgeprägt (Gurtner et al., 2008; Reinke und Sorg, 2012). Auch die menschliche Fingerkuppe zeigt im Vergleich zu anderen Körperarealen eine sehr großes regeneratives Potential (Kisch et al., 2015). Das Wissen über solche möglichen Regenerationsprozesse, verbunden mit modernen technischen Gegebenheiten, ermöglicht in der heutigen Zeit neue Therapieansätze. Besonders autologe adulte Stammzellen aus leicht zu erschließenden Körperarealen stellen sich als vielversprechende Basis für diverse Stammzelltherapien dar.

Seit den ersten Stammzelltransplantationen mit Knochenmarksstammzellen in den 50er Jahren (Mathe et al., 1959; Thomas, 2005; Thomas et al., 1957) sind viele Behandlungsmethoden etabliert, bei denen autologe oder allogene multipotente Stammzellen aus dem Knochenmark angeborene und erworbene Erkrankungen wie Immundefekte, Anämien oder Leukämien therapieren (Amorin et al., 2014; Battiwalla und Hematti, 2009). Die gezielte Differenzierung adulter Stammzellen stellt auch für die Behandlung anderer Krankheiten eine erfolgsversprechende Therapieform dar. Denkbar sind hierbei prinzipiell alle Erkrankungen, bei denen es zur Gewebedegeneration kommt. In Kardiomyozyten differenzierte Stammzellen könnten geschädigte Regionen nach einem Herzinfarkt ersetzen, in Knorpelzellen differenzierte Stammzellen könnten der Knorpeldegeneration entgegenwirken und in Betazellen differenzierte Stammzellen könnten ihren Einsatz bei Diabetespatienten finden. Von besonderem Interesse sind auch Stammzellen, die sich in Neurone oder Gliazellen differenzieren lassen und somit neurodegenerative Vorgänge bei Alzheimer oder Parkinson verhindern oder verlangsamen und nach einem Schlaganfall degeneriertes Gewebe ersetzen könnten (Sakthiswary und Raymond, 2012). Ebenso wie für das ZNS sind auch für Läsionen im PNS die unterstützenden Effekte von Stammzellen eine Hoffnung für bessere Heilungsaussichten. Eine neuartige Therapieform mit adulten Stammzellen aus dem Limbus wurde in Europa im Februar 2015 zugelassen. Dieses ATMP (Advanced Therapy Medicinal Product), Holoclar<sup>®</sup>, soll nach Verbrennungen oder Verätzungen die Cornea des Auges regenerieren und lieferte in Studien vor der Zulassung vielversprechende Ergebnisse (Pellegrini et al., 1997; Rama et al., 2010).

Der regenerative Effekt humaner Stammzellen wird häufig nur ihrem Differenzierungspotential in die verschiedenen Zelltypen der Zielgewebe zugeschrieben (Wu et al., 2007). Zusätzlich aber beeinflussen parakrine Effekte die Regenerationsprozesse erheblich (Baraniak und McDevitt, 2010). Für hSGSCs wurde die Produktion verschiedener bioaktiver Moleküle nachgewiesen, unter anderem MMP-9, TIMP-1, VEGF, IGFBP-3 und IL-8 (Danner et al., 2012).

#### II.4. Modelle für die periphere Nervenregeneration

Studien an peripheren Nerven erfordern für *in vivo* Modelle oft eine hohe Anzahl an Tieren. Das am häufigsten genutzte Modell dafür ist der *Nervus ischiadicus* (Ischiasnerv) der Ratte. Als Versuchstiere dienen aber auch Maus, Kaninchen, Hund, Katze, Schaf, Affe oder Schwein. Keines dieser Tiermodelle kann allerdings die Vorgänge während der peripheren Nervenregeneration im Menschen optimal repräsentieren (Angius et al., 2012). Allein schon die große Distanz der zu regenerierenden Nervenläsion vom Nervenzellkörper, beispielsweise bei einer Nervenverletzung an der Hand, ist nicht im Tierversuch nachzubilden. Um die Prozesse während der peripheren Nervenregeneration zu untersuchen wird im Tier eine Nervenläsion gesetzt, die folglich zu einem Verlust der Sensorik und Motorik in der betreffenden Extremität führt. Dieser Verlust wiederum führt in den Versuchstieren häufig zu einer Selbstverstümmelung (Wall et al., 1979). Daten sind bei solchen Vorfällen schwierig oder gar nicht zu erheben und die Versuche müssen vorzeitig abgebrochen werden. An dieser Stelle sollten Alternativen für den Tierversuch in Betracht gezogen werden. Viele Fragestellungen können durch Zelllinien oder Primärzellen als *in vitro* Modelle beantwortet werden. Somit kann auch die Anzahl folgender Tierversuche vermindert werden.

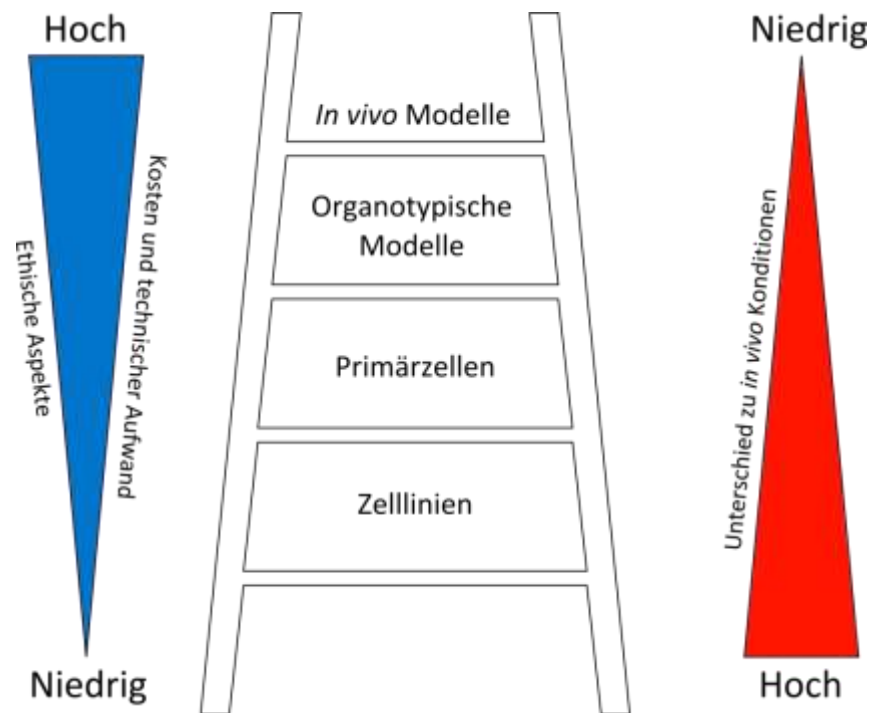
Das authentischste *in vitro* Modellsystem für die periphere Nervenregeneration sind primäre Nervenzellen aus dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG, *Dorsal Root Ganglia*). Diese Zellen lassen sich aus pränatalen (Wang und Marquardt, 2012), postnatalen (Horie und Kim, 1984) und adulten (Scott, 1977) DRG isolieren und in Kultur bringen. Wie in II.1.1 beschrieben handelt es sich um Zellkörper von Neuronen, die Signale über sensible Nervenfasern in Richtung Rückenmark leiten. Eine Isolation solcher Zellen aus ihrer physiologischen Umgebung bedeutet im Prinzip eine Nervenläsion direkt am Soma der Nervenzelle. In der Kulturschale können Regenerationsprozesse als Auswachsen von Neuriten beobachtet werden. Ein Einfluss auf die periphere Nervenregeneration durch bestimmte Substanzen, Zellen oder andere Faktoren kann statt direkt im Tiermodell an DRG Neuronen *in vitro*

getestet werden. Standardmäßig werden hierfür meist DRG der Ratte verwendet, aber auch die Maus kann als Modellorganismus für DRG Neurone gewählt werden.

Es besteht auch die Möglichkeit DRG Zelllinien zu erwerben, beispielsweise „F11“ oder „ND7/23“ (Sigma-Aldrich). Für bestimmte Versuchsvorhaben kann die Verwendung immortalisierter Zellen einen Vorteil bieten, primäre DRG Neurone jedoch stellen die physiologische Situation einer Nervenläsion besser dar. Zelllinien fehlen zum Teil Oberflächenrezeptoren oder sie sind nicht elektrisch aktiv. Zudem stellt allein die Immortalisierung eine Abweichung vom nativen Zustand der Zelle dar. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von ganzen Spinalganglien aus Ratte oder Maus. Anstelle einer Zellisolation werden die DRG als großes Zellaggregat direkt kultiviert und ein sternförmiges Auswachsen der Neuriten beobachtet.

Versuche mit Nervenleitschienen, für die der Einsatz von Versuchstieren zwingend erforderlich scheint, können ebenfalls zuvor im *in vitro* Modell beurteilt werden. Die Zellbesiedlung von Nervenleitschienen beispielsweise ist ein Prozess, der vor dem Einsatz ins Tier im *in vitro* Modell umfassend charakterisiert werden kann. Bei der Forschung an der peripheren Nervenregeneration sollte die Versuchsplanung im Sinne des 3R-Konzeptes (*Replacement, Reduction, Refinement*) erfolgen und Modelle bevorzugt werden, die Versuchstierleiden vermeiden oder bestmöglich vermindern (Russell und Burch, 1959).

Ein Schema, das von Stefano Geuna entworfen wurde (Geuna et al., 2015), verdeutlicht die Einordnung der hier beschriebenen *in vitro* Modelle im Hinblick auf ethische Aspekte, Kosten und technischen Aufwand und in Relation zur Ähnlichkeit zum komplexen *in vivo* Modell (Abb. 6). Durch *in vitro* Analysen mit neuronalen Zelllinien bestehen keine ethischen Konflikte und der Kosten- und technische Aufwand sind gering. Der Gebrauch von Primärzellen (DRG Neurone) und organotypischen Modellen (DRG Explant) bietet eine größere Ähnlichkeit zum *in vivo* Modell, erfordert jedoch einen höheren technischen Aufwand, höhere Kosten und für die Tierpräparation eine ethische Prüfung. Versuche am *in vivo* Modell müssen aufgrund ethischer Fragestellungen im Rahmen eines Tierversuchsantrages geprüft werden und bedeuten einen großen technischen Aufwand sowie hohe Kosten.



**Abbildung 6: Schema von *in vitro* Modellen für die periphere Nervenregeneration**  
 Die Modelle sind im Treppenmodell anhand der ethischen Aspekte, der Kosten und des technischen Aufwands in Relation zu den Unterschieden zum *in vivo* Modell sortiert. Abbildung nach Geuna (Geuna et al., 2015).

## II.5. Ziel dieser Arbeit

Neben der Etablierung von Isolation und Kultivierung Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen (hSGSCs) wurde an der Fraunhofer EMB bereits ihr therapeutisches Potential für die dermale Wundheilung nachgewiesen.

In dieser Arbeit sollten hSGSCs für eine potentielle Verwendung in der Therapie peripherer Nervenläsionen *in vitro* charakterisiert werden.

Für die Durchführung von *in vitro* Versuchen mit peripheren Nervenzellen sollten zunächst die Isolations- und Kultivierungsbedingungen von adulten und pränatalen DRG Neuronen etabliert und optimiert werden. Ebenso sollten die optimalen Bedingungen für eine Ko-Kultivierung von DRG Neuronen und hSGSCs bestimmt werden.

In Ko-Kultur Experimenten sollte der gegenseitige Einfluss von hSGSC und DRG Neuronen untersucht werden um das Verhalten der Zellen in einer potentiellen Therapie von Nervenläsionen zu simulieren.

Durch Analysen zum Auswachsen von Neuriten sollte nach der Ko-Kultivierung untersucht werden, ob hSGSCs einen stimulierenden Einfluss auf DRG Neurone haben. Der Effekt der DRG Neurone auf hSGSCs sollte sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Zytokinebene charakterisiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die Zellen einen parakrinen Einfluss aufeinander ausüben und ob Umgebungsfaktoren im Medium zu einer veränderten Genexpression oder Zytokinproduktion führen.

Für einen potenziellen therapeutischen Einsatz von hSGSCs sollte ein erstes Konzept für die Besiedlung von Nervenleitschienen etabliert werden, mit dem hSGSCs in periphere Nervenläsionen eingebracht werden können.

Es war das Ziel das regenerative Potenzial von hSGSCs in der peripheren Nervenregeneration zu evaluieren und das Verhalten der Zellen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen, vor allem im Hinblick auf die spätere *in vivo* Situation, bestmöglich zu charakterisieren.

### III. Material und Methoden

#### III.1. Material

##### III.1.1. Reagenzien und Chemikalien

3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Roth, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche, Schweiz
Aceton	Roth, Deutschland
B-27 Supplement (Lot: 687879)	Gibco, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dispase II, neutrale protease	Roche, Schweiz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose + L-Glutamine	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Österreich
Fibrinogen aus humanem Plasma	Calbiochem, über Merck-Millipore, Deutschland
Fluoresceindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kollagenase NB 8	Serva, Deutschland
L-15 Medium	Gibco, Deutschland
Laminin, Typ 1	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
MEM Earle's	Biochrom, Deutschland
Methanol	Roth, Deutschland
<i>Nerve Growth Factor</i> (NGF) 2.5S	Gibco, Deutschland
Neurobasal	Gibco, Deutschland
Neurobasal A	Gibco, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck-Millipore, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich

Poly-L-Lysin hydrobromid, Molekulargewicht $\geq 300,000$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Reagenz A (Lysepuffer)	Chemometec, Dänemark
Reagenz B (Stabilisierender Puffer)	Chemometec, Dänemark
Thrombin aus humanem Plasma	Calbiochem, über Merck-Millipore, Deutschland
Tissue-Tek <sup>®</sup> OCT	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Triton-X 100	Fluka , Schweiz
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Österreich
Tween 20	VWR, Deutschland
Vectashield <sup>®</sup>	Vector Laboratories, USA
Ziegennormalserum	Vector Laboratories, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland

### III.1.2. Kits

Proteome Profiler – Human Cytokine Array Panel A	R&D Systems, Deutschland
Proteome Profiler – Human XL Cytokine Array	R&D Systems, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Deutschland
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Deutschland



**III.1.3. Verbrauchsmaterialien**

100 µm Filter CellTrics®	Partec, Deutschland
Chamber Slides (4-Well)	BD Biosciences, Deutschland
Deckgläser (13 mm)	VWR, Deutschland
Einfrierboxen Coolcell®	Biocision, USA
Einweg-Spritzen Omnifix® (5 ml)	Braun, Deutschland
Kryo-Röhrchen, 2 ml	TPP, Schweiz
Micro-Assay-Plate 96-Well, black, clear bottom	Greiner, Deutschland
NeuraGen® Nervenleitschienen	Integra LifeSciences, USA
Nucleo Cassette™	Chemometec, Dänemark
Objektträger Super Frost	Roth, Deutschland
PCR Platte (96-Well)	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Costar, über VWR, Deutschland
Skalpelle	Braun, Deutschland
Sterilfilter (0,45 µm)	Roth, Deutschland
ThinCerts™ Zellkultureinsätze (6- und 24-Well, 0.4 µm Porengröße, Transparent)	Greiner, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten (6- und 24-Well)	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen (22,1 cm <sup>2</sup> , 60,1 cm <sup>2</sup> )	TPP, Schweiz

**III.1.4. Geräte**

Array Scanner Axon GenePix®	Molecular Devices, USA
Brutschrank	Binder, Deutschland
Chemilumineszenz-Detektor Fusion SL	Vilber Lourmat, über Fisher Biotec, Australien
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver Z.1	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot plus	Zeiss, Deutschland
Kryotom HM560	Microm Deutschland)

Laser Scanning Mikroskop LSM 710	Zeiss, Deutschland
Mikroplattenleser Mithras LB 940	Berthold Technologies, Österreich
Nanodrop-Spektrophotometer ND-1000	PaqLab, Deutschland
PCR Cycler Mastercycler Realplex <sup>2</sup>	Eppendorf, Deutschland
QIAcube	Qiagen, Deutschland
Schüttler GFL 3031	Hassa, Deutschland
Stereomikroskop Discovery.V8	Zeiss, Deutschland
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Deutschland
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Deutschland
Zeitraffer-Mikroskop Olympus IX81	Olympus, Japan
Zellzähler Nucleocounter <sup>®</sup>	Chemometec, Dänemark

### III.1.5. Software

AxioVision 4.8	Carl Zeiss AG, Deutschland
Cell <sup>M</sup> 3.1	Olympus, Japan
Gene Pix <sup>®</sup> Pro 7	Molecular Devices, USA
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health, USA
Inkscape 0.48.4	Inkscape, Boston, USA
Microsoft Office Anwendungen 2010	Microsoft, Deutschland
Mikrowin 2000	Berthold Technologies, Österreich
ND-1000 V3.5.2	NanoDrop Technologies, USA
Prism 5.04	GraphPad Software Inc., USA
Realplex 2.2	Eppendorf, Deutschland
VesSeg Tool V0.1.4	Universität zu Lübeck, Deutschland <a href="http://www.isip.uni-luebeck.de/?id=150">http://www.isip.uni-luebeck.de/?id=150</a>

## III.1.6. Primer

Tabelle 1: Verwendete Primer

Alle Primer wurden von Qiagen bezogen (QuantiTect Primer Assays). In der Tabelle sind Genbezeichnung, das entsprechende Protein, die Amplikonlänge in Basenpaaren (bp) und die Herstellerbezeichnung angegeben. Außerdem ist angegeben, ob der Primer intronspannend ist. Die Schmelztemperatur wurde experimentell ermittelt.

Genbezeichnung	Protein	Amplikonlänge [bp]	Intronspannend	Schmelztemperatur [°C]	Herstellerbezeichnung
alpha SMA	<i>alpha Smooth Muscle Actin</i>	83	ja	82,9	Hs_ACTA2_1_SG
Amylase	Amylase	96	ja	79,8	Hs_AMY2A_2_SG
AP	Alkalische Phosphatase	110	ja	85,7	Hs_ALPL_1_SG
β-Aktin	β-Aktin	146	ja	89,4	Hs_ACTB_1_SG
b3T	β3 Tubulin	78	ja	86,6	Hs_TUBB3_1_SG
Ki67	Ki67	86	ja	80,4	Hs_MKI67_1_SG
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>	97	ja	83,1	Hs_LIF_1_SG
LIFR	<i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>	120	ja	80,6	Hs_LIFR_1_SG
Map2	<i>Microtubule-Associated Protein 2</i>	137	ja	83,1	Hs_MAP2_1_SG
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>	60	ja	80,7	Hs_MBP_1_SG
Nestin	Nestin	77	nein	81,6	Hs_NES_1_SG
NFH	Neurofilament H	97	nein	84,0	Hs_NEFH_1_SG
NFL	Neurofilament L	99	ja	81,0	Hs_NEFL_1_SG
NFM	Neurofilament M	74	ja	80,7	Hs_NEFM_1_SG
NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>	118	ja	88,6	Hs_NGFR_1_SG
NSE	Neurospezifische Enolase	61	ja	82,6	Hs_ENO2_1_SG
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>	110	ja	85,1	Hs_UCHL1_1_SG
vWF	von Willebrand Faktor	108	ja	84,8	Hs_VWF_1_SG

## III.1.7. Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Zielstruktur	Abkürzung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
<i>alpha Smooth Muscle Actin</i>	alpha SMA	Maus monoklonal	1:1000	DAKO, Dänemark
β3 Tubulin	b3T	Maus monoklonal	1:250	Santa Cruz, Deutschland
Ki67	-	Kaninchen polyklonal	1:500	Abcam, UK
Nestin	-	Kaninchen polyklonal	1:200	Abcam, UK
Neurofilament Mix	NF	2:1 Mix aus NFL und NF H&M beide Maus monoklonal	1:200	Millipore, Deutschland
<i>Protein Gene Product 9.5</i>	PGP9.5	Kaninchen polyklonal	1:2000	Millipore, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

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

### III.1.8. Puffer, Lösungen und Medien

#### Puffer und Lösungen

Einfríermedium	90 % (v/v) fetales Kälberserum 10 % (v/v) DMSO
FDA-Lösung für FDA-Färbung	1,6 µl/ml FDA-Stammlösung (8 µg/ml) in DMEM
FDA-PI-Lösung für FDA-PI-Färbung	1,6 µl/ml FDA-Stammlösung (8 µg/ml) 3,75 µl/ml PI-Stammlösung (7,5 µg/ml) in DMEM
FDA-Stammlösung	5 mg/ml FDA in Aceton
Fibrinogen-Lösung	20 mg Fibrinogen in 1 ml DMEM / 10 % FKS
Kollagenase-Dispase-Isolationsmedium	1 mg/ml Kollagenase NB8 2 mg/ml Dispase II neutral protease in MEM Earle's steril filtrieren mit 0.45 µm Filter
Methanol/Aceton	70 % Methanol (v/v) 30 % Aceton (v/v)
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
PFA-Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd 10 % (w/v) Sucrose Mit NaOH und HCl auf pH 7,4 einstellen
PI-Stammlösung	2 mg/ml PI in dH <sub>2</sub> O
TBST + 0,1 % BSA	150 mM Natriumchlorid 10 mM Tris (pH 8,8) 0,05 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) BSA Mit NaOH und HCl auf pH 8 einstellen
Thrombin-Lösung	1 µl Thrombin (1U) in 1 ml DMEM / 10 % FKS
Triton-X-DAPI-Lösung	0,1 % (v/v) Triton-X 100 Lösung 0,1 % (v/v) DAPI
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % EDTA (w/v) in PBS

**Medien**

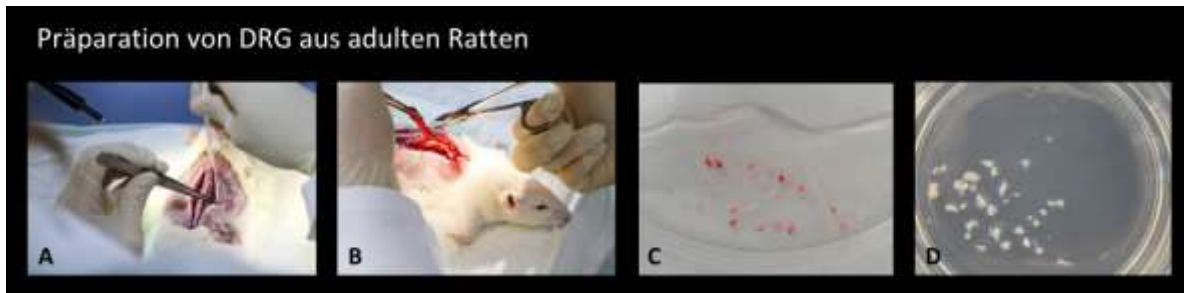
Standard Zellkulturmedium	DMEM 10 % FKS Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 0.1 mg/ml
Kulturmedium für adulte DRG Neurone	Neurobasal A Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 0.1 mg/ml L-Glutamin, 2 mM B-27, 1:50
Kulturmedium für pränatale DRG Neurone	Neurobasal Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 0.1 mg/ml L-Glutamin, 2 mM B-27, 1:50 <i>Nerve Growth Factor</i> , 50 ng/ml
Ko-Kultur Medium für Ko-Kulturen mit adulten DRG Neuronen	50 % DMEM 50 % Neurobasal A Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 0.1 mg/ml L-Glutamin, 1 mM B-27, 1:100
Ko-Kultur Medium für Ko-Kulturen mit pränatalen DRG Neuronen	50 % DMEM 50 % Neurobasal Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 0.1 mg/ml L-Glutamin, 1 mM B-27, 1:100 <i>Nerve Growth Factor</i> , 25 ng/ml

### III.2. Zellpräparation

Die Verwendung von adulten und pränatalen Ratten wurde vom „Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein“ mit den Zeichen V 242-72241.122-39 und V 312-72241.122-39 genehmigt.

#### III.2.1. Isolation von peripheren Neuronen aus der adulten Ratte

Die Isolation peripherer adulter Neurone erfolgte aus männlichen Wistar-Ratten mit 200-300 g Gewicht. Die Tiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Nach Entfernung der Rückenhaut wurde die Wirbelsäule mithilfe eines Skalpell vom thorakalen bis zum lumbalen Bereich freigelegt (Abb. 7A). Thorakal wurde die Wirbelsäule durchtrennt und V-förmig geöffnet, sodass der obere Teil des Wirbelkanals zur Exposition des Rückenmarks angehoben werden konnte (Abb. 7B). Vom Rückenmark ausgehend und den Spinalnerven zu beiden Seiten folgend konnten unter einem Stereomikroskop DRG lokalisiert und mit Mikropinzetten abgetrennt werden. DRG wurden in PBS auf Eis gesammelt (Abb. 7C). Vorhandene Nervenstränge und Bindegewebshüllen wurden mit Skalpell vorsichtig entfernt und die gereinigten DRG (Abb. 7D) in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Kollagenase-Dispase-Isolationsmedium überführt. Eine Minute mechanische Zerkleinerung mit einer sterilen Schere und 10 Minuten enzymatischer Verdau bei 37 °C und Schütteln mit 150 Zyklen/min wurden zweifach durchgeführt. Die entstandene Suspension wurde 50 mal mit einer 1000 µl Spitze auf und ab pipettiert, mit 1500 µl MEM verdünnt durch ein 100 µm Zellsieb gegeben und für 5 min bei 180 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Medium auf Basis von Neurobasal A resuspendiert und für die Kultur ausgebracht. Falls eine zusätzliche Filterung durch einen BSA-Filter stattfinden sollte, wurde die Zellsuspension unmittelbar nach dem Verdau und der Filterung durch das Zellsieb auf 3 ml 15 % BSA (w/v) in PBS in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und 5 Minuten bei 180 g zentrifugiert.



**Abbildung 7: Methodik zur Präparation von DRG aus adulten Ratten**

Die Rückenhaut der Ratte wurde entfernt und die Wirbelsäule freigelegt (A). Nach thorakaler Durchtrennung der Wirbelsäule konnte der Wirbelkanal V-förmig geöffnet werden (B). Die Spinalnerven gehen beidseitig vom Rückenmark ab und ermöglichen eine Identifikation der DRG. Diese werden mit Mikroscheren abgetrennt, in PBS auf Eis gesammelt (C) und von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit (D).

### III.2.2. Isolation von peripheren Neuronen aus pränatalen Ratten

Die Isolation von peripheren pränatalen Neuronen erfolgte aus Ratten an Tag 16-18 der Embryonalentwicklung (E16-E18). Per Definition wird die Ratte bis zum Tag 16 in der Entwicklung als Embryo bezeichnet, ab dem Tag 17 bis zur Geburt als Fetus. Im Folgenden wird die Bezeichnung pränatale Ratte für die verwendeten Tiere gewählt. Das Muttertier samt pränataler Tiere wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet, der Uterus entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. In frischem PBS wurden die pränatalen Ratten aus dem Uterus entnommen und in L-15 Medium auf Eis gesammelt. Die weitere Präparation erfolgte mithilfe eines Stereomikroskops. Mit Mikropinzetten wurden Kopf, Extremitäten und ventraler Teil entfernt und die dorsalen Strukturen mit der Wirbelsäule freigelegt. In Abbildung 8A+B sind die dorsalen Strukturen gekennzeichnet, in Abbildung 8C frei präpariert. Zwischen Wirbelsäule und Wirbelkanal greifend wurde die Wirbelsäule aufgetrennt und das Rückenmark mit den DRG freigelegt (Abb. 8D). DRG wurden mit Mikropinzetten abgezogen (Abb. 8E) und in einem Reaktionsgefäß mit 500 µl L-15 Medium gesammelt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Medium entfernt und 500 µl Trypsin zugegeben. Eine Minute mechanische Zerkleinerung mit der Schere und 10 Minuten enzymatischer Verdau bei 37 °C und Schütteln mit 150 Zyklen/min wurden identisch zum Präparationsprozess adulter Neuronen zweifach durchgeführt. Mit der 1000 µl Pipette wurde die entstandene Suspension 50 mal auf und ab pipettiert und mit 1500 µl MEM verdünnt für 5 min bei 180 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Medium auf Basis von Neurobasal resuspendiert und für die Kultur mit  $4-5 \cdot 10^4$  Z / cm<sup>2</sup> ausgebracht.





**Abbildung 8: Methodik zur Präparation von DRG aus pränatalen Ratten**

Pränatale Ratten wurden unter dem Stereomikroskop präpariert (A). Die dorsalen Strukturen der Wirbelsäule wurden freigelegt (B) und Extremitäten, Kopf sowie umliegendes Gewebe entfernt (C). Die Auftrennung der Wirbelsäule legte die DRG frei (D), welche mit Mikropinzetten abgezogen werden konnten (E).

### III.3. Zellkultur

#### III.3.1. Kultivierung von adulten und pränatalen peripheren Neuronen

Adulte und pränatale periphere Neurone wurden auf Zellkulturplastik oder Deckgläsern mit einer Doppelbeschichtung aus Poly-L-Lysin (PLL) und Laminin kultiviert. Für die Beschichtung nach Herstellerangaben wurde PLL (100 µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweifach mit sterilem entionisiertem Wasser gewaschen und für mindestens 2 h offen in steriler Umgebung trocknen gelassen. Die Laminin-Beschichtung (50 µg/ml) erfolgte für 30 min bei 37 °C und anschließend zweifachen Waschen mit MEM. 4-Well Chamberslides und 6-Well Inserts wurden mit jeweils 500 µl Volumen beschichtet. Deckgläser (13 mm) wurden umgekehrt auf einen 20 µl Tropfen mit der entsprechenden Beschichtung aufgelegt, zum Waschen in Gefäße mit sterilem entionisiertem Wasser bzw. MEM eingetaucht und anschließend in 24-Wellplatten platziert. Mit MEM überschichtet konnte eine Lagerung bei 37 °C über Nacht erfolgen.

Frisch isolierte DRG Neurone wurden in den entsprechenden Kulturmedien in die vorbereiteten Kulturgefäße ausgebracht. Die Medien für adulte und pränatale DRG Neurone sind in III.1.8 aufgeführt.

Ein Wechsel von 50 % des Mediums erfolgte stets 24 h nach Zellisolation und anschließend täglich, sofern keine Ko-Kultivierung mit anderen Zellen stattfand oder eine Analyse der Medien bevorstand.

### III.3.2. Kultivierung von humanen Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen (hSGSCs)

Die verwendeten hSGSCs wurden im Vorfeld dieser Arbeit nach Aufklärung und rechtlich wirksamer Einwilligung der Patienten in der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie des Universitätsklinikums Lübeck (Ethikvotum Aktenzeichen 10-058) isoliert.

Subkultivierung:

Die standardmäßige Kultivierung von hSGSCs erfolgte in 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM / 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen bis zu drei Tage weiterkultiviert und anschließend im Verhältnis 1:3 subkultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 0.05 % (w/v) Trypsin für 2 Minuten bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe der doppelten Menge DMEM / 10 % FKS gestoppt und die Zellsuspension durch 5-minütige Zentrifugation bei 180 g pelletiert. Das Zellpellet wurde für die Subkultur oder für spezifische Versuchsbedingungen in DMEM / 10 % FKS resuspendiert und neu ausgebracht. Ein Medienwechsel erfolgte am Folgetag und anschließend alle zwei bis drei Tage. Die verwendeten Zellen befanden sich in den Passagen 11-17.

Zellzahlbestimmung:

Für die Aussaat definierter Zellzahlen wurde eine Zellzahlbestimmung mithilfe propidiumiodidhaltiger Einwegkassetten und folgender Fluoreszenzmessung am *Nucleocounter* durchgeführt. Nach enzymatischer Ablösung der Zellen durch Trypsin wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Lysepuffer durch Auf- und Abpipettieren lysiert und anschließend mit 50 µl Stabilitätspuffer versetzt. Die Suspension wurde in die Einwegkassette aufgenommen, in welcher das Propidiumiodid in die DNA freiliegender Zellkerne interkaliert. Im *Nucleocounter* wurden fluoreszierende Zellkerne detektiert und als Zellzahl pro ml ausgegeben, wobei der Verdünnungsfaktor 3 einberechnet wurde.

Auftauen und Kryokonservieren von Stammzellen:

Bei < -135 °C gelagerte Stammzellen wurden kurz angetaut und direkt in ein mit vorgewärmtem DMEM / 10 % FKS gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 180 g wurde das entstandene Zellpellet in entsprechender Menge DMEM / 10 % FKS in Zellkulturflaschen ausgebracht.

Zum Kryokonservieren der Stammzellen wurden konfluent gewachsene Zellen wie für die Subkultivierung durch Trypsin enzymatisch abgelöst, das entstandene Zellpellet mit DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. In Einfrierboxen erfolgte eine Lagerung bei -80 °C über Nacht, bei der die Temperatur der Probe um 1 °C pro Minute abgesenkt wurde. Anschließend wurden die Zellen bei < -135 °C in die Gasphase von flüssigem Stickstoff umgelagert.

Kultivierung von hSGSCs während der Zeitraffer-Mikroskopie:

Für die Zeitraffermikroskopie am Zeitraffer-Mikroskop Olympus IX81 wurden hSGSCs in 4-Well Chamberslides ausgebracht. Die Zellen waren adhären, bevor sie in die Zeitraffer-Mikroskopie-Kammer umgesetzt wurden. Die Kultivierung innerhalb der Kammer erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 70 % Luftfeuchtigkeit. Ein Medienwechsel erfolgte unmittelbar bevor die Zeitraffer-Mikroskopie gestartet wurde. Während der Zeitraffer-Mikroskopie für 48 h blieb die Kammer geschlossen und wurde abgedunkelt. Mit dem Objektiv wurden mithilfe der Software Cell<sup>M</sup> 3.1 (Olympus, Japan) automatisiert bis zu 6 Positionen pro Versuch angefahren und alle 20 min Aufnahmen in der 4-fachen Vergrößerung und mit den Phasenkontrasten PH1 und PHL gemacht.

### III.3.3. Besiedlung von Kollagen-basierten Hydrogel-Scheiben

Die Versuche zur Besiedlung von Hydrogelen erfolgten im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Michael C. Hacker und Caroline Kohn vom Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie aus dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig. Zur Vorbereitung der Hydrogel-Scheiben wurden diese 12-24 h vor der Besiedlung in Standard-Zellkulturmedium quellen gelassen. Die getrockneten Hydrogel-Scheiben wurden dafür in Vertiefungen einer 24-Well Platte platziert und 300 µl Medium pro Hydrogel-Scheibe hinzugegeben. Der Quellvorgang erfolgte bei Raumtemperatur.

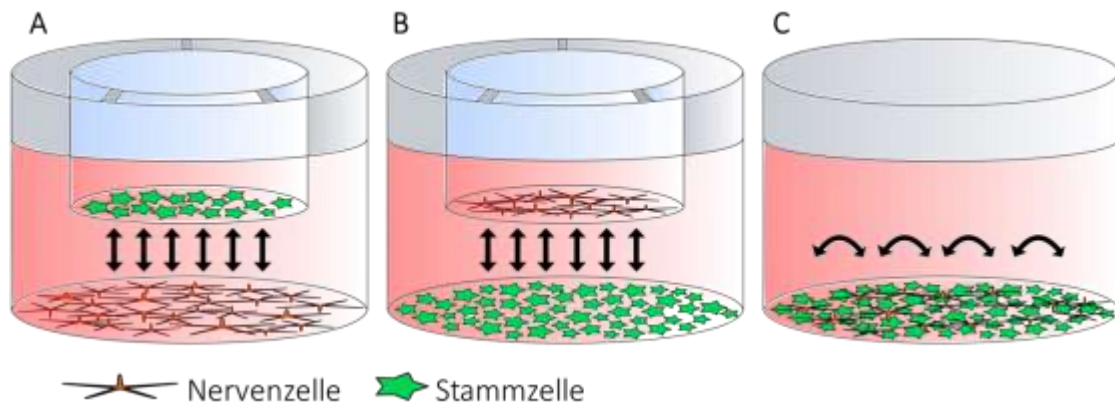
Am Tag der Besiedlung wurden speziell angefertigte Ringe eingesetzt um die Gele auf dem Wellboden zu fixieren. Vor der Aussaat wurden hSGSCs wie beschrieben kultiviert (siehe oben). Nach dem enzymatischen Ablösen der Zellen durch Trypsin wurden sie in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> direkt auf die Gel-Schieben ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### III.3.4. Besiedlung von NeuraGen<sup>®</sup> Nervenleitschienen mit hSGSCs

NeuraGen<sup>®</sup> Nervenleitschienen wurden für die luminale Füllung mit Fibrin in trockenem Zustand verwendet. Auf diese Weise wurde die Handhabung erleichtert. Fibrinogen wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMEM / 10 % FKS angesetzt und die Lösung durch einen 0.45 µm Filter steril filtriert. Zu einer Suspension aus hSGSCs ( $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml) in DMEM / 10 % FKS wurde 1 µl/ml Thrombin (1 U/µl) gegeben. Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, unmittelbar mit einer Pipette in die Nervenleitschiene gespritzt und in der Waagerechten aushärten gelassen. Die Inkubation erfolgte in DMEM / 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für weitere Analysen wurde die Nervenleitschiene in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet, bei -80 °C gelagert und Kryoschnitte in einer Dicke von 8 µm angefertigt. Die Fixierung und Färbung dieser Schnitte erfolgte auf Objektträgern mit Methanol/Aceton (7:3) und 0,1 % DAPI für 5 min bei Raumtemperatur.

### III.3.5. Ko-Kultur Systeme

Die Abbildung 9 stellt die verwendeten Ko-Kultur Systeme mit DRG Neuronen und hSGSCs dar. Zur Analyse von DRG Neuronen wurden diese auf PLL- und Laminin-beschichteten Deckgläsern in den Vertiefungen einer 24-Well Platte kultiviert, während hSGSCs im entsprechenden Insert kultiviert wurden (Abb. 9A). Diese Ko-Kultivierung erfolgte für 24 h. Für Differenzierungsanalysen von hSGSCs und auch für Zytokinanalysen der Medienüberstände wurden hSGSCs in Vertiefungen einer 6-Well Platte und DRG Neurone im entsprechenden beschichteten Insert für 48 h kultiviert (Abb. 9B). Direkte Ko-Kulturen erfolgten für bis zu vier Tage auf Deckgläsern oder in 4-Well Chamberslides (Abb. 9C).



**Abbildung 9: Ko-Kultur Systeme**

Die verschiedenen Ko-Kultur Systeme, die für Versuchsvorhaben eingesetzt wurden, sind schematisch dargestellt. In der indirekten Ko-Kultur wurden entweder die Nervenzellen auf beschichteten Deckgläsern auf den Wellboden und die Stammzellen in entsprechenden Inserts kultiviert (A) oder die Stammzellen direkt auf dem Wellboden und die Nervenzellen in Inserts (B). In der direkten Ko-Kultur wurden die Stammzellen auf den Wellboden ausgebracht und die Nervenzellen nach 24 h auf den angewachsenen *Feeder-Layer* aus Stammzellen ausgesät. Schwarze Pfeile stehen für den parakrinen Stoffaustausch. Die Porengröße der Inserts betrug 0,4  $\mu\text{m}$ .

Als Medium für Ko-Kulturen mit hSGSCs und DRG Neuronen wurde eine 1:1 Mischung aus DMEM (ohne FKS) und Neurobasal A für Ko-Kulturen mit adulten DRG Neuronen bzw. Neurobasal für Ko-Kulturen mit pränatalen DRG Neuronen verwendet. Die Menge Penicillin/Streptomycin wurde auf das Gesamtvolumen angepasst. Die Zusammensetzung der Ko-Kultur Medien ist in III.1.8 zusammengefasst.

Einen Tag vor Beginn der Ko-Kultivierung wurden hSGSCs mit einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 24-Wellplatten oder in Inserts ausgebracht. Die Kultivierung erfolgte zunächst in DMEM / 10 % FKS.

DRG Neurone wurden unmittelbar vor der Ko-Kultivierung isoliert, direkt auf beschichtete Inserts oder Deckgläser ausgebracht und mit hSGSCs in Ko-Kultur gebracht. Vor dem Umsetzen in Ko-Kultur wurden hSGSCs mit PBS gewaschen. Die Ko-Kultivierung erfolgte von Beginn an in den Ko-Kultur Medien. Während einer indirekten Ko-Kultur für 24 h oder für 48 h erfolgte kein Medienwechsel. Bei direkten Ko-Kulturen wurde alle ein bis zwei Tage ein Wechsel von 50 % des Mediums durchgeführt.

Bei Beendigung der Ko-Kultur wurden die Überstände paralleler Ansätze vereint und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin enzymatisch abgelöst und als Zellpellet bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### III.3.6. MTT-Test

Die metabolische Aktivität von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurde mithilfe des MTT-Tests bestimmt. Der wasserlösliche, gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) wird von metabolisch aktiven Zellen zu wasserunlöslichem, blau-violetter, Formazan reduziert. Die entstandene Menge an Formazan dient als Maß für die Stoffwechselaktivität und steht in Korrelation mit der Zellvitalität. Die Zellen, für den MTT-Test im 24-Well Format kultiviert, wurden mit PBS gewaschen und mit 350 µl MTT-Lösung (1:10 in DMEM / 10 % FKS) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 300 µl DMSO für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert und das Formazan gelöst. Die Zellen wurden einige Male leicht gespült, die blau-violette Lösung in Reaktionsgefäße überführt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Quantifizierung durch Messung der Extinktion bei 540 nm Wellenlänge im Spektrometer. Die Messung erfolgte in Triplikaten und als Kontrolle und Nullwert diente reines DMSO. Die Belichtungszeit des Spektrometers Mithras LB 940 betrug 5 s, die Lampenenergie 20.000 Einheiten (interne Skala bezogen auf die Watt-Zahl).

### III.3.7. FDA-PI-Färbung von hSGSCs und DRG Neuronen

Zellvitalität und Zellmorphologie von hSGSCs und DRG Neuronen auf verschiedenen Wachstumsoberflächen wurden mit der FDA-PI-Färbung analysiert. Es handelt sich um eine einfach und schnell durchzuführende Lebend-Tot-Färbung mit wenigen Waschschritten und somit wenig Scherstress. Das nicht fluoreszierende Fluorescein-Diacetat durchdringt die Zellmembran und wird in vitalen Zellen von Esterasen zu grün fluoreszierendem Fluorescein gespalten. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist die zytoplasmatische, grüne Fluoreszenz ein Indikator für Zellvitalität und zudem kann die Zellmorphologie beurteilt werden. Propidiumiodid (PI) kann die Zellmembran intakter Zellen nicht durchdringen, durch Membranen toter Zellen kann PI allerdings den Zellkern erreichen und in die DNA interkalieren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können tote Zellen durch rote Fluoreszenz identifiziert werden.

Sowohl zur Färbung von hSGSCs als auch von DRG Neuronen wurde einmal mit DMEM gewaschen und so viel FDA-PI-Lösung hinzugegeben, dass der komplette Zellrasen bedeckt war. Nach einer Minute wurde die Lösung abgenommen und die Probe unmittelbar unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zur Beurteilung von Zellen, die auf dem Wellboden

kultiviert wurden, konnten 4-Well Chamber Slides direkt vor der Mikroskopie auseinandergebaut und mit einem Deckglas und Vectashield® eingedeckt werden. Für auf Inserts kultivierte Zellen wurden die Insert-Membranen mit einem Skalpell ausgeschnitten, auf Objektträger gelegt und mit einem Deckglas eingedeckt.

### **III.3.8. FDA-Färbung und DAPI-Färbung von hSGSCs auf Hydrogel-Scheiben**

Zur Darstellung von hSGSCs, die auf Hydrogel-Scheiben kultiviert wurden, erfolgte eine FDA-Färbung oder eine DAPI-Färbung. Für die Färbungen waren die Hydrogel-Scheiben mit den für die Kultivierung verwendeten Fixierungs-Ringen beschwert.

Für die FDA-Färbung wurden die Zellen zunächst mit DMEM gewaschen und anschließend mit 500 µl FDA-Lösung pro Gel für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Der Fixierungs-Ring wurde entfernt, das Gel mit einem Spatel aus der Vertiefung der Wellplatte gehoben und auf einem Objektträger platziert. Das Gel wurde mit einem Deckglas abgedeckt und unmittelbar mikroskopiert.

Für die DAPI-Färbung erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS eine Fixierung der Zellen mit 500 µl PFA-Fixierlösung pro Gel für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl Triton-X-DAPI-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Gele identisch zur Vorgehensweise bei der FDA-Färbung aus den Vertiefungen gehoben und auf einem Objektträger mit Deckglas mikroskopiert. Die Mikroskopie erfolgte am Fluoreszenzmikroskop AxioObserver Z.1 oder am Laser Scanning Mikroskop LSM 710 unter Verwendung der Z-Stapel Funktion. Die Schichtdicke wurde je nach Probenbeschaffenheit individuell eingestellt.

## **III.4. Molekularbiologische Analysen**

### **III.4.1. RNA-Isolation**

Zur Charakterisierung des Genexpressionslevels von hSGSCs unter verschiedenen Zellkulturbedingungen wurde zunächst die RNA isoliert. Von Experimenten in 6-Well Platten, wie beispielsweise Ko-Kultur-Experimenten, wurden Zellen aller gleich behandelten Ansätze für die RNA-Isolation vereint. Für die automatisierte RNA-Isolation wurde der Nukleinsäureaufreinigungsroboter QIAcube mit dem RNeasy Plus Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zuvor wurden die Zellen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem

Lysepuffer und mithilfe von Kanülen (Durchmesser 0,9 mm) lysiert. Das Isolationsverfahren beinhaltet die Bindung der RNA an eine Silikat-Gel-Membran und einen Eliminationsschritt für genomische DNA. Die Elution der RNA erfolgte in 30 µl RNase freiem Wasser.

#### III.4.2. Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten mRNA wurden mithilfe des Spektrophotometers *NanoDrop ND-1000* bestimmt. Zur Analyse wurden 2 µl RNA-Lösung unmittelbar nach RNA-Isolation eingesetzt. Die optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, diente zur Bestimmung der RNA-Konzentration. Die zusätzliche Messung der optischen Dichte bei 280 nm Wellenlänge ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ermöglichte die Bildung des Quotienten  $OD_{280} / OD_{260}$ , der ca. 2 betragen sollte und damit auf eine nicht durch Proteine verunreinigte Probe schließen lässt. Die RNA wurde im Anschluss bei -80 °C gelagert.

#### III.4.3. Reverse Transkription

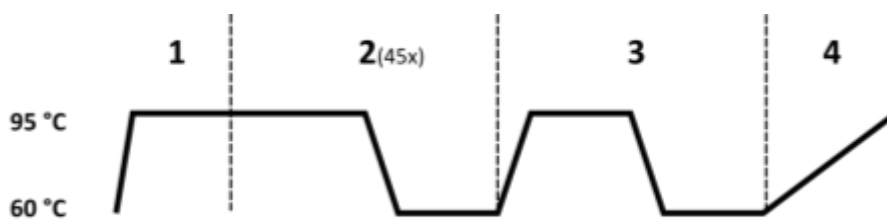
Die isolierte mRNA musste für den Einsatz in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (III.4.4) in komplementäre DNA (*cDNA = complementary DNA*) umgeschrieben werden. Es wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA eingesetzt. Zunächst wurde potentielle genomische DNA mithilfe eines *gDNA-Wipeout*-Puffers für 2 min bei 42 °C eliminiert. Die Probe wurde mit Reverser Transkriptase (RT), einem Primer-Mix inklusive  $Mg^{2+}$  und Desoxyribonukleotidtriphosphaten und RT-Puffer versetzt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 42 °C schreibt die RT die mRNA in cDNA um. Nach Inaktivierung der RT für 3 min bei 95 °C wurde die Probe 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### III.4.4. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde mit der aus mRNA hergestellten cDNA (III.4.3) eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR = *quantitative polymerase chain reaction*) durchgeführt. Die qPCR erlaubt eine direkte Detektion der PCR-Produkte über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der an die neu synthetisierte DNA bindet. Das Signal des angeregten Farbstoffes korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann in Echtzeit dargestellt werden. Die Genexpression wird relativ in Bezug auf das Haushalts-Gen  $\beta$ -Aktin bestimmt. Es wurde das *Quanti Fast SYBR Green PCR Kit* nach Herstellerangaben



verwendet und *QuantiTect Primer Assays*, eine vorgefertigte Mischung aus Vorwärts- und Rückwärts-Primern, eingesetzt. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmungen im 96-Well Format mit einem Gesamtvolumen von jeweils 25 µl (10 µl cDNA, 12.5 µl *Quanti Fast SYBR Green PCR Master Mix*, 2.5 µl Primer Mix) durchgeführt. Zu jedem Ansatz wurde eine Negativkontrolle mit Wasser statt cDNA in Doppelbestimmung angesetzt um Kontaminationen oder die Bildung von Primerdimeren zu detektieren. Im *Mastercycler Realplex<sup>2</sup>* wurde das folgende Temperaturprogramm durchlaufen (Abb. 10):



1) 5 min bei 95 °C:	Aktivierung der <i>Hotstart-Polymerase</i>
2) 45x (10 sek bei 95 °C + 30 sek bei 60 °C)	Zweischritt-Amplifikationszyklen: Aufschmelzen der Doppelstränge (95 °C) + Anlagerung der Primer und DNA-Synthese (60 °C) Nach jedem Zyklus wird der Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen
3) 15 sek bei 95 °C + 15 sek bei 60 °C	Finaler Amplifikationsschritt
4) 60 °C → 95 °C in 20 min	Schmelzkurvenanalyse Die doppelsträngige DNA jedes Produktes denaturiert je nach Länge und Basenzusammensetzung bei spezifischen Schmelztemperaturen. Das erlaubt den Nachweis unspezifisch amplifizierter Produkte.

Abbildung 10: Temperaturprogramm für die qPCR

Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe des CalQplex-Algorithmus (Realplex 2.2), welcher den Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert = *Cycle Threshold*) mithilfe der 2. Ableitung für jede Amplifikationskurve berechnet. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der Mittelwert der Ct-Werte von Doppelansätzen wurde auf die endogene Kontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert.

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

Das relative Expressionslevel R jedes Zielgens im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin konnte berechnet werden.

$$R = 2^{-\Delta Ct}$$

Zum Vergleich des Expressionslevels von Zielgenen in einer behandelten Probe und in einer Kontrolle wurde eine Normierung auf die Kontrolle durchgeführt.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Das relative Expressionslevel der Zielgene konnte nun wie folgt berechnet werden.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### III.5. Proteinbiochemische Analysen

#### III.5.1. Immunzytochemie

Von Zellen produzierte Proteine wurden mit der indirekten Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Spezielle Fluorophor-markierte Sekundärantikörper binden an unmarkierte Primärantikörper, welche gegen ihr spezifisches zelluläres Epitop gerichtet sind.

Die zu färbenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit PFA-Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung und Kernfärbung mit Triton-X-DAPI-Lösung für 10 min bei RT, gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen mit PBS. Nach der Inkubation mit 1,65 % (v/v) Ziegennormalserum für 20 min bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die spezifischen Primärantikörper, entsprechend Tabelle 2 (III.1.7) in TBST + 0,1 % BSA verdünnt, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf dreimaliges Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit entsprechenden Sekundärantikörpern, die gegen die Herkunftsspezies des Primärantikörpers gerichtet waren und entsprechend Tabelle 3 (III.1.7) mit PBS verdünnt wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen eingedeckt. Bei Färbungen, die auf Deckgläsern erfolgten, wurden diese umgekehrt auf einen Tropfen

Vectashield® gelegt. Chamber Slides wurden mit entsprechenden Deckgläsern und einigen Tropfen Vectashield® eingedeckt. Die Analyse der immunzytochemisch gefärbten Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver Z.1 oder Axioskop2 mot plus). Die Belichtungszeit wurde bei Aufnahmen, die miteinander verglichen werden sollten, identisch gehalten.

### III.5.2. Membranbasierte Zytokin-Arrays

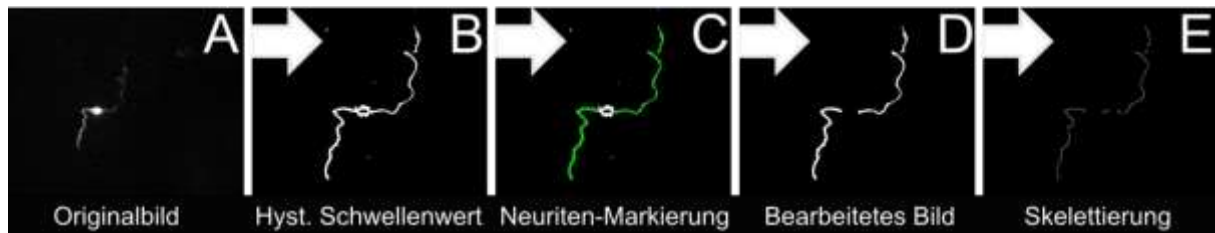
Die Zytokine, die von Zellen in Kultur produziert und ins Zellkulturmedium abgegeben werden, wurden mithilfe eines Zytokin-Arrays untersucht. Die Zytokin-Arrays „*Proteome Profiler – Human Cytokine Array Panel A*“ und „*Proteome Profiler Human XL Cytokine Array*“ (R&D Systems) sind membranbasierte Arrays zur Detektion von 36 bzw. 102 verschiedenen Zielproteinen. Zytokin-spezifische Antikörper sind als Dupletts auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert (Liste der Zytokine: Anhang VII.4.2) und die im Zellkulturmedium vorliegenden Zytokine werden mit einem ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - ähnlichen Verfahren nachgewiesen.

Für alle durchgeführten Zytokin-Arrays wurden die Zellkulturüberstände nach zweitägiger Kultur bzw. Ko-Kultur abgenommen, 5 min bei 180 g zentrifugiert und die Überstände bei -80 °C bis zur Verwendung gesichert. Als Negativkontrolle für alle Arrays wurde Zellkulturmedium ebenfalls für zwei Tage kultiviert und bei -80 °C gelagert.

Die Zellkulturüberstände wurden mit biotinylierten Detektionsantikörpern versetzt und anschließend über Nacht unter Rotation bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase, wobei sich Biotin-Streptavidin-Komplexe bildeten und somit die an die Membran gebundenen Zytokine mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt wurden. Durch eine Chemilumineszenzreaktion, durch die Meerrettichperoxidase katalysiert, wurde Licht freigesetzt und die Zytokine wurden in Form von Spots mithilfe eines Chemilumineszenz-Detektors sichtbar gemacht. Die Expositionszeit wurde anhand einer der Membranen (Kontrollmembran = hSGSCs + D<sup>+</sup>) automatisch ermittelt und für alle zu vergleichenden Membranen identisch eingestellt. Zur Auswertung wurden die Spot-Intensitäten der Kontrollen (Medien ohne Zellen) von den jeweiligen Spot-Intensitäten der zu testenden Ansätze abgezogen. Die Angabe der Daten erfolgte als prozentualer Wert im Verhältnis zu den internen Positiv-Kontrollspots.

### III.5.3. Neuriten-Auswuchs Analyse

Für Ko-Kultur-Experimente, bei denen DRG-Neurone auf beschichteten Deckgläsern in 24-Well Platten und hSGSCs in Inserts kultiviert wurden (IV.3), wurde eine spezielle Methodik benötigt, mit welcher der parakrine Einfluss von hSGSCs auf das Auswachsen von Neuriten analysiert und quantifiziert werden konnte. Dazu wurden die auf Deckgläsern angewachsenen Zellen zunächst immunzytochemisch gefärbt (III.5.1) und nach mikroskopischer Dokumentation wurde mithilfe des VesSeg Tool V0.1.4 die Neuriten-Gesamtlänge quantifiziert. Diese Software wurde an der Universität zu Lübeck ursprünglich für die Gefäßsegmentierung und -analyse entwickelt und ermöglicht die Darstellung sehr dünner Strukturen. Als Ausgangsbild diente eine Immunfluoreszenzaufnahme Neurofilament-gefärbter Neurone. Von dieser wurde zunächst zur besseren Darstellung eine verkleinerte rechteckige Sektion ausgeschnitten, auf der sich das zu analysierende Neuron mit allen Neuriten befand (Abb. 11A). Es wurden nur Neurone zur Analyse verwendet, die sich in ihrer Gesamtheit in einen Bildausschnitt in 20x Vergrößerung einpassten. Die Bilder wurden in binäre Bilder umgewandelt und zunächst ein Hysteresis-Schwellenwert-Algorithmus angewendet (Abb. 11B). Durch diesen Algorithmus wurden alle Pixel oberhalb eines Schwellenwertes weiß dargestellt, alles andere schwarz. Für die garantierte Sichtbarkeit aller Neuriten, die aufgrund ihrer Feinheit teilweise schwer zu erkennen waren, wurden die Einstellungen zur Hintergrund-Abdeckung (*Background Coverage* = 100 %) und zur Gefäß-Abdeckung (*Vessel Coverage* = 1-4 %) festgelegt. In dem neu entstandenen Bild wurden alle Neuriten selektiert und Somata ausgespart (Abb. 11C). Auf dieser Bildauswahl (Abb. 11D) wurde ein zweiter Algorithmus zum Skelettieren der Neuriten angewendet. Das resultierende Bild bestand aus einzelnen aneinandergereihten Pixeln (Abb. 11E) und ermöglichte eine zuverlässige Quantifizierung der Neuriten-Gesamtlänge. Verfälschende Einflüsse durch Dicke oder Wachstumsrichtung der Neuriten wurden mit dieser Methode verhindert.



**Abbildung 11: Vorgehensweise bei einer Neuriten-Auswuchs-Analyse**

Ein Immunfluoreszenzbild von Neurofilament-gefärbten Neuronen wurde in die Software VesSeg Tool V0.1.4 geladen und in ein binäres Bild konvertiert (A). Auf dieses Bild wurde ein Hysteresis-Schwellenwert-Algorithmus angewendet (B) und auf dem entstandenen Bild Neuriten selektiert und Somata ausgespart (C). Die Neuriten in dem resultierenden Bild (D) wurden mithilfe eines weiteren Algorithmus skelettisiert und es konnte die Neuriten-Gesamtlänge quantifiziert werden.

### III.6. Statistik

Alle statistischen Auswertungen und Balkendarstellungen wurden mit dem Programm Prism 5.04 (GraphPad) durchgeführt. Für die grafische Darstellung von Daten wurde der Mittelwert aus drei Stichproben und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *Standard Error of the Mean*) verwendet. Die statistische Auswertung für drei und mehr zu vergleichende Gruppen erfolgte mit dem 1-Way ANOVA (*analysis of variance*) (Konfidenzintervall: 95 % und Dunnett Post-Test), für zwei zu vergleichende Gruppen mit dem t-Test nach Student (ungepaart, doppelseitig, Konfidenzintervall: 95 %).

## IV. Ergebnisse

### IV.1. Etablierung peripherer Neurokulturen aus adulten und pränatalen Ratten

Als *in vitro* Model für die periphere Nervenregeneration wurden in dieser Arbeit periphere Nervenzellen aus adulten und pränatalen Ratten verwendet. Mit den Nervenzellen wurden Ko-Kultur Experimente durchgeführt um den Einfluss von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen auf das Auswachsen neuer Neuriten aus den Nervenzellen zu untersuchen.

Die Methodik zur Präparation, Isolation und Kultivierung von adulten und pränatalen DRG Neuronen wurde experimentell etabliert. Zunächst wurde die Methodik an adulten Ratten erlernt und optimiert. Die Präparation an 200-300 g schweren Tieren, die durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet wurden, erwies sich als reproduzierbar und erbrachte bei Öffnung des Wirbelkanals vom thorakalen bis zum lumbalen Bereich eine Ausbeute von etwa 12 gut erreichbaren und abtrennbaren DRG. Die Ganglien stellten sich als deutliche Schwellungen der Spinalnerven dar und es konnte beobachtet werden, dass die Ganglien L4 und L5 größer als die anderen Ganglien waren (Hall, 2006).

Die Präparation von pränatalen DRG wurde für einige Versuche zunächst aus E16-E18 Ratten durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Auftrennung der Wirbelsäule zur Freilegung der DRG bei E16 Ratten deutlich einfacher und schneller durchführen ließ als bei E18 Ratten. Für spätere Versuche wurden daher E16 Ratten verwendet. Aus einer pränatalen Ratte ließen sich etwa 30-40 DRG präparieren.

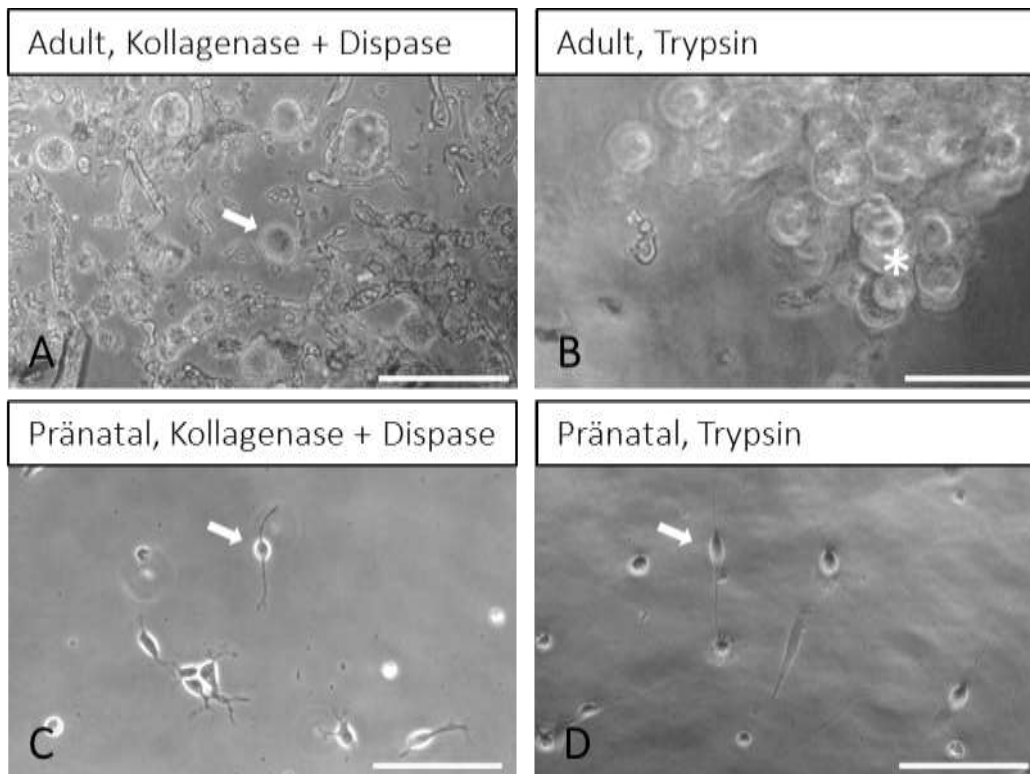
Eine komplette Präparation von adulten DRG benötigte bis zur Zellaussaat etwa 1,5-2,0 Stunden. Für die Präparation von pränatalen DRG wurden bis zur Zellaussaat je nach Anzahl der zu präparierenden pränatalen Tiere 4-5 Stunden benötigt. Die Zellausbeute war aufgrund der höheren Anzahl isolierter DRG bei pränatalen Ratten stets größer.

#### IV.1.1. Optimierung der Isolation peripherer Neurone aus adulten und pränatalen Ratten

Für die Isolation von Nervenzellen aus Ganglien existieren mehrere veröffentlichte Protokolle (Hall, 2006; Kingham et al., 2011; Lindsay et al., 1991). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Ganglien enzymatisch zu verdauen um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Es können Kollagenase, Dispase und Trypsin bzw. Kombinationen aus den drei Enzymen als Verdauenzyme verwendet werden. In Anlehnung an das Zellisolutionsprotokoll von Hall (Hall, 2006) und an ein Protokoll, das in der Fraunhofer EMB standardmäßig für die Isolation von Schweißdrüsen aus der Vollhaut eingesetzt wird (Nagel et al., 2013), wurde ein Isolationsmedium getestet, das Kollagenase und Dispase enthält. Parallel dazu wurde ein Verdau der Ganglien mit Trypsin-Lösung durchgeführt, die standardmäßig für die Ablösung von Zellen bei der Subkultivierung eingesetzt wird.

Der Vergleich der beiden Isolationsmedien ergab für adulte DRG Unterschiede. Adulte DRG ließen sich durch das Kollagenase-Dispase-Isolationsmedium gut zu einer Einzelzellsuspension verdauen (Abb. 12A, Einzelzelle exemplarisch durch einen Pfeil markiert). Mit Trypsin-Lösung hingegen wurden die Zellaggregate nicht vollständig verdaut, es verblieben viele große Zellaggregate in der Probe (Abb. 12B, Zellaggregat exemplarisch durch einen Stern markiert). Für Versuchsvorhaben mit adulten DRG Neuronen wurde daher stets mit Kollagenase und Dispase verdaut.

Für pränatale DRG ergab der Vergleich der Isolationsmedien keine Unterschiede. Sowohl Trypsin-Lösung als auch Kollagenase-Dispase-Isolationsmedium führten zu einer Einzelzellsuspension ohne Zellaggregate (Abb. 12C+D, Einzelzellen exemplarisch durch einen Pfeil markiert). Zur Beschleunigung des Präparationsablaufes wurde für alle Versuchsvorhaben mit pränatalen DRG Neuronen mit Trypsin-Lösung verdaut.



**Abbildung 12: Testung von Isolationsmedien für den Verdau von DRG aus der Ratte**

Beim Verdau von adulten DRG wurde mit einem Kollagenase (1 mg/ml) und Dispase (2 mg/ml) haltigem Isolationsmedium eine Suspension aus einzelnen Zellen erzielt (A). Nach dem Verdau adulter DRG mit Trypsin (0,05 %) verblieben große Zellaggregate (B). Für pränatale DRG ergab der Verdau mit Kollagenase und Dispase bzw. Trypsin keinen erkennbaren Unterschied. In beiden Fällen konnte eine Einzelzellsuspension erzeugt werden (C+D). Die Aufnahmen wurden innerhalb von vier Stunden nach der Isolation gemacht. Pränatale DRG Neurone begannen zu diesem Zeitpunkt schon zu adhären. → = Einzelzellen, \* = Zellaggregat, Maßstab: 100 µm

Ebenfalls in Anlehnung an ein in der Fraunhofer EMB etabliertes Isolationsprotokoll für Zellen aus diversen Organen verschiedener Spezies (Kruse et al., 2004) wurde eine Kombination aus enzymatischem und mechanischem Verdau durchgeführt. Während der Isolation sedimentierten Zellen und Gewebe stets in dem Reaktionsgefäß und die Ergänzung der mechanischen Zerkleinerung während des Isolationsprozesses führte zu einer guten Durchmischung (Abb 13).

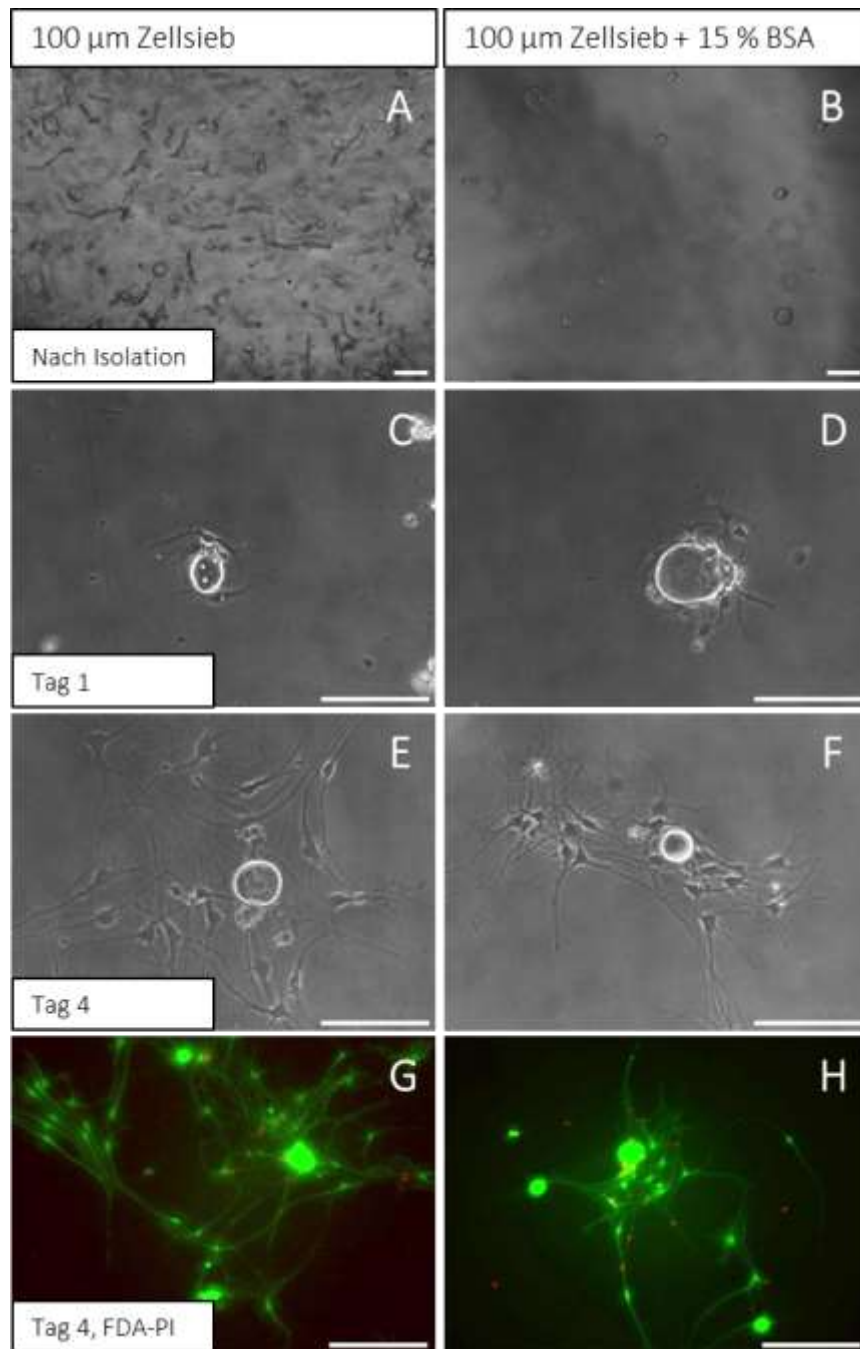




**Abbildung 13: Mechanische Zerkleinerung als Teilschritt des Isolationsprotokolls**

Während der Isolation von adulten und pränatalen Neuronen aus Spinalganglien wurde zusätzlich zur enzymatischen eine mechanische Zerkleinerung mit einer sterilen Schere durchgeführt. Das entstandene Sediment konnte dadurch gut durchmischt werden und die Enzymwirkung sollte somit verbessert werden.

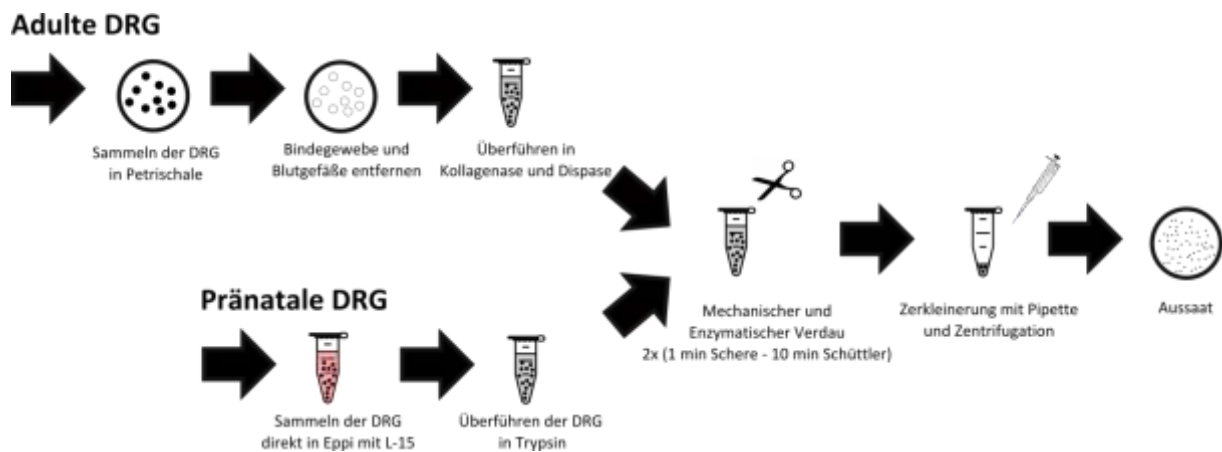
Die fertige Zellsuspension aus frisch isolierten adulten DRG Neuronen war stark durch Myelinreste verunreinigt (siehe Abb. 12A und 14A). Die schmalen Strukturen ließen sich durch das verwendete 100  $\mu\text{m}$  Zellsieb nicht aufhalten. Es wurde versucht mithilfe eines 15 % BSA-Filters eine aufgereinigte Zellsuspension zu erhalten. Mit dieser Methode konnte das im Verhältnis zu den Zellen leichtere Myelin herausgesiebt werden und das resultierende Zellpellet konnte zu einer deutlich reineren Zellsuspension resuspendiert werden (Abb. 14B). Allerdings befanden sich nach der Aufreinigung mit BSA deutlich weniger Zellen im Pellet, was ein direkter Vergleich ungefilterter und BSA-gelilterter Zellen zeigt (Abb. 14A+B). Nach einem Tag akkumulierte das Myelin in der verunreinigten Probe jedoch und ließ sich gut durch einen Wechsel von 50 % des Mediums entfernen, sodass sich am Tag nach der Isolation keine Unterschiede bei der Beobachtung von Einzelzellen ergaben. Auch in Zellmorphologie, Neuritenauswachsen und Vitalität, nachgewiesen mit einer FDA-PI Färbung, (Abb. 14C-H) waren keine Unterschiede erkennbar. Da sich Myelinreste wie auch vorhandene Kontaminationszellen wie Schwanzzellen und Fibroblasten in der authentischen Situation einer Nervenläsion befinden und somit keinen eigentlichen Störfaktor darstellen, wurde zugunsten der Zellausbeute für alle Versuchsvorhaben kein zusätzlicher BSA-Filter verwendet.



**Abbildung 14: Ein BSA-Filter konnte zur Aufreinigung von adulten DRG Neuronen genutzt werden**

Unmittelbar nach der Zellisolation aus adulten DRG war die Zellsuspension stark durch Myelinreste verunreinigt. Ein 100 µm Zellsieb filterte diese nicht komplett heraus (A). Ein BSA-Filter reduzierte die Myelinreste, verminderte aber auch die Zellausbeute (B). Nach einem (C+D) und vier (E+F) Tagen zeigte sich keine Veränderung in Zellmorphologie und Neuritenauswachsen. Auch die Zellvitalität, nachgewiesen mithilfe einer FDA-PI Färbung, unterschied sich nicht. Maßstab: 100 µm

Das folgende Schema stellt zusammenfassend das etablierte Vorgehen zur Isolation von adulten und pränatalen DRG Neuronen dar (Abb. 15).



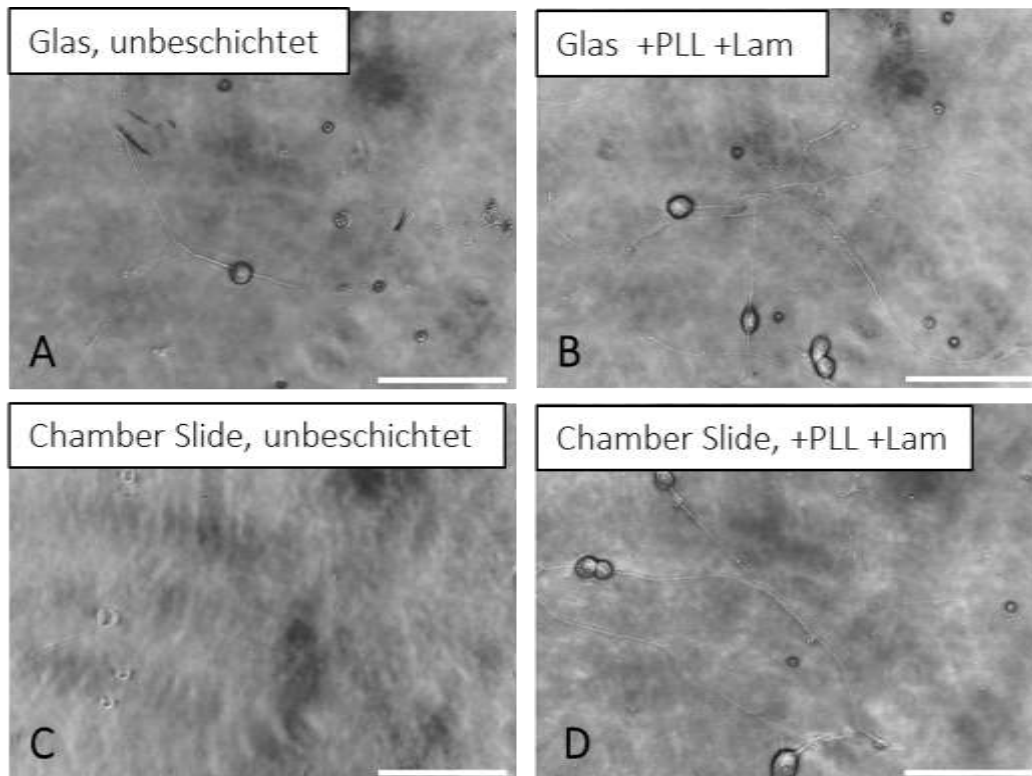
**Abbildung 15: Schema zur optimierten Isolation von adulten und pränatalen DRG Neuronen**

Nach der Präparation wurden adulte DRG in einer Petrischale mit PBS auf Eis gesammelt und mit Skalpell und Mikropinzetten von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit. Die gereinigten DRG wurden in Kollagenase-Dispase-Isolationsmedium überführt. Pränatale DRG wurden nach der Präparation in einem Reaktionsgefäß in L-15 Medium auf Eis gesammelt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Medium entfernt und Trypsin-Lösung hinzugegeben. Adulte und pränatale DRG wurden anschließend eine Minute mit einer Schere mechanisch zerkleinert und 10 min bei 37 °C unter Schütteln (150 Zyklen / min) inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Mit einer 1000 µl Pipette wurde die Zellsuspension 50 mal auf und ab pipettiert, bei 180 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in der jeweils gewünschten Menge Medium resuspendiert und ausgesät.

#### IV.1.2. Optimierung der Kultur peripherer DRG Neurone aus adulten und pränatalen Ratten

Periphere DRG Neurone benötigen wie viele andere Primärzellen bestimmte Oberflächenmoleküle zum Anhaften an die Kulturschale. Empfohlen wird unter anderem eine Doppelbeschichtung aus Poly-L-Lysin, ein positiv geladenes Aminosäure-Polymer, und Laminin, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (Hall, 2006). Diese Doppelbeschichtung wurde zur Sicherstellung reproduzierbarer Ergebnisse für Deckgläser und Chamber Slides jeweils im Vergleich zu nicht beschichteten Materialien getestet und ist für pränatale DRG Neurone in Abbildung 16 dargestellt. Auf unbeschichtetem Glas oder Chamber Slides hafteten nur sehr wenige Zellen und wenige Neuriten waren erkennbar (Abb. 16A+C). Die

Doppelbeschichtung führte zu verbesserter Anhaftung der Zellen und zum Auswachsen von Neuriten (Abb. 16B+D). Zwischen beschichtetem Glas und beschichteten Chamber Slides konnte kein Unterschied verzeichnet werden und beide beschichteten Zellkulturoberflächen wurden für weitere Versuchsvorhaben eingesetzt. Die Vorgehensweise bei der Doppelbeschichtung mit Poly-L-Lysin und Laminin erfolgte nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich, siehe III.3.1).



**Abbildung 16: Zellkulturbeschichtungen mit Poly-L-Lysin und Laminin eigneten sich zur Kultivierung von DRG Neuronen**

Pränatale DRG Neurone hafteten nur schlecht auf unbeschichteten Deckgläsern und Chamber Slides, Neuriten wuchsen nur wenig aus (A+C). Mit Poly-L-Lysin (PLL, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Laminin (Lam, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet, hafteten deutlich mehr Zellen an der Oberfläche und es wurde stärkeres Auswachsen von Neuriten beobachtet (B+D). Zwischen beschichteten Deckgläsern und beschichteten Chamber Slides wurde kein Unterschied beobachtet. Teile dieser Abbildung wurden im Rahmen eines Studentenpraktikums von Tanja Lüneburg angefertigt. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

#### IV.2. Etablierung von Ko-Kultur Systemen

Periphere Nervenzellen sollten in den folgenden Versuchen mit humanen Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen ko-kultiviert werden um einen Effekt der beiden Zelltypen aufeinander zu untersuchen. Die Ko-Kultur Systeme wurden neu etabliert und es war

zunächst eine Analyse der Zellen in veränderten Zellkulturmedien und auf neuen Wachstumsoberflächen nötig. Das Ziel war, eine Basis für alle weiterführenden Versuche zu legen.

#### IV.2.1. Das Medium als Grundlage für Ko-Kulturen

In einer Ko-Kultur von zwei verschiedenen Zelltypen muss ein Kulturmedium gewählt werden, welches für beide möglichst geeignete Eigenschaften bietet. Das Standard-Zellkulturmedium für hSGSCs ist DMEM / 10 % FKS und für DRG Neurone wurde Neurobasal inklusive Zusätze (L-Glutamin, NGF und der Serumersatz B-27) verwendet. Voraussetzung für diese Arbeit war allerdings eine Kultivierung in serumfreiem Medium um Zytokinanalysen zu ermöglichen. Für die Ko-Kulturen wurden daher verschiedene Zusammensetzungen aus DMEM pur und Neurobasal A (inklusive Zusätze) getestet und sowohl metabolische Aktivität als auch Zellmorphologie der hSGSCs beurteilt. Aufgrund der Vielzahl von Medienzusammensetzungen, die auch in weiteren Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, wird die in Tabelle 4 beschriebene vereinfachte Namensgebung verwendet. DMEM mit 10 % FKS wird als D<sup>+</sup> bezeichnet, DMEM ohne FKS oder Serumersatz als D<sup>-</sup>. Neurobasal bzw. Neurobasal A mit Zusätzen (III.1.8) wird als N<sup>+</sup> bezeichnet, ohne Zusätze wird es als N<sup>-</sup> benannt. Kombinationen aus mehreren Medien werden mit einem „/“ gekennzeichnet.

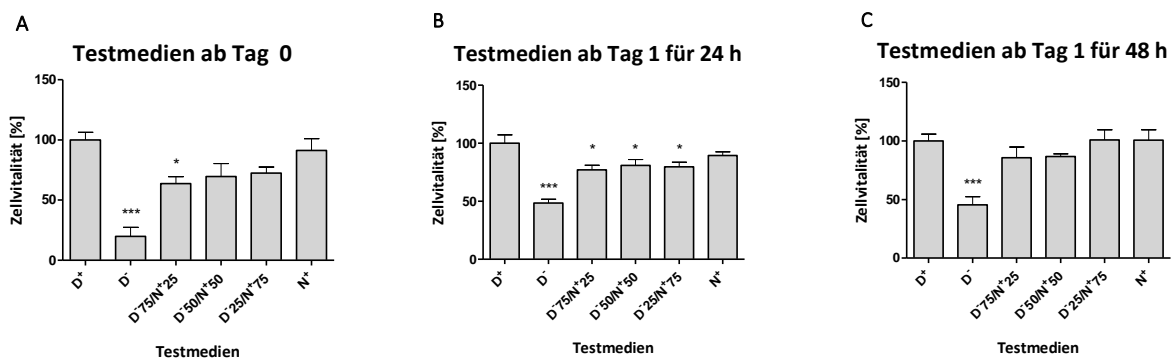
#### Tabelle 4: Bezeichnung der verwendeten Medien und Medienzusammensetzungen

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Medienzusammensetzungen eingesetzt. Zur vereinfachten Darstellung und Wiedererkennung wurden die aufgeführten Bezeichnungen verwendet. Alle Medien enthielten zusätzlich Penicillin und Streptomycin.

Bezeichnung	Medium
D <sup>+</sup>	DMEM inkl. 10 % FKS, Standard-Zellkulturmedium
D <sup>-</sup>	DMEM pur
N <sup>+</sup>	Neurobasal inkl. Zusätze (L-Glutamin, B-27, NGF), Ko-Kultur Medium
N <sup>-</sup>	Neurobasal pur
D <sup>-</sup> /N <sup>-</sup>	DMEM pur und Neurobasal pur, 1:1
D <sup>-</sup> 75/N <sup>+</sup> 25	75 % D <sup>-</sup> / 25 % N <sup>+</sup>
D <sup>-</sup> 50/N <sup>+</sup> 50	50 % D <sup>-</sup> / 50 % N <sup>+</sup>
D <sup>-</sup> 25/N <sup>+</sup> 75	25 % D <sup>-</sup> / 75 % N <sup>+</sup>

Es wurden verschiedene Szenarien untersucht. Zunächst wurden hSGSCs direkt nach dem Passagieren in den neuen Testmedien ausgebracht, für 24 h kultiviert und anschließend ein MTT-Test durchgeführt (Abb. 17A). Zudem wurden hSGSCs nach dem Passagieren für 24 h in  $D^+$  kultiviert, erst dann in den Testmedien für 24 h oder 48 h weiterkultiviert und schließlich ein MTT-Test durchgeführt (Abb. 17B+C). Die Testmedien waren  $D^+$  als Kontrolle,  $D^-$ ,  $D^- 75/N^+ 25$ ,  $D^- 50/N^+ 50$ ,  $D^- 25/N^+ 75$  und  $N^+$ . Es wurden jeweils hSGSC in drei verschiedenen Passagen untersucht (P12, P15, P17). Es zeigten sich niedrigere Extinktionswerte in Ansätzen, bei denen die Zellen direkt in den Testmedien ausgebracht wurden, was an der kürzeren Gesamt-Inkubationszeit von nur 24 h liegen kann. Auffallend war auch der stärkere negative Einfluss der Testmedien im Vergleich zum Standard-Zellkulturmedium in diesem Ansatz (Abb. 17A).

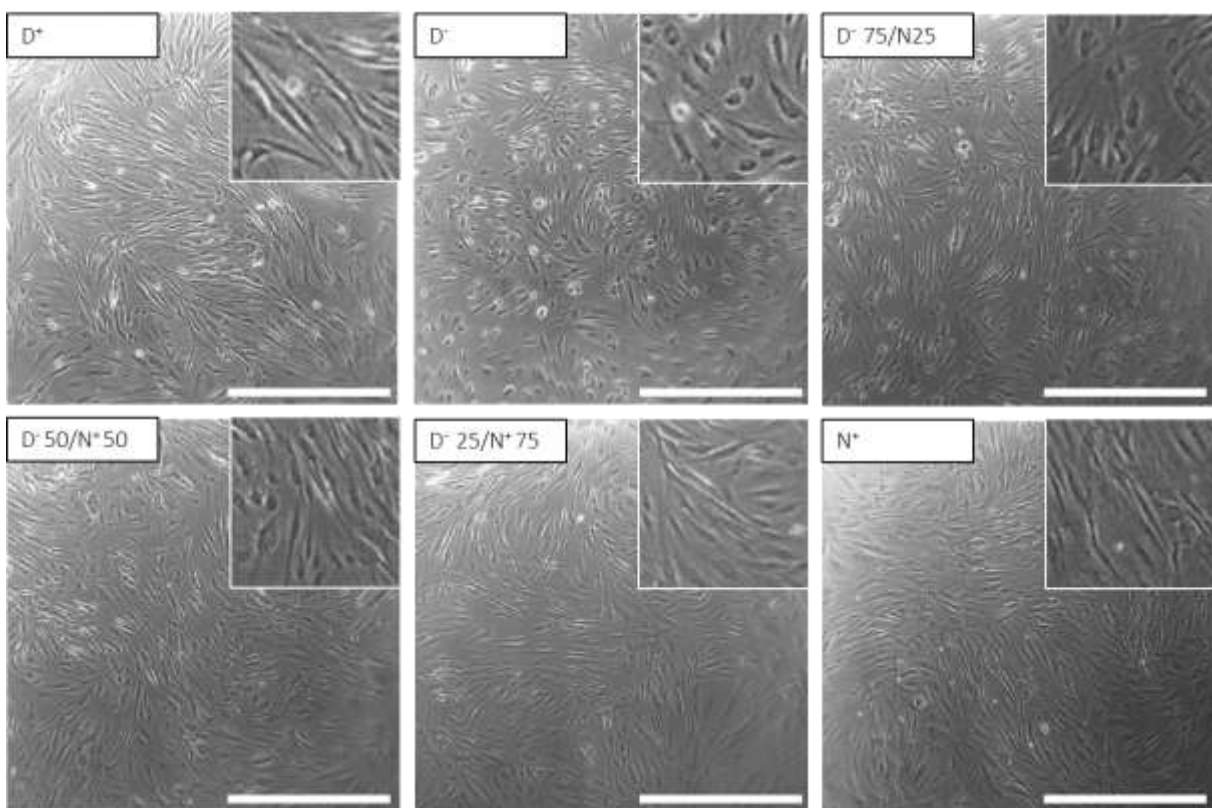
Die beiden anderen Ansätze unterschieden sich nur minimal in der Höhe der Extinktionswerte (Abb. 17B+C), was möglicherweise durch die erreichte Konfluenz begründet ist. Auch der Einfluss der Testmedien auf die metabolische Aktivität war vergleichbar zwischen diesen beiden Ansätzen. Alle Testmedien außer dem komplett serumfreien  $D^-$  zeigten eine zufriedenstellende metabolische Aktivität. Für weitere Ko-Kultur Versuche in dieser Arbeit wurde  $D^- 50/N^+ 50$ , das die Grundmedien beider Zelltypen beinhaltet und im Folgenden verkürzt als  $D^-/N^+$  bezeichnet, als Ko-Kultur Medium verwendet.



**Abbildung 17: Zusammensetzung der Testmedien und Zeitpunkt des Medienwechsels beeinflussten die metabolische Aktivität von hSGSCs**

Die metabolische Aktivität von hSGSCs in verschiedenen Testmedien wurde mittels eines MTT-Tests bestimmt. Zellen wurden nach dem enzymatischen Ablösen durch Trypsin entweder direkt in die Testmedien ausgebracht (A) oder zunächst für 24 h in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) kultiviert und anschließend für 24 h (B) und 48 h (C) in den Testmedien kultiviert. Es wurden drei verschiedene Zellpassagen (P12, P15, P17) verwendet. Die Testmedien waren jeweils  $D^+$  als Kontrolle,  $D^- 75/N^+ 25$ ,  $D^- 50/N^+ 50$ ,  $D^- 25/N^+ 75$  und  $N^+$ . Die Normierung erfolgte auf den Ansatz „ $D^+$ “ und auch die Signifikanz wurde jeweils im Verhältnis zum Ansatz „ $D^+$ “ ermittelt. 1-Way-Anova, Konfidenzintervall: 95 %, Dunnetts Post-Test. Mittelwert  $\pm$  SEM

Die Morphologie, welche die Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Testmedien aufwiesen, wurde mikroskopisch dokumentiert (Abb. 18). Die Aussaat erfolgte in  $D^+$ . Nach 24 h wurden die Zellen für 48 h in den Testmedien weiterkultiviert. In  $D^+$  als Kontrollmedium wiesen die Zellen eine spindelförmige Morphologie mit länglichen Ausläufern auf, genauso wie in den Testmedien  $D^- 50/N^+ 50$ ,  $D^- 25/N^+ 75$  und  $N^+$  (Abb. 18). In  $D^-$  zeigten sich die Zellen abgerundet mit wenigen Ausläufern und auch in  $D^- 75/N^+ 25$  waren einige Zellen mit abgerundeter Morphologie zu finden. Diese Untersuchung legte ebenfalls die Verwendung von  $D^- 50/N^+ 50$  als Ko-Kultur Medium nahe.



**Abbildung 18: Zusammensetzung der Testmedien beeinflusste die Morphologie von hSGSCs**

Die Aussaat der hSGSCs erfolgte in  $D^+$ . Nach 24 h wurden die Zellen in den Testmedien weiterkultiviert und die Morphologie der Zellen nach 48 h mikroskopisch beurteilt. Im Kontrollmedium  $D^+$  sowie in den Testmedien  $D^- 50/N^+ 50$ ,  $D^- 25/N^+ 75$  und  $N^+$  zeigten die Zellen eine spindelförmige Morphologie mit länglichen Ausläufern. In  $D^-$  hatten viele Zellen eine abgerundete Form mit wenigen Ausläufern, in  $D^- 75/N^+ 25$  zeigten einige Zellen dieses Bild. Maßstab = 500  $\mu\text{m}$

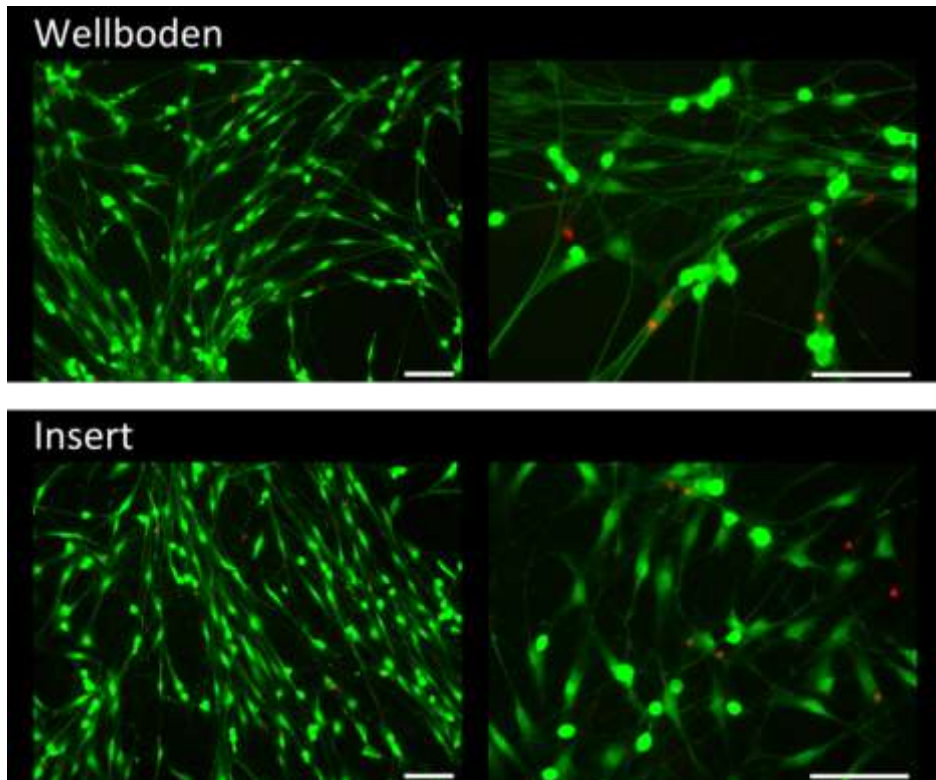
#### IV.2.2. Zellkultur-Inserts als Wachstumsoberfläche für Ko-Kulturen

Die verwendeten Zellkultur-Inserts mit einer Porengröße von 0,4 µm ermöglichen die Kultivierung von zwei verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Kulturgefäßes. Auf diese Weise findet eine räumliche Trennung der Zellpopulationen statt, während ein Austausch löslicher Faktoren durch die Membran der Inserts stattfinden kann.

In verschiedenen indirekten Ko-Kulturen wurden hSGSCs und pränatale DRG Neurone in Inserts kultiviert. Für DRG Neurone wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin und Laminin beschichtet. Es wurde jeweils für beide Zellarten nach 48 h morphologisch untersucht, ob die Kultivierung auf der Oberfläche des Inserts einen Einfluss auf die Zellen hat. Auf dem Wellboden kultivierte Zellen dienten als Kontrolle.

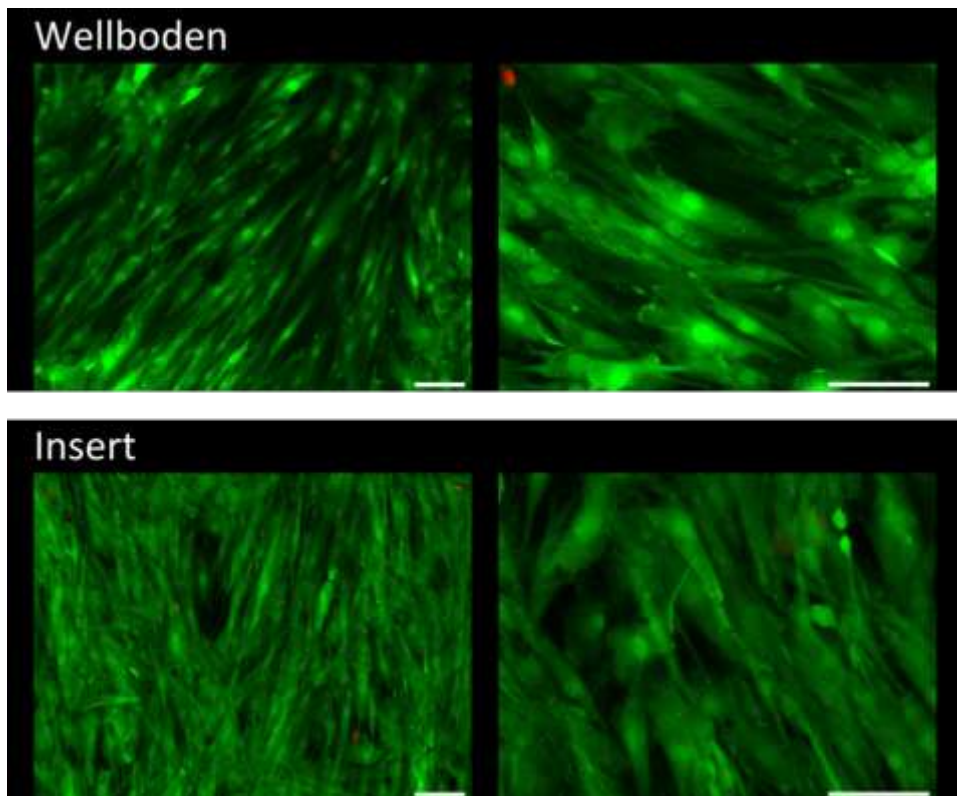
Pränatale DRG Neurone wiesen auf der beschichteten Oberfläche von Wellboden und Insert eine identische Morphologie auf. Sowohl Zelldichte als auch das Auswachsen von Neuriten wurde durch die andere Oberflächenstruktur der Inserts im Vergleich zum Wellboden nicht beeinträchtigt (Abb. 19) Für hSGSCs konnte beobachtet werden, dass die Zelldichte auf Inserts mit ihrer tiefer strukturierten Oberfläche leicht erhöht ist (Abb. 20). Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl für DRG Neurone als auch für hSGSCs Inserts als Wachstumsoberfläche in Ko-Kultur Experimenten eingesetzt werden können.





**Abbildung 19: Die Kultivierung auf Inserts hatte keinen negativen Einfluss auf die Morphologie von DRG Neuronen**

Pränatale DRG Neurone wurden auf Poly-L-Lysin und Laminin beschichteter Oberfläche von Wellboden und Inserts 48 h nach Aussaat auf ihre Morphologie untersucht. Es wurde mit FDA-PI gefärbt um vitale und tote Zellen unterscheiden zu können. Insgesamt waren nur wenige tote Zellen erkennbar, bei denen es sich aufgrund der Größe um Schwannzellen und nicht um Neuronen handelt. Es zeigten sich keine Unterschiede in Zelldichte und Auswachsen von Neuriten. Färbung: FDA-PI, grün: vitale Zellen, rot: tote Zellen, Maßstab = 100 µm



**Abbildung 20: Die Kultivierung auf Inserts hatte keinen negativen Einfluss auf die Morphologie von hSGSCs**

hSGSCs wurden auf der Oberfläche von Wellboden und Inserts 48 h nach Aussaat ( $2 \cdot 10^4$  Z/cm<sup>2</sup>) auf ihre Morphologie untersucht. Es wurde mit FDA-PI gefärbt um vitale und tote Zellen unterscheiden zu können. Insgesamt waren nur vereinzelt tote Zellen erkennbar. Es konnte eine höhere Zelldichte von hSGSCs auf Inserts im Vergleich zum Wellboden beobachtet werden. Färbung: FDA-PI, grün: vitale Zellen, rot: tote Zellen, Maßstab = 100  $\mu$ m

### IV.3. Indirekte Ko-Kulturen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen und peripheren Neuronen

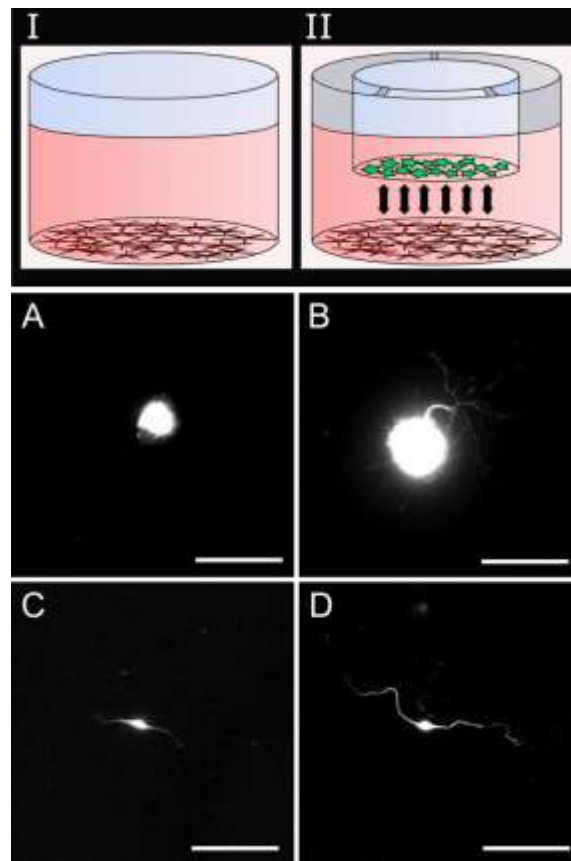
Ko-Kultur Systeme wurden für verschiedene Versuchsvorhaben eingesetzt. In der indirekten Ko-Kultur wurde der Einfluss von hSGSCs auf das Neuriten-Auswachsen von adulten und pränatalen DRG Neuronen untersucht. Der Effekt von Ko-Kultur und Ko-Kultur Medium auf das Differenzierungsverhalten von hSGSCs wurde mittels qPCR analysiert und die Medienüberstände mithilfe von Zytokin-Arrays auf parakrine Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen untersucht.

In den folgenden Experimenten wird für die Zellkultivierung mit dem Ko-Kultur Medium die Kennzeichnung „D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>“ verwendet (vergleiche auch IV.2.1).

#### IV.3.1. Analyse des Auswachsens von Neuriten

In der indirekten Ko-Kultur wurde untersucht, ob hSGSCs einen Effekt auf das Neuriten-Auswachsen von DRG Neuronen haben. In einem Kontrollansatz wurden DRG Neurone ohne Ko-Kultivierung mit hSGSCs auf beschichteten Deckgläsern, im Wellboden platziert, ausgebracht (Schema: Abb. 21.I). Im Ko-Kultur Ansatz wurden DRG Neurone identisch zum Kontrollansatz ausgebracht, zusätzlich wurden im Insert ausgebrachte hSGSCs ko-kultiviert (Schema: Abb. 21.II).

Die Aussaat von hSGSCs in Inserts erfolgte 24 h vor Beginn der Ko-Kultur. Direkt nach Präparation und Isolation der DRG Neurone wurde die Ko-Kultur gestartet und nach 24 h beendet. Zu diesem Zeitpunkt konnte ein Auswachsen der Neuriten beobachtet werden, es hatte sich aber noch kein dichtes Netz aus Neuriten gebildet. Es wurde ein stärkeres Auswachsen von Neuriten adulter DRG Neurone beobachtet, wenn eine Ko-Kultivierung mit hSGSCs stattgefunden hatte (Abb. 21B), als wenn die Neurone alleine kultiviert wurden (Abb. 21A). Auch pränatale DRG Neurone zeigten mit der Ko-Kultur ein stärkeres Auswachsen von Neuriten (Abb. 21D) im Vergleich zur Kontrolle ohne hSGSCs (Abb. 21C).

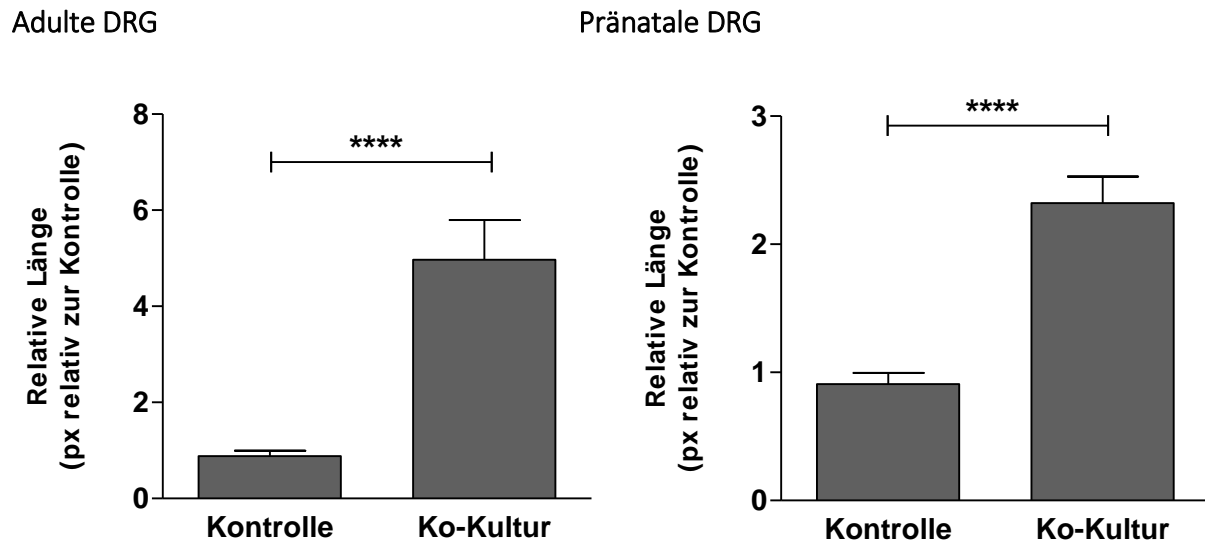


**Abbildung 21: Adulte und pränatale DRG Neurone zeigten in Ko-Kultur mit hSGSCs ein stärkeres Auswachsen von Neuriten als ohne Ko-Kultur**

Als Kontrollansatz wurden DRG Neurone (in der Abbildung rot dargestellt) auf beschichteten und im Wellboden platzierten Deckgläsern ohne hSGSCs kultiviert (I). Für die Ko-Kultur wurden DRG Neurone identisch zum Kontrollansatz und hSGSCs (in der Abbildung grün dargestellt) in Zellkultur-Inserts kultiviert (II). Im Vergleich zu adulten (A) und pränatalen (C) DRG Neuronen ohne Ko-Kultur mit hSGSCs zeigten adulte (B) und pränatale (D) DRG Neurone nach 24 h Ko-Kultur mit hSGSCs ein stärkeres Auswachsen von Neuriten. Maßstab: 100  $\mu$ m

Das verstärkte Auswachsen von Neuriten mit einer hSGSCs Ko-Kultur wurde quantitativ ausgewertet. Dazu wurden sowohl adulte als auch pränatale DRG Neurone in drei separaten Ansätzen untersucht. Für adulte Neurone wurden drei Ratten verwendet, für pränatale Neurone drei Muttertiere. Die aus einem Muttertier gewonnen pränatalen DRG wurden jeweils für einen Ansatz vereint. Für jeden Ansatz wurden 18 Neuronen mit Ko-Kultur und 18 Neuronen ohne Ko-Kultur als Kontrolle quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe einer Neuriten-Auswuchs Analyse (III.5.3). Für adulte DRG Neurone erhöhte sich mit der Ko-Kultur die relative Neuriten-Gesamtlänge um den Faktor 5,6 im Vergleich zu DRG Neuronen ohne Ko-Kultur (Abb. 22). Die absoluten Längen in Pixeln betragen  $93 \pm 11$  für die Kontrolle und  $523 \pm 86$  für die Ko-Kultur. Die Neuriten-Gesamtlänge pränataler DRG Neurone erhöhte

sich mit der Ko-Kultur um den Faktor 2,6 (Abb. 22). Die absoluten Längen in Pixeln betragen  $92 \pm 9$  für die Kontrolle und  $236 \pm 21$  für die Ko-Kultur.

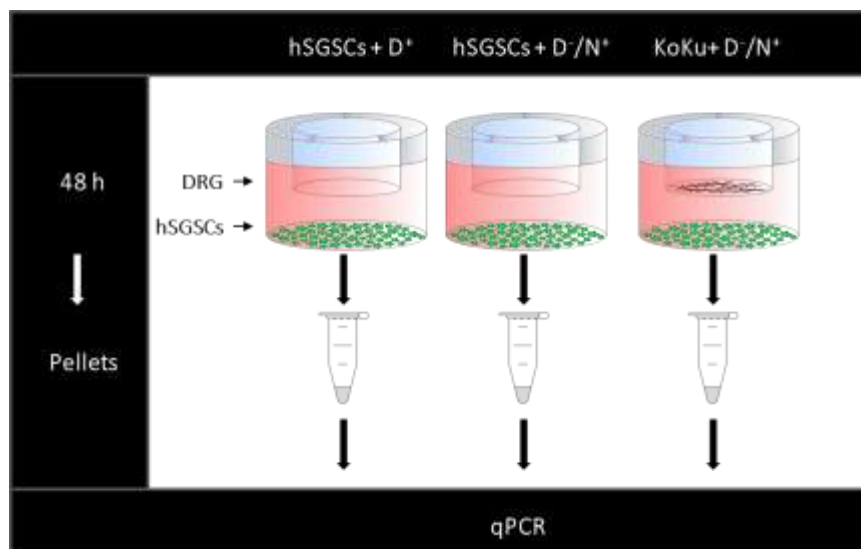


**Abbildung 22:** Die Neuriten-Gesamtlänge von adulten und pränatalen DRG Neuronen war nach 24 stündiger Ko-Kultur mit hSGSCs signifikant erhöht.

Die Neuriten-Gesamtlänge adulter DRG Neurone war nach 24 h indirekter Ko-Kultur mit hSGSCs um den Faktor 5,6 signifikant erhöht (Kontrolle:  $93 \pm 11$ , Ko-Kultur:  $523 \pm 86$ ) (links). Für pränatale DRG Neurone erhöhte sich die Neuriten-Gesamtlänge nach 24 h Ko-Kultur mit hSGSCs um den Faktor 2,6 signifikant (Kontrolle:  $92 \pm 9$ , Ko-Kultur:  $236 \pm 21$ ) (rechts). Die Länge wurde in Pixeln (px) an skelettierten Neuriten gemessen.  $n = 3$ ; 18 Neuronen pro Ko-Kultur und 18 Neuronen pro Kontrolle. \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ . Mittelwert  $\pm$  SEM.

### IV.3.2. Differenzierungsanalysen von hSGSCs nach Ko-Kultur mit DRG Neuronen

Der Einfluss von DRG Neuronen und Ko-Kultur Medium auf das Differenzierungsverhalten von hSGSCs während einer indirekten Ko-Kultur wurde mittels qPCR ermittelt. Drei Ansätze wurden parallel kultiviert und analysiert (Abb. 23). In einem Ansatz wurden als Kontrolle hSGSCs im Standard-Zellkulturmedium (hSGSCs + D<sup>+</sup>) kultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden hSGSCs in Ko-Kultur Medium (hSGSCs + D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>) kultiviert. Für die indirekte Ko-Kultur wurden hSGSCs in der Vertiefung einer Wellplatte und pränatale DRG Neurone im Zellkultur-Insert in Ko-Kultur Medium kultiviert (KoKu + D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>). Die Ko-Kultivierung erfolgte für 48 h und die gesicherten Zellpellets wurden für die qPCR verwendet.

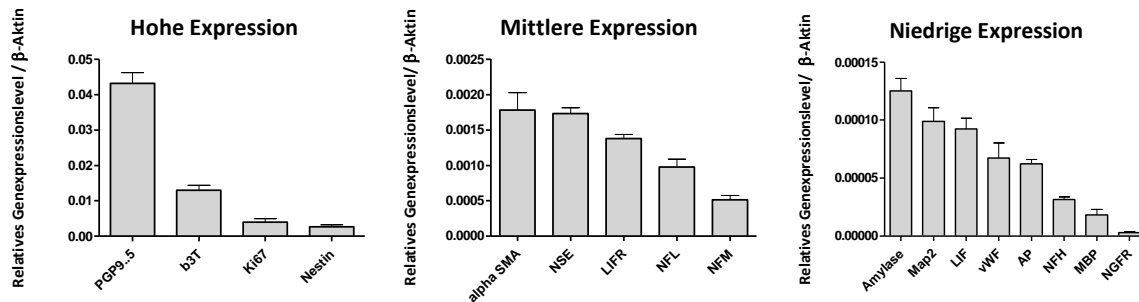


**Abbildung 23: Zellkulturansätze für Differenzierungsanalysen**

Drei verschiedene Ansätze wurden kultiviert und analysiert. hSGSCs wurden **1)** mit Standard-Zellkulturmedium kultiviert (hSGSCs + D<sup>+</sup>), **2)** mit Ko-Kultur Medium kultiviert (hSGSCs + D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>) und **3)** gemeinsam mit pränatalen DRG Neuronen in Ko-Kultur Medium indirekt ko-kultiviert (KoKu + D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>). Die Ko-Kultur erfolgte für 48 h. Anschließend wurden die Zellpellets für die qPCR gesichert.

Für die mittels qPCR analysierten Gene wurde zunächst die basale Expression unter Kultivierung im Standard-Zellkulturmedium D<sup>+</sup> untersucht. Die Expression wurde, wie in III.4.4 beschrieben, relativ bezogen auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin gemessen. Zur besseren Übersicht wurde die Expression in hoch, mittel und niedrig eingeteilt (Abb. 24). *Protein Gene Product 9.5* (PGP9.5),  $\beta$ 3 Tubulin (b3T), Ki67 und Nestin zeigten eine hohe Expression, *alpha Smooth Muscle Actin* (alpha SMA), Neuronenspezifische Enolase (NSE), *Leukemia Inhibitory Factor Receptor* (LIFR), Neurofilament L (NFL) und Neurofilament M (NFM) eine mittlere Expression

und eine niedrige Expression zeigte sich bei Amylase, *Microtubule-associated protein 2* (Map2), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), Von-Willebrand-Faktor (vWF), Alkalische Phosphatase (AP), Neurofilament H (NFH), *Myelin Basic Protein* (MBP) und *Nerve Growth Factor Receptor* (NGFR).



**Abbildung 24: Basales Genexpressionslevel von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium in Relation zu  $\beta$ -Aktin**

Das Genexpressionslevel von hSGSCs unter Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) wurde relativ zur Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin gemessen. PGP9.5 (*Protein Gene Product 9.5*), b3T ( $\beta 3$  Tubulin), Ki67 und Nestin zeigten eine hohe Expression, alpha SMA (*alpha Smooth Muscle Actin*), NSE (Neuronenspezifische Enolase), LIFR (*Leukemia Inhibitory Factor Receptor*), NFL (Neurofilament L) und NFM (Neurofilament M) eine mittlere Expression und Amylase, Map2 (*Microtubule-associated protein 2*), LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), vWF (Von-Willebrand-Faktor), AP (Alkalische Phosphatase), NFH (Neurofilament H), MBP (*Myelin Basic Protein*) und NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*) eine niedrige Expression.  $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM

Es wurde jeweils analysiert, in welchem Maße die Genexpression durch die Kultivierung in verändertem Zellkulturmedium (Ko-Kultur Medium statt Standard-Zellkulturmedium) und durch die Kultivierung in Ko-Kultur mit pränatalen DRG Neuronen und Ko-Kultur Medium beeinflusst wird. In Abbildung 25 ist das relative Genexpressionslevel zu  $\beta$ -Aktin dargestellt, normiert auf die Expression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium.

Im Gesamtbild zeigte sich ein deutlicher Effekt des Ko-Kultur Mediums auf die Genexpression und die Differenzierung von hSGSCs, jedoch nur ein geringer Effekt durch zusätzliche Ko-Kultivierung mit pränatalen DRG Neuronen.

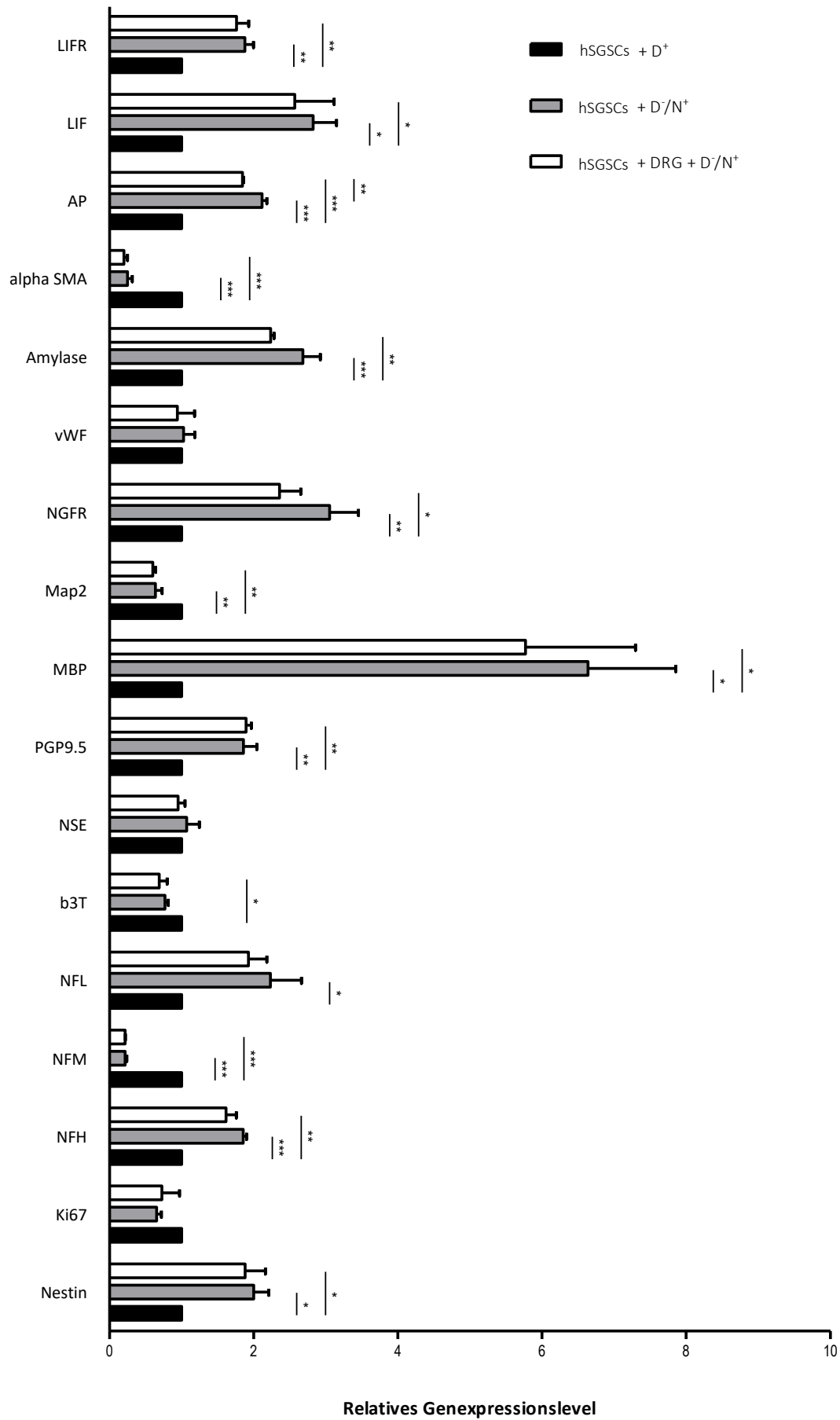
Der Stammzell- sowie ektodermale Marker Nestin wurde durch das Ko-Kultur Medium um den Faktor 2 hoch reguliert, der Proliferationsmarker Ki67 leicht herunter reguliert. Für viele ektodermale Marker zeigte sich eine erhöhte Expression mit dem Ko-Kultur Medium. NFH, NFL, PGP9.5 wurden etwa um den Faktor 2 hoch reguliert, NGFR etwa um den Faktor 3, und MBP um den Faktor 6. Die ektodermalen Marker NFM, b3T und Map2 wurden stark (NFM um

den Faktor 4) bzw. sehr leicht (b3T und Map2 beide etwa Faktor 1,5) herunter reguliert, die Expression von NSE wurde kaum beeinflusst. Die Expression des endodermalen Markers vWF wurde ebenso kaum beeinflusst, der endodermale Marker Amylase wurde allerdings etwa um den Faktor 3 hoch reguliert. Bei den mesodermalen Markern zeigte sich für alpha SMA eine erniedrigte Expression um den Faktor 4, für AP eine erhöhte Expression um den Faktor 2.

LIF wurde durch die Kultur mit Ko-Kultur Medium etwa um den Faktor 3 hoch reguliert, LIFR etwa um den Faktor 2. Eine Zunahme oder Abnahme um den Faktor 2 wurde als spezifische Änderung des Expressionslevels gewertet. Folgende Gene waren aufgrund ihrer spezifischen Regulierung durch das Ko-Kultur Medium um mehr als den Faktor 2 von besonderem Interesse: Nestin (↑), NFM (↓), NFL (↑), MBP (↑), NGFR (↑), Amylase (↑), alpha SMA (↓), AP (↑) und LIF (↑). Eine Ko-Kultivierung mit pränatalen DRG Neuronen und Ko-Kultur Medium wies keine spezifische Änderung im Vergleich zur Kultivierung im Ko-Kultur Medium ohne Neurone auf.



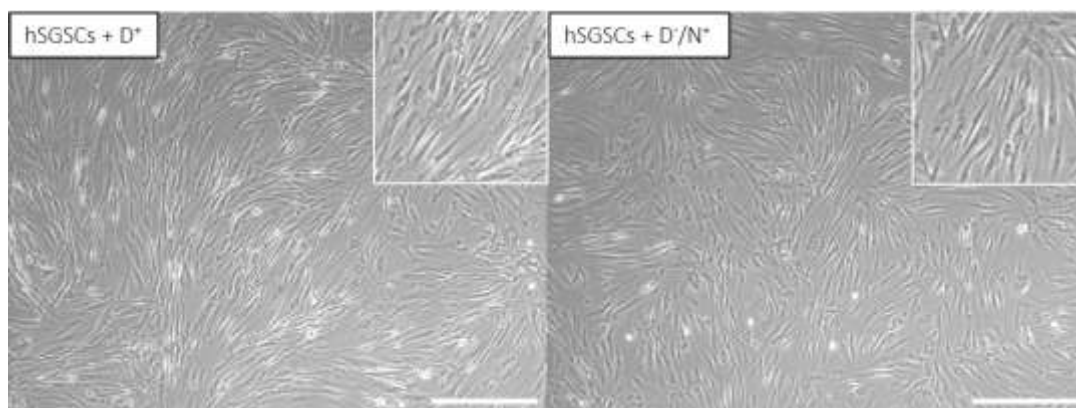
Markergene



### Abbildung 25: Relative Genexpression von hSGSCs in Ko-Kultur Medium und in Ko-Kultur mit pränatalen DRG Neuronen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium

Die Genexpression von hSGSCs wurde jeweils relativ zur Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin gemessen. Es wurden drei Kulturbedingungen miteinander verglichen, hSGSCs +  $D^+$ , hSGSCs +  $D^-/N^+$  und hSGSCs + DRG +  $D^-/N^+$ , wobei auf hSGSCs +  $D^+$  als Kontrolle in Standard-Kulturmedium normiert wurde. Als spezifische Änderung des Expressionslevels wurde eine Ab- oder Zunahme um mehr als den Faktor 2 gewertet. Somit wurden folgende Gene reguliert: Nestin ( $\uparrow$ ), NFM ( $\downarrow$ ), NFL ( $\uparrow$ ), MBP ( $\uparrow$ ), NGFR ( $\uparrow$ ), Amylase ( $\uparrow$ ), alpha SMA ( $\downarrow$ ), AP ( $\uparrow$ ) und LIF ( $\uparrow$ ).  $\uparrow$  = Hoch reguliert;  $\downarrow$  = Herunter reguliert. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM

Die mit den beiden verschiedenen Medien kultivierten hSGSCs wurden vor Beendigung der Ko-Kultur morphologisch beurteilt (Abb. 26). Es zeigten sich zwischen hSGSCs, die mit Standard-Zellkulturmedium kultiviert wurden (hSGSCs +  $D^+$ ) und hSGSCs, die mit Ko-Kultur Medium kultiviert wurden (hSGSCs +  $D^-/N^+$ ) keine Unterschiede in Zellmorphologie und Zelldichte.



**Abbildung 26: Morphologie von hSGSCs in  $D^+$  und  $D^-/N^+$  nach 48 h**

Nach 48 h Kultivierung in  $D^+$  und  $D^-/N^+$  wurden hSGSCs für Genexpressionsanalysen verwendet. Eine Kultur mit Ko-Kultur Medium (hSGSCs +  $D^-/N^+$ ), welche zu einer Regulation mehrerer Markergene führte (Abb. 25), bewirkte in der Zellmorphologie keine Unterschiede im Vergleich zur Kultur mit Standard-Zellkulturmedium (hSGSCs +  $D^+$ ). Bei den abgebildeten Zellen handelt es sich genau um die Zellen, die anschließend für die qPCR Analyse verwendet wurden. Maßstab = 500  $\mu$ m

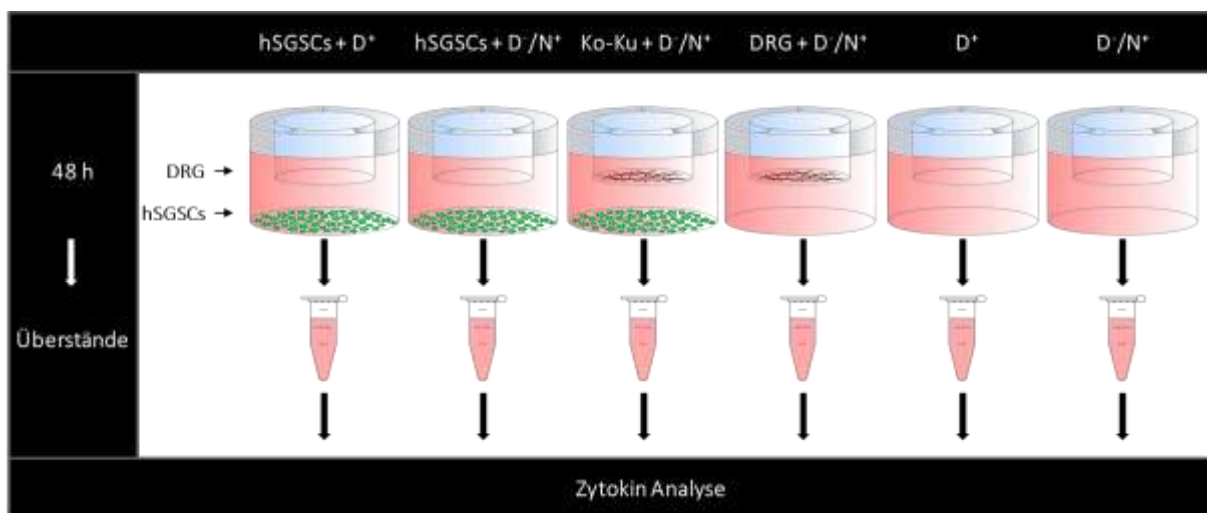
#### IV.3.3. Analyse von Zellkulturüberständen nach Ko-Kultur von hSGSCs und DRG Neuronen

Zellen sekretieren Zytokine ins Medium und können somit über parakrine Effekte mit anderen Zellen interagieren. In indirekten Ko-Kulturen ist eine räumliche Trennung der Zellpopulationen gewährleistet und eine Interaktion kann nur über Zytokine stattfinden. Eine Analyse der Zellkulturüberstände ermöglicht Rückschlüsse auf ein verändertes Zytokinprofil

unter veränderten Zellkulturbedingungen. Mit dem Ziel, Zytokine zu identifizieren, mit denen hSGSCs Einfluss auf DRG Neurone nehmen, wurden hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium, in Ko-Kultur Medium und gemeinsam mit DRG Neuronen in Ko-Kultur Medium kultiviert und die Zellkulturüberstände mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* analysiert. Im Ansatz der Ko-Kultur wurden hSGSCs in der Vertiefung einer Wellplatte kultiviert und pränatale DRG Neurone im Zellkultur-Insert. Als Kontroll-Ansätze wurden pränatale DRG Neurone im Insert ohne Ko-Kultur mit hSGSCs eingesetzt und Ansätze kultiviert, in welchen sich nur das Standard-Zellkulturmedium und nur das Ko-Kultur Medium befanden. Die Kultur erfolgte jeweils für 48 h.

Der Membran-basierte Zytokin-Array wurde mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion ausgewertet. Von jeder Membran wurde unter UV-Licht eine Aufnahme zur weiteren Analyse gemacht. Die verwendeten Ansätze sind in Abbildung 27 dargestellt.

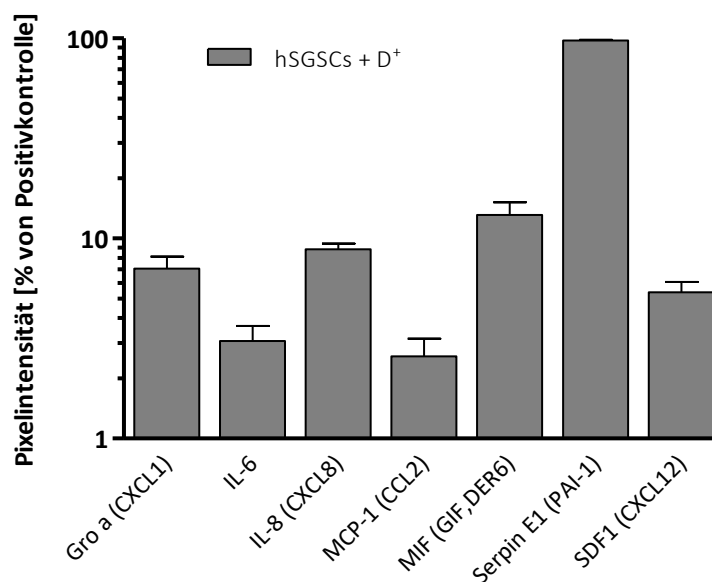
Die Messwerte der Kontroll-Ansätze der jeweiligen verwendeten Medien ( $D^+$  oder  $D^-/N^+$ ) wurden von denen der zu analysierenden Proben abgezogen. Der Ansatz nur mit DRG Neuronen diente als Negativkontrolle für den humanspezifischen Array. Abbildung der Membranen: siehe Anhang, Abb. 43 (VII.4.1).



**Abbildung 27: Zellkulturansätze für die Analyse mittels Membran-basiertem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A***

Für den Membran-basierten Zytokin-Array *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* wurden **1)** hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium (hSGSCs +  $D^+$ ) **2)** hSGSCs in Ko-Kultur Medium (hSGSCs +  $D^-/N^+$ ) **3)** hSGSCs zusammen mit DRG Neuronen in Ko-Kultur Medium (Ko-Ku +  $D^-/N^+$ ) **4)** DRG Neurone in Ko-Kultur Medium (DRG +  $D^-/N^+$ ) **5)** Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) und **6)** Ko-Kultur Medium ( $D^-/N^+$ ) für 48 h kultiviert und die Überstände analysiert.

In Standard-Zellkulturmedium kultivierte hSGSCs wurden zunächst zur Bestimmung eines basalen Zytokin-Sekretionsprofils analysiert. Da es sich bei dem verwendeten Zytokin-Array um ein semi-quantitatives System handelt, wurde die Sekretion in Pixelintensitäten angegeben und konnte nicht quantifiziert werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte jedoch darauf geschlossen werden, welche Zytokine in vergleichsweise höherem Maße (*Serin Protease Inhibitor E1* (Serpin E1), *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), Interleukin-8 (IL-8), *Growth-Related Oncogen- $\alpha$*  (Gro  $\alpha$ )) und welche in niedrigerem Maße (Interleukin-6 (IL-6), *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) und *Stromal Cell-Derived Factor* (SDF1)) sekretiert wurden (Abb. 28).

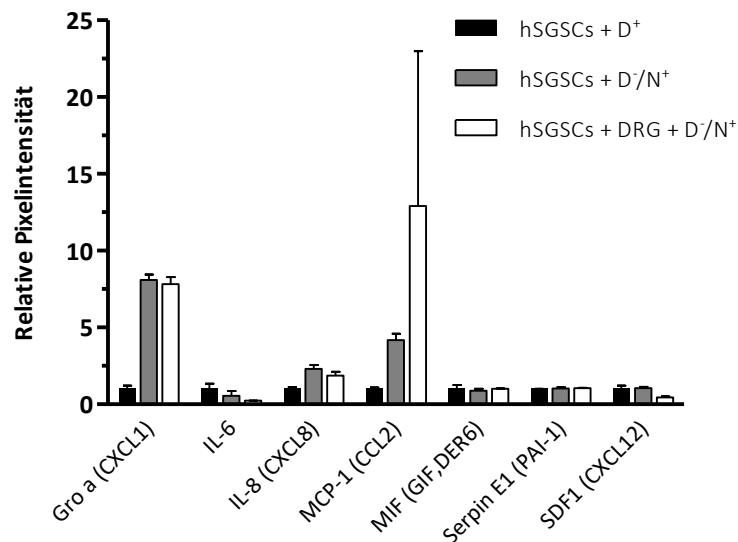


**Abbildung 28: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium**

Das basale Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs unter Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium D<sup>+</sup> für 48 h wurde mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* von R&D Systems bestimmt. Es sind die Zytokine dargestellt, die bei der Detektion mittels Chemilumineszenz ein Signal aufwiesen. Signal in Pixelintensität abzüglich Hintergrundsignal und relativ zu den internen Positiv-Kontrollspots, n = 3, Mittelwert  $\pm$  SEM

Es wurde analysiert, ob hSGSCs durch Veränderung der Kulturbedingungen ein verändertes Zytokin-Sekretionsprofil aufweisen. Eine 48-stündige Kultivierung von hSGSCs in Ko-Kultur Medium und hSGSCs zusammen mit DRG Neuronen in Ko-Kultur Medium bewirkte eine veränderte Spot-Intensität im Vergleich zur Kultivierung von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium (Abb. 29). Zur Quantifizierung wurde jeweils die Intensität der Spots mit

dem Hintergrund-Signal verrechnet, die entsprechenden Medien-Kontrollen abgezogen und anschließend auf das Signal des Ansatzes mit Standard-Zellkulturmedium normiert. Es wurde durch die Kultivierung in Ko-Kultur Medium oder in Ko-Kultur Medium zusammen mit DRG Neuronen eine erhöhte Sekretion der Zytokine Gro  $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 detektiert. Gro  $\alpha$  wurde durch die Kultur in  $D^-/N^+$  um etwa den Faktor 8 stärker sekretiert. Die Ko-Kultur mit DRG Neuronen veränderte diese Sekretion nicht zusätzlich. Die Sekretion von IL-8 wurde durch die Kultur in  $D^-/N^+$  etwa um den Faktor 2,3 erhöht, durch die Ko-Kultur mit DRG Neuronen war die Sekretion etwas niedriger und nicht eindeutig erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Die Sekretion von MCP-1 wurde durch das Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  etwa um den Faktor 4,2 erhöht, die Ko-Kultur mit DRG Neuronen schien diese Tendenz noch zu verstärken, konnte aufgrund eines zu großen Standardfehlers jedoch nicht gewertet werden. Die Sekretion von SDF1 wurde durch das Ko-Kultur Medium nicht verändert, die Ko-Kultur mit DRG Neuronen jedoch verringerte die Sekretion etwa um den Faktor 2,3 im Vergleich zur Kultur in  $D^-/N^+$ . Ebenfalls wurde die Sekretion von IL-6 durch  $D^-/N^+$  und Ko-Kultur mit DRG Neuronen vermindert, wobei die Abweichung der Einzelwerte hoch ist.



**Abbildung 29: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen**

Das Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs wurde nach Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ), nach Kultivierung mit Ko-Kultur Medium ( $D^-/N^+$ ) und nach Kultivierung mit DRG Neuronen in Ko-Kultur Medium ( $DRG + D^-/N^+$ ) mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* von R&D Systems bestimmt. Die Kultur erfolgte jeweils für 48 h. Es sind die Zytokine dargestellt, die bei der Detektion mittels Chemilumineszenz ein Signal aufwiesen und außerdem jene, die bei der basalen Expression (Abb. 28) detektiert werden konnten. Signal in Pixelintensität abzüglich Hintergrundsignal und relativ zu den internen Positiv-Kontrollspots, Normierung auf hSGSCs +  $D^+$ , n = 2, Mittelwert  $\pm$  SEM

#### IV.4. Analysen zur Serum- und Serumersatz-freien Kultivierung von hSGSCs

In den Genexpressionsanalysen (IV.3.2) und den Zytokinanalysen (IV.3.3) zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Ko-Kultur Mediums ( $D^-/N^+$ ) auf Genexpression und Zytokinproduktion der hSGSCs. Es konnte anhand der Regulierung einiger Markergene auf eine verstärkte Differenzierung der hSGSCs geschlossen werden. Die Produktion einiger der analysierten Zytokine wurde erhöht oder erniedrigt. Durch weitere Experimente sollte auf die Ursache für die beobachteten Veränderungen geschlossen werden. Ziel war es dabei, den beobachteten Effekt für weitere Vorhaben nutzen bzw. sogar verstärken zu können. Es wurde ein Test durchgeführt, in dem einzelne Komponenten des Ko-Kultur Mediums auf ihren Effekt auf die Genexpression untersucht wurden (siehe Anhang, Abb. 47 (VII.4.6)). Das Ko-Kultur Medium wurde dafür auf die Weise modifiziert, dass jeweils pro Ansatz eine oder mehrere der zusätzlichen Substanzen, die im „N<sup>+</sup>“ vorhanden sind (L-Glutamin, B-27, NGF), weggelassen wurden. Als Kontrollmedium diente jeweils Standard-Zellkulturmedium  $D^+$ . Es wurden dieselben Markergene mittels qPCR untersucht wie in Abbildung 25 dargestellt. Es zeigten sich leichte Schwankungen in der Genexpression zwischen den verschiedenen Ansätzen, aber es konnte dennoch eine eindeutige Beobachtung gemacht werden. In allen Ansätzen, in denen der Serumersatz B-27 fehlte, stieg die Genexpression einiger Markergene wie MBP, Map2, Amylase und vWF sehr stark an. Dieser Einfluss fehlender wachstumsfördernder Zusätze auf die Genexpression der Zellen wurde im Folgenden spezifischer untersucht und zusätzlich auf die Analyse produzierter Zytokine auf Proteinebene erweitert.

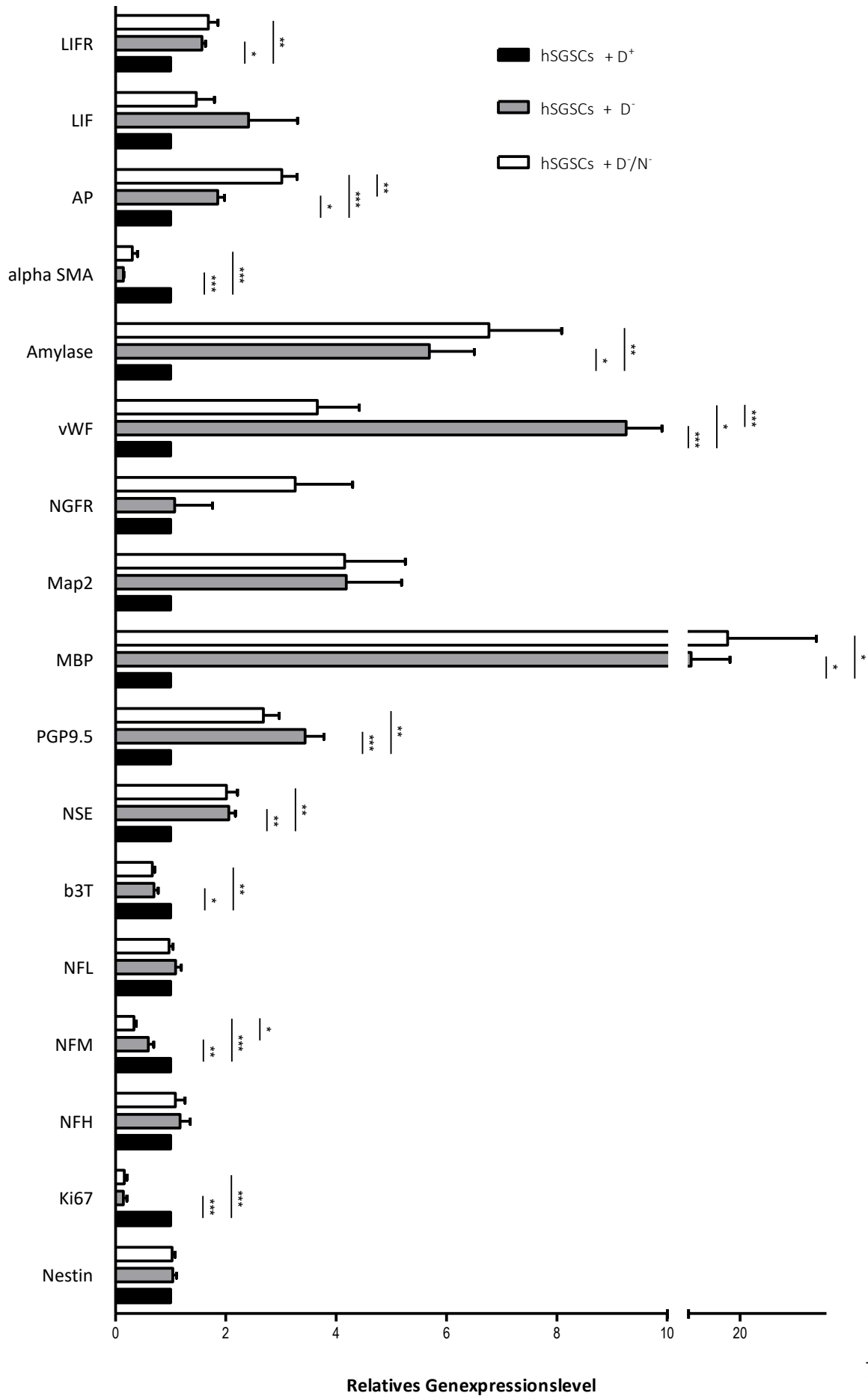
#### IV.4.1. Differenzierungsanalysen von hSGSCs nach Serum- und Serumersatz-freier Kultivierung

Die Kultivierung von hSGSCs erfolgte neben Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) in DMEM ohne FKS ( $D^-$ ) und in DMEM pur / Neurobasal pur im Verhältnis 1:1 ( $D^-/N^-$ ). Eine qPCR zum Nachweis derselben Marker wie in Abbildung 25 (IV.3.2) wurde durchgeführt (Abb. 30). In den beiden Testansätzen war weder FKS noch der Serumersatz B-27 vorhanden. Die Veränderung der Genexpression durch  $D^-$  und  $D^-/N^-$  zeigte identische Tendenzen wie durch das Ko-Kultur Medium (IV.3.2), jedoch war die Expressionsänderung teilweise stärker ausgeprägt. Eine signifikante Hochregulierung der Genexpression um mehr als den Faktor 2 erfolgte für die Marker NSE, PGP9.5, MBP, vWF, Amylase und AP. Eine deutliche Hochregulierung, jedoch ohne Signifikanz, erfolgte bei Map2 und NGFR. Besonders auffällig im Vergleich zu den Ergebnissen in IV.3.2 war die extrem stark erhöhte Expression von MBP um den Faktor 20 durch  $D^-$  und  $D^-/N^-$ . Ebenso war die Expression von NSE, die durch das Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  nicht erhöht wurde (IV.3.2) um den Faktor 2 erhöht. Map2, dessen Expression durch das Ko-Kultur Medium herunter reguliert wurde (IV.3.2), wurde durch  $D^-$  und  $D^-/N^-$  um den Faktor 4 hoch reguliert. Der endodermale Marker vWF wurde durch das Ko-Kultur Medium nicht erhöht (IV.3.2), durch  $D^-$  und  $D^-/N^-$  aber um den Faktor 9 bzw. 3,5 erhöht. Die Hochregulierung der Amylase-Expression war mit dem Faktor 6 im Vergleich zur Kultivierung in Ko-Kultur Medium (IV.3.2) etwa doppelt so stark ausgeprägt.

Während die Expression von Nestin durch das Ko-Kultur Medium hochreguliert wurde (IV.3.2), zeigte sich bei der Kultivierung in  $D^-$  und  $D^-/N^-$  keine Änderung des Expressionslevels im Vergleich zu  $D^+$ . Ebenso veränderte sich die Expression von NFH und NFL nicht.

Der Proliferationsmarker ki67 wurde von hSGSCs, die in  $D^-$  und  $D^-/N^-$  kultiviert wurden, in sehr geringem Maße exprimiert, diese Tendenz war ebenfalls stärker ausgeprägt als bei der Kultivierung in Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  (IV.3.2).

Markergene



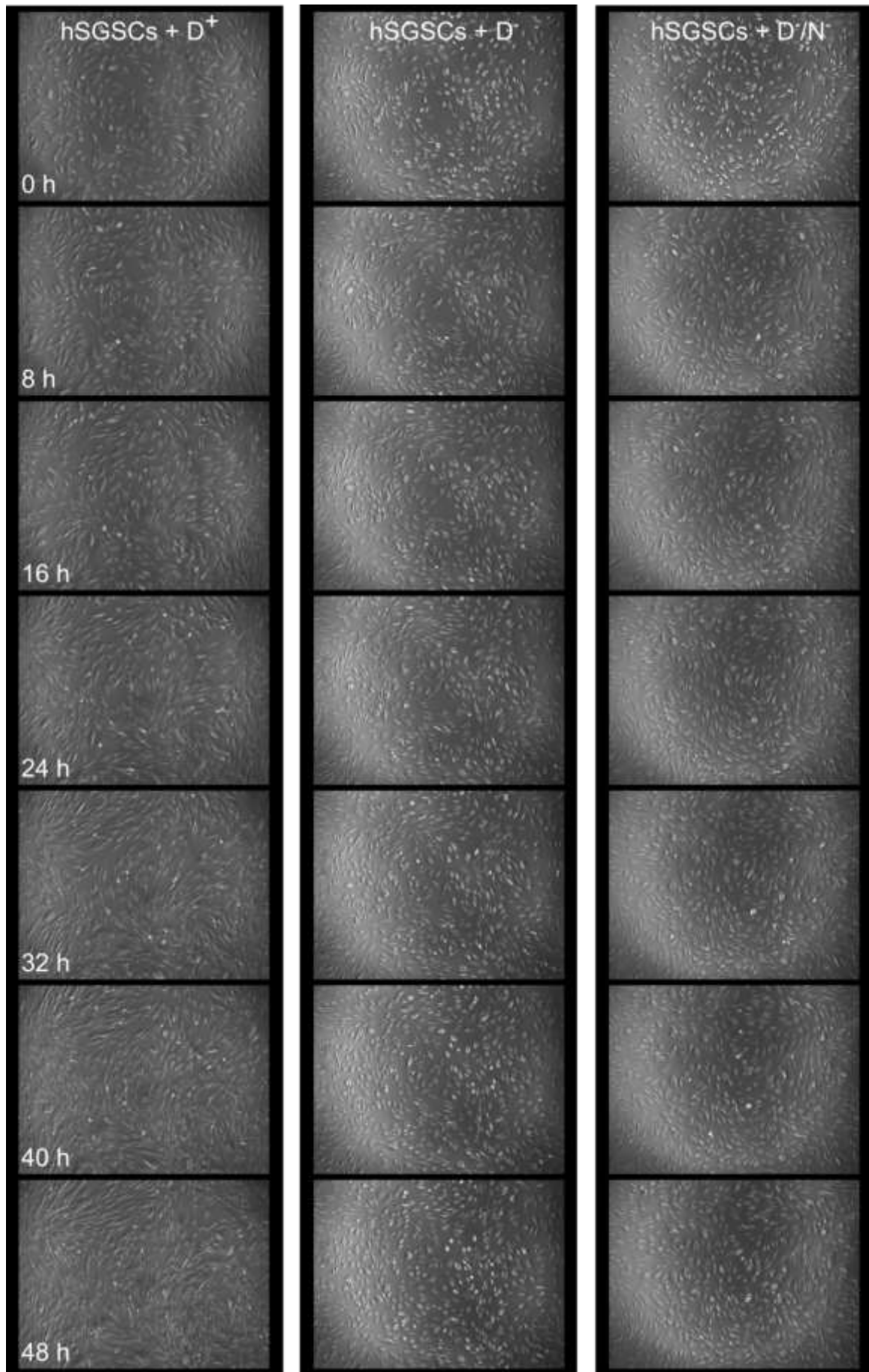


### Abbildung 30: Relative Genexpression von hSGSCs unter Serum- und Serumersatz-freien Kultivierungsbedingungen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium

Die Genexpression von hSGSCs wurde jeweils relativ zur Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin gemessen. Es wurden drei Kultivierungsbedingungen miteinander verglichen, hSGSCs +  $D^+$ , hSGSCs +  $D^-$  und hSGSCs +  $D^-/N^-$ , wobei auf hSGSCs +  $D^+$  als Kontrolle in Standard-Zellkulturmedium normiert wurde. Als spezifische Änderung des Expressionslevels wurde eine Ab- oder Zunahme um mehr als den Faktor 2 gewertet. Somit wurden folgende Gene reguliert: Ki67 ( $\downarrow$ ), NFM ( $\downarrow$ ), NSE ( $\uparrow$ ), PGP9.5 ( $\uparrow$ ), MBP ( $\uparrow$ ), Map2 ( $\uparrow$ ), NGFR ( $\uparrow$ ), vWF ( $\uparrow$ ), Amylase ( $\uparrow$ ), alpha SMA ( $\downarrow$ ), AP ( $\uparrow$ ).  $\uparrow$  = Hoch reguliert;  $\downarrow$  = Herunter reguliert. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ,  $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM

#### IV.4.2. Morphologische Zellveränderungen durch Serum- und Serumersatz-freie Kultivierung

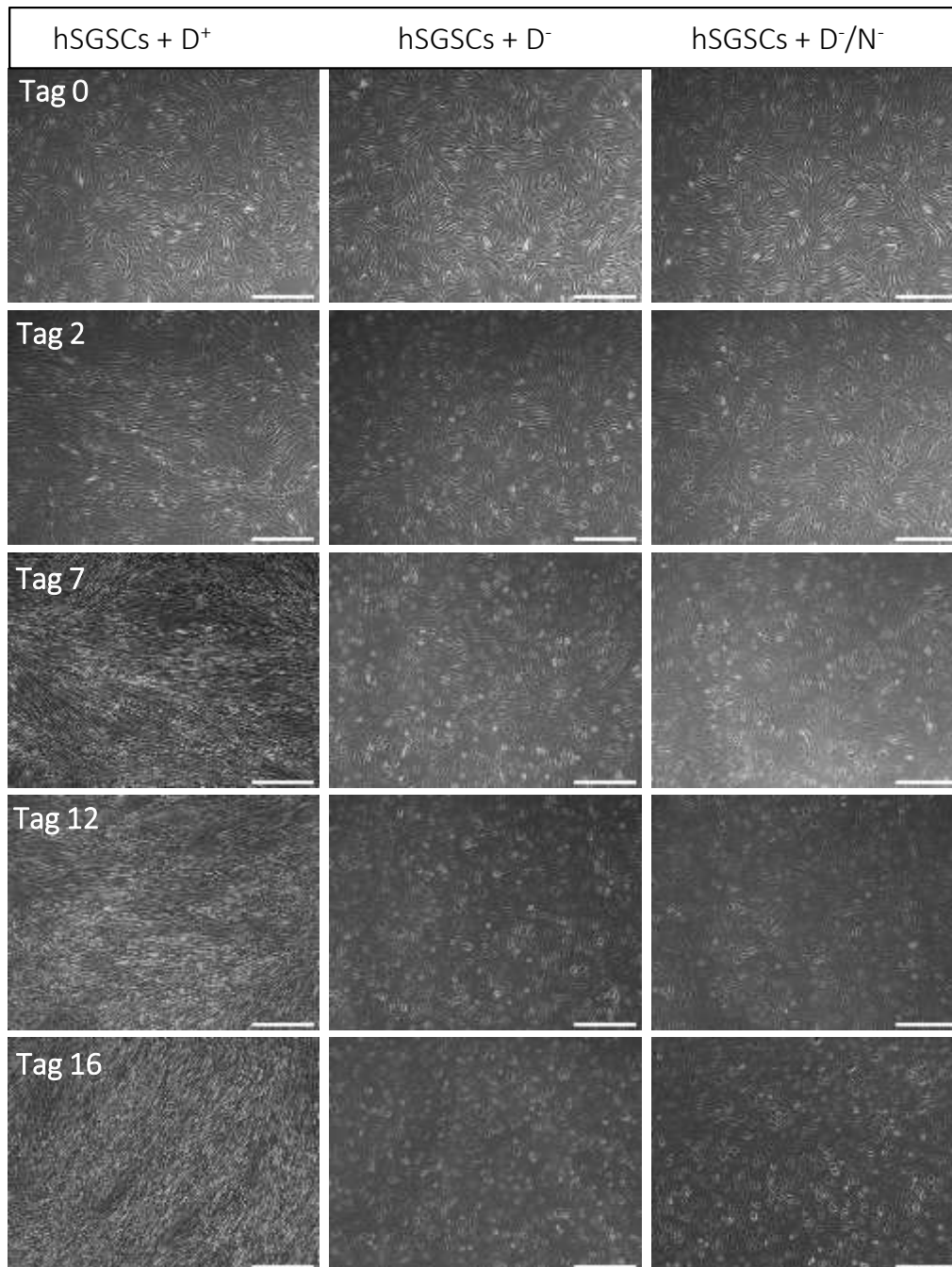
Parallel zur qPCR wurden hSGSCs in Kultur mit Standard-Zellkulturmedium und den Serum- und Serumersatz-freien Testmedien auf morphologische Veränderungen untersucht. Unter dem Einfluss der Testmedien  $D^-$  und  $D^-/N^-$  konnte wie auch schon bei den ersten morphologischen Untersuchungen von Zellen, die in  $D^-$  kultiviert wurden (IV.2.1), eine abgerundete Zellform und eine geringere Zelldichte beobachtet werden. Die morphologische Veränderung der Zellen wurde mithilfe der Zeitraffer-Mikroskopie über einen Zeitraum von 48 h beobachtet. Unter den drei Konditionen wurden hSGSCs parallel zueinander kultiviert und alle 20 min direkt nacheinander mit der Kamera aufgenommen. Exemplarisch sind Aufnahmen nach jeweils 8 h dargestellt (Abb. 31). In  $D^+$  kultivierte hSGSCs zeigten eine stetige Proliferation und die typisch spindelförmige Zellform. Bei Kultivierung in  $D^-$  und  $D^-/N^-$ , den Serum- und Serumersatz-freien Medien, war kaum eine Proliferation der Zellen zu beobachten und die Zellform war abgerundet. Bereits nach 24 h war diese Veränderung in Zellmorphologie und Zelldichte anhand der Einzelbilder deutlich erkennbar (Abb. 31, 24h), nach 48 h war sie noch stärker ausgeprägt (Abb. 31, 48h). Ein Video der Zeitraffer-Mikroskopie befindet sich im Anhang (VII.5).



**Abbildung 31: Zeitraffer-Mikroskopie von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für 48 h**

Die morphologischen Veränderungen von hSGSCs unter dem Einfluss verschiedener Zellkultur-Medien wurden für 48 h mit der Zeitraffer-Mikroskopie dokumentiert. Das Standard-Zellkulturmedium  $D^+$  und die Serum- und Serumersatz-freien Medien  $D^-$  und  $D^-/N^-$  wurden zur Kultivierung der hSGSCs verwendet. Aufnahmen erfolgten alle 20 Minuten, dargestellt sind jeweils Aufnahmen im Abstand von 8 h. hSGSCs in  $D^+$  proliferierten stetig und zeigten eine spindelförmige Morphologie, während hSGSCs in  $D^-$  und  $D^-/N^-$  kaum proliferierten und eine abgerundete Zellform aufwiesen.

In Ergänzung zur Zeitraffer-Mikroskopie wurde dieser Versuch bis zum Tag 16 nach Aussaat unter regelmäßigem Wechsel der Medien durchgeführt um den längerfristigen Effekt der verschiedenen Medien zu beurteilen. Die Aufnahmen erfolgten in diesem Fall manuell und zu den angegebenen Zeitpunkten (Abb. 32). Diese weitere Beobachtung der Zellen deckte sich mit den Aufnahmen der Zeitraffer-Mikroskopie in Abbildung 31. Die in  $D^+$  kultivierten Zellen proliferierten bis zur Konfluenz und die Zellform wurde sehr lang und schmal. In  $D^-$  und  $D^-/N^-$  kultivierte hSGSCs nahmen eine abgerundete Morphologie an, proliferierten sehr wenig und änderten diesen Status auch nach 16 Tagen nicht. Ein Absterben der Zellen wurde in keinem der Testmedien beobachtet.

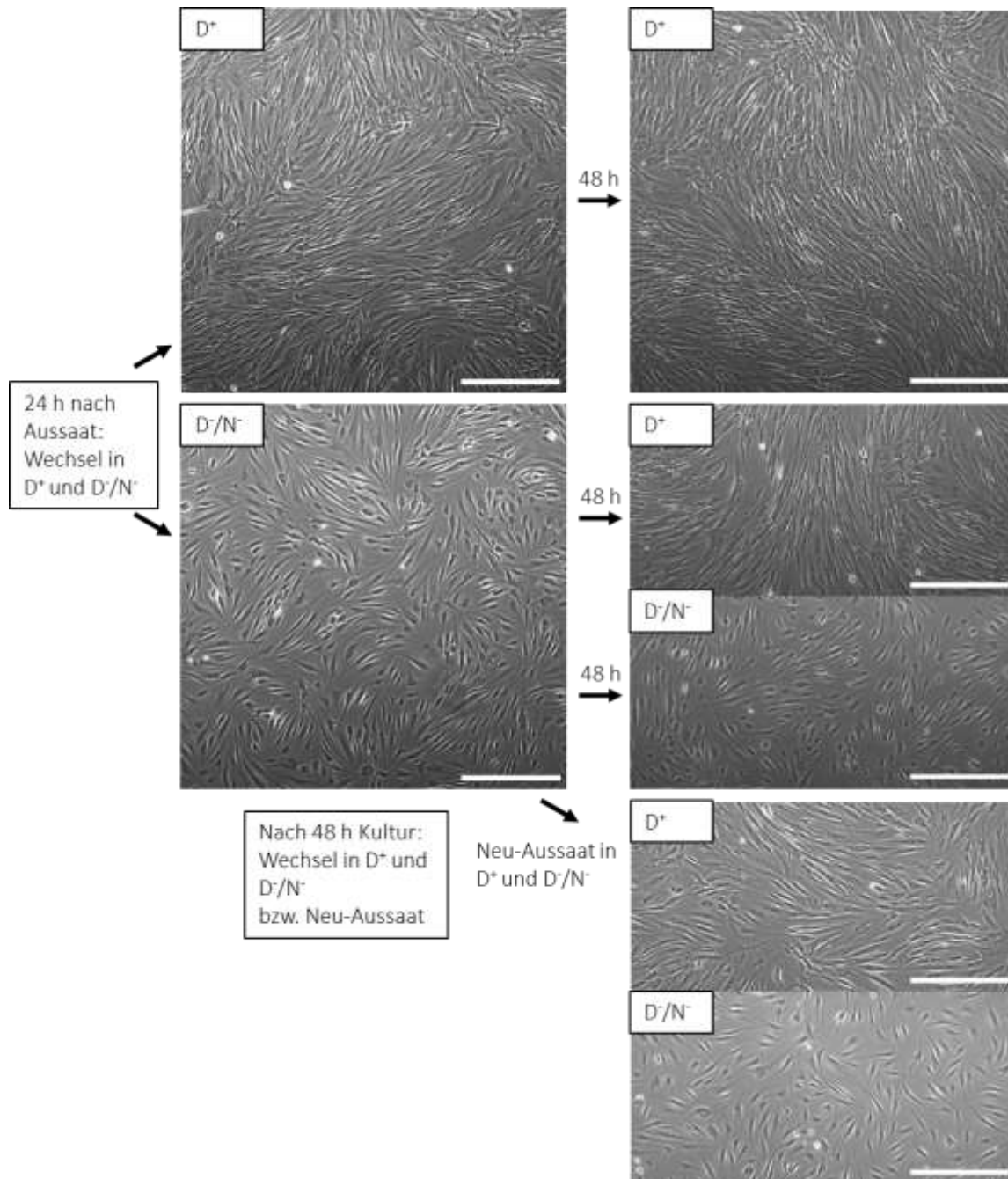


**Abb 32: Morphologische Veränderungen von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für 16 Tage**

Für die Testmedien, mit denen hSGSCs für die Zeitraffer-Mikroskopie in Abbildung 31 kultiviert wurden, wurde ein Langzeit-Versuch durchgeführt. Die Zellen wurden 16 Tage unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen beobachtet und regelmäßig mikroskopiert. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Morphologie von hSGSCs in D<sup>+</sup> wurde innerhalb dieser Zeit länglich und es zeigte sich ein dichtes Wachstum, hSGSCs in D<sup>-</sup> und in D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup> veränderten sich kaum in ihrer Morphologie, sie proliferierten ab Tag 2 nicht mehr deutlich, es konnte aber auch kein Absterben beobachtet werden. Maßstab = 500 µm

Für einen potentiellen *in vivo* Einsatz von Zellen müssen diese in der Regel *in vitro* vorkultiviert werden. Für die Nutzung der Effekte bestimmter Medien, z. B. Serum- oder Serumersatz-freien Mediums, während einer solchen Vorkultivierung, muss es möglich sein die Zellen nach der Vorkultivierung abzulösen und neu auszubringen, beispielsweise für die periphere Nervenregeneration in eine Nervenleitschiene. Innerhalb einer solchen Nervenleitschiene können je nach Vorgehensweise ein Mangel an zusätzlichen Nährstoffen oder ein künstlich zugeführtes erhöhtes Nährstoffangebot herrschen. Eine entsprechende Situation sollte *in vitro* simuliert werden, indem die Zellen nach 48 h Kultur in  $D^-/N^-$ , in denen sich die Zellen morphologisch verändert hatten, enzymatisch durch Trypsin abgelöst wurden und in  $D^+$  oder  $D^-/N^-$  neu ausgebracht wurden. Gleichzeitig sollte ermittelt werden, ob der Effekt auf die Zellmorphologie, den die Serum- oder Serumersatz-freie Umgebung bewirkt hat, reversibel ist. Durch Wechsel in  $D^+$  nach 48 h wurde ein Wiederangebot von wachstumsfördernden Zusätzen gewährleistet.

Für 48 h in  $D^+$  kultivierte Zellen, die nach einem Medienwechsel erneut für 48 h in  $D^+$  kultiviert wurden, zeigte sich ihre typische spindelförmige Morphologie und ein dichtes Wachstum (Abb. 33 oben). In  $D^-/N^-$  kultivierte Zellen zeigten die bereits bekannte abgerundete Morphologie in geringerer Zelldichte. Ein Wechsel in  $D^-/N^-$  änderte nichts an dieser Morphologie, ein Wechsel in  $D^+$  hingegen bewirkte eine Veränderung der Morphologie wieder zur typischen spindelförmigen Zellmorphologie (Abb. 33 mitte). Eine Neu-Aussaat von in  $D^-/N^-$  kultivierten Zellen war sowohl in  $D^-/N^-$  als auch in  $D^+$  erfolgreich (Abb. 33 unten). In  $D^-/N^-$  adhärten die Zellen und zeigten wieder die abgerundete Zellform, eine Proliferation fand kaum statt. In  $D^+$  adhärten die Zellen, nahmen wieder die für  $D^+$  typische längliche Zellform an und begannen zu proliferieren. Auch nach einer Woche behielten die Zellen diese Morphologie bei (Bilder: siehe Anhang, Abb. 46 (VII.4.5))



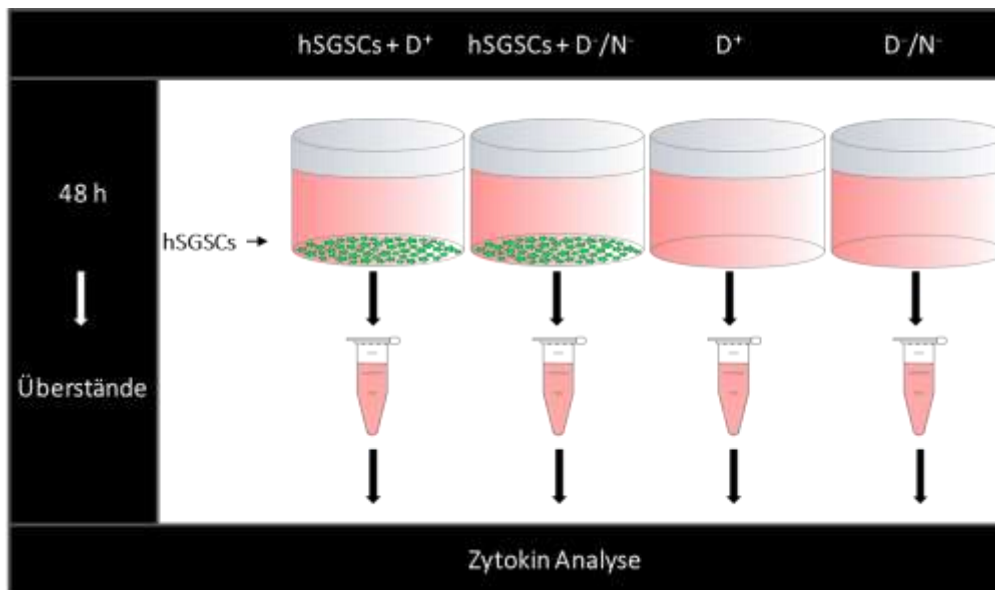
**Abb 33: Morphologie von hSGSCs nach Kultivierung in verschiedenen Medien, nach Medienwechsel und Neu-Aussaat**

Nach Kultivierung von hSGSCs für 24 h in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) wurde in  $D^+$  und in  $D^-/N^-$  gewechselt und für 48 h weiterkultiviert. Die Morphologie von hSGSCs in  $D^-/N^-$  zeigte die schon in Abbildung 31+32 beobachtete abgerundete Form und eine geringere Zelldichte als in  $D^+$ . Anschließend wurde ein Medienwechsel in  $D^+$  und in  $D^-/N^-$  durchgeführt und für 48 h weiterkultiviert. Nach 48 h in  $D^+$  änderte sich die zuvor in  $D^-/N^-$  ausgeprägte abgerundete Morphologie wieder zur typischen spindelförmigen Zellmorphologie in  $D^+$ . In einem weiteren Ansatz wurden Zellen nach 48 h in  $D^-/N^-$  enzymatisch durch Trypsin abgelöst und neu ausgesät. Eine Neu-Aussaat erfolgte in  $D^+$  und in  $D^-/N^-$ . Die Morphologie nach 48 h in  $D^-/N^-$  war wieder typisch abgerundet und die Zelldichte war geringer als nach 48 h in  $D^+$ . In  $D^+$  proliferierten die Zellen wieder und zeigten eine spindelförmige Morphologie. Maßstab = 500  $\mu\text{m}$

#### IV.4.3. Analyse von Zellkulturüberständen nach Serum- und Serumersatz- freier Kultivierung

Durch Kultivierung in Serum- und Serumersatz-freien Medien wurde die Genexpression der getesteten Markergene von hSGSCs teilweise stark verändert (Abb. 30) und auch morphologische Veränderungen konnten im Vergleich zum Standard-Zellkulturmedium deutlich beobachtet werden (Abb. 31). Mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems wurde die Zytokinproduktion durch hSGSCs unter der Kultivierung mit Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) und dem Serum- oder Serumersatz-freien Testmedium  $D^-/N^-$  für 48 h analysiert. Ein Schema der verwendeten Ansätze und Kontrollen ist in Abbildung 34 dargestellt. Zunächst wurde das basale Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) ermittelt. Wie bei dem Zytokin-Array in IV.3.3 handelt es sich um ein semi-quantitatives System und wird identisch diesem ausgewertet. Dargestellt sind die Pixelintensitäten, anhand derer darauf geschlossen werden kann, in welchem Maße die Zytokine sekretiert werden. Eine vergleichsweise hohe Sekretion von DKK-1, IL-8, MCP-1 und Serpin E1 konnte verzeichnet werden (Abb. 35).

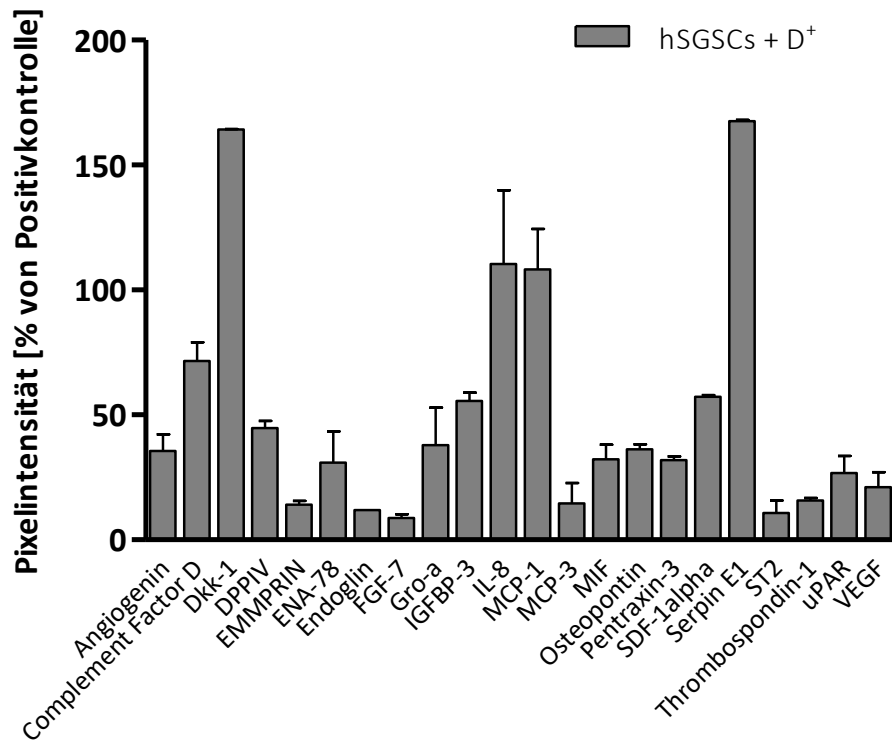
Es wurde analysiert, ob hSGSCs durch die Kultur in Serum- und Serumersatz-freiem Medium ein verändertes Zytokin-Sekretionsprofil aufweisen. Im Vergleich zur Kultur in Standard-Zellkulturmedium wurde in dem Ansatz mit  $D^-/N^-$  eine geringere Menge aller sezernierter Zytokine nachgewiesen, teilweise in sehr starkem Ausmaß (Abb. 36). Zur Quantifizierung wurde jeweils die Intensität der Spots mit dem Hintergrund-Signal verrechnet, die entsprechenden Medien-Kontrollen abgezogen und anschließend auf das Signal des Ansatzes mit Standard-Zellkulturmedium  $D^+$  normiert. Abbildungen der Membranen: siehe Anhang, Abbildung 44 (VII.4.1).



**Abb 34: Zellkulturansätze für die Analyse mittels Membran-basiertem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array***

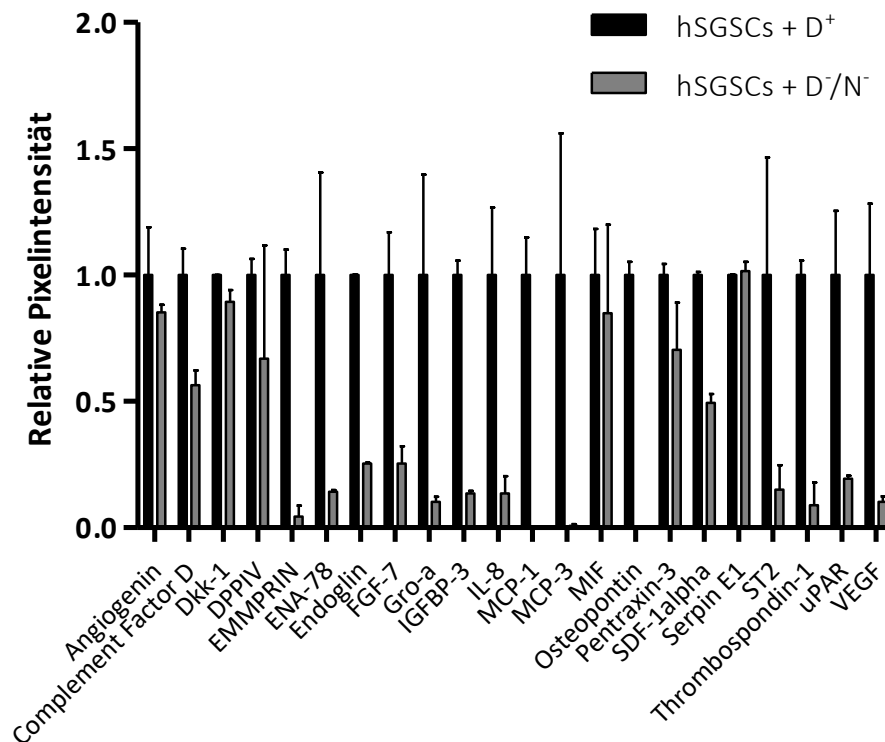
Für den Membran-basierten Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems wurden **1)** hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium (hSGSCs + D<sup>+</sup>) **2)** hSGSCs in Serum- und Serumersatz-freiem Medium (hSGSCs + D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup>) und als Kontrollen **3)** Standard-Zellkulturmedium (D<sup>+</sup>) und **4)** Serum- und Serumersatz-freies Medium D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup> für 48 h kultiviert und die Überstände analysiert.





**Abb 35: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium**

Das basale Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs unter Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium für 48 h wurde mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems bestimmt. Einige der Spots zeigten ein stärkeres Chemilumineszenzsignal als die Positiv-Kontrollspots, weshalb nach der Normierung auf die Positiv-Kontrollspots eine Pixelintensität von über 100 % errechnet wurde. Es sind die Zytokine dargestellt, die bei der Detektion mittels Chemilumineszenz ein Signal aufwiesen. Signal in Pixelintensität abzüglich Hintergrundsignal und relativ zu den internen Positiv-Kontrollspots, n = 2, Mittelwert  $\pm$  SEM



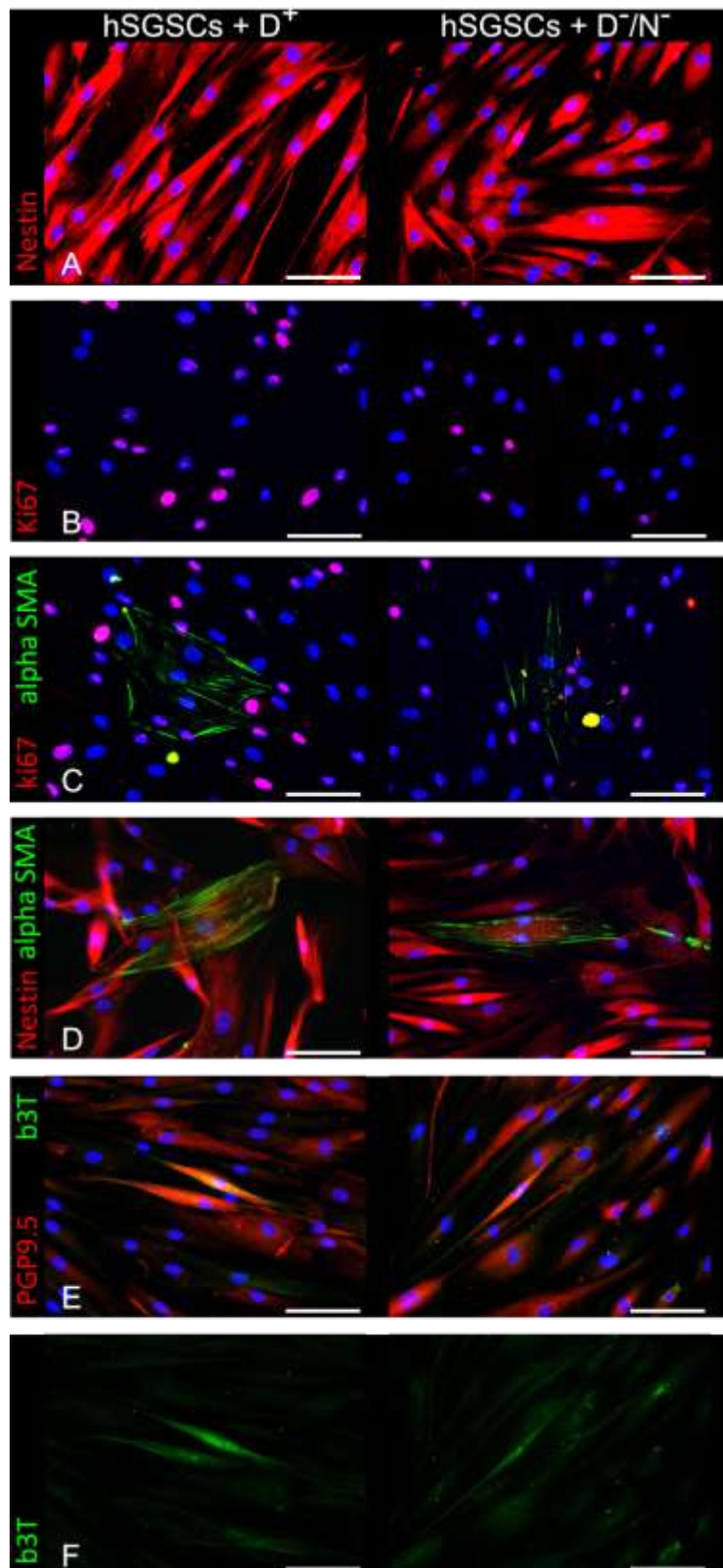
**Abbildung 36: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs nach Kultivierung mit Standard-Zellkulturmedium und Serum- und Serumersatz-freiem Medium**

Das Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs wurde nach Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium (D<sup>+</sup>) und nach Kultivierung in Serum- und Serumersatz-freiem Medium mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems bestimmt. Die Kultur erfolgte jeweils für 48 h. Es sind die Zytokine dargestellt, die bei der Detektion mittels Chemilumineszenz ein Signal aufwiesen und außerdem jene, die bei der basalen Expression (Abb. 35) detektiert werden konnten. Signal in Pixelintensität abzüglich Hintergrundsignal und relativ zu den internen Positiv-Kontrollspots, Normierung auf hSGSCs + D<sup>+</sup>, n = 2, Mittelwert ± SEM

#### IV.4.4. Proteinnachweis nach Serum- und Serumersatz-freier Kultivierung

Es wurde bisher ein starker Effekt von Serum- und Serumersatz-freiem Medium auf die Genexpression und die Morphologie von hSGSCs beobachtet. Einige der Marker, die zuvor mittels qPCR auf mRNA-Ebene untersucht worden sind, wurden zusätzlich mit einer immunzytochemischen Färbung auf Proteinebene nachgewiesen. Die Zellen wurden zuvor 48 h entweder in Standard-Zellkulturmedium (D<sup>+</sup>) oder in Serum- und Serumersatz-freiem Medium (D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup>) kultiviert. Der Stammzellmarker Nestin wurde in beiden Medien sehr stark exprimiert, in den abgebildeten Bildausschnitten (Abb. 37A) waren alle Zellen positiv für Nestin. Alpha SMA, b3T und PGP9.5 wurden vereinzelt exprimiert. Es zeigten sich im Vergleich von den Zellen, die in D<sup>+</sup> und in D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup> kultiviert wurden, keine Unterschiede in Intensität oder

Häufigkeit dieser Proteine (Abb. 37C-F). Der Proliferationsmarker Ki67 wurde in Zellen, die in D<sup>+</sup> kultiviert wurden, stärker exprimiert als in Zellen, die in D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup> kultiviert wurden (Abb. 37B+C). Zellen, die positiv für alpha SMA waren, exprimierten kein Ki67 (Abb. 37C). Für b3T positive Zellen exprimierten oft in stärkerer Intensität auch PGP9.5 (Abb. 37E).

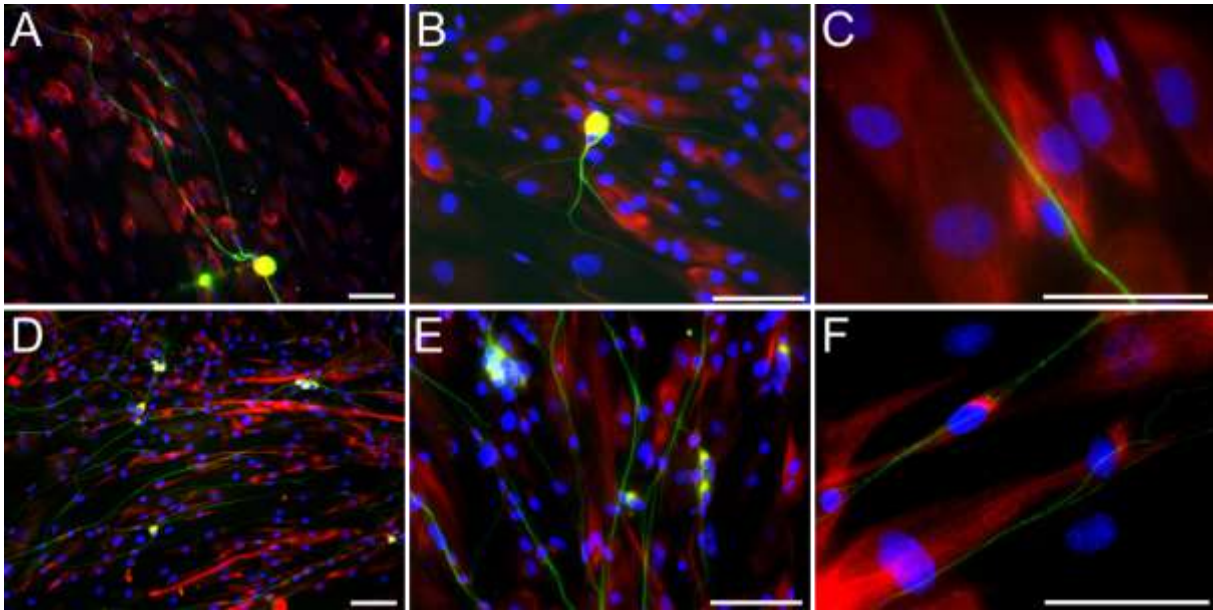


### Abbildung 37: Immunzytochemische Färbung verschiedener Markerproteine von hSGSCs nach Kultivierung mit Standard-Zellkulturmedium und Serum- und Serumersatz-freiem Medium

Für 48 h kultivierte hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) und in Serum- und Serumersatz-freiem Medium ( $D^-/N^-$ ) wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine, deren mRNA in IV.3.2 und IV.4.1 mittels qPCR nachgewiesen wurde, immunzytochemisch gefärbt. Für Nestin, PGP 9.5, alpha SMA und b3T konnte kein Unterschied in Intensität oder Häufigkeit des Markers festgestellt werden (A, C-F). Der Proliferationsmarker Ki67 wurde stärker in Zellen produziert, die in  $D^+$  kultiviert wurden (B+C). Die Bildausschnitte in E und F sind identisch. Bei den gelben Strukturen in Bild C handelt es sich um Artefakte. Marker für Zellkerne: DAPI (blau), Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

#### IV.5. Direkte Ko-Kulturen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen und peripheren Neuronen

Stammzellen wurden schon in verschiedenen Forschungsgruppen zur Besiedlung von Nervenleitschienen verwendet, wo sie zum verbesserten Auswachsen von Neuriten beitragen sollten (Ao et al., 2011; Kingham et al., 2014; Liu et al., 2011; Wrobel et al., 2014). Auch für hSGSCs, die *in vitro* bereits eine vielversprechende Wirkung auf das Neuritenauswachsen zeigten (IV.3.1), könnte der Einsatz in Nervenleitschienen ein großes Potential haben. In diesem Fall würde ein direkter Kontakt zwischen hSGSCs und den neu aussprossenden Neuriten entstehen, der neben den parakrinen Effekten der Stammzellen auch richtungsweisend auf die Neuriten wirken könnte. Um die Situation innerhalb einer besiedelten Nervenleitschiene *in vitro* zu simulieren, wurden hSGSCs und DRG Neurone direkt miteinander ko-kultiviert. Die hSGSCs wurden einen Tag zuvor ausgesät und waren zum Start der Ko-Kultivierung bereits adhärent, wie es auch beim Einsatz in einer Nervenleitschiene der Fall sein könnte. Sowohl für adulte als auch für pränatale DRG Neurone wurde ein sehr gutes Anhaften auf dem *Feeder Layer* von hSGSCs beobachtet und am Folgetag war bereits das Auswachsen von Neuriten erkennbar. Mittels Immunfluoreszenz wurde der adulte Stammzellmarker Nestin und der neuronale Marker  $\beta 3$  Tubulin nachgewiesen (Abb. 38). Neben den hSGSCs waren auch die Somata der Neurone Nestin-positiv. Sowohl für adulte (Abb. 38A-C) als auch für pränatale (Abb. 38D-F) DRG Neurone war in den verschiedenen Vergrößerungen die Ausrichtung der Neuriten erkennbar ähnlich zur Gesamtausrichtung der hSGSCs.



**Abbildung 38: Direkte Ko-Kultivierung von hSGSC und primären DRG Neuronen**

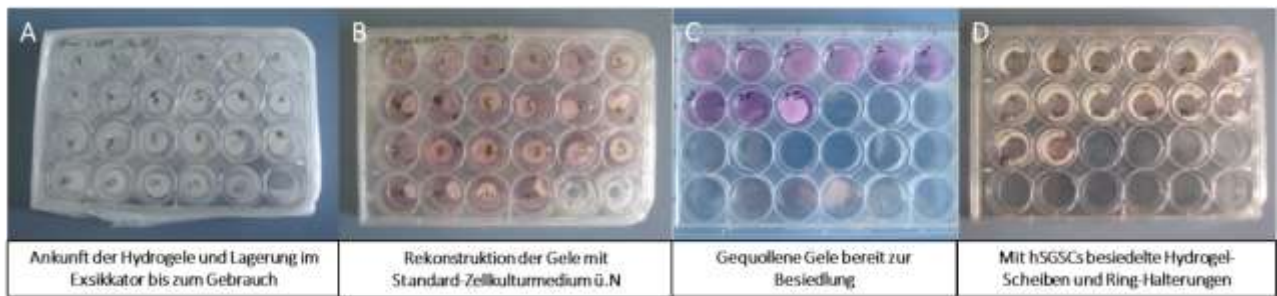
Primäre adulte DRG Neurone (A-C) und primäre pränatale DRG Neurone (D-F) hafteten auf einem *Feeder Layer* aus hSGSCs und die Ausrichtung ihrer Neuriten war erkennbar ähnlich zur Gesamtausrichtung der hSGSCs. Marker für Neurone:  $\beta 3$  Tubulin (grün), Marker für hSGSCs: Nestin (rot), Marker für Zellkerne: DAPI (blau), Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

#### IV.6. Nervenleitschienen als Matrix für die Besiedlung mit hSGSCs

Im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung von hSGSCs in einer peripheren Nervenläsion wurden mit den Kooperationspartnern Dr. Michael C. Hacker und Caroline Kohn vom Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie aus dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig erste Versuche zur Besiedlung und zur Handhabung von Nervenleitschienen durchgeführt. Die in Leipzig hergestellten Leitschienen wurden aus einem neuartigen, variabel gestaltbaren Biomaterial fabriziert. Es handelt sich um ein Hydrogel, basierend auf Hydrolyseprodukten des Kollagens wie Collagel® und Gelatine („cGEL“), welche mit einem synthetischen Oligomer quervernetzt werden. Mithilfe dieses Quervernetzers und einer Modulierung der Reaktionsbedingungen lassen sich die Nervenleitschienen in ihren mechanischen Eigenschaften sowie ihrer Resorptionszeit anpassen. So können besonders flexible Leitschienen hergestellt werden, die bei Beanspruchung nicht abknicken.

Im Folgenden sollte die Besiedlung dieses Materials mit hSGSCs erprobt werden und eine Darstellung der Zellen auf den Hydrogelen etabliert werden.

Die Fähigkeit zur Besiedlung wurde für diverse Hydrogel-Formulierungen zunächst in einem zweidimensionalen System getestet und mit verschiedenen Analysen begutachtet. Für Experimente zur Materialtestung wurden die Hydrogele in Form von flachen Scheiben verwendet, die sich in Vertiefungen einer 24-Well Platte einpassen. Es konnte ein erfolgreicher Besiedlungsvorgang dieser Gel-Scheiben erstellt werden, der vom gefriergetrockneten Hydrogel bis zur festen Zelladhäsion etwa 24 h benötigt (Abb. 39). Er beinhaltet vor Gebrauch der Hydrogele eine luftdichte Lagerung der gefriergetrockneten Scheiben im Exsikkator (Abb. 39A), das Aufquellen der Gele mit Zellkulturmedium über Nacht (Abb. 39B+C) und die Besiedlung selbst. Es wurden hierfür spezielle Ring-Halterungen entworfen und angefertigt (Anfertigung durch Dennis Wendt, Fraunhofer EMB), mit denen es möglich wurde die Gele auf dem Boden der Platten zu immobilisieren (Abb. 39D).

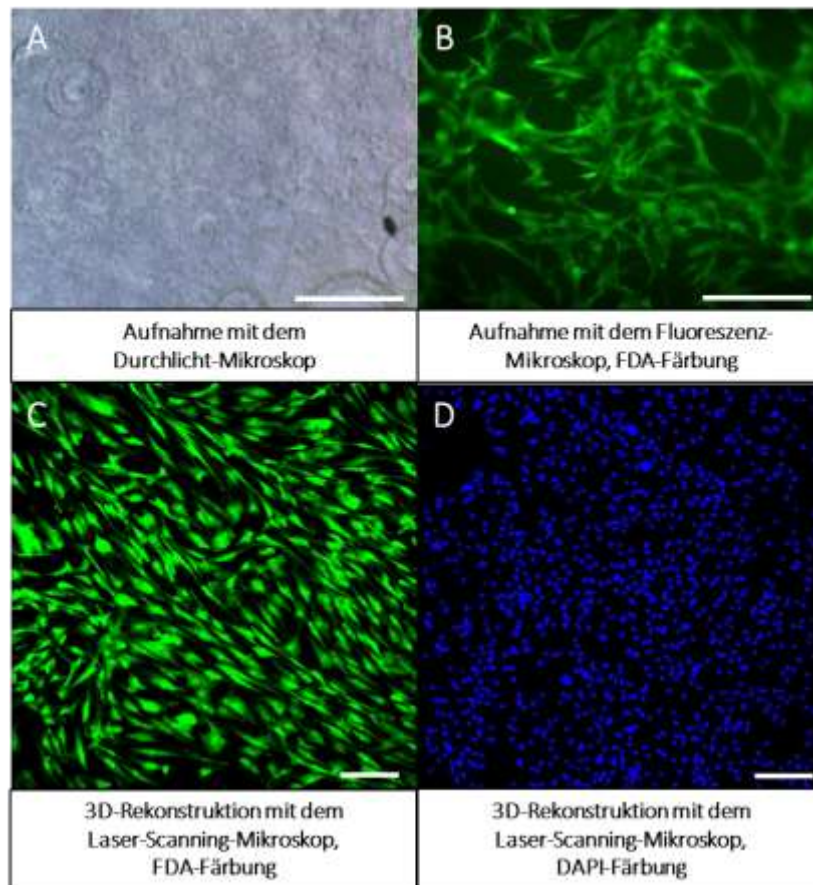


**Abbildung 39: Vorgehensweise für das Besiedeln von Hydrogel-Scheiben**

Nach Ankunft der gefriergetrockneten Hydrogele erfolgte eine luftdichte Lagerung im Exsikkator. Zur Rekonstruktion (Quellvorgang) wurden Hydrogel-Scheiben über Nacht in Standard-Zellkulturmedium quellen gelassen. Die gequollenen Gele füllten die Vertiefungen einer 24-Well Platte aus und ermöglichten die Besiedlung mit Zellen. Zur Fixierung wurden speziell angefertigte Halterungs-Ringe eingesetzt.

Für die Beurteilung eines Besiedlungserfolges war die Darstellung der Zellen auf den Hydrogel-Scheiben essentiell. Exemplarisch sind in Abbildung 40 mit hSGSCs besiedelte Hydrogel-Scheiben dargestellt, auf denen hSGSCs durch verschiedene Detektionsverfahren markiert wurden. Im Durchlicht waren Zellen aufgrund der sehr unruhigen Gelstruktur nur sehr schlecht erkennbar (Abb. 40A). Eine Färbung mit FDA stellte die Zellen sehr gut dar, sie ließen sich sowohl mit einem Fluoreszenzmikroskop in zweidimensionaler Ansicht (Abb. 40B) als auch mit einem Laser-Scanning-Mikroskop in dreidimensionaler Rekonstruktion darstellen (Abb. 40C). Auch eine Färbung mit DAPI ließ in der dreidimensionalen Rekonstruktion des Laser-Scanning-Mikroskops sehr gut einzelne Zellkerne auf dem Hydrogel erkennen (Abb. 40D).



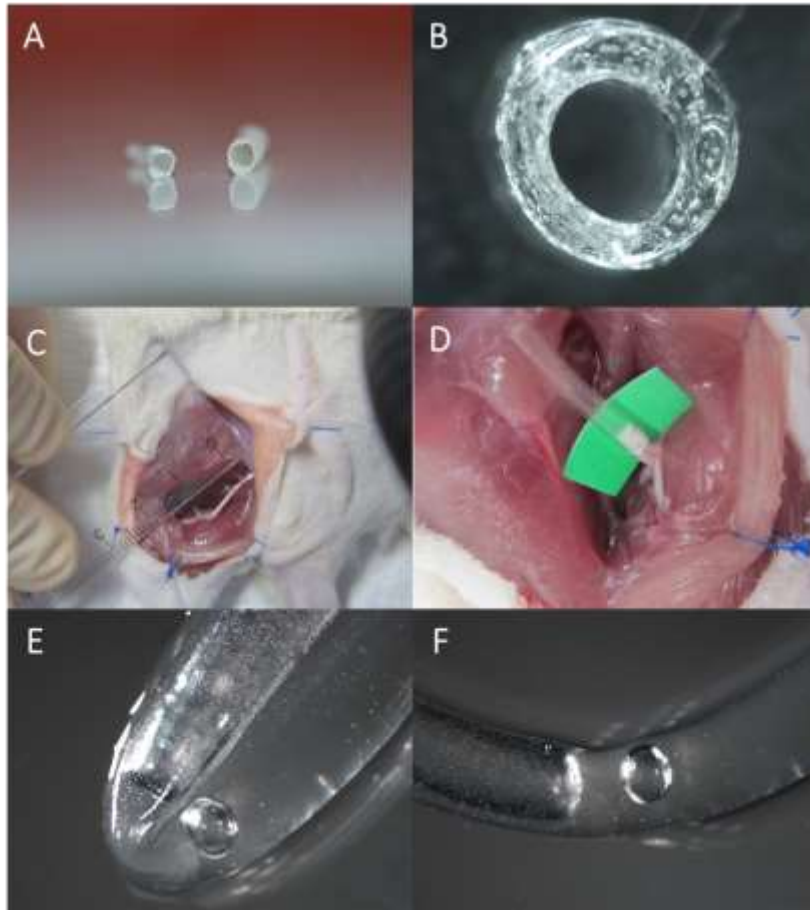


**Abbildung 40: Verschiedene Detektionsverfahren ermöglichten die Darstellung von hSGSCs auf Hydrogel-Scheiben**

Hydrogel-Scheiben wurden mit hSGSCs besiedelt und mit verschiedenen Detektionsverfahren markiert. Unter dem Durchlichtmikroskop waren die Zellen nur schwer erkennbar (A). Eine FDA-Färbung und anschließende Fluoreszenzmikroskopie stellte die Zellen zweidimensional gut dar (B). Mit einem Laser-Scanning-Mikroskop ließen sich in dreidimensionaler Rekonstruktion, in der einzelne z-stack Aufnahmen übereinander gelagert wurden, FDA gefärbte Zellen (C) und DAPI gefärbte Zellkerne (D) sehr gut darstellen. Maßstab: 200 µm

Erste Versuche zur Handhabung der Hydrogel-basierten Nervenleitschienen wurden mit dem Kooperationspartner Dr. Tobias Kisch aus der Plastischen Chirurgie und Handchirurgie des Universitätsklinikums Lübeck durchgeführt (Abb. 41). Die Nervenleitschienen lagen zunächst in gefriergetrocknetem Zustand vor (Abb. 41A) und wurden in einem Quellvorgang, identisch zu den Hydrogel-Scheiben, hydratisiert (Abb. 41B). Eine 1 cm große Nervenläsion wurde am *Nervus ischiadicus* der zuvor getöteten Ratte künstlich erzeugt (Abb. 41C). Die Nervenendigung konnte erfolgreich in die Leitschiene eingeführt werden. An der Kontaktstelle wirkten Adhäsionskräfte und der Nerv wurde ohne das zusätzliche Ausüben von Druck in die Leitschiene hineingezogen (Abb. 41D). An dieser Kontaktstelle würde auch die Nervennaht gesetzt werden, für die allerdings zunächst eine reißfestere Gelformulierung

hergestellt werden muss. Mit den Nervenleitschienen wurde ein Abknick-Versuch durchgeführt um die Flexibilität auszutesten. Die Leitschiene wurde stark abgeknickt und anschließend wieder geöffnet. Es konnte keine Schädigung am Material festgestellt werden.

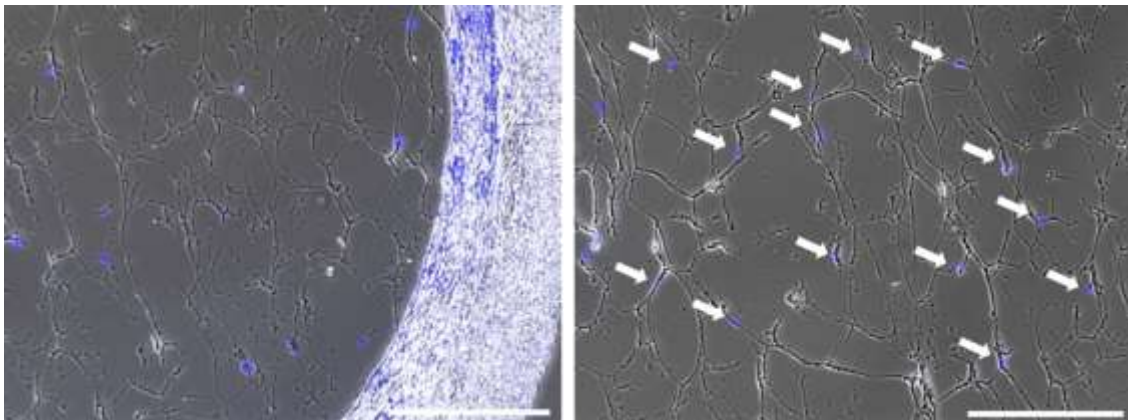


#### Abbildung 41: Handhabung von Hydrogel-basierten Nervenleitschienen

Die Nervenleitschienen befanden sich zunächst in einem gefriergetrocknetem Zustand (A). Nach dem Quellvorgang, der identisch zu den Hydrogel-Scheiben erfolgte, lag die Nervenleitschiene in ihrer gebrauchsfertigen Form vor (B, Querschnitt). Die Hydrogel-basierten Nervenleitschienen wurden testweise in einen durchtrennten *Nervus ischiadicus* der Ratte eingesetzt um ihre Handhabung zu testen. Ein 1 cm großer Nervendefekt wurde künstlich erzeugt (C) und die Nervenendigung in die Leitschiene eingeführt. An dieser Stelle würde die Naht erfolgen (D). Ein Abknickversuch wurde durchgeführt, bei dem eine Leitschiene stark abgeknickt wurde und anschließend wieder geöffnet wurde (E+F) Es konnte keine Beschädigung des Materials beobachtet werden. Die Abbildungen A+B wurden zur Verfügung gestellt von Caroline Kohn, Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie der Universität Leipzig.

Eine mögliche Matrix um hSGSCs in das Lumen von Nervenleitschienen zu applizieren ist Fibrin. Die Machbarkeit dieser Vorgehensweise wurde mithilfe einer kommerziell erwerblichen Nervenleitschiene (NeuraGen<sup>®</sup>, Integra) getestet. NeuraGen<sup>®</sup> ist Kollagenbasiert und in trockenem Zustand sehr stabil und robust handzuhaben. Das Fibrin wurde durch Zusammengeben von Fibrinogen- und Thrombin-Lösung, in welcher die hSGSCs suspendiert waren, unmittelbar nach Einspritzen in die Nervenleitschiene fest. Somit konnte verhindert werden, dass Zellen aus der anderen Öffnung der Leitschiene wieder verloren gingen.

Am nächsten Tag wurde die Zellverteilung im Fibrin innerhalb der Nervenleitschiene mit einer Färbung der Zellkerne auf Kryoschnitten beurteilt. Die Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung im Fibrin (Abb. 42).



**Abbildung 42: Besiedlung von NeuraGen<sup>®</sup> mit hSGSCs in einer Matrix aus Fibrin**

Die Machbarkeit einer Besiedlung von Nervenleitschienen mit hSGSCs wurde in einer NeuraGen<sup>®</sup> Nervenleitschiene und mit Fibrin als Matrix ausgetestet. Einen Tag nach der Besiedlung wurde die gleichmäßige Verteilung der Zellen mittels einer Färbung der Zellkerne mit DAPI dargestellt. In der rechten Abbildung sind die Zellkerne zusätzlich mit weißen Pfeilen hervorgehoben. Maßstab: 500  $\mu$ m

## V. Diskussion

### V.1. Peripherere Neurokulturen für *in vitro* Studien zur Nervenregeneration

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolation und Kultivierung peripherer Neurone aus adulten und pränatalen DRG an der Fraunhofer EMB erstmals etabliert. Die Methodik wird in vielen Institutionen bereits seit vielen Jahrzehnten für verschiedenste Organismen verwendet (Banks et al., 1970; Horie und Kim, 1984; St Amand und Tipton, 1954; Wood und Bunge, 1986). In vielen Publikationen, insbesondere aus der Zeit vor den 1970er Jahren, wurden Explant-Kulturen aus DRG verwendet (Hughes, 1953; Levi-Montalcini, 1964; Nakai und Kawasaki, 1959; Peterson und Murray, 1955). Der Vorteil von Explant-Kulturen gegenüber dissoziierten Neurokulturen ist der Erhalt der ursprünglichen Zellanordnung im Ganglion und der vorhandenen Zellkontakte. Ebenso bleibt die native Anordnung von Schwannzellen und Makrophagen in einer Explant-Kultur erhalten. Der Erhalt dieser Originalstrukturen kann besonders für Studien von Bedeutung sein, bei denen *in vitro* die Interaktion von Neuronen und Schwannzellen untersucht werden soll (Bunge et al., 1982). Dissoziierte Neurone, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, bieten den Vorteil, einzelne Neuriten, die aus dem Soma auswachsen, genau beobachten und exakte Messungen der Neuriten-Länge vornehmen zu können. Das Auswachsen von Neuriten ist bei Explant-Kulturen nur sehr ungenau zu bestimmen, da dieses sternförmig und sehr dicht aus dem Zellaggregat heraus geschieht, in dem sich die vielen Nervenzellkörper befinden. Zur Beantwortung von Fragestellungen zum Einfluss bestimmter Parameter auf das Auswachsen von Neuriten ist eine dissoziierte Neurokultur gegenüber einer Explant-Kultur vorzuziehen. Die Art und Weise, in der *in vitro* das Auswachsen von Neuriten geschieht, unterscheidet sich von der nativen pseudounipolaren Form von DRG Neuronen im Spinalganglion (siehe Abb. 2 (II.1.1)). Es wachsen teilweise mehrere Neuriten direkt aus dem Soma aus.

Die am meisten verwendeten Modelle für die Isolation von primären DRG Neuronen sind Maus und Ratte. Im Vergleich zur Maus sind DRG der Ratte größer und einfacher aus dem Tier zu präparieren. Zudem sind *in vivo* Experimente an peripheren Nerven der Ratte deutlich einfacher durchzuführen, da die Strukturen in der Maus für einige Experimente, beispielsweise das Einsetzen von Nervenleitschienen im *Nervus ischiadicus* oder *Nervus medianus*, zu klein sind.

Periphere Neurokulturen lassen sich aus adulten, postnatalen oder pränatalen Tieren gewinnen. Pränatale und auch frühe postnatale DRG Neurone benötigen zum Überleben in Kultur die Zugabe von *Nerve Growth Factor* (NGF) (Burnham et al., 1972; Eichler und Rich, 1989). Je ausgereifter die Neurone in ihrem Entwicklungsstatus werden, desto weniger abhängig werden sie auch von NGF. Dodge *et al.* vermuten einen engen Zusammenhang mit den durch NGF aktivierten Signalwegen der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) und der Protein Kinase C (PKC) (Dodge et al., 2002).

Adulte DRG Neurone lassen sich ohne NGF kultivieren. Die Zugabe von NGF kann das Auswachsen von Neuriten in adulten DRG Kulturen beschleunigen, zum Überleben wird NGF jedoch nicht benötigt (Delree et al., 1989; Tanaka et al., 1990).

Die Entscheidung, ob für bestimmte Versuchsvorhaben adulte oder pränatale DRG Neurone verwendet werden sollen, muss individuell nach Beurteilung der jeweiligen Vor- und Nachteile getroffen werden. Die Zellisolation aus adulten DRG erbringt eine vergleichsweise geringe Zellausbeute und lässt sich für Versuchsvorhaben nicht realisieren, für die eine große Zellzahl nötig ist. Für Experimente in dieser Arbeit, in denen viele parallele Ansätze durchgeführt werden mussten, war eine große Zellausbeute essentiell. Die Verwendung pränataler Neurone erwies sich hier als vorteilhaft. Zudem benötigen adulte DRG Neurone mehr Zeit zum Anhaften und das Auswachsen von Neuriten kann erst einige Stunden später als bei pränatalen DRG Neuronen beobachtet werden. Im Hinblick auf eventuelle *in vivo* Versuche ist die Kultur adulter DRG Neurone ähnlicher zu der Situation im Tier, da die Neurone sich im selben Entwicklungsstadium befinden (Melli und Höke, 2009). Andererseits existieren Parallelen zwischen Regenerationsvorgängen und Vorgängen während der Embryogenese. Für Studien von Regenerationsvorgängen wie der peripheren Nervenregeneration kann die Verwendung von pränatalen DRG Neuronen somit repräsentativ sein (Levin, 2012; Sastry und Shukal, 2010). In dieser Arbeit wurden für die Analysen zum Effekt humaner Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen (hSGSCs) auf periphere Neurone sowohl adulte als auch pränatale DRG Neurone verwendet. Für weitere Experimente zu Medientestungen, Differenzierungs- und Zytokinanalysen, für die eine große Anzahl von Zellen benötigt wurde, dienten pränatale DRG Neurone.

Für die Isolation von einzelnen Neuronen aus DRG existieren verschiedenste Protokolle. Die meisten basieren auf einem enzymatischen Verdau der DRG mit den Enzymen Kollagenase, Dispase oder Trypsin (Hall, 2006; Kingham et al., 2011; Lindsay et al., 1991). Bei der

Etablierung des für diese Arbeit verwendeten Isolationsmediums war das Ziel, möglichst viele Einzelzellen zu gewinnen. Gleichzeitig sollte ein möglichst kurzes Isolations-Protokoll erprobt werden um die Zellen so kurz wie möglich dem Zellstress während des Enzymverdaus auszusetzen. Für adulte und pränatale DRG sollte das jeweils bessere Isolationsmedium gefunden werden. Für adulte DRG erfolgte nur mit einem Isolationsmedium aus Kollagenase in Kombination mit Dispase ein kompletter Verdau zu einer Einzelzellsuspension, nach einem Verdau mit Trypsin verblieben viele größere Zellaggregate. Für pränatale DRG konnte mit Trypsin eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Die Bindegewebsschichten adulter DRG sind deutlich stärker ausgeprägt als bei pränatalen DRG. Nach Entfernen der äußeren zugänglichen Bindegewebsschicht sind noch viele weitere Schichten zu durchdringen und aufgrund des größeren Durchmessers adulter DRG reichte ein Verdau mit Trypsin in diesem Fall nicht aus. Die Kombination von enzymatischem Verdau und mechanischer Zerkleinerung, wie sie auch standardmäßig in einem in der Fraunhofer EMB etablierten Isolationsprotokoll für Zellen aus Organen diverser Spezies eingesetzt wird, führte zu einer guten Durchmischung der Gewebesuspension während des Isolationsprozesses. In nur zwei enzymatischen Verdauenschritten von jeweils 10 Minuten und zwei mechanischen Zerkleinerungsschritten von jeweils einer Minute konnte für adulte und embryonale DRG gleichermaßen ein erfolgreiches, schnell durchführbares Isolationsprotokoll etabliert werden.

In vielen publizierten Arbeiten wird die gewonnene Zellsuspension zusätzlich aufgereinigt und von Kontaminationszellen wie Schwannzellen befreit. Hierzu eignet sich eine mehrwöchige Behandlung mit antimitotischen Agentien, welche die Proliferation von Schwannzellen hemmen (Liu et al., 2013) oder eine sequentielle Aussaat der Zellen, die auf dem schnelleren Anhaften von Schwannzellen im Vergleich zu Neuronen beruht (Lange et al., 2012).

Es muss jedoch immer überdacht werden, ob es die richtige Entscheidung ist, die Zellsuspension zu reinigen oder ob es für das geplante Versuchsvorhaben sinnvoll sein kann, die native Situation inklusive Schwannzellen zu erhalten. Die Myelinisierungsstudien in der Arbeitsgruppe um Freda Miller beispielsweise wurden mit DRG Kulturen durchgeführt, die zuvor durch die antimitotische Cytosin Arabinose aufgereinigt wurden (McKenzie et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Eliminierung von Schwannzellen vorgenommen. In den Ko-Kultur Experimenten herrschte somit die Zellzusammensetzung, wie sie auch *in vivo* vorzufinden wäre. Eine Reinigung von Myelinresten, also Material von abgestorbenen Schwannzellen, das zuvor die Neuriten umhüllt hat, wurde hingegen testweise auch in dieser

Arbeit vorgenommen. Eine Filterung durch eine 15 % BSA-Lösung wurde durchgeführt, allerdings zugunsten einer höheren Zellausbeute ohne die zusätzliche Filterung nicht in das Isolationsprotokoll aufgenommen. Die in der Zellsuspension schwimmenden Strukturen des Myelin stören besonders am Tag der Isolation und am Folgetag die Mikroskopie der Zellen und verhindern oft eine genaue Beurteilung des Isolationserfolges, einen beeinträchtigenden Effekt auf die Kultur selbst hat das Myelin aber nicht.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die *in vitro* Kultivierung von DRG ist die Wachstumsoberfläche. Auf den gängigen Zellkulturplastiken oder Glas-Objekträgern war ein Anhaften von adulten und pränatalen DRG Neuronen kaum möglich. Nur vereinzelt hafteten Zellen an der Oberfläche, ein Auswachsen von Neuriten war kaum zu beobachten. In vielen Publikationen wird eine Doppelbeschichtung mit Poly-Lysinen und Laminin beschrieben (Chierzi et al., 2005; Goldner et al., 2006; Lange et al., 2012; McKenzie et al., 2006). DRG Neurone exprimieren zwei funktionelle Integrine ( $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 3\beta 1$ ) auf ihrer Zelloberfläche, die als Lamininrezeptoren dienen (Tomaselli et al., 1993). Laminine sind als Bestandteil der extrazellulären Matrix auch bei Regenerationsvorgängen peripherer Nerven von großer Bedeutung, da sie Interaktionen zwischen Wachstumskegel des neu aussprossenden Axons und der noch bestehenden Matrix ermöglichen (Plantman et al., 2008). Wallquist *et al.* konnten sogar eine Hochregulierung bestimmter Integrine nach einer peripheren Nervenläsion des *Nervus ischiadicus* in der Ratte beobachten (Wallquist et al., 2004). Poly-L-Lysin oder Poly-D-Lysin sind Polykationen, die häufig zur Beschichtung von Zellkulturoberflächen verwendet werden (Greve et al., 2007; Mazia et al., 1975; Varoni et al., 2013). Sie erhöhen durch ihre positive Ladung elektrostatische Interaktionen zwischen der negativ geladenen Zelloberfläche und der Kulturoberfläche. Für die Kultur von DRG Neuronen ergibt sich durch die Doppelbeschichtung mit Laminin und Poly-L-Lysin eine attraktive Oberfläche mit Adhäsionsmolekülen und zusätzlicher positiver Ladung. In dieser Arbeit konnte auf dieser Doppelbeschichtung ein sehr gutes Anhaften von Neuronen und Auswachsen von Neuriten beobachtet werden (IV.1.2). Eine andere Möglichkeit hätte in der Einbettung der DRG Neurone in einer dreidimensionalen Matrix, beispielsweise einer Gelatineschicht, bestanden. Hierbei wäre ein frühes Ablösen der Zellen durch mechanische Faktoren wie das Transportieren der Kulturschale auszuschließen. In der dreidimensionalen Kultur jedoch wären Ko-Kultur Experimente erschwert oder sogar verhindert worden, da der parakrine Stoffaustausch aus der Matrix heraus möglicherweise nicht stattfinden könnte.

Zur quantitativen Analyse des Auswachsens von Neuriten wurde in dieser Arbeit eine spezielle Methodik etabliert und verwendet. Für alle Fragestellungen, die das Auswachsen von Neuriten aus einzelnen DRG Neuronen oder Explant Kulturen betreffen, ist die exakte Bestimmung der Neuritenlänge essentiell. Es besteht die einfache Möglichkeit Neuriten unter dem Durchlichtmikroskop zu vermessen. Diese Technik ist sehr unpräzise, insbesondere weil die Neuriten oft in verschiedene Richtungen auswachsen und einige der filigranen Strukturen auf diese Weise kaum sichtbar werden. Oft wird zur Quantifizierung der längste Neurit pro Zelle vermessen oder die Anzahl der Neuriten pro Zelle angegeben (Daud et al., 2012). Bei dieser Analyse wird jedoch die Gesamtheit der Länge aller Neuriten außer Acht gelassen und es kann zu ungenauen Ergebnissen kommen. Eine weitere Möglichkeit zur Messung der Neuritenlänge ist, eine invertierte schwarz-weiße Version eines Bildes zu generieren und den Anteil an weißen Pixeln pro definierte Fläche zu messen. Diese Methodik ist sehr gut geeignet um das Auswachsen von Neuriten aus einem DRG Explant zu analysieren (Akkradate Siriphorn et al., 2009). Für die Anwendung auf einzelne Neurone ist sie zu ungenau, da der Einfluss des Neuritendurchmessers einen zu großen Einfluss auf das Gesamtergebnis hat. Die Neuriten-Auswuchs Analyse mithilfe von VesSeg Tool, die in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde, ist sehr präzise in der Messung der Gesamt-Neuritenlänge (III.5.3). Ursprünglich wurde die Software für die Gefäßsegmentierung und -analyse entwickelt (Condurache et al., 2005; Condurache und Aach, 2005; Condurache und Mertins, 2012). Sie ermöglicht die Darstellung sehr dünner Strukturen und ist daher jeder einfachen Längenbestimmung anhand von Durchlicht- oder Fluoreszenzbildern vorzuziehen. Der Hysteresis-Schwellenwert-Algorithmus ermöglicht die Visualisierung aller Neuriten auf dem verwendeten Fluoreszenzbild, auch jene, die sehr dünn und daher auch sehr schwach im Signal sind. Der folgende Algorithmus zum Skelettieren der Neuriten gleicht Unterschiede im Durchmesser der Neuriten aus und ermöglicht eine genaue Auswertung der Neuritenlänge. Für die Messung der Gesamt-Neuritenlänge ist die Nutzung dieser beiden Algorithmen in Kombination mit einem Aussparen des Soma besonders gut geeignet und stellt eine präzise Technik zur Messung der Neuritenlänge bei einzelnen Neuronen dar.



## V.2. Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen für die zelluläre Unterstützung in der peripheren Nervenregeneration

Bei peripheren Nervenläsionen mit bis zu 2 cm Distanz zwischen proximaler und distaler Nervenendigung oder deutlicher Beschädigung der Hüllstrukturen kann eine Nervenleitschiene Einsatz finden. Mittlerweile sind verschiedene Nervenleitschienen von der *Food and Drug Administration* zugelassen worden. Sie unterscheiden sich in Material, Degradationszeit, Wanddurchmesser und Länge (Kehoe et al., 2012). Für die zelluläre Therapie von peripheren Nervenläsionen muss die Nervenleitschiene eine Biologisierung mit dem entsprechenden Zelltyp erlauben. Die innere Oberfläche der Leitschiene muss die Zelladhäsion ermöglichen. Alternativ können die Zellen mittels einer Trägersubstanz, beispielsweise ECM-ähnlichen *Scaffolds* in die Leitschiene eingebracht werden. Die Konstruktion von Nervenleitschienen, deren Lumen mit transfizierten Zellen besiedelt ist, wurde bereits in II.2.2 beschrieben. Der Vorteil eines solchen Systems ist, dass es theoretisch weiter ausgebaut werden kann, beispielsweise mit mehreren verschiedenen Faktoren, deren Genexpression zeitabhängig an- oder abgeschaltet werden kann und die dadurch in den verschiedenen Stadien der Regeneration wirksam sein kann. Je komplexer ein solches Wachstumsfaktor-System jedoch aufgebaut ist, desto anfälliger für Schwankungen und desto risikobelasteter ist es natürlicherweise und erschwert eine Übertragbarkeit auf den Einsatz im Menschen.

Das Ziel in dieser Arbeit war es Stammzellen, die aus dem Stroma von apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen gewonnen wurden, auf ihr Potential für die periphere Nervenregeneration zu untersuchen. Ein Fokus lag bei diesen Untersuchungen auch auf der Applikation der Zellen mittels Nervenleitschienen. Hierfür war es zunächst erforderlich mittels *in vitro* Analysen die Interaktionen der Stammzellen mit peripheren Nervenzellen zu untersuchen, die Wirkmechanismen zu charakterisieren und das therapeutische Potential mit anderen Quellen adulter Stammzellen zu vergleichen.

### V.2.1. Potential Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen für die periphere Nervenregeneration

Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen zeichnen sich zunächst durch ihre einfache und minimal-invasive Gewinnung aus. In dieser Arbeit wurde, wie auch von Petschnik *et al.* beschrieben (Petschnik et al., 2010) eine gleichmäßige Proliferation und stets eine Expression

von Nestin in über 80 % der Zellen nachgewiesen (siehe Anhang, Abb. 45 (VII.4.5)). Während aller durchgeführten Versuche konnten hSGSCs reproduzierbar für alle Analysen eingesetzt werden.

Für therapeutische Vorhaben könnte eine Achselbiopsie des Patienten ausreichen um in wenigen Wochen eine ausreichende Menge adulter multipotenter Stammzellen zu erhalten und im Rahmen einer Stammzellbank für den therapeutischen Einsatz zu lagern.

In indirekten Ko-Kulturen von hSGSCs und adulten sowie pränatalen peripheren Nervenzellen konnte ein signifikant erhöhtes Auswachsen von Neuriten beobachtet werden (Abb. 22, IV.3.1). Diese Daten deuten zunächst stark auf eine parakrine Wirkweise hin, da nur lösliche Faktoren die Membran der Ko-Kultur-Inserts durchdringen können. Der Einfluss von hSGSCs auf das Auswachsen von Neuriten aus adulten DRG Neuronen war mit einem Faktor 5,6 höher als der Einfluss auf pränatale DRG Neurone mit einem Faktor von 2,6 (Abb. 22, IV.3.1). In der Literatur wurden ähnliche Beobachtungen bisher nicht beschrieben, allerdings wurden auch in keinen zu diesem Zeitpunkt und Wissensstand bekannten Studien adulte und pränatale Neurone direkt miteinander verglichen. Es wurde entweder mit dem adulten oder mit dem pränatalen Organismus gearbeitet. Eine Begründung für den beobachteten Unterschied kann jedoch eine Betrachtung des allgemeinen Auswuchs-Verhaltens der Neuriten liefern. Das Anhaften sowie das Auswachsen erster Neuriten erfolgte bei pränatalen DRG Neuronen wesentlich schneller als bei adulten DRG Neuronen. Pränatale DRG Neurone hafteten innerhalb weniger Stunden an der Zellkulturoberfläche, das Auswachsen von Neuriten konnte bereits kurz danach beobachtet werden und am Folgetag zeigte bereits ein Großteil der Neurone deutliches Auswachsen von Neuriten. Adulte DRG Neurone hafteten erst am Folgetag der Präparation, so dass erst später ein Auswachsen von Neuriten möglich war. Viele Neuriten adulter DRG Neurone waren zum Zeitpunkt der Neuriten-Auswuchs-Analyse noch sehr kurz, wohingegen einige Neurone, vor allem in Ko-Kultur mit hSGSC, bereits sehr lange Neuriten zeigten. Der Längenunterschied war somit stärker ausgeprägt als bei pränatalen DRG, bei denen sich die individuelle Neuriten-Länge aufgrund des längeren Zeitraumes, in dem das Auswachsen möglich war, bereits leicht angeglichen haben kann. Eine reduzierte Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle in adulten im Vergleich zu pränatalen DRG Neuronen ist eine mögliche Erklärung dafür, dass das Anhaften von adulten DRG Neuronen nicht so erfolgreich und schnell erfolgte wie das von pränatalen DRG Neuronen (Bando et al., 2013; Plantman et al., 2008). Für folgende *in vivo* Studien mit hSGSCs an adulten Ratten sind

die Ergebnisse der Neuriten-Auswuchs-Analyse jedoch umso vielversprechender. Die ersten Anzeichen von Neuriten-Auswuchs im proximalen Segment können im Menschen bereits 24 h nach der Nervenverletzung verzeichnet werden (Burnett und Zager, 2004). Wenn von einem ähnlichen Effekt der Stammzellen wie dem *in vitro* beobachteten auch im *in vivo* Modell ausgegangen wird, so würde dieser einen wesentlichen Vorteil für ein beschleunigtes Neuritenwachstum bedeuten.

Eine weitere mögliche Erklärung für die stärkere Reaktion von adulten DRG Neuronen auf die Ko-Kultivierung mit hSGSCs im Vergleich zu pränatalen DRG Neuronen ist eine eventuell höhere Rezeptordichte auf der Zelloberfläche von adulten DRG Neuronen, mit der eine stärkere Reaktion auf wachstumsfördernde Zytokine im Umgebungsmedium erfolgen konnte.

Aus den beschriebenen Beobachtungen ergibt sich die Frage nach dem Wirkungsmechanismus von hSGSCs auf die peripheren Nervenzellen. Eine ähnliche Fragestellung ergab sich auch bei einer Studie zum Regenerationspotential von hSGSCs in der dermalen Wundheilung. In dieser Studie konnte ein positiver Einfluss der Stammzellen auf die Vaskularisierung in einem *in vivo* Vollhaut-Defekt nachgewiesen werden (Danner et al., 2012).

Es gibt zwei Hypothesen, wie hSGSCs diesen positiven Effekt ausüben können. Zum einen erhöhte sich die Zellproliferation und – migration in einer pro-angiogenetischen Umgebung, es wurde die Bildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet und die Expression des Endothelzellmarker vWF nachgewiesen. Auf diese Weise könnten hSGSCs die Geweberegeneration durch direkte Differenzierung in Gefäß-ähnliche Zellen (Endothelzell-ähnlich) verbessern. Die zweite Hypothese ist eine Wirkweise von hSGSC über parakrine Effekte. Die Stammzellen könnten über die Ausschüttung bestimmter Zytokine ein Regenerationsmilieu in der Wundregion schaffen. Diese Wirkweise wurde bereits zuvor für mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks beschrieben (Caplan und Dennis, 2006).

Für den unterstützenden Effekt von hSGSCs in der Regeneration peripherer Nerven sind prinzipiell auch beide Szenarien möglich: Eine direkte Differenzierung in neuronale oder Schwannzell-ähnliche Zelltypen oder eine Wirkweise über die Ausschüttung von neuroattraktiven Faktoren.

### V.2.2. Mögliche Wirkmechanismen Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen in der peripheren Nervenregeneration über Differenzierungsvorgänge oder parakrine Effekte

In weiteren Analysen zum Differenzierungsverhalten und zur Zytokinproduktion von hSGSC wurde genauer untersucht, worin die Ursache für den positiven Effekt von hSGSCs auf das Auswachsen von Neuriten liegen könnte. Im Fokus standen die oben bereits erwähnten Hypothesen, dass die Zellen entweder direkt in einen Neuronen- oder Schwanzzell-ähnlichen Zelltyp differenzieren oder Zytokine produzieren, die das Neuritenwachstum fördern. Zudem sollte in diesen Analysen untersucht werden, ob die Neurone in Ko-Kultivierung mit hSGSCs einen Einfluss auf die Genexpression oder die Zytokinproduktion der hSGSCs haben. In Differenzierungsanalysen mittels qPCR wurde die Differenzierung von hSGSCs nach einer Ko-Kultivierung mit DRG Neuronen untersucht. Der Fokus bei der Auswahl der Marker wurde auf Neuronen- oder Schwanzzell- assoziierte Markergene gelegt, aber auch endodermale und mesodermale Marker sowie der Proliferationsmarker Ki67 wurden untersucht. Zunächst wurde für hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium das basale Genexpressionslevel bestimmt (Abb. 24, IV.3.2). Diese Daten ermöglichen eine relative Einordnung, in welcher Größenordnung das jeweilige Gen in hSGSCs exprimiert wird und wie eine entsprechende Regulierung dieses Gens einzuschätzen ist. Diese Einschätzung bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass die mRNA Menge, die mittels qPCR nachgewiesen wird, mit der Protein-Menge korreliert. Viele posttranskriptionale Mechanismen können die absolute Menge einer mRNA auf dem Weg zum Protein verändern und es besteht keine Sicherheit, dass sich die mRNA Menge in einem *Steady-State* befindet oder durch einen Stimulus akut verändert wurde (Vogel und Marcotte, 2012).

Das Ko-Kultur Medium D<sup>-</sup>/N<sup>+</sup> bewirkte in den hSGSCs eine veränderte Expression vieler Markergene, wohingegen die Ko-Kultur mit DRG Neuronen keine zusätzliche Veränderung in der Expression bewirkte (Abb. 25, IV.3.2). Die Veränderung der Genexpression war besonders bei MBP (*Myelin Basic Protein*) sehr auffällig, dessen Expression durch das Ko-Kultur Medium etwa um den Faktor 7 erhöht wurde. MBP ist ein Hauptbestandteil der Myelinscheide von Oligodendrozyten und Schwanzzellen. Es ist bei Bildung und Aufrechterhaltung des Myelins beteiligt (Boggs, 2006; Lutz et al., 2014). Zusätzlich wurde die Expression von NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*) um mehr als den Faktor drei erhöht. Der Rezeptor des *Nerve Growth Factor* wird von Schwanzzellen während der Myelinisierung exprimiert (Fan und Gelman, 1992; Roberson et al., 1995). Sowohl MBP als auch NGFR wurden von hSGSCs im Vergleich zu

den anderen untersuchten Markern gering transkribiert, die Hochregulierung deutet allerdings dennoch auf eine Differenzierung in Schwanzzell-ähnliche Zellen hin. Es wurde ebenfalls eine Hochregulierung von LIF um etwa den Faktor 3 beobachtet. LIF spielt bei der Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen eine entscheidende Rolle und wird bei der Kultivierung von embryonalen und induzierten Stammzellen eingesetzt (Graf et al., 2011). Richards *et al.* konnten einen induzierenden Effekt von LIF auf die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zeigen (Richards et al., 1996). LIF spielt ebenfalls bei der Regeneration von Nervenschädigungen eine wichtige Rolle. Es wird von Schwanzzellen nach einer Nervenverletzung verstärkt produziert und wirkt wachstumsfördernd auf Neurone (Cafferty et al., 2001). Zudem induziert es die Expression von IL-6 und MCP-1, welche auch in den Zytokinanalysen (Abb. 28, IV.3.3) nachgewiesen wurden (Villiger et al., 1993). Gleichzeitig wurde auch der Rezeptor für LIF (LIFR) um den Faktor 1,8 hoch reguliert. LIF könnte somit auch auf autokrine Weise verstärkt Proliferations- und Differenzierungsfördernd wirken. Die verstärkte Expression von LIF in hSGSCs konnte bereits in einer vorherigen Studie durch die Ko-Kultivierung mit Rattenhirn-Biopsien beobachtet werden (Elsner, 2012).

Gleichzeitig wurde Nestin um etwa den Faktor 2 hoch reguliert, dessen Rolle bei der Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen (Park et al., 2010) sowie als Proliferationsmarker bekannt ist (Namiki und Tator, 1999; Suzuki et al., 2010). Die Hochregulierung von LIF und Nestin lässt darauf schließen, dass sich die Zellen in einem proliferativen Zustand befinden, obwohl der Proliferationsmarker Ki67 nicht hoch, sondern leicht herunter reguliert wurde. Die verstärkte Transkription von Nestin, sowie das um den Faktor 2 erhöhte NFL, ein wichtiges filamentäres Strukturprotein von Neuronen (Yuan et al., 2012) deuten auf eine neuronale Differenzierung von hSGSCs hin. Die anderen beiden Neurofilamente M und H wurden nicht verstärkt exprimiert, NFM sogar herunterreguliert. In Neuronen ko-polymerisieren die drei Neurofilamente NFH, NFM und NFL um das endgültige strukturbildende Filament zu bilden (Carter et al., 1998). Es könnte vermutet werden, dass es in nicht-neuronalen Zellen zu einer partiellen Hochregulierung der Neurofilamente kommen kann, ohne dass eine funktionelle Einheit ausgebildet wird. Fabrizi et al. konnten beispielsweise in ihren Studien eine transiente Expression von NFL und NFM in Schwanzzellen verzeichnen (Fabrizi et al., 1997). Diese Hochregulierung könnte auch auf Differenzierungsvorgänge hindeuten. In einer indirekten Ko-Kultivierung mit Rattenhirn-Biopsien konnten hSGSCs bereits in die neuronale Richtung differenziert werden (Petschnik,

2011). In dieser Studie wurde die Genexpression von NFL und NFM um den Faktor 4 bzw. 7 erhöht, NFH jedoch nur sehr gering.

Bei den Markern für endodermale und mesodermale Differenzierung zeigte sich keine eindeutige Tendenz. Der mesodermale Marker AP wurde hoch, der mesodermale Marker alpha SMA herunterreguliert. Der endodermale Marker Amylase wurde hochreguliert, während der endodermale Marker vWF unverändert exprimiert wurde. Zur endodermalen und mesodermalen Differenzierungskapazität von hSGSCs nach Kultur in Ko-Kultur Medium oder in Ko-Kultur mit DRG Neuronen lässt sich keine eindeutige Aussage treffen.

Morphologisch veränderten sich hSGSCs, die in Ko-Kultur Medium kultiviert wurden und bei denen sich viele Regulierungen auf Genexpressionsebene verzeichnen ließen, nicht erkennbar. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den zuvor durchgeführten Analysen zur metabolischen Aktivität, die mit Zellvitalität korreliert, in den entsprechenden Zellkulturmedien, in denen das Medium  $D^-/N^+$  zum Ko-Kultur Medium bestimmt wurde (IV.2.1).

Die beobachteten Veränderungen in der Genexpression lassen insgesamt darauf schließen, dass durch das Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  Differenzierungsvorgänge in hSGSCs induziert wurden. Diese Veränderung in den hSGSCs lässt vermuten, dass sich auch das Profil produzierter Zytokine verändert hat. Gerade in Bezug auf die indirekte Ko-Kultur mit DRG Neuronen ist die Untersuchung des Zytokin-Sekretionsprofils von Bedeutung. Bestimmte Zytokine könnten Regenerationsvorgänge begünstigen und somit sowohl für die in dieser Arbeit untersuchte periphere Nervenregeneration als auch für die dermale Wundheilung von Bedeutung sein.

Zunächst wurde mit einem membranbasierten Array von R&D Systems das basale Zytokin-Profil von hSGSCs bestimmt (IV.3.3). Die basale Zytokinproduktion wurde in einem späteren Versuch auch mit einem weiteren Zytokin-Array untersucht (IV.4.3). Beide Analysen wurden an dieser Stelle gemeinsam zusammengestellt um eine Übersicht darüber zu schaffen, welche Zytokine hSGSCs in Kultur mit Standard-Zellkulturmedium produzieren und welchen Effekt sie im Rahmen einer Therapie haben können. Hierbei sollte nicht nur die Therapie peripherer Nervenläsionen im Vordergrund stehen, sondern ebenso die Therapie dermalen Wunden. Im Anhang in Tabelle 5 (VII.4.4) sind alle in den Arrays detektierten Zytokine mit in entsprechender Literatur angegebenen Funktionen und Effekten aufgelistet.

Durch eine Kultivierung in Ko-Kultur Medium ( $D^-/N^+$ ) wurde die Sekretion von Gro  $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 gesteigert. Die zusätzliche Ko-Kultur von DRG Neuronen hatte keinen zusätzlichen signifikanten Effekt auf die Zytokinproduktion. Für Serpin E1 konnte keine veränderte Zytokinproduktion nachgewiesen werden, da die Intensität der Spots in der Sättigung lag.

Der Serinprotease-Inhibitor Serpin E1, welcher von hSGSC verglichen zu den anderen detektierten Zytokinen sehr stark produziert wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, wo es durch die Inhibierung von tPA (*tissue-type plasminogen activator*) und uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) die Fibrinolyse reguliert (Cale und Lawrence, 2007). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Serpin E1 von olfaktorischen *ensheathing glia* exprimiert wird (Simón et al., 2011). Diese Zellen haben für olfaktorische Neurone dieselbe Funktion wie Schwannzellen für periphere Nerven. Serpin E1 zeigte eine wichtige Funktion bei der Regeneration von retinalen Ganglienzellen und könnte daher auch für die Regeneration von DRG Neurone eine fördernde Wirkung haben.

Gro  $\alpha$ , auch als CXCL1 bekannt, spielt neben seiner Rolle bei der Migration von Immunzellen auch eine wichtige Funktion bei der Proliferation und Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Filipovic et al., 2003). Oligodendrozyten sind die Gliazellen des ZNS, wie es die Schwannzellen für das PNS sind. Die stärkere Produktion von Gro  $\alpha$  in hSGSCs würde damit auch im Einklang mit der zuvor beobachteten Differenzierung in die Schwannzell-ähnliche Richtung stehen.

Die Produktion von IL-8 wurde ebenfalls durch die Kultur mit Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  hochreguliert. Es wirkt durch Förderung von Proliferation und Migration der Epithelzellen pro-angiogenetisch und verbessert die dermale Wundheilung (Rennekampff et al., 2000). Neben einem positiven Effekt auf die Wundheilung könnte eine verbesserte Angiogenese auch nach einer peripheren Nervenläsion von Vorteil sein, da sich zahlreiche neue Gefäße bilden müssen um den sich neu ausbildenden Nerven auch innerhalb der vielen Bindegewebshüllen mit Nährstoffen zu versorgen.

Die Sekretion von MCP-1 wurde ebenfalls durch das Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  erhöht. MCP-1 wirkt chemoattraktiv auf Monozyten (Gibran et al., 1997) und T-Lymphozyten (Carr et al., 1994). Von Taskinen und Røytta wurde nachgewiesen, dass MCP-1 auch von Schwannzellen etwa 6 Stunden nach einer peripheren Nervenläsion exprimiert wird, anschließend wurde die Expression auch in rekrutierten Makrophagen und Endothelzellen nachgewiesen (Taskinen und Røytta, 2000). Die Expression von MCP-1 durch hSGSC würde in dem Areal der

Nervenläsion die physiologischen Vorgänge somit zusätzlich fördern können und unterstützt auch die Vermutung, dass hSGSCs in einen Schwanzzell-ähnlichen Zelltypen differenzieren könnten.

Ein Faktor, der durch die Ko-Kultur mit DRG Neuronen im Vergleich zur Kultur in  $D^+$  und  $D^-/N^+$  signifikant weniger sezerniert wurde, ist SDF1 (*Stromal cell-derived factor 1*). Zwischen der Kultur in  $D^+$  und  $D^-/N^-$  zeigte sich kein Unterschied. SDF1, auch als CXCL12 bekannt, ist dafür bekannt während der Embryogenese und bei Regenerationsvorgängen die Migration von Stammzellen zu steuern (Lau und Wang, 2011). Das so genannte *homing* von Stammzellen beispielsweise in der Wundregion ist ein wichtiger Vorgang für folgende Regenerationsprozesse. In dem hier simulierten Fall, in dem Stammzellen direkt in die regenerierende Region appliziert werden, ist ein solches *homing* nicht erforderlich.

In einer Publikation von Danner *et al.* (Danner et al., 2012) wurden hSGSCs für den Einsatz in der dermalen Wundheilung auf eine dreidimensionale Matrix ausgesät und auf die produzierten Zytokine untersucht. Es konnten Zytokine nachgewiesen werden, die auch in dieser Arbeit in zweidimensionaler Kultur detektiert wurden (PAI-1, Pentraxin 3, Thrombospondin-1, IGFBP-3, IL-8, VEGF und CD26). Ebenfalls wurden in der Masterarbeit von Martina Elsner an der Fraunhofer EMB Zytokinanalysen zum Vergleich von hSGSCs und Stammzellen aus der Vollhaut durchgeführt (Elsner, 2012). In diesen Analysen, die ebenso auf der zweidimensionalen Kultivierung von hSGSCs basierten, wurden Serpin E1, IGFBP-3, Gro  $\alpha$ , IL-8, MCP-1 und VEGF detektiert.

In den verschiedenen Zytokinanalysen mit unterschiedlichen Zytokin-Arrays, die jeweils unterschiedlichen Fragestellungen dienten, wurden viele übereinstimmende Zytokine nachgewiesen, die von hSGSCs produziert wurden, und die Untersuchungen somit validiert.

Insgesamt ließ sich in den durchgeführten Differenzierungs- und Zytokinanalysen ein positiver Einfluss des Ko-Kultur Mediums auf hSGSCs verzeichnen. Die erhöhte Genexpression einiger der untersuchten Marker und die verstärkte Produktion einiger der untersuchten Zytokine unter Einfluss des Ko-Kultur Mediums zeigten, dass eine Vorkonditionierung der hSGSCs in  $D^-/N^+$  vor einem potentiellen *in vivo* Einsatz vorteilhaft sein könnte. Differenzierungsvorgänge in den Zellen könnten besonders für die zelluläre Unterstützung bei der peripheren Nervenregeneration von entscheidendem Nutzen sein. In einer Applikation mittels Nervenleitschienen könnten hSGSCs durch einen protektiven und proangiogenetischen Effekt die Wirkung nativer Schwanzzellen unterstützen.



### V.2.3. Vergleich des Potentials Schweißdrüsen-abgeleiteter Stammzellen mit anderen adulten Zelltypen

Als unterstützender Zelltyp in Nervenleitschienen während der peripheren Nervenregeneration kommen zunächst Schwanzzellen in Betracht. Bei Nervenverletzungen unterstützen Schwanzzellen die Regenerationsvorgänge, sie bilden die Hanken-Bünger-Bänder, phagozytieren Myelinreste, rekrutieren Makrophagen zur Stelle der Verletzung und produzieren neurotrophe Faktoren, die den geschädigten Nerven beim Wachstum unterstützen (Svennigsen und Dahlin, 2013). Falls in eine periphere Nervenläsion eine Nervenleitschiene eingesetzt wird, können autologe Schwanzzellen in diese eingebracht werden um in größerer Anzahl vorhanden zu sein und um näher an die neu auswachsenden Nervenendigungen herangebracht zu werden. In vielen Studien lieferten Schwanzzellen, die in Nervenleitschienen eingebracht wurden, sehr gute Ergebnisse für die periphere Nervenregeneration (Berrocal et al., 2013; Evans et al., 2002; Hood et al., 2009; Udina et al., 2004). Problematisch ist die dafür notwendige Isolation der Zellen aus dem Patienten, für die genau wie für das autologe Nerventransplantat ein Stück eines anderen Nerven entnommen werden muss, und die Expansion und Aufreinigung der Zellen, die oft mehrere Wochen in Anspruch nimmt (Mosahebi et al., 2001; Niapour et al., 2010).

Zur Umgehung der Problematik einer Nervenbiopsie, die bei einer autologen Nerventransplantation oder auch bei einer Entnahme von Schwanzzellen notwendig ist, wurden von vielen Forschungsgruppen bereits alternative Zellquellen für den Einsatz in der peripheren Nervenregeneration untersucht. Die im Kontext der Isolation, Expansion und Transplantation am besten charakterisierten adulten Zellen sind mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs = *Bone Marrow Stem Cells*) (Le Blanc und Ringdén, 2007). Sie lassen sich in Neuronen-ähnliche Zellen (Yim et al., 2007) und in Schwanzzell-ähnliche Zellen differenzieren (Wakao et al., 2010). Ao et al. siedelten aus BMSCs gewonnene Schwanzzellen auf Chitosan-Nervenleitschienen und analysierten ihren Effekt auf das Auswachsen von Neuriten im Tiermodell Ratte (Ao et al., 2011). Toluidinblau gefärbte Nervensegmente zeigten einen signifikant höheren Anteil myelinisierter Neuriten durch die Anwesenheit der aus BMSCs gewonnenen Schwanzzell-ähnlichen Zellen. Auch Fett-abgeleitete Stammzellen können relativ leicht gewonnen werden. Sie zeigten bereits eine Differenzierung in einen Schwanzzell-ähnlichen Phänotyp und eine Förderung der peripheren Nervenregeneration (Liu et al., 2011; Radtke et al., 2009; di Summa et al., 2010). Mit dem Fokus auf eine einfache

Zugänglichkeit der Zellen können auch aus Vollhautbiopsien multipotente Stammzellen gewonnen werden. McKenzie *et al.* sowie Biernaskie und Miller beschrieben Haut-abgeleitete Vorläuferzellen als gut zugängliche Zellquelle für die Myelinisierung von zentralen und peripheren Nerven (Biernaskie und Miller, 2010; McKenzie *et al.*, 2006).

Eine alternative Zellquelle, die an dieser Stelle erwähnt werden soll, sind induziert pluripotente Stammzellen (iPS). Takahashi und Yamanaka gelang es 2006 erstmals adulte Fibroblasten der Ratte durch retrovirale Transduktion mit vier Faktoren (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) in einen pluripotenten Status zu reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Ein Jahr später gelang diese Reprogrammierung auch für humane dermale Fibroblasten (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Für die Patienten-spezifische Therapie sind iPS vielversprechend und ihr Potential wurde auch für die periphere Nervenregeneration bereits bestätigt (Uemura *et al.*, 2012). Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit zur Teratombildung im Tiermodell (Gutierrez-Aranda *et al.*, 2010) und somit ungewissen Entwicklung im humanen Organismus besteht der Haupteinsatz von iPS bisher in der Entwicklung patientenspezifischer Testsysteme (Grskovic *et al.*, 2011).

Für hSGSCs konnte in dieser Arbeit eine Differenzierung in einen Schwannzell-ähnlichen Zelltypen vermutet werden. Weiterführende Untersuchungen, beispielsweise zur Produktion spezifischer Proteine oder auch Myelinisierungs-Experimente, wie sie von McKenzie *et al.* durchgeführt wurden (McKenzie *et al.*, 2006), könnten diese Vermutung stützen. Ebenso könnte durch gezielte Differenzierung versucht werden, die Schwannzell-Ähnlichkeit von hSGSCs zusätzlich zu erhöhen. Differenzierungsmedien mit den Zusätzen Forskolin, bFGF (*basic fibroblast growth factor*), *All-trans retinoic acid* und BDNF könnten die Differenzierung in die Schwannzell-Richtung unterstützen (Gao *et al.*, 2015).

Insgesamt lässt sich im Hinblick auf die entsprechende Literatur zusammenfassen, dass adulte multipotente Stammzellen großes Potential besitzen die periphere Nervenregeneration zu unterstützen. Dabei können sie entweder in einen Schwannzell-Phänotyp oder in einen neuronalen Phänotyp differenzieren oder über die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu Regenerationsprozessen beitragen.

Besonders im Hinblick auf eine einfache Zugänglichkeit der Zellen stellen sich hSGSCs als unterstützender Zelltyp für die periphere Nervenregeneration besonders vielversprechend dar. Ein direkter Vergleich mit anderen adulten Stammzellen in Bezug auf die Wirksamkeit ist allein aufgrund der verschiedenen Auswertungsverfahren und Modellsysteme nicht möglich.

Ein *in vivo* Versuch ist zudem notwendig um den Nutzen von hSGSCs für die Regeneration peripherer Nerven zu bestätigen.

### V.3. Serum- und Serumersatz-freie Kultivierung von hSGSCs

Nach der Kultur von hSGSCs in Ko-Kultur Medium ( $D^-/N^+$ ) anstelle des Standard-Zellkulturmediums  $D^+$  wurde ein verändertes Genexpressionsprofil und eine teilweise veränderte Produktion von Zytokinen nachgewiesen. Für weitere Vorhaben mit hSGSC, eventuell auch im Hinblick auf einen potentiellen *in vivo* Einsatz der Stammzellen, wurde die Ursache für die durch das Medium hervorgerufenen Veränderungen genauer untersucht. Diese Untersuchungen sind gerade in Bezug auf eine Reproduzierbarkeit von *in vitro* Ergebnissen in der *in vivo* Situation von Bedeutung. Es ist bekannt, dass Zellen bei der Inkulturnahme, die letztlich einen Wechsel von einer 3D Kultur in eine 2D Kultur und eine Herauslösung der Zellen aus dem Zellverbund bedeutet, viele Veränderungen erfahren (Frahm, 2014). Es muss bei *in vitro* Analysen grundsätzlich bedacht werden, dass beobachtete Prozesse nicht den physiologischen Prozessen entsprechen müssen. Umgekehrt regulieren Zellen möglicherweise *in vitro* bestimmte simulierte Prozesse, *in vivo* jedoch nicht. Es sollte für jede Fragestellung nach Betrachtung der Umgebungsparameter abgeschätzt werden, welche Faktoren einen Einfluss auf die Zellen nehmen können. Dabei spielt beispielsweise die Oberfläche oder die Matrix, auf der die Zellen wachsen, eine Rolle, aber auch die zusätzlichen Wachstumsfaktoren, die in der Umgebung der Zellen vorhanden sind. Nährstoffe und zusätzliche Faktoren im Medium, das den Zellen in der *in vitro* Kultur angeboten wird, nehmen einen großen Einfluss darauf, wie sich die Zellen entwickeln, ob sie differenzieren oder ob sie überhaupt in Kultur proliferieren (Gong et al., 2009; Harmouch et al., 2013; Huber et al., 2015; Stern-Straeter et al., 2014). Zudem muss bedacht werden, dass tierische Zusätze wie FKS aufgrund von Sicherheitsbedenken für therapeutische Vorhaben nicht verwendet werden dürfen. Zellen, die *in vitro* stets mit FKS kultiviert wurden, dürfen somit nicht direkt *in vivo* Einsatz finden. Ein Wechsel von einer Kultivierung mit FKS in eine serumfreie Kultur oder eine Kultur mit Serumersatz ist nötig, diese jedoch kann in den Zellen wiederum Veränderungsprozesse im Proliferations-, Sekretions- oder Differenzierungsverhalten auslösen (Page et al., 2014; Yokoyama et al., 2008). Aus diesen Gründen kann es vorteilhaft sein, bereits bei *in vitro* Versuchen auf den Zusatz von Serum zu verzichten um das Verhalten der Zellen unter diesen Umständen zu beobachten.

Die Kultur von hSGSCs erfolgt standardmäßig in DMEM mit dem Zusatz von 10 % FKS. Unter diesen Bedingungen proliferieren die Zellen gut und einige der Zellen differenzieren spontan in Zellen aller drei Keimblätter (Petschnik et al., 2010). Für einen therapeutischen Einsatz von hSGSCs würden diese serumfrei oder mit Serumersatz kultiviert werden müssen, bevor sie beispielsweise in eine Nervenleitschiene eingebracht werden. Auch dort würden sie zunächst mit einer Unterversorgung an Nährstoffen konfrontiert sein, da das Areal, in das die Zellen eingebracht werden, noch nicht mit Blutgefäßen versorgt ist.

In IV.3.2 und IV.3.3 wurde ersichtlich, dass eine Kultur in Ko-Kultur Medium ( $D^-/N^+$ ), in dem kein FKS, dafür aber B-27 als Serumersatz vorhanden war, in hSGSCs Veränderungen in Differenzierungsverhalten und Zytokinproduktion hervorruft. In B-27 sind Vitamine, Proteine und andere Zusätze enthalten (Liste siehe Anhang VII.4.3). Die Komposition von FKS kann niemals klar definiert sein, da es je nach Charge vielen Schwankungen in der Zusammensetzung unterliegt. FKS liefert ein breites Spektrum an Makromolekülen, Transportproteinen für lipide Substanzen, Spurenelementen, Bindungsproteinen, Anheftungsfaktoren, niedermolekularen Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren (Gstraunthaler, 2003). Es liegt nahe, dass FKS eine größere Vielfalt von Faktoren beinhaltet als B-27, jedoch kann ein genauer Vergleich aufgrund fehlender Information zu den Bestandteilen im FKS nicht stattfinden. In den Versuchen in IV.3.2 und IV.3.3 wurde das Neurobasal Medium, dem B-27 zugefügt wurde, 1:1 mit DMEM gemischt, die Konzentration von B-27 wurde somit nochmals halbiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den Kulturen mit Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$  ein Verlust an wachstumsfördernden Inhaltsstoffen im Vergleich zur Kultur in  $D^+$  herrscht. Die verstärkte Differenzierung und die teilweise veränderte Produktion von Zytokinen könnte ihre Ursache darin finden. Diese Hypothese wurde in IV.4 überprüft, indem hSGSCs Serum- und Serumersatz-frei kultiviert wurden. In einem Vorexperiment wurde bereits in verschiedenen Ansätzen auf einzelne Komponenten des  $N^+$  verzichtet. Es zeigte sich in allen Ansätzen, in denen sowohl FKS als auch B-27 fehlten, eine stärkere Hochregulierung einiger der getesteten Marker (Anhang VII.4.6). In den Differenzierungsanalysen in IV.4.1 wurden diese Beobachtungen bestätigt. Die in Serum- und Serumersatz-freiem  $D^-/N^-$  kultivierten hSGSCs exprimierten die Markergene MBP, vWF, Amylase, Map2, PGP9.5 und NSE verstärkt, wobei die Erhöhung der MBP Expression um den Faktor 19 besonders auffällig war. Die starke Expression dieses für Schwannzellen und Oligodendrozyten charakteristischen Markers (Brenner et al., 1986) lässt eine Differenzierung

der hSGSCs in diese Richtung vermuten. Während einer peripheren Nervenläsion wäre eine Funktion von hSGSCs als Schwannzell-ähnlicher Zelltyp von großem Vorteil. Von McKenzie *et al.* konnte bereits für Haut-abgeleitete Vorläuferzellen nachgewiesen werden, dass sie eine myelinisierende Funktion für Neurone übernehmen können (McKenzie *et al.*, 2006). Map2 und NSE sind neuronale Marker und ihre höhere Genexpression deutet auf eine Differenzierung in einen Neuronen-ähnlichen Zelltyp hin (Dehmelt *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2003). Hierfür spricht auch die in IV.4.4 beobachtete Proteinexpression von b3T und PGP9.5. Die verstärkte Expression von vWF und Amylase durch die Kultur in  $D^-/N^-$  gibt Hinweise auf eine endodermale Differenzierung. Eine solche Richtung kann für die dermale Wundheilung von Bedeutung sein, wenn hSGSCs Gefäß-ähnliche Strukturen ausbilden würden. Beobachtungen zur Bildung Gefäß-ähnlicher Strukturen von hSGSCs wurden von Danner *et al.* gemacht (Danner *et al.*, 2012). Die Expression von Ki67 wurde stark herunter reguliert, was eine deutlich geringere Proliferation von hSGSCs unter dem Einfluss von  $D^-/N^-$  bedeutet. Diese Beobachtung wurde auch in der Immunfluoreszenzfärbung in IV.4.4 bestätigt. Die Nestin-Expression, die ebenfalls einen Hinweis auf Proliferation gibt, wurde durch  $D^-/N^-$  jedoch nicht beeinflusst. In dem Ko-Kultur Medium  $D^-/N^+$ , in dem B-27 enthalten ist, wurde die Expression erhöht (IV.3.2). Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen ohne Serum oder Serumersatz kaum proliferieren. Diese Folgerung wurde in der Zeitraffermikroskopie bestätigt (Abbildung 31, IV.4.2). Während hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium stark proliferierten und konfluent wurden, zeigten sie in  $D^-/N^-$  keine Proliferation. Sie änderten ihre Morphologie zu einer abgerundeten Zellform.

Zusätzlich wurde untersucht, ob Neurobasal als Teil des Grundmediums einen Einfluss auf die Genexpression von hSGSCs hat. Die Ergebnisse in 0 schließen einen deutlichen Einfluss aus, jedoch konnte ein geringer Effekt des Neurobasal auf die Expression von vWF, AP und NFM festgestellt werden. In der Zeitraffer-Mikroskopie proliferierten Zellen, die in  $D^-$  kultiviert werden, genauso wenig wie in  $D^-/N^-$  kultivierte Zellen und wiesen ebenso eine abgerundete Morphologie anstelle der spindelförmigen Morphologie auf.

Die morphologischen Veränderungen von hSGSC in Kultur mit  $D^-/N^-$  und  $D^-$  wurden in IV.4.2 für 16 Tage beobachtet. In dieser Zeit veränderte sich das Verhalten der Zellen in ihren jeweiligen Medien nicht. In Standard-Zellkulturmedium kultivierte hSGSCs proliferierten weiter bis zur Konfluenz und wurden tendenziell immer länglicher in ihrer Form. In  $D^-/N^-$  und  $D^-$  kultivierte hSGSCs proliferierten nicht und behielten ihre abgerundete Morphologie

(Abb. 32, IV.4.2). Eine entscheidende Beobachtung war, dass die nicht-proliferativen Zellen nicht abstarben. Während der 16 Tage konnten kaum tote Zellen in der Kultur entdeckt werden.

In IV.3.3 wurde die Produktion einiger Zytokine durch die Kultur in  $D^-/N^+$  erhöht. Wenn eine leichte Reduktion zusätzlicher wachstumsfördernder Zusätze im Vergleich zur Standardkultur in  $D^+$  diesen Effekt zeigt, so könnte ein kompletter Entzug dieser Zusätze den Effekt zusätzlich verstärken. In IV.4.3 wurde die Zytokinproduktion von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium  $D^+$  und in Serum- und Serumersatz-freiem  $D^-/N^-$  mit dem Zytokin-Array *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* bestimmt. Alle der nachgewiesenen Zytokine ergaben nach Kultivierung in  $D^-/N^-$  ein schwächeres Signal. Die Produktion von Zytokinen wurde durch den Mangel zusätzlicher wachstumsfördernder Zusätze herunter reguliert.

Als Fazit lässt sich nach dieser Untersuchung zusammenfassen, dass hSGSCs in dem Standard-Zellkulturmedium gut proliferieren und eine spindelförmige, längliche Morphologie aufweisen. Sobald den Zellen die zusätzlichen wachstumsfördernden Zusätze aus B-27 oder FKS entzogen werden, reagieren sie mit einem Einstellen ihrer Proliferation und einer verstärkten Differenzierung. Besonders die neuronale, endodermale und Schwannzell-ähnliche Richtung kann aufgrund der Datenlage vermutet werden. Die Produktion von Zytokinen wird reduziert. Begleitet werden diese Vorgänge von einer morphologischen Veränderung der Zellen zu einer abgerundeten Zellform.

Croft und Przyborski beschrieben in ihrer Publikation die Bildung von Neuronen-ähnlichen Zellen aus Stammzellen des Knochenmarks unter serumfreien Konditionen (Croft und Przyborski, 2006). Sie beobachteten die Expression neuronaler Proteine und die Ausbildung einer neuronalen Morphologie. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass die Veränderungen in den Stammzellen nicht der typischen Neurogenese entsprechen. Die Autoren vermuteten den neuronalen Phänotyp als Resultat des Wechsels aus der Stammzellnische in eine 2D Kultur und dem damit verbundenen Zellstress. In weiteren Studien wurde ebenfalls ein Effekt des Serumentzugs auf die neuronale Differenzierung beschrieben (Pacherník et al., 2005; Wislet-Gendebien et al., 2003). Von Potier *et al.* und Zhu *et al.* wurde die Kombination von Hypoxie und Serumentzug, wie sie beispielsweise nach einer Zelltransplantation ins Herz vorliegt, als Apoptose-auslösend beschrieben (Potier et al., 2007; Zhu et al., 2006).

Die Beobachtungen, die in dieser Arbeit zu Differenzierungsvorgängen und Zytokinproduktion von hSGSCs nach der Reduktion von zusätzlichen wachstumsfördernden Faktoren gemacht wurden, sollten dennoch kritisch beurteilt werden. Durch die *in vitro* Analysen ließen sich erste Hinweise auf ein *in vivo* Verhalten der Zellen erhalten, welches sie unter Nährstoff- und Wachstumsfaktormangel nach Einsetzen in eine Nervenleitschiene zeigen könnten. Es kann jedoch nicht vorhergesagt werden, welchen genauen Umgebungsparametern die Zellen innerhalb der Leitschiene tatsächlich begegnen. Falls die ersten Neuriten neu auswachsen und Schwanzzellen zu proliferieren beginnen, könnte es schnell zu einem Anstieg von zusätzlichen Faktoren kommen, die bis in das Innere der Nervenleitschiene Wirkung zeigen und einen Einfluss auf hSGSCs nehmen könnten, der unmöglich *in vitro* vorhergesagt werden kann.

Die Erkenntnisse, die aus den erfolgten *in vitro* Analysen gewonnen wurden, können genutzt werden um einen *in vivo* Versuch bestmöglich und sinnvoll durchzuführen. In IV.4.2 konnte gezeigt werden, dass hSGSCs, die nach der Kultur in Serum- und Serumersatz-freiem Medium (D<sup>-</sup>/N<sup>-</sup>) kultiviert worden sind und eine nicht proliferative Population mit abgerundeter Zellmorphologie ausgebildet haben, wieder neu ausgesät werden können. Dieser Versuch zeigt, dass hSGSCs vor der Transplantation in eine periphere Nervenläsion vorbehandelt werden können um eine gewünschte veränderte Genexpression und Zytokinproduktion zu erhalten. Sie würden nach dieser Behandlung mit wachstumsfaktorarmem Medium wieder adhären und auch *in vivo*, sollte dort ein Mangel an diesen Faktoren herrschen, überleben. In der Fraunhofer EMB wurden hSGSCs bereits unter hypoxischen Bedingungen (2 % O<sub>2</sub>) kultiviert und zeigten dabei ein gutes Proliferationsverhalten und eine verstärkte Ausschüttung von VEGF (Elsner, 2012). In anderen Arbeitsgruppen wurde eine Induktion der Zytokinproduktion durch Hypoxie in mesenchymalen Stammzellen (Razban et al., 2012) und in Fett-abgeleiteten Stammzellen (Chung et al., 2009) beobachtet. Es kann vermutet werden, dass innerhalb einer Nervenleitschiene ebenfalls hypoxische Bedingungen herrschen und die hSGSCs zumindest vorübergehend mit vermindertem Sauerstoffgehalt überleben müssen. In weiteren Versuchen könnte eine Untersuchung mit gleichzeitiger Reduktion von wachstumsfördernden Zusätzen und Sauerstoffgehalt durchgeführt werden um die mögliche *in vivo* Situation noch besser zu simulieren.

#### V.4. Besiedelte Nervenleitschienen für die periphere Nervenregeneration

Die Experimente, die in dieser Arbeit zur Charakterisierung von hSGSCs durchgeführt wurden, zielten auf einen potentiellen therapeutischen Einsatz in der peripheren Nervenregeneration ab. Nach *in vitro* Analysen zum Verhalten der Zellen, beispielsweise unter reduziertem Serumangebot oder anschließender Neu-Aussaat, sollte als nächster Schritt eine Möglichkeit gefunden werden die Zellen in die Nervenläsion einzubringen. Dabei wurde zunächst bewusst nicht auf kommerziell erwerbliche Produkte zurückgegriffen, die eine Röhrenstruktur bieten. Eine Röhre kann entweder nur an den Wänden besiedelt werden oder mit einer zweiten Matrix, beispielsweise einem Kollagengel, Matrigel oder Fibrin, gefüllt werden, in der die Zellen eingebracht sind.

Optimal ist ein Material, das vielfältig und nach Bedarf modifiziert werden kann. Zukünftig sollten die Nervenleitschienen mit intraluminalen Strukturen hergestellt werden, welche das Hindurchwachsen von Neuriten begünstigen. Ebenfalls ist ein Druckverfahren denkbar, in dem die Stammzellen direkt bei der Herstellung mit in das Biomaterial eingearbeitet werden. In der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie aus dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig (Kooperationspartner: Dr. Michael C. Hacker und Caroline Kohn) werden Kollagen-basierte, quervernetzte Hydrogele hergestellt. Die freien Aminogruppen des Proteins reagieren dabei mit intakten Anhydrid-Funktionen des artifiziellen Quervernetzers. Dadurch können Vernetzungsgrade moduliert und verschiedene strukturelle Eigenschaften erhalten werden (Loth et al., 2014). Des Weiteren bietet das Material die Möglichkeit, Signalmoleküle kovalent zu integrieren um somit die Zelladhäsion zu verbessern und physiologische Prozesse während der Nervenregeneration zu unterstützen. Laufende Experimente dieser Kooperationsarbeit sollen die Zusammensetzung dieses Materials für die Besiedlung mit Stammzellen und die Herstellung von Nervenleitschienen optimieren. Erste Besiedlungs-Versuche wurden mit scheibenförmigen Hydrogelen erfolgreich durchgeführt. Die Beurteilung des Besiedlungs-Erfolgs war unter dem Durchlichtmikroskop aufgrund der unruhigen Struktur der Geloberfläche nicht möglich. Es wurden erfolgreich zwei Färbungen etabliert, mit denen Zellkerne oder Zytoplasma der Zellen gut visualisiert werden können (IV.6). Durch eine 3D-Rekonstruktion mehrerer Schichtaufnahmen der Geloberfläche könnte sich die Zelladhäsion bzw. die Zellproliferation quantifizieren lassen. Aus den Formulierungen der ausgetesteten Hydrogele wurden in Leipzig erste Prototypen für Nervenleitschienen hergestellt. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer Kooperation mit Dr. Tobias Kisch



aus der Plastischen Chirurgie und Handchirurgie des Universitätsklinikums Lübeck am *Nervus ischiadicus* der Ratte auf ihre Zweckmäßigkeit getestet (IV.6). Für diese Versuche wurde die Ratte zuvor durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet. Die verwendeten Nervenleitschienen waren zunächst Röhren-förmig mit einem einzigen Lumen. Die Nervenleitschienen zeigten gute elastische Eigenschaften und ließen sich, ohne zu brechen, stark biegen. Die Elastizität des Materials ist von großer Bedeutung, da die Nervenleitschiene im Organismus diversen Scherkräften und mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt sein wird. Ebenso ließ sich die Nervenendigung sehr leicht in die Leitschiene einführen. Die Nervennaht konnte in den bisher durchgeführten Versuchen nicht gesetzt werden, da die Reißfestigkeit der Hydrogel-Leitschienen nicht hoch genug war. Für folgende Versuche müsste die Formulierung der Hydrogele so modifiziert werden, dass die Flexibilität und Zellattraktivität erhalten bleibt, die Reißfestigkeit jedoch erhöht wird. Ebenso steht die exakte Definition der Resorptionszeit *in vivo* noch aus. Zukünftig wäre es auch denkbar die Zellbesiedlung bereits während des Herstellungsprozesses durchzuführen und die Zellen beispielsweise in intraluminale Strukturen einzubetten. Ein solches Verfahren wäre sehr vorteilhaft, da die Besiedlung der sehr schmalen Lumina eine schwierige Herausforderung darstellt.

Mit kommerziell erwerblichen Produkten, deren Beschaffung zudem für die experimentelle Forschung schnell sehr kostenintensiv wird (über 500 Euro pro Stück für z.B. NeuraGen<sup>®</sup>, siehe unten), wären solche Vorhaben nicht durchführbar. Es stellt einen großen Vorteil dar, wenn das Produkt mit der zusätzlichen zellulären Unterstützung gemeinsam weiterentwickelt und optimiert wird. So kann die Entwicklung auf die jeweilige Anwendung angepasst werden und noch frühzeitig auf die Anforderungen der Zellbesiedlung eingegangen werden. Für kommerziell erwerbliche Produkte kann lediglich der Versuch unternommen werden, ob eine Besiedlung gelingt oder nicht. Optimierungen an der grundlegenden Struktur oder Zusammensetzung sind hier nicht mehr möglich.

Die Durchführbarkeit einer Zellbesiedlung mit Fibrin als Matrix im Lumen einer Nervenleitschiene wurde in dieser Arbeit dennoch anhand einer kommerziell erwerblichen Nervenleitschiene (NeuraGen<sup>®</sup>) durchgeführt (IV.6). Der Vorteil an NeuraGen<sup>®</sup> ist die hohe Festigkeit in trockenem Zustand, welche die Handhabung sehr erleichtert. Die Besiedlung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Nach einem Tag zeigte sich anhand einer Zellkern-Färbung eine gleichmäßige Verteilung der hSGSCs innerhalb der Nervenleitschiene. In

weiteren Versuchen könnte dieses Verfahren weiter evaluiert werden, beispielsweise auf Vitalität der Zellen geprüft werden oder über längere Zeiträume kultiviert werden.

Nervenleitschienen, die mit hSGSCs besiedelt sind, könnten mehrere denkbare Funktionen erfüllen. Zum einen könnten sie durch die Ausschüttung von Zytokinen (siehe Anhang VII.4.4) zum verbesserten Auswachsen von Neuriten beitragen oder protektiv und stimulierend auf die für Regenerationsvorgänge wichtigen Schwannzellen wirken. Zum anderen könnten hSGSCs selber eine Schwannzell-ähnliche Funktion ausüben und die neu auswachsenden Neuriten direkt schützen. Die Situation, die innerhalb einer mit hSGSCs besiedelten Nervenleitschiene vorliegen würde, sollte in einer direkten Ko-Kultur aus hSGSCs und peripheren Nervenzellen nachgestellt werden (IV.5). Sowohl adulte als auch pränatale DRG Neurone hafteten auf dem *Feeder Layer* aus hSGSCs. Eine besonders entscheidende Beobachtung war das gute Auswachsen von Neuriten auf den hSGSCs. Das Anhaften und Neuriten-Auswachsen von DRG Neuronen erfolgt kaum auf Zellkulturplastik, sondern erfordert spezielle Beschichtungen wie beispielsweise mit Laminin und Poly-L-Lysin (IV.1.2). Das gute Wachstum auf den hSGSC und auch die Ausrichtung der Neuriten in die Richtung, in die sich die Stammzellen in Kultur orientiert haben, sprechen für die Verwendung von hSGSC in Nervenleitschienen um das Auswachsen von Neuriten nach einer Nervenläsion zu fördern.

## V.5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen für ihren potentiellen therapeutischen Einsatz in der peripheren Nervenregeneration charakterisiert.

Als Quelle adulter Stammzellen zeichnen sich Schweißdrüsen und das angrenzende Mesenchym durch ihre einfache und minimal-invasive Zugänglichkeit aus. Eine Achselhaut-Biopsie genügt zur Isolation ausreichend vieler Schweißdrüsen.

Umsetzen ließe sich der therapeutische Einsatz von hSGSCs durch das Konzept einer Stammzellbank, da eine Entnahme und Generierung einer ausreichenden Zellmenge bei akutem Bedarf nur schwer möglich ist. Patienten würden ihre Stammzellen für therapeutische Zwecke in Stickstoff konserviert lagern und könnten im Notfall direkt mit autologem Zellmaterial versorgt werden.

In indirekten Ko-Kulturen wurde untersucht, wie sich hSGSCs und periphere Nervenzellen gegenseitig über den parakrinen Weg beeinflussen. Dabei zeigte sich ein fördernder Effekt der hSGSCs auf das Neuriten-Auswachsen von adulten und pränatalen peripheren DRG Neuronen.

Es zeigte sich wiederum kein Einfluss von peripheren Nervenzellen auf hSGSCs, es konnte allerdings ein Effekt des verwendeten Mediums auf Differenzierung und Zytokinproduktion von hSGSCs festgestellt werden. Durch weitere Analysen konnte ermittelt werden, dass eine Reduzierung und ein Entzug des Angebots an wachstumsfördernden Zusätzen im Medium eine veränderte Genexpression bewirken. Diese Ergebnisse liefern einen wichtigen Hinweis darauf, wie sich die Zellen nach dem Einsetzen in eine Nervenleitschiene in einer peripheren Nervenläsion im Vergleich zu den Standard-Kulturbedingungen verändern könnten.

Als weiterführender Versuch könnte eine Kultivierung von hSGSCs unter Reduzierung wachstumsfördernder Zusätze in Kombination mit einer hypoxischen Umgebung durchgeführt werden. Mit dieser Simulation könnte die Situation innerhalb einer Nervenleitschiene noch besser dargestellt werden. Des Weiteren könnte die in dieser Arbeit postulierte Differenzierung von hSGSCs in Schwannzell-ähnliche Zellen durch den Nachweis weiterer Markergene bzw. Markerproteine genauer untersucht werden.

In einer direkten Ko-Kultur von hSGSCs und peripheren Nervenzellen wurde die Situation simuliert, die in einer mit hSGSCs besiedelten Nervenleitschiene vorliegen würde. Aus einer durchtrennten Nervenendigung neu aussprossende Neuriten würden in diesem Fall in direkten Kontakt mit den hSGSCs kommen.

Die Neurone hafteten in der direkten Ko-Kultur sehr gut auf dem *Feeder Layer* aus hSGSC und es wurde das Auswachsen von Neuriten beobachtet. Die Wachstumsrichtung der Neuriten schien sich dabei an der Ausrichtung der hSGSCs zu orientieren. Für eine fortgeschrittene Art der Nervenleitschiene könnte eine solche wegweisende Eigenschaft eine attraktive Möglichkeit sein, die Wachstumsrichtung der Neuriten zu unterstützen.

Eine zusätzliche Möglichkeit wäre ein alternatives Modellsystem, welches DRG Neurone, die aus humanen iPS Zellen generiert wurden, nutzt. Mithilfe dieser Zellen könnten die bisherigen *in vitro* Versuche auch allogon oder theoretisch sogar patientenspezifisch autolog durchgeführt werden.

Es wurden erste Versuche zur Besiedlung kollagenbasierter Hydrogele für die Herstellung von Nervenleitschienen unternommen. Die von einem Kooperationspartner hergestellten Materialien erwiesen sich als attraktive Oberfläche für hSGSCs. Mit verschiedenen Färbemethoden konnten die Zellen auf den Hydrogelen dargestellt werden. Eine Herstellung der Hydrogele in Form von Nervenleitschienen ist ebenfalls möglich. Prototypen wurden bereits auf ihre Praktikabilität an einer künstlich erzeugten Nervenläsion des *Nervus ischiadicus* der Ratte geprüft. Die Leitschiene überzeugte durch ihre Flexibilität, war jedoch nicht stabil genug um eine Nervennaht zu setzen. In weiteren, bereits laufenden Versuchen sollen die Leitschienen mehr Festigkeit erhalten, ihre Flexibilität und die Zellattraktivität aber dennoch beibehalten.

Das Ziel wird sein, eine mit hSGSCs besiedelte Nervenleitschiene aus Kollagen-basiertem Hydrogel herzustellen, die eine hohe Flexibilität, eine ausreichende Festigkeit, eine definierte Bioresorbierbarkeit und eine sehr gute Zellattraktivität besitzt. Eine automatisierte Weiterentwicklung in der Herstellung dieser Nervenleitschiene könnte in Zukunft die direkte Einbettung der hSGSCs während des Herstellungsprozesses in Form eines Druckverfahrens sein. Diese weiterentwickelte Form der Nervenleitschiene könnte in einem nächsten Entwicklungsabschnitt auf ihre Anwendbarkeit *in vivo* getestet werden, beispielsweise am *Nervus ischiadicus* oder am *Nervus medianus* der Ratte.

Insgesamt stellen sich Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen durch ihre gute Isolierbarkeit sowie Kultivierbarkeit und den in dieser Arbeit nachgewiesenen positiven Effekt auf das Neuritenauswachsen peripherer Nervenzellen als potentielle zelluläre Unterstützung bei der Therapie peripherer Nervenläsionen dar.

## VI. Literatur

- Akkradate Siriphorn, M.S., Supin Chompoopong, M.S., und Kanokwan Tilokskulchai, M.S. (2009). The Neurite Outgrowth Measurement of Dorsal Root Ganglia Explants Cultured on Estrogen and Schwann Cell-Conditioned Medium by Using Image Analysis. *Siriraj Med. J.* 61, 130–134.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., und Hoffman, R.M. (2009). Multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells. *J. Dermatol.* 36, 1–9.
- Amorin, B., Alegretti, A.P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A.M., da Silva, M.A.L., Wieck, A., und Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum. Cell.* 27, 137–150.
- Anderson, P.N., und Turmaine, M. (1986). Axonal regeneration through arterial grafts. *J. Anat.* 147, 73–82.
- Angius, D., Wang, H., Spinner, R.J., Gutierrez-Cotto, Y., Yaszemski, M.J., und Windebank, A.J. (2012). A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials.* 33, 8034–8039.
- Ao, Q., Fung, C.K., Tsui, A.Y., Cai, S., Zuo, H.C., Chan, Y.S., und Shum, D.K. (2011). The regeneration of transected sciatic nerves of adult rats using chitosan nerve conduits seeded with bone marrow stromal cell-derived Schwann cells. *Biomaterials.* 32, 787–796.
- Armstrong, S.J., Wiberg, M., Terenghi, G., und Kingham, P.J. (2007). ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. *Tissue Eng.* 13, 2863–2870.
- Ayva, S.K., Karabulut, A.A., Akatli, A.N., Atasoy, P., und Bozdogan, O. (2013). Epithelial expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 and matrix metalloproteinase-2 in neoplasms and precursor lesions derived from cutaneous squamous cells: An immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* 209, 627–634.
- Baggiolini, M., Walz, A., und Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84, 1045–1049.
- Baldwin, A.D., und Kiick, K.L. (2010). Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Biopolymers.* 94, 128–140.
- Bando, T., Morikawa, Y., Hisaoka, T., Komori, T., Miyajima, A., und Senba, E. (2013). Dynamic expression pattern of leucine-rich repeat neuronal protein 4 in the mouse dorsal root ganglia during development. *Neurosci. Lett.* 548, 73–78.
- Banks, B.E., Banthorpe, D. V, Lamont, D.M., Pearce, F.L., Redding, K.A., und Vernon, C.A. (1970). Dissociation of sensory ganglia from the embryonic chick by pronase and other dispersing agents. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23, 519–530.

- Baraniak, P.R., und McDevitt, T.C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen. Med.* 5, 121–143.
- Barbour, J.R., Yee, A., Moore, A.M., Trulock, E.P., Buchowski, J.M., und Mackinnon, S.E. (2015). Cadaveric nerve allotransplantation in the treatment of persistent thoracic neuralgia. *Ann. Thorac. Surg.* 99, 1414–1417.
- Battiwalla, M., und Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 11, 503–515.
- Bell, J.H.A., und Haycock, J.W. (2012). Next generation nerve guides: materials, fabrication, growth factors, and cell delivery. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 18, 116–128.
- Benfey, M., und Aguayo, A.J. (1982). Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature.* 296, 150–152.
- Benson, M.D., Romero, M.I., Lush, M.E., Lu, Q.R., Henkemeyer, M., und Parada, L.F. (2005). Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10694–10699.
- Bergström, T., und Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Ups. J. Med. Sci.* 117, 132–142.
- Berrocal, Y.A., Almeida, V.W., Gupta, R., und Levi, A.D. (2013). Transplantation of Schwann cells in a collagen tube for the repair of large, segmental peripheral nerve defects in rats. *J. Neurosurg.* 119, 720–732.
- Bertelli, J.A., und Mira, J.C. (1995). The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 58, 151–155.
- Biernaskie, J., und Miller, F.D. (2010). White matter repair: skin-derived precursors as a source of myelinating cells. *Can. J. Neurol. Sci.* 37 *Suppl 2*, S34–S41.
- Birbaumer, N., und Schmidt, R.F. (2006). Autonomes Nervensystem. In *Biologische Psychologie*, (Springer Lehrbuch), pp. 101–115.
- Bjornson, C., Rietze, R., Reynolds, B., Magli, M., und Vescovi, A. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 283, 534–537.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R., und Weimann, J.M. (2001). The Evolving Concept of a Stem Cell. *Cell.* 105, 829–841.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., und Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 382, 829–833.
- Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1945–1961.

- Bomze, H.M., Bulsara, K.R., Iskandar, B.J., Caroni, P., und Pate Skene, J.H. (2001). Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat. Neurosci.* *4*, 38–43.
- Bonilla, I.E., Tanabe, K., und Strittmatter, S.M. (2002). Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J. Neurosci.* *22*, 1303–1315.
- Bosch, P., Musgrave, D.S., Lee, J.Y., Cummins, J., Shuler, F., Ghivizzani, S.C., Evans, C., Robbins, P.D., und Huard, J. (2000). Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J. Orthop. Res.* *18*, 933–944.
- Brattain, K. (2013). Analysis of the Peripheral Nerve Repair Market in the United States. Magellan Med. Technol. Consult.
- Brenner, T., Lisak, R.P., Rostami, A., Pleasure, D.E., und Silberberg, D.H. (1986). Astrocytes, oligodendrocytes, and Schwann cells share a common antigenic determinant that cross-reacts with myelin basic protein: identification with monoclonal antibody. *J. Neurosci.* *6*, 1925–1933.
- Bunge, M.B., Williams, A.K., und Wood, P.M. (1982). Neuron-schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev. Biol.* *92*, 449–460.
- Büngner, O.V. (1891). Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. *Beitr. Pathol. Anat.* *10*, 321–387.
- Burnett, M.G., und Zager, E.L. (2004). Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg. Focus.* *16*, E1.
- Burnham, P., Raiborn, C., und Varon, S. (1972). Replacement of nerve-growth factor by ganglionic non-neuronal cells for the survival in vitro of dissociated ganglionic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 3556–3560.
- Cafferty, W.B.J., Gardiner, N.J., Gavazzi, I., Powell, J., McMahon, S.B., Heath, J.K., Munson, J., Cohen, J., und Thompson, S.W.N. (2001). Leukemia Inhibitory Factor Determines the Growth Status of Injured Adult Sensory Neurons. *J. Neurosci.* *21*, 7161–7170.
- Calandra, T., und Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 791–800.
- Cale, J.M., und Lawrence, D.A. (2007). Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent. *Curr. Drug Targets.* *8*, 971–981.
- Caplan, A.I., und Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* *98*, 1076–1084.
- Carlson, N.G., Wieggl, W.A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S.W., und Gahring, L.C. (1999). Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J. Immunol.* *163*, 3963–3968.

- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., und Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3652–3656.
- Carter, J., Gragerov, A., Konvicka, K., Elder, G., Weinstein, H., und Lazzarini, R.A. (1998). Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. *J. Biol. Chem.* *273*, 5101–5108.
- Chen, C.J., Ou, Y.C., Liao, S.L., Chen, W.Y., Chen, S.Y., Wu, C.W., Wang, C.C., Wang, W.Y., Huang, Y.S., und Hsu, S.H. (2007). Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp. Neurol.* *204*, 443–453.
- Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., und Schwab, M.E. (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* *403*, 434–439.
- Chierzi, S., Ratto, G.M., Verma, P., und Fawcett, J.W. (2005). The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 2051–2062.
- Chiu, D.T., Lovelace, R.E., Yu, L.T., Wolff, M., Stengel, S., Middleton, L., Janecka, I.P., und Krizek, T.J. (1988). Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. *J. Reconstr. Microsurg.* *4*, 303–309, 311–312.
- Chung, H.M., Won, C.H., und Sung, J.H. (2009). Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin. Biol. Ther.* *9*, 1499–1508.
- Ciardelli, G., und Chiono, V. (2006). Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol. Biosci.* *6*, 13–26.
- Clemmons, D.R. (1993). IGF binding proteins and their functions. *Mol. Reprod. Dev.* *35*, 368–374; discussion 374–375.
- Condurache, A.P., und Aach, T. (2005). Vessel Segmentation in Angiograms using Hysteresis Thresholding. In *Proceedings of the Ninth Conference on Machine Vision Applications*, pp. 269–272.
- Condurache, A.P., und Mertins, A. (2012). Segmentation of retinal vessels with a hysteresis binary-classification paradigm. In *Computerized Medical Imaging and Graphics : The Official Journal of the Computerized Medical Imaging Society*, pp. 325–335.
- Condurache, A.P., Aach, T., Grzybowski, S., und Machens, H.G. (2005). Imaging and analysis of angiogenesis for skin transplantation by microangiography. In *IEEE International Conference on Image Processing 2005*, pp. 1250–1253.
- Croft, A.P., und Przyborski, S.A. (2006). Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells.* *24*, 1841–1851.



- Cross, M.J., und Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 201–207.
- Cuevas, P., Carceller, F., Dujovny, M., Garcia-Gómez, I., Cuevas, B., González-Corrochano, R., Diaz-González, D., und Reimers, D. (2002). Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol. Res.* 24, 634–638.
- Cuevas, P., Carceller, F., Garcia-Gómez, I., Yan, M., und Dujovny, M. (2004). Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol. Res.* 26, 230–232.
- Dailey, A.T., Avellino, A.M., Benthem, L., Silver, J., und Kliot, M. (1998). Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J. Neurosci.* 18, 6713–6722.
- Danner, S., Kremer, M., Petschnik, A.E., Nagel, S., Zhang, Z., Hopfner, U., Reckhenrich, A.K., Weber, C., Schenck, T.L., Becker, T., et al. (2012). The use of human sweat gland-derived stem cells for enhancing vascularization during dermal regeneration. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1707–1716.
- Daud, M.F.B., Pawar, K.C., Claeysens, F., Ryan, A.J., und Haycock, J.W. (2012). An aligned 3D neuronal-glia co-culture model for peripheral nerve studies. *Biomaterials.* 33, 5901–5913.
- David, S., und Aguayo, A.J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system ‘bridges’ after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 214, 931–933.
- Decimo, I., Bifari, F., Krampera, M., und Fumagalli, G. (2012). Neural stem cell niches in health and diseases. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1755–1783.
- Declerck, P.J., und Gils, A. (2013). Three decades of research on plasminogen activator inhibitor-1: a multifaceted serpin. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 356–364.
- Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., und Halpain, S. (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J. Neurosci.* 23, 9479–9490.
- Delree, P., Leprince, P., Schoenen, J., und Moonen, G. (1989). Purification and culture of adult rat dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci. Res.* 23, 198–206.
- Dodge, M.E., Rahimtula, M., und Mearow, K.M. (2002). Factors contributing to neurotrophin-independent survival of adult sensory neurons. *Brain Res.* 953, 144–156.
- Duff, S.E., Li, C., Garland, J.M., und Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17, 984–992.
- Eichler, M.E., und Rich, K.M. (1989). Death of sensory ganglion neurons after acute withdrawal of nerve growth factor in dissociated cell cultures. *Brain Res.* 482, 340–346.

Elkwood, A.I., Holland, N.R., Arbes, S.M., Rose, M.I., Kaufman, M.R., Ashinoff, R.L., Parikh, M.A., und Patel, T.R. (2011). Nerve allograft transplantation for functional restoration of the upper extremity: case series. *J. Spinal Cord Med.* 34, 241–247.

Elsner, M. (2012). Parakrine Interaktion Haut-abgeleiteter Stammzellen mit Hirnbiopsien unter Normoxie und Hypoxie. Universität zu Lübeck.

Evans, G.R., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., Wang, B., Meszlenyi, R.K., Lu, L., Mikos, A.G., et al. (2002). Bioactive poly(l-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 23, 841–848.

Fabrizi, C., Kelly, B.M., Gillespie, C.S., Schlaepfer, W.W., Scherer, S.S., und Brophy, P.J. (1997). Transient expression of the neurofilament proteins NF-L and NF-M by Schwann cells is regulated by axonal contact. *J. Neurosci. Res.* 50, 291–299.

Fairbairn, N.G., Meppelink, A.M., Ng-Glazier, J., Randolph, M.A., und Winograd, J.M. (2015). Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J. Stem Cells.* 7, 11–26.

Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shrayar, D., und Carson, P. (2007). Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 13, 1299–1312.

Fan, X., und Gelman, B.B. (1992). Schwann cell nerve growth factor receptor expression during initiation of remyelination. *J. Neurosci. Res.* 31, 58–67.

Fawcett, J.W., und Keynes, R.J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 43–60.

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., und Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279, 1528–1530.

Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., und Vallee, B.L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry.* 24, 5480–5486.

Filipovic, R., Jakovcevski, I., und Zecevic, N. (2003). GRO-alpha and CXCR2 in the human fetal brain and multiple sclerosis lesions. *Dev. Neurosci.* 25, 279–290.

Fine, E.G., Decosterd, I., Papaloizos, M., Zurn, A.D., und Aebischer, P. (2002). GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur. J. Neurosci.* 15, 589–601.

Frahm, S. (2014). Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen. Universität zu Lübeck.

- Friedman, A.H., Elias, W.J., und Midha, R. (2009). Introduction: peripheral nerve surgery-biology, entrapment, and injuries. *Neurosurg. Focus.* *26*, E1.
- Fu, S.Y., und Gordon, T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* *14*, 67–116.
- Fuchs, E., und Horsley, V. (2008). More than one way to skin . . . *Genes Dev.* *22*, 976–985.
- Fujimoto, E., Mizoguchi, A., Hanada, K., Yajima, M., und Ide, C. (1997). Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J. Neurocytol.* *26*, 511–528.
- Gagner, J.E., Kim, W., und Chaikof, E.L. (2014). Designing protein-based biomaterials for medical applications. *Acta Biomater.* *10*, 1542–1557.
- Gao, X., und Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *40*, 619–624.
- Gao, S., Zheng, Y., Cai, Q., Wu, X., Yao, W., und Wang, J. (2015). Different methods for inducing adipose-derived stem cells to differentiate into Schwann-like cells. *Arch. Med. Sci.* *11*, 886–892.
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., et al. (2002). Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* *420*, 182–186.
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., und Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 337–366.
- Garlick, J.A., und Taichman, L.B. (1994). Effect of TGF-beta 1 on re-epithelialization of human keratinocytes in vitro: an organotypic model. *J. Invest. Dermatol.* *103*, 554–559.
- Geuna, S., Raimondo, S., Fregnan, F., Haastert-Talini, K., und Grothe, C. (2015). In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* *10*.1111.
- Gibran, N.S., Ferguson, M., Heimbach, D.M., und Isik, F.F. (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J. Surg. Res.* *70*, 1–6.
- Glasby, M.A., Gschmeissner, S.E., Huang, C.L., und De Souza, B.A. (1986). Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. *J. Hand Surg. Br.* *11*, 347–351.
- Goldner, J.S., Bruder, J.M., Li, G., Gazzola, D., und Hoffman-Kim, D. (2006). Neurite bridging across micropatterned grooves. *Biomaterials.* *27*, 460–472.
- Gong, Z., Calkins, G., Cheng, E., Krause, D., und Niklason, L.E. (2009). Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A.* *15*, 319–330.

- Goraltchouk, A., Scanga, V., Morshead, C.M., und Shoichet, M.S. (2006). Incorporation of protein-eluting microspheres into biodegradable nerve guidance channels for controlled release. *J. Control. Release.* *110*, 400–407.
- Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T.H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C., et al. (2009). Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur. J. Cell Biol.* *88*, 409–421.
- Graf, U., Casanova, E.A., und Cinelli, P. (2011). The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes.* *2*, 280–297.
- Grant, G., und Robertson, B. (2004). Primary Afferent Projections to the Spinal Cord -. In *The Rat Nervous System - Third Edition*, G. Paxinos, ed. pp. 111–119.
- Gray, H. (1918). The Spinal Nerves. In *Anatomy of the Human Body Kapitel 6*, (Public Domain), pp. 1–19.
- Greene, E.C. (1963). Nervous System. In *Anatomy of the Rat*, (Hafner Publishing Company), pp. 115–176.
- Greve, F., Frerker, S., Bittermann, A.G., Burkhardt, C., Hierlemann, A., und Hall, H. (2007). Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface. *Biomaterials.* *28*, 5246–5258.
- Grinsell, D., und Keating, C.P. (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res. Int.* *2014*, 698256.
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., und Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells-opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 915–929.
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX.* *20*, 275–281.
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y., und Liu, J. (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* *93*, 204–230.
- Guo, L., Yu, Q.C., und Fuchs, E. (1993). Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits striking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J.* *12*, 973–986.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., und Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature.* *453*, 314–321.
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P.J., Mácia, A., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia-Parez, J.L., und Menendez, P. (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells.* *28*, 1568–1570.

- Hall, A.K. (2006). Rodent sensory neuron culture and analysis. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 3, Unit 3.19.*
- Harmouch, C., El-Omar, R., Labrude, P., Decot, V., Menu, P., und Kerdjoudj, H. (2013). Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. *Biomed. Mater. Eng. 23, 273–280.*
- Hayward, C.J., Fradette, J., Galbraith, T., Rémy, M., Guignard, R., Gauvin, R., Germain, L., und Auger, F.A. (2013). Harvesting the potential of the human umbilical cord: isolation and characterisation of four cell types for tissue engineering applications. *Cells. Tissues. Organs. 197, 37–54.*
- Hoffman, R.M. (2007). The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. *Expert Opin. Biol. Ther. 7, 289–291.*
- Hood, B., Levene, H.B., und Levi, A.D. (2009). Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurg. Focus. 26, E4.*
- Horie, H., und Kim, S.U. (1984). Improved survival and differentiation of newborn and adult mouse neurons in F12 defined medium by fibronectin. *Brain Res. 294, 178–181.*
- Huber, B., Volz, A.C., und Kluger, P.J. (2015). How do culture media influence in vitro perivascular cell behavior? *Cell Biol. Int. 39, 1395–1407.*
- Hughes, A. (1953). The growth of embryonic neurites; a study of cultures of chick neural tissues. *J. Anat. 87, 150–162.*
- Huxley, A.F., und Stämpeli, R. (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J. Physiol. 108, 315–339.*
- Ijima, F.F., Nicolai, J.P., und Meek, M.F. (2006). Sural nerve donor-site morbidity: thirty-four years of follow-up. *Ann. Plast. Surg. 57, 391–395.*
- Jankowski, M.P., McIlwrath, S.L., Jing, X., Cornuet, P.K., Salerno, K.M., Koerber, H.R., und Albers, K.M. (2009). Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. *Brain Res. 1256, 43–54.*
- Jiang, X., Lim, S.H., Mao, H.Q., und Chew, S.Y. (2010). Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp. Neurol. 223, 86–101.*
- Jimenez, J.C., Tyson, D.R., Dhar, S., Nguyen, T., Hamai, Y., Bradshaw, R.A., und Evans, G.R.D. (2004). Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells): characterization and dose-response relationship for modulated release of nerve growth factor for nerve regeneration. *Plast. Reconstr. Surg. 113, 605–610.*
- Johnson, E.O., und Soucacos, P.N. (2008). Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury. 39 Suppl 3, S30–S36.*

- Jones, S.A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* *175*, 3463–3468.
- Jones, D.L., und Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 11–21.
- Kalbermatten, D.F., Pettersson, J., Kingham, P.J., Pierer, G., Wiberg, M., und Terenghi, G. (2009). New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg.* *25*, 27–33.
- Kammermeier, S. (2012). *Last Minute Neurologie* (Elsevier).
- Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H., und Tamura, K. (2013). Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *367*, 33–49.
- Kehoe, S., Zhang, X.F., und Boyd, D. (2012). FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury.* *43*, 553–572.
- Kingham, P., Kolar, M., Novikova, L., Novikov, L., und Wiberg, M. (2014). Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.* *23*, 741–754.
- Kingham, P.J., Mantovani, C., und Terenghi, G. (2011). Stem cell and neuron co-cultures for the study of nerve regeneration. *Methods Mol. Biol.* *695*, 115–127.
- Kisch, T., Klemens, J.M., Hofmann, K., Liodaki, E., Gierloff, M., Moellmeier, D., Stang, F., Mailaender, P., Habermann, J., und Brandenburger, M. (2015). Collection of Wound Exudate From Human Digit Tip Amputations Does Not Impair Regenerative Healing: A Randomized Trial. *Medicine.* *94*, e1764.
- Kottis, V., Thibault, P., Mikol, D., Xiao, Z.C., Zhang, R., Dergham, P., und Braun, P.E. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* *82*, 1566–1569.
- Kruse, C. (2006). *Isolierte adulte pluripotente Stammzellen und Verfahren zu deren Isolierung und Kultivierung - EP 1 636 347 B1.*
- Kruse, C., Birth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A., und Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl. Phys. A.* *79*.
- Kruspe, M., Thieme, H., Guntinas-Lichius, O., und Irintchev, A. (2014). Motoneuron regeneration accuracy and recovery of gait after femoral nerve injuries in rats. *Neuroscience.* *280*, 73–87.
- Labrador, R.O., Butí, M., und Navarro, X. (1998). Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp. Neurol.* *149*, 243–252.

- Lange, M., Zeng, Y., Knight, A., Windebank, A., und Trushina, E. (2012). Comprehensive Method for Culturing Embryonic Dorsal Root Ganglion Neurons for Seahorse Extracellular Flux XF24 Analysis. *Front. Neurol.* *3*, 175.
- Lau, T.T., und Wang, D.A. (2011). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 189–197.
- Lawler, J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell. Mol. Med.* *6*, 1–12.
- Leitlinienreport (2013). Versorgung peripherer Nerven. AWMF 005/010.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., und McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* *60*, 585–595.
- Levi, A.D., Guénard, V., Aebischer, P., und Bunge, R.P. (1994). The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J. Neurosci.* *14*, 1309–1319.
- Levi-Montalcini, R. (1964). The Nerve Growth Factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *118*, 149–170.
- Levin, M. (2012). Morphogenetic fields in embryogenesis, regeneration, and cancer: non-local control of complex patterning. *Biosystems.* *109*, 243–261.
- Levy, Y.S., Merims, D., Panet, H., Barhum, Y., Melamed, E., und Offen, D. (2003). Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells. *J. Mol. Neurosci.* *21*, 121–132.
- Li, L., und Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 605–631.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., und Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* *170*, 3369–3376.
- Li, G.D., Wo, Y., Zhong, M.F., Zhang, F.X., Bao, L., Lu, Y.J., Huang, Y. De, Xiao, H.S., und Zhang, X. (2002). Expression of fibroblast growth factors in rat dorsal root ganglion neurons and regulation after peripheral nerve injury. *Neuroreport.* *13*, 1903–1907.
- Li, S.T., Archibald, S.J., Krarup, C., und Madison, R.D. (1992). Peripheral nerve repair with collagen conduits. *Clin. Mater.* *9*, 195–200.
- Lindsay, R.M., Evison, C.J., und Winter, J. (1991). Culture of adult mammalian peripheral neurons. In *Cellular Neurobiology: A Practical Approach*, Chapter 1, (Oxford University Press), pp. 3–16.
- Liu, G.B., Cheng, Y.X., Feng, Y.K., Pang, C.J., Li, Q., Wang, Y., Jia, H., und Tong, X.J. (2011). Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve repair. *Arch. Med. Sci.* *7*, 592–596.

- Liu, R., Lin, G., und Xu, H. (2013). An Efficient Method for Dorsal Root Ganglia Neurons Purification with a One-Time Anti-Mitotic Reagent Treatment. *PLoS One*. *8*, e60558.
- Loth, T., Hötzel, R., Kascholke, C., Anderegg, U., Schulz-Siegmund, M., und Hacker, M.C. (2014). Gelatin-based biomaterial engineering with anhydride-containing oligomeric cross-linkers. *Biomacromolecules*. *15*, 2104–2118.
- Lucas, J.H., Gross, G.W., Emery, D.G., und Gardner, C.R. (1985). Neuronal survival or death after dendrite transection close to the perikaryon: correlation with electrophysiologic, morphologic, and ultrastructural changes. *Cent. Nerv. Syst. Trauma*. *2*, 231–255.
- Lukowiak, K., und Peretz, B. (1977). The interaction between the central and peripheral nervous systems in the mediation of gill withdrawal reflex behavior in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* *117*, 219–244.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). Haut und Hautanhangsgebilde. In *Taschenlehrbuch Histologie*, (Thieme Verlag), pp. 446–467.
- Lutz, D., Loers, G., Kleene, R., Oezen, I., Kataria, H., Katagihallimath, N., Braren, I., Harauz, G., und Schachner, M. (2014). Myelin basic protein cleaves cell adhesion molecule L1 and promotes neuritogenesis and cell survival. *J. Biol. Chem.* *289*, 13503–13518.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., und Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9448–9453.
- Mackey, E.A., Spiro, D., und Wiener, J. (1964). A study of chromatolysis in dorsal root ganglia at the cellular level. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *23*, 508–526.
- Marshak, D.R., Gardner, R.L., und Gottlieb, D. (2001). Introduction: Stem Cell Biology. In *Stem Cell Biology*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1–16.
- Masear, V.R. (2011). Nerve wrapping. *Foot Ankle Clin.* *16*, 327–337.
- Mathe, G., Jammet, H., Pendic, B., Schwarzenberg, L., Duplan, J.F., Maupin, B., Latarjet, R., Larrieu, M.J., Kalic, D., und Djukic, Z. (1959). Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* *4*, 226–238.
- Mazia, D., Schatten, G., und Sale, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* *66*, 198–200.
- McConnell, M.P., Dhar, S., Naran, S., Nguyen, T., Bradshaw, R.A., und Evans, G.R.D. (2004). In vivo induction and delivery of nerve growth factor, using HEK-293 cells. *Tissue Eng.* *10*, 1492–1501.
- McKenzie, I.A., Biernaskie, J., Toma, J.G., Midha, R., und Miller, F.D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J. Neurosci.* *26*, 6651–6660.



- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., und Braun, P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. *13*, 805–811.
- McKinley, J.C. (1921). The intraneural plexus of fasciculi and fibers in the sciatic nerve. *Arch Neurol Psychiatry*. *6*, 377–399.
- Melli, G., und Höke, A. (2009). Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin. Drug Discov*. *4*, 1035–1045.
- Mennen, U. (1999). End-to-side nerve suture-a technique to repair peripheral nerve injury. *S. Afr. Med. J.* *89*, 1188–1194.
- Menovsky, T.M., und Bartels, R.H. (1999). Stabilization and Accurate Trimming of Nerve Ends: Practical Use of Fibrin Glue: Technical Note. *Neurosurgery*. *44*, 224–225.
- Mihaylova, M., Sabatini, D., und Yilmaz, Ö. (2014). Dietary and metabolic control of stem cell function in physiology and cancer. *Cell Stem Cell*. *14*, 292–305.
- Mohammadi, R., Ahsan, S., Masoumi, M., und Amini, K. (2013). Vascular endothelial growth factor promotes peripheral nerve regeneration after sciatic nerve transection in rat. *Chinese J. Traumatol*. *16*, 323–329.
- Molander, H., Olsson, Y., Engkvist, O., Bowald, S., und Eriksson, I. (1982). Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve*. *5*, 54–57.
- Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Jones, E.Y., Kikutani, H., Lubetzki, C., et al. (2003). The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J. Neurosci*. *23*, 9229–9239.
- Mosahebi, A., Woodward, B., Wiberg, M., Martin, R., und Terenghi, G. (2001). Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration. *Glia*. *34*, 8–17.
- Motavkin, P.A. (1963). Pseudounipolar neurons of the spinal cord and its anterior and posterior roots. *Bull. Exp. Biol. Med.* *53*, 337–340.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., et al. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell*. *1*, 423–434.
- Nagel, S., Rohr, F., Weber, C., Kier, J., Siemers, F., Kruse, C., Danner, S., Brandenburger, M., und Matthiessen, A.E. (2013). Multipotent nestin-positive stem cells reside in the stroma of human eccrine and apocrine sweat glands and can be propagated robustly in vitro. *PLoS One*. *8*, e78365.

- Nakai, J., und Kawasaki, Y. (1959). Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. The reaction of the growth cone to various obstructions. *Zeitschrift Für Zellforsch. Und Mikroskopische Anat.* 51, 108–122.
- Namiki, J., und Tator, C.H. (1999). Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 489–498.
- Nassiri, F., Cusimano, M.D., Scheithauer, B.W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G.M., Syro, L. V, Kovacs, K., und Lloyd, R. V (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 31, 2283–2290.
- Niapour, A., Karamali, F., Karbalaie, K., Kiani, A., Mardani, M., Nasr-Esfahani, M.H., und Baharvand, H. (2010). Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells. *Biotechnol. Lett.* 32, 781–786.
- Nishio, Y., Nishihira, J., Ishibashi, T., Kato, H., und Minami, A. (2002). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in peripheral nerve regeneration: anti-MIF antibody induces delay of nerve regeneration and the apoptosis of Schwann cells. *Mol. Med.* 8, 509–520.
- Nix, W.A. (1987). Zur Funktion und Anatomie von Nerv und Muskel. In *Der Periphere Nerv - Funktion Und Verletzungen, Diagnostik Und Therapie - 2. Auflage*, (Einhorn-Press Verlag GmbH), pp. 15–50.
- of Bertapaglia, L. (1989). *On Nerve Injuries and Skull Fractures* (Futura Publishing Company).
- of Milan, L., und von Fleischhacker, R. (1894). *Lanfrank's Science of Chirurgie* (Asher & Company).
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 410, 701–705.
- Pacherník, J., Bryja, V., Esner, M., Kubala, L., Dvorák, P., und Hampl, A. (2005). Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: inhibitory effect of serum. *Physiol. Res.* 54, 115–122.
- Page, P., DeJong, J., Bandstra, A., und Boomsma, R.A. (2014). Effect of serum and oxygen concentration on gene expression and secretion of paracrine factors by mesenchymal stem cells. *Int. J. Cell Biol.* 601063.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.G., Liu, X.M., Shao, Y., Ma, B.F., Lee, J.H., Ha, K.S., et al. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 28, 2162–2171.
- Park, J.S., Lee, J.H., Han, C.S., Chung, D.W., und Kim, G.Y. (2011). Effect of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose solution on perineural scar formation after sciatic nerve repair in rats. *Clin. Orthop. Surg.* 3, 315–324.

- PearsonEducation (2012). Peripheral Nerve Anatomy. <https://www.studyblue.com/notes/note/n/ch-13-the-Peripheral-Nervous-system/deck/6141327>.
- Pellegrini, G., Traverso, C.E., Franzi, A.T., Zingirian, M., Cancedda, R., und De Luca, M. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 349, 990–993.
- Pellegrino, R.G., Politis, M.J., Ritchie, J.M., und Spencer, P.S. (1986). Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J. Neurocytol.* 15, 17–28.
- Peterson, E.R., und Murray, M.R. (1955). Myelin sheath formation in cultures of avian spinal ganglia. *Am. J. Anat.* 96, 319–355.
- Petschnik, A.E. (2011). Xenogene Kokultur zur Induktion der neuronalen Differenzierung in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen. Universität zu Lübeck.
- Petschnik, A.E., Klatte, J.E., Evers, L.H., Kruse, C., Paus, R., und Danner, S. (2010). Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br. J. Dermatol.* 162, 380–383.
- Petschnik, A.E., Fell, B., Tiede, S., Habermann, J.K., Pries, R., Kruse, C., und Danner, S. (2011). A novel xenogeneic co-culture system to examine neuronal differentiation capability of various adult human stem cells. *PLoS One*. 6, e24944.
- Pham, M., Bäumer, T., und Bendszus, M. (2014). Peripheral nerves and plexus: imaging by MR-neurography and high-resolution ultrasound. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 370–379.
- Plantman, S., Patarroyo, M., Fried, K., Domogatskaya, A., Tryggvason, K., Hammarberg, H., und Cullheim, S. (2008). Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 50–62.
- Potier, E., Ferreira, E., Meunier, A., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., und Petite, H. (2007). Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng.* 13, 1325–1331.
- Providence, K.M., und Higgins, P.J. (2004). PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *J. Cell. Physiol.* 200, 297–308.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., und Williams, S.M. (2001). The Axonal Growth Cone. In *Neuroscience 2nd Edition*, (Sinauer Associates), p. Kapitel 23.
- Radtke, C., Schmitz, B., Spies, M., Kocsis, J.D., und Vogt, P.M. (2009). Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 817–823.

- Raine, C.S. (1984). Myelin - Morphology of Myelin and Myelination. In Myelin, P. Morell, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 1–50.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Da Costa, C., Iwata, O., Galiano, M., Hristova, M., Nateri, A.S., Makwana, M., Riera-Sans, L., Wolfer, D.P., et al. (2004). The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron*. *43*, 57–67.
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., und Pellegrini, G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N. Engl. J. Med.* *363*, 147–155.
- Rao, M., Ahrlund-Richter, L., und Kaufman, D.S. (2012). Concise review: Cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities. *Stem Cells*. *30*, 55–60.
- Ray, W.Z., und Mackinnon, S.E. (2010). Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp. Neurol.* *223*, 77–85.
- Razban, V., Lotfi, A.S., Soleimani, M., Ahmadi, H., Massumi, M., Khajeh, S., Ghaedi, M., Arjmand, S., Najavand, S., und Khoshdel, A. (2012). HIF-1 $\alpha$  Overexpression Induces Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells. *Biores. Open Access*. *1*, 174–183.
- Reichert, F., Levitzky, R., und Rotshenker, S. (1996). Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 530–535.
- Reinke, J.M., und Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* *49*, 35–43.
- Rennekampff, H.O., Hansbrough, J.F., Woods, V., Doré, C., Kiessig, V., und Schröder, J.M. (1997). Role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA/gro) on keratinocyte function in wound healing. *Arch. Dermatol. Res.* *289*, 204–212.
- Rennekampff, H.O., Hansbrough, J.F., Kiessig, V., Doré, C., Sticherling, M., und Schröder, J.M. (2000). Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* *93*, 41–54.
- Rezza, A., Sennett, R., und Rendl, M. (2014). Adult Stem Cell Niches: Cellular and Molecular Components. *Curr. Top. Dev. Biol.* *107*, 333–372.
- Rich, K.M., Luszczynski, J.R., Osborne, P.A., und Johnson, E.M. (1987). Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J. Neurocytol.* *16*, 261–268.
- Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Dutton, R., Tan, S.S., Gearing, D.P., Bartlett, P.F., und Murphy, M. (1996). Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 291–299.
- Richardson, P.M., McGuinness, U.M., und Aguayo, A.J. (1980). Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature*. *284*, 264–265.

- Rishal, I., und Fainzilber, M. (2014). Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 32–42.
- Roberson, M.D., Toews, A.D., Bouldin, T.W., Weaver, J., Goines, N.D., und Morell, P. (1995). NGFR-mRNA expression in sciatic nerve: a sensitive indicator of early stages of axonopathy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *28*, 231–238.
- de Ruitter, G.C.W., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., und Spinner, R.J. (2009). Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus.* *26*, E5.
- Russell, W.M.S., und Burch, R.L. (1959). *The Principles of Human Experimental Technique* (Methuen, London).
- Sakthiswary, R., und Raymond, A.A. (2012). Stem cell therapy in neurodegenerative diseases: From principles to practice. *Neural Regen. Res.* *7*, 1822–1831.
- Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., und Murphy, W.J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* *96*, 34–40.
- Samardžić, M.M., Rasulić, L.G., und Grujčić, D.M. (1998). Results of cable graft technique in repair of large nerve trunk lesions. *Acta Neurochir.* *140*, 1177–1182.
- Santos, M.J., und Ventura-Juncá, P. (2012). Bioethical aspects of basic research and medical applications of human stem cells. *Biol. Res.* *45*, 317–326.
- Sastry, K. V., und Shukal, V. (2010). Regeneration. In *Developmental Biology*, (Rastogi Publications), pp. 364–381.
- Savkovic, V., Dieckmann, C., Milkova, L., und Simon, J.C. (2012). Improved method of differentiation, selection and amplification of human melanocytes from the hair follicle cell pool. *Exp. Dermatol.* *21*, 948–950.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F., und Giachelli, C.M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol.* *141*, 1083–1093.
- Schlosshauer, B., Dreesmann, L., Schaller, H.-E., und Sinis, N. (2006). Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurgery.* *59*, 740–747; discussion 747–748.
- Schröder, J.M., May, R., und Weis, J. (1993). Perineurial cells are the first to traverse gaps of peripheral nerves in silicone tubes. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *95 Suppl*, S78–S83.
- Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., und Moser, B. (1992). High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10542–10546.

- Scott, B.S. (1977). Adult mouse dorsal root ganglia neurons in cell culture. *J. Neurobiol.* 8, 417–427.
- Seal, J., und Commenges, D. (1986). Modeling of the stimulus-response process and the determination of function in the central nervous system. *Math. Model.* 7, 905–913.
- Seckel, B.R., Chiu, T.H., Nyilas, E., und Sidman, R.L. (1984). Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. *Plast. Reconstr. Surg.* 74, 173–181.
- Seddon, H.J. (1942). A Classification of Nerve Injuries. *Br. Med. J.* 2, 237–239.
- Seddon, H.J. (1943). Three types of nerve injury. *Brain* 66, 237–288.
- Seiffers, R., Allchorne, A.J., und Woolf, C.J. (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 143–154.
- Shah, R. V, und Januzzi, J.L. (2010). ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 7, 9–14.
- Shen, J., und Wang, Z.-W. (2014). The level and influencing factors of quality of life in patients with brachial plexus injury. *Int. J. Nurs. Sci.* 1, 171–175.
- Simón, D., Martín-Bermejo, M.J., Gallego-Hernández, M.T., Pastrana, E., García-Escudero, V., García-Gómez, A., Lim, F., Díaz-Nido, J., Avila, J., und Moreno-Flores, M.T. (2011). Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration. *Glia.* 59, 1458–1471.
- Sjöberg, J., und Kanje, M. (1989). Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res.* 485, 102–108.
- Slack, J.R., Hopkins, W.G., und Pockett, S. (1983). Evidence for a motor nerve growth factor. *Muscle Nerve.* 6, 243–252.
- Smith, H.W., und Marshall, C.J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 23–36.
- Snider, W.D., Zhou, F.-Q., Zhong, J., und Markus, A. (2002). Signaling the pathway to regeneration. *Neuron.* 35, 13–16.
- Sodek, J., Ganss, B., und McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 279–303.
- Soltani, A.M., Allan, B.J., Best, M.J., Mir, H.S., und Panthaki, Z.J. (2014). Revision decompression and collagen nerve wrap for recurrent and persistent compression neuropathies of the upper extremity. *Ann. Plast. Surg.* 72, 572–578.
- St Amand, G.S., und Tipton, S.R. (1954). The separation of neuroblasts and other cells from grasshopper embryos. *Science.* 119, 93–94.

- Steidinger, T.U., Standaert, D.G., und Yacoubian, T.A. (2011). A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *116*, 334–341.
- Sterne, G.D., Brown, R.A., Green, C.J., und Terenghi, G. (1997). Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 1388–1396.
- Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Juritz, S., Birk, R., Goessler, U.R., Bieback, K., Bugert, P., Schultz, J., Hörmann, K., Kinscherf, R., et al. (2014). Evaluation of the effects of different culture media on the myogenic differentiation potential of adipose tissue- or bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* *33*, 160–170.
- Stoll, G., Griffin, J.W., Li, C.Y., und Trapp, B.D. (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* *18*, 671–683.
- di Summa, P.G., Kingham, P.J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., und Kalbermatten, D.F. (2010). Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* *63*, 1544–1552.
- Sunderland, S. (1978). *Nerves and Nerve Injuries*, 2nd edition (Churchill Livingstone).
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., und Okano, H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* *58*, 721–730.
- Svemmingsen, Å., und Dahlin, L. (2013). Repair of the Peripheral Nerve—Remyelination that Works. *Brain Sci.* *3*, 1182–1197.
- Takahashi, K., und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., und Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* *131*, 861–872.
- Tanaka, M., Kanai, H., und Hirai, S. (1990). Effects of nerve growth factor on cultured adult dorsal root ganglion neurons evaluated by enzyme immunoassay for neurofilament protein. *Age.* *13*, 57–60.
- Taskinen, H.S., und Røyttä, M. (2000). Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J. Peripher. Nerv. Syst.* *5*, 75–81.
- Thomas (1963). The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. *J. Anat.* *97*, 35–44.
- Thomas, E.D. (2005). Bone marrow transplantation from the personal viewpoint. *Int. J. Hematol.* *81*, 89–93.

- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Lu, W.C., und Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *257*, 491–496.
- Tiede, S., Kloepper, J.E., Ernst, N., Poeggeler, B., Kruse, C., und Paus, R. (2009). Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 2711–2720.
- Tomaselli, K.J., Doherty, P., Emmett, C.J., Damsky, C.H., Walsh, F.S., und Reichardt, L.F. (1993). Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *J. Neurosci.* *13*, 4880–4888.
- Trepel, M. (2012). *Neuroanatomie - Struktur und Funktion - 5. Auflage* (Elsevier).
- Udina, E., Rodríguez, F.J., Verdú, E., Espejo, M., Gold, B.G., und Navarro, X. (2004). FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells. *Glia.* *47*, 120–129.
- Uemura, T., Takamatsu, K., Ikeda, M., Okada, M., Kazuki, K., Ikada, Y., und Nakamura, H. (2012). Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *419*, 130–135.
- Varejão, A.S.P., Meek, M.F., Ferreira, A.J.A., Patrício, J.A.B., und Cabrita, A.M.S. (2001). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J. Neurosci. Methods.* *108*, 1–9.
- Varoni, E., Canciani, E., Palazzo, B., Varasano, V., Chevallier, P., Petrizzi, L., Dellavia, C., Mantovani, D., und Rimondini, L. (2013). Effect of Poly-L-Lysine coating on titanium osseointegration: from characterization to in vivo studies. *J. Oral Implantol.* *41*, 626–631.
- Vaschetto, R., Navalesi, P., Clemente, N., Boggio, E., Valsecchi, S., Olivieri, C., Soluri, M.F., Kroumova, V., Fonio, P., Dinatale, C., et al. (2015). Osteopontin induces soluble urokinase-type plasminogen activator receptor production and release. *Minerva Anestesiol.* *81*, 157–165.
- Venkataramana, N.K., Kumar, S.K. V, Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K., et al. (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res.* *155*, 62–70.
- Villiger, P., Geng, Y., und Lotz, M. (1993). Induction of cytokine expression by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest.* *91*, 1575–1581.
- Vogel, C., und Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 227–232.
- Wagers, A.J., und Weissman, I.L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell.* *116*, 639–648.



- Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., und Tomkiewicz, M.M. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*. 7, 103–111.
- Waller, A. (1850). Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. London*. 140, 423–429.
- Wallquist, W., Zelano, J., Plantman, S., Kaufman, S.J., Cullheim, S., und Hammarberg, H. (2004). Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy. *J. Comp. Neurol*. 480, 162–169.
- Walz, A., Schmutz, P., Mueller, C., und Schnyder-Candrian, S. (1997). Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J. Leukoc. Biol*. 62, 604–611.
- Wang, L., und Marquardt, T. (2012). Direct live monitoring of heterotypic axon-axon interactions in vitro. *Nat. Protoc*. 7, 351–363.
- Wang, J., Shou, J., und Chen, X. (2000). Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*. 19, 1843–1848.
- Wei, M., Li, H., Shang, Y., Zhou, Z., und Zhang, J. (2014). Increased CD147 (EMMPRIN) expression in the rat brain following traumatic brain injury. *Brain Res*. 1585, 150–158.
- Weise, K., und Schiltenswolf, M. (2014). Neurologische Zusatzbegutachtung. In *Grundkurs Orthopädisch-Unfallchirurgische Begutachtung*, 2. Auflage, (Springer), pp. 219–230.
- Whitaker, M.J., Quirk, R.A., Howdle, S.M., und Shakesheff, K.M. (2001). Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J. Pharm. Pharmacol*. 53, 1427–1437.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V, Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R., und Wobus, A.M. (2004). Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell. Mol. Life Sci*. 61, 2510–2522.
- Wilson-Pauwels, L., Akesson, E.J., Stewart, P.A., und Spacey, S.D. (2002). Introduction. In *Cranial Nerves in Health and Disease*, (BC Decker), pp. 1–11.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G., und Rogister, B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci*. 116, 3295–3302.
- Wolfe, S.W., Strauss, H.L., Garg, R., und Feinberg, J. (2012). Use of bioabsorbable nerve conduits as an adjunct to brachial plexus neurolysis. *J. Hand Surg. Am*. 37, 1980–1985.
- Wood, P.M., und Bunge, R.P. (1986). Myelination of cultured dorsal root ganglion neurons by oligodendrocytes obtained from adult rats. *J. Neurol. Sci*. 74, 153–169.

- Wrobel, S., Serra, S.C., Ribeiro-Samy, S., Sousa, N., Heimann, C., Barwig, C., Grothe, C., Salgado, A.J., und Haastert-Talini, K. (2014). In vitro evaluation of cell-seeded chitosan films for peripheral nerve tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*. 20, 2339–2349.
- Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., und Tredget, E.E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 25, 2648–2659.
- Xu, L.L., McVicar, D.W., Ben-Baruch, A., Kuhns, D.B., Johnston, J., Oppenheim, J.J., und Wang, J.M. (1995). Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors: binding and signaling of MCP3 through shared as well as unique receptors on monocytes and neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 25, 2612–2617.
- Xu, X., Yee, W.-C., Hwang, P.Y.K., Yu, H., Wan, A.C.A., Gao, S., Boon, K.-L., Mao, H.-Q., Leong, K.W., und Wang, S. (2003). Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials*. 24, 2405–2412.
- Xuan, W., Qu, Q., Zheng, B., Xiong, S., und Fan, G.-H. (2015). The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 97, 61–69.
- Yamanaka, H., Obata, K., Fukuoka, T., Dai, Y., Kobayashi, K., Tokunaga, A., und Noguchi, K. (2005). Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 132, 183–191.
- Yan, X., Chen, B., Lin, Y., Li, Y., Xiao, Z., Hou, X., Tan, Q., und Dai, J. (2010). Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 90, 66–72.
- Yang, J., Rose, F.R.A.J., Gadegaard, N., und Alexander, M.R. (2009). A High-Throughput Assay of Cell-Surface Interactions using Topographical and Chemical Gradients. *Adv. Mater.* 21, 300–304.
- Yang, Y., Ding, F., Wu, J., Hu, W., Liu, W., Liu, J., und Gu, X. (2007). Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 28, 5526–5535.
- Yip, H.K., Rich, K.M., Lampe, P.A., und Johnson, E.M. (1984). The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 4, 2986–2992.
- Yokoyama, M., Miwa, H., Maeda, S., Wakitani, S., und Takagi, M. (2008). Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 46–50.
- Yoshii, S., Oka, M., Ikeda, N., Akagi, M., Matsusue, Y., und Nakamura, T. (2002). Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments. *J. Hand Surg. Am.* 26, 52–59.

- Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J., Floyd, J.A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., et al. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 264, 51–62.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318, 1917–1920.
- Yuan, A., Rao, M. V, Veeranna, und Nixon, R.A. (2012). Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 3257–3263.
- Zhong, J., Rao, X., und Rajagopalan, S. (2013). An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 226, 305–314.
- Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S., und Chen, X. (2006). Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24, 416–425.
- Zhu, W., O'Brien, C., O'Brien, J.R., und Zhang, L.G. (2014). 3D nano/microfabrication techniques and nanobiomaterials for neural tissue regeneration. *Nanomedicine.* 9, 859–875.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., und Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

## VII. Anhang

### VII.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Segment des Rückenmarks mit Vorder- und Hinterwurzel.....	4
Abbildung 2: Anatomie des peripheren Nerven .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung peripherer Nervenverletzungen: Neurapraxie (A), Axonotmesis (B) und Neurotmesis (C) .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Nervenleitschiene .....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer adulten Stammzellnische .....	17
Abbildung 6: Schema von <i>in vitro</i> Modellen für die periphere Nervenregeneration .....	23
Abbildung 7: Methodik zur Präparation von DRG aus adulten Ratten .....	34
Abbildung 8: Methodik zur Präparation von DRG aus pränatalen Ratten.....	35
Abbildung 9: Ko-Kultur Systeme .....	39
Abbildung 10: Temperaturprogramm für die qPCR.....	43
Abbildung 11: Vorgehensweise bei einer Neuriten-Auswuchs-Analyse.....	47
Abbildung 12: Testung von Isolationsmedien für den Verdau von DRG aus der Ratte .....	50
Abbildung 13: Mechanische Zerkleinerung als Teilschritt des Isolationsprotokolls .....	51
Abbildung 14: Ein BSA-Filter konnte zur Aufreinigung von adulten DRG Neuronen genutzt werden .....	52
Abbildung 15: Schema zur optimierten Isolation von adulten und pränatalen DRG Neuronen	53
Abbildung 16: Zellkulturbeschichtungen mit Poly-L-Lysin und Laminin eigneten sich zur Kultivierung von DRG Neuronen.....	54
Abbildung 17: Zusammensetzung der Testmedien und Zeitpunkt des Medienwechsels beeinflussten die metabolische Aktivität von hSGSCs.....	56
Abbildung 18: Zusammensetzung der Testmedien beeinflusste die Morphologie von hSGSCs .....	57
Abbildung 19: Die Kultivierung auf Inserts hatte keinen negativen Einfluss auf die Morphologie von DRG Neuronen.....	59
Abbildung 20: Die Kultivierung auf Inserts hatte keinen negativen Einfluss auf die Morphologie von hSGSCs .....	60

Abbildung 21: Adulte und pränatale DRG Neurone zeigten in Ko-Kultur mit hSGSCs ein stärkeres Auswachsen von Neuriten als ohne Ko-Kultur .....	62
Abbildung 22: Die Neuriten-Gesamtlänge von adulten und pränatalen DRG Neuronen war nach 24 stündiger Ko-Kultur mit hSGSCs signifikant erhöht. ....	63
Abbildung 23: Zellkulturansätze für Differenzierungsanalysen .....	64
Abbildung 24: Basales Genexpressionslevel von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium in Relation zu $\beta$ -Aktin .....	65
Abbildung 25: Relative Genexpression von hSGSCs in Ko-Kultur Medium und in Ko-Kultur mit pränatalen DRG Neuronen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium .....	68
Abbildung 26: Morphologie von hSGSCs in $D^+$ und $D^-/N^+$ nach 48 h .....	68
Abbildung 27: Zellkulturansätze für die Analyse mittels Membran-basiertem Zytokin-Array <i>Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A</i> .....	69
Abbildung 28: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium .....	70
Abbildung 29: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen .....	71
Abbildung 30: Relative Genexpression von hSGSCs unter Serum- und Serumersatz-freien Kultivierungsbedingungen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium .....	75
Abbildung 31: Zeitraffer-Mikroskopie von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für.....	77
48 h.....	77
Abb 32: Morphologische Veränderungen von hSGSCs unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für 16 Tage.....	78
Abb 33: Morphologie von hSGSCs nach Kultivierung in verschiedenen Medien, nach Medienwechsel und Neu-Aussaat.....	80
Abb 34: Zellkulturansätze für die Analyse mittels Membran-basiertem Zytokin-Array <i>Proteome Profiler Human XL Cytokine Array</i> .....	82
Abb 35: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium.....	83
Abbildung 36: Zytokin-Sekretionsprofil von hSGSCs nach Kultivierung mit Standard-Zellkulturmedium und Serum- und Serumersatz-freiem Medium .....	84

Abbildung 37: Immunzytochemische Färbung verschiedener Markerproteine von hSGSCs nach Kultivierung mit Standard-Zellkulturmedium und Serum- und Serumersatz-freiem Medium .	87
Abbildung 38: Direkte Ko-Kultivierung von hSGSC und primären DRG Neuronen .....	88
Abbildung 39: Vorgehensweise für das Besiedeln von Hydrogel-Scheiben .....	90
Abbildung 40: Verschiedene Detektionsverfahren ermöglichten die Darstellung von hSGSCs auf Hydrogel-Scheiben .....	91
Abbildung 41: Handhabung von Hydrogel-basierten Nervenleitschienen.....	92
Abbildung 42: Besiedlung von NeuraGen <sup>®</sup> mit hSGSCs in einer Matrix aus Fibrin.....	93
Abbildung 43: Fotos des Zytokin-Arrays <i>Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A</i> von R&D Systems.....	vi
Abbildung 44: Fotos des Zytokin-Arrays <i>Proteome Profiler Human XL Cytokine Array</i> von R&D Systems .....	vii
Liste mit Zytokinen des Zytokin-Arrays <i>Proteome Profiler Human XL Cytokine Array</i> von R&D Systems .....	viii
Liste mit Zytokinen des Zytokin-Arrays <i>Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A</i> von R&D Systems.....	ix
Liste der im B-27 enthaltenen Komponenten (Herstellerangaben, ohne Konzentrationsangaben).....	ix
Abbildung 45: Nestin-positive hSGSCs .....	xiii
Abbildung 46: Ergänzung zur Abbildung 33: hSGSCs 7 Tage nach Neu-Aussaat in D <sup>+</sup> und D <sup>-</sup> /N <sup>-</sup> .....	xiii
Abbildung 47: Relative Genexpression von hSGSCs unter Kultivierung mit verschiedenen Medienzusammenstellungen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium .....	xv

## VII.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer .....	29
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper.....	30
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper .....	30
Tabelle 4: Bezeichnung der verwendeten Medien und Medienzusammensetzungen .....	55
Tabelle 5: Zusammenfassung der untersuchten Zytokine, die hSGSCs bei Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium D <sup>+</sup> produzieren.....	x

## VII.3. Abkürzungsverzeichnis

alpha SMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
b3T	beta 3 Tubulin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMSCs	<i>Bone Marrow Stem Cells</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CAMs	<i>Cell Adhesion Molecules</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DKK	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor</i>
DMEM / D	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMB	Einrichtung für Marine Biotechnologie
FDA	Fluoresceindiacetat
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GDNF	<i>Glial-Derived Neurotrophic Factor</i>
Gro	<i>Growth-related oncogen</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
hSGSC	<i>human Sweat Gland- Derived Stem Cells</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor- Binding Protein</i>
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Klf-4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LIFR	<i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>
Map2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
Mg	Magnesium
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonucleic acid</i>

MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Neurobasal
NF	Neurofilament
NFH	Neurofilament schwere Kette
NFL	Neurofilament leichte Kette
NFM	Neurofilament mittlere Kette
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NT	Neutrophin
Oct-4	Octamer-binding Transcription Factor 4
P	Passage
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGA	<i>Polyglycolic Acid</i>
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PI	Propidiumiodid
PLA	<i>Polylactic Acid</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	Peripheres Nervensystem
px	Pixel
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDF	<i>Stromal Cell-Derived Factor</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Serpin	Serin Protease Inhibitor
Sox2	<i>SRY (Sex determining Region Y)-Box 2</i>
t/u PA	<i>tissue/urokinase plasminogen activator</i>
TBST	Tris-Buffered Saline and Triton X-100
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
U	<i>Units</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem



VII.4. Ergänzendes Material

VII.4.1. Membranen der Zytokin-Arrays

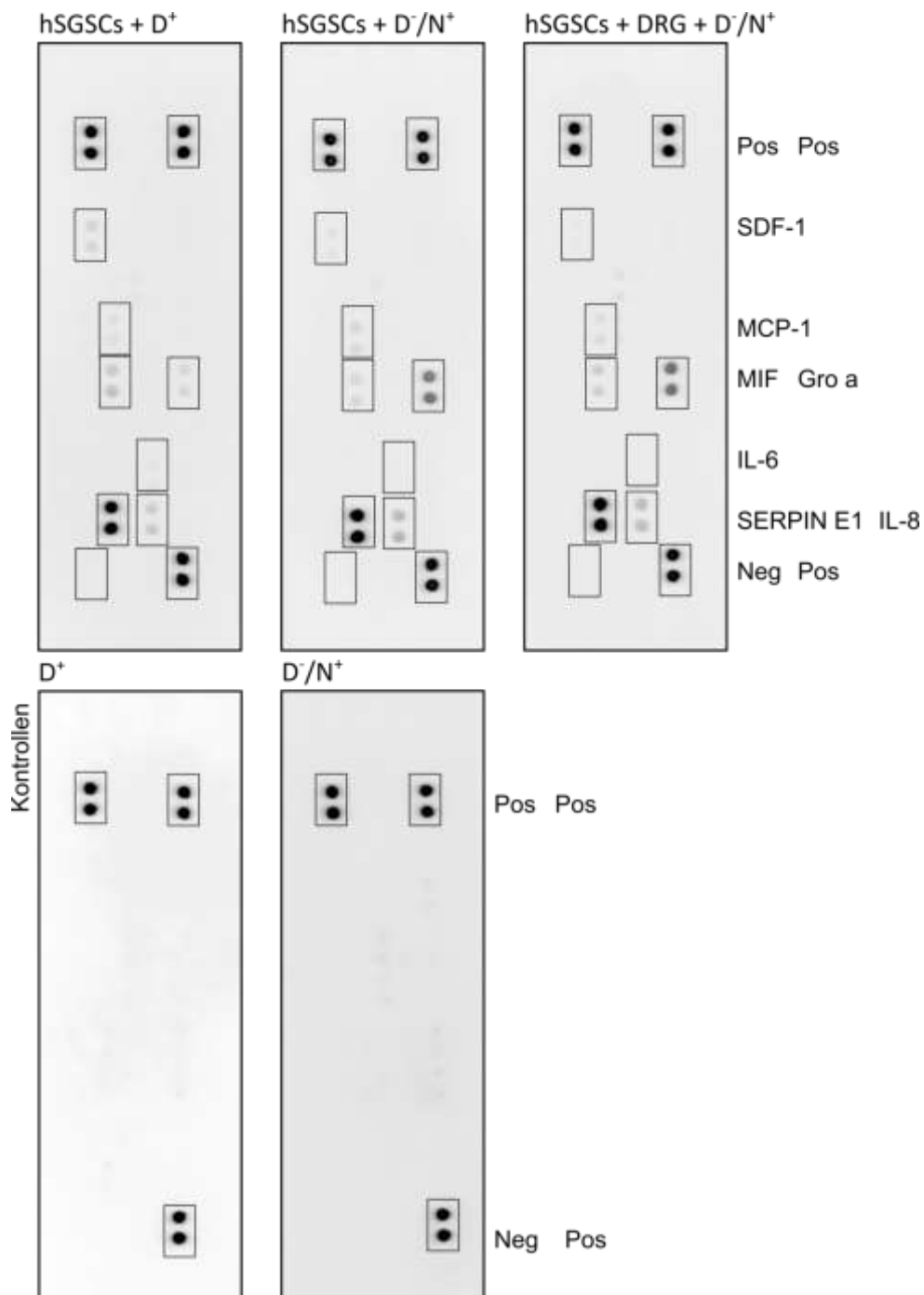


Abbildung 43: Fotos des Zytokin-Arrays *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* von R&D Systems

Die Membranen wurden mit dem Chemilumineszenz-Detektor Fusion SL fotografiert und die Fotos für die weitere Auswertung verwendet. Alle detektierten Zytokin-Spots wurden in dieser Abbildung markiert und mit den entsprechenden Zytokinen benannt.

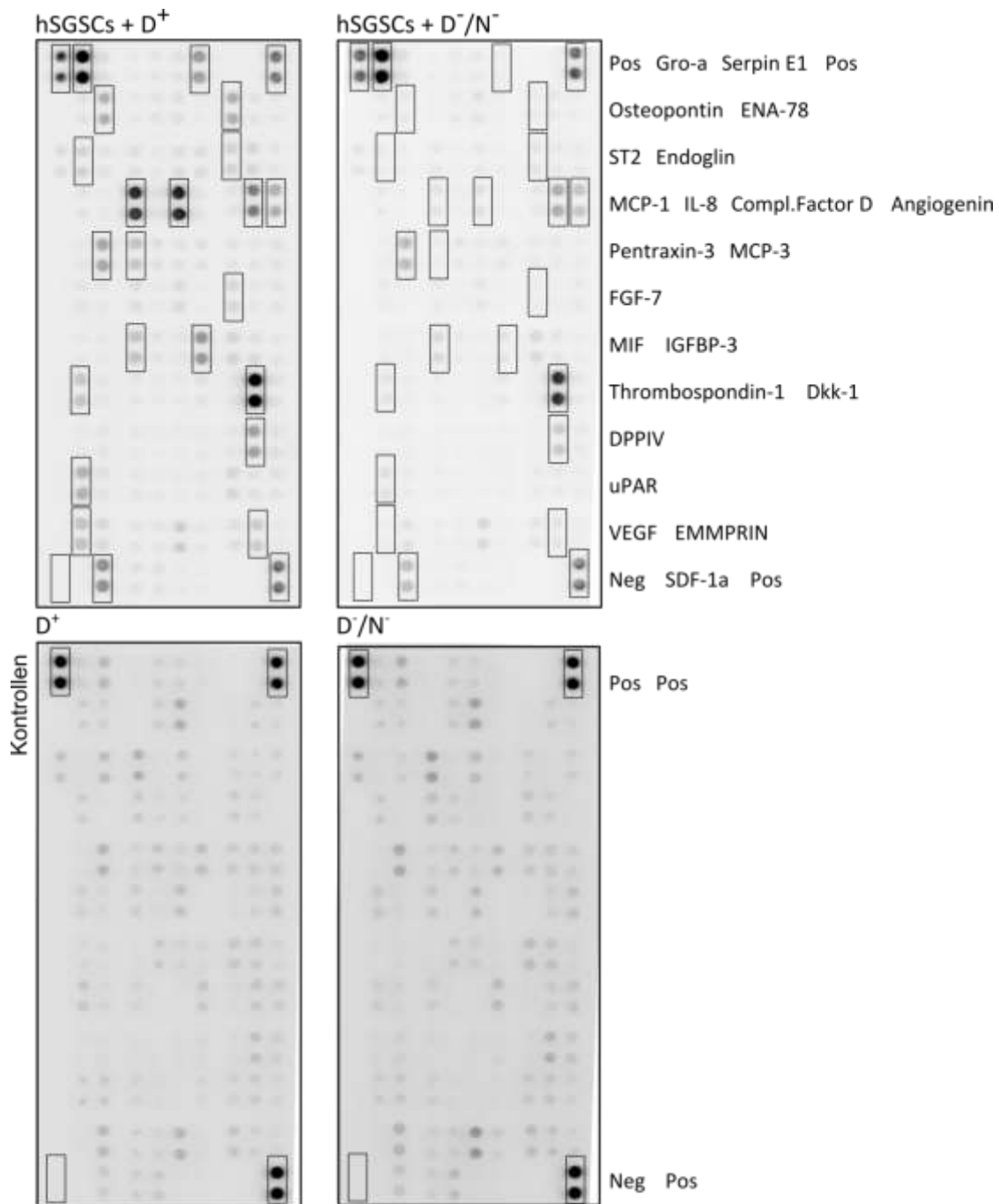


Abbildung 44: Fotos des Zytokin-Arrays *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems

Die Membranen wurden mit dem Chemilumineszenz-Detektor Fusion SL fotografiert und die Fotos für die weitere Auswertung verwendet. Alle detektierten Zytokin-Spots wurden in dieser Abbildung markiert und mit den entsprechenden Zytokinen benannt.

## VII.4.2. Zytokin-Listen der Zytokin-Arrays

Liste mit Zytokinen des Zytokin-Arrays *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* von R&D Systems

Adiponectin/Acrp30	IFN-gamma	Lipocalin-2/NGAL
Aggrecan	IGFBP-2	CCL2/MCP-1
Angiogenin	IGFBP-3	CCL7/MCP-3
Angiopoietin-1	IL-1 alpha/IL-1F1	M-CSF
Angiopoietin-2	IL-1 beta/IL-1F2	MIF
BAFF/BLyS/TNFSF13B	IL-1ra/IL-1F3	CXCL9/MIG
BDNF	IL-2	CCL3/CCL4 MIP-1 alpha/beta
CD14	IL-3	CCL20/MIP-3 alpha
CD30	IL-4	CCL19/MIP-3 beta
CD40 Ligand/TNFSF5	IL-5	MMP-9
Chitinase 3-like	IL-6	Myeloperoxidase
Complement Component C5/C5a	IL-8	Osteopontin (OPN)
Complement Factor D	IL-10	PDGF-AA
C-Reactive Protein/CRP	IL-11	PDGF-AB/BB
Cripto-1	IL-12 p70	Pentraxin 3/TSF-14
Cystatin C	IL-13	CXCL4/PF4
Dkk-1	IL-15	RAGE
DPPIV/CD26	IL-16	CCL5/RANTES
EGF	IL-17A	RBP4
CXCL5/ENA-78	IL-18 BPa	Relaxin-2
Endoglin/CD105	IL-19	Resistin
EMMPRIN	IL-22	CXCL12/SDF-1 alpha
Fas Ligand	IL-23	Serpin E1/PAI-1
FGF basic	IL-24	SHBG
KGF/FGF-7	IL-27	ST2/IL1 R4
FGF-19	IL-31	CCL17/TARC
Flt-3 Ligand	IL-32 alpha/beta/gamma	TFF3
G-CSF	IL-33	TfR
GDF-15	IL-34	TGF-alpha
GM-CSF	CXCL10/IP-10	Thrombospondin-1
CXCL1/GRO alpha	CXCL11/I-TAC	TNF-alpha
Growth Hormone (GH)	Kallikrein 3/PSA	uPAR
HGF	Leptin	VEGF
ICAM-1/CD54	LIF	Vitamin D BP

Liste mit Zytokinen des Zytokin-Arrays *Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* von R&D Systems

C5a	IL-4	IL-32 alpha
CD40 Ligand/TNFSF5	IL-5	CXCL10/IP-10
G-CSF	IL-6	CXCL11/I-TAC
GM-CSF	IL-8	CCL2/MCP-1
CXCL1/GRO alpha	IL-10	MIF
CCL1/I-309	IL-12 p70	CCL3/MIP-1 alpha
ICAM-1	IL-13	CCL4/MIP-1 beta
IFN-gamma	IL-16	CCL5/RANTES
IL-1 alpha/IL-1F1	IL-17	CXCL12/SDF-1
IL-1 beta/IL-1F2	IL-17E	Serpin E1/PAI-1
IL-1ra/IL-1F3	IL-23	TNF-alpha
IL-2	IL-27	TREM-1

#### VII.4.3. Zusammensetzung von B-27

Liste der im B-27 enthaltenen Komponenten (Herstellerangaben, ohne Konzentrationsangaben)

Vitamine	Biotin
	DL Alpha-Tocopherol Acetat
	DL Alpha-Tocopherol
	Vitamin A (Acetat)
Proteine	BSA, <i>fatty acid free</i> Fraction V
	Humanes Rekombinantes Insulin
	Humanes Transferrin
	Superoxid Dismutase
Andere Komponenten	Corticosteron
	D-Galactose
	Ethanolamin HCl
	Glutathion (reduziert)
	L-Carnitin HCl
	Linolsäure
	Linolensäure
	Progesteron
	Putrescin 2HCl
	Natriumselenit
	T3 (Triiodthyronin)

#### VII.4.4. Detektierte Zytokine

**Tabelle 5: Zusammenfassung der untersuchten Zytokine, die hSGSCs bei Kultivierung in Standard-Zellkulturmedium D<sup>+</sup> produzieren.**

Die Zytokine wurden mit zwei verschiedenen Zytokin-Arrays von R&D Systems nachgewiesen (*Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A* und *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array*).

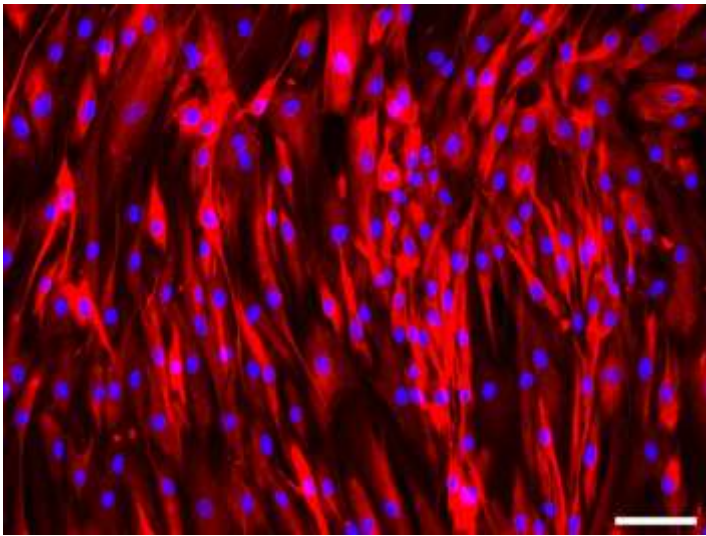
Abkürzungen der Zytokine: Gro  $\alpha$  (*Growth regulated oncogene-alpha*), IL-6 (Interleukin-6), IL-8 (Interleukin-8), MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*), Serpin E1 (*Serin protease inhibitor E1*), Dkk-1 (*Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*), DPPIV (*Dipeptidylpeptidase 4*), EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*), ENA-78 (*Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*), FGF-7 (*Fibroblast growth factor 7*), IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor-binding protein-3*), MCP-3 (*Monocyte chemotactic protein-3*), SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*), IL1 R4 (*Interleukin 1 receptor-like 1*), uPAR (*Urokinase-type plasminogen activator receptor*), VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)

Angiogenin	Induziert Angiogenese (Fett et al., 1985) Interagiert mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen um Migration, Invasion, Proliferation und die Bildung tubulärer Strukturen zu induzieren (Gao und Xu, 2008) Hat neuroprotektive Eigenschaften im ZNS (Steidinger et al., 2011)
Complement Factor D	Spielt als Teil des Serum Complements eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen während der Wallerischen Degeneration (Dailey et al., 1998)
Dkk-1	Wirkt als Antagonist des Wnt-Signalweges (Wang et al., 2000) Erforderlich für die Embryogenese im Mausmodell (Mukhopadhyay et al., 2001)
DPPIV/CD26	Reguliert Glykämie und spielt eine Rolle bei einer Vielzahl von Signalwegen, Zell-Matrix-Interaktionen und der Aktivität vieler Proteine (Zhong et al., 2013)
EMMPRIN	Reguliert Matrix-Metalloproteinasen (Ayva et al., 2013) Hat eine Funktion bei der Gefäßpermeabilität und der Aktivierung von Leukozyten (Wei et al., 2014)
ENA-78/CXCL5	Wirkt chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten (Walz et al., 1997)
Endoglin/CD105	Ist ein Co-Rezeptor für TGF- $\beta$ , von dem es auch eine lösliche Form gibt (Nassiri et al., 2011). Ist involviert in Angiogenese (Duff et al., 2003)
FGF-7/KGF	Stimuliert Migration von Keratinozyten (Garlick und Taichman, 1994) Fördert Zellproliferation von epidermalen Zellen (Guo et al., 1993) Ist ein wichtiger Faktor für DRG Neurone nach einer Nervenverletzung (Li et al., 2002)

Gro $\alpha$ /CXCL1	Wirkt chemoattraktiv und aktivierend auf Neutrophile (Schumacher et al., 1992) Fördert die Wundheilung durch Stimulation der Keratinozyten-Proliferation (Rennekampff et al., 1997) Wichtig bei Proliferation und Migration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen (Filipovic et al., 2003)
IGFBP-3	Transportiert IGFs ( <i>Insulin Growth Factor</i> ) durch den Blutkreislauf und bringt sie zu spezifischen Zelltypen (Clemmons, 1993)
IL-6	Reguliert Übergang von angeborener zu adaptiver Immunabwehr (Jones, 2005) Wirkt neuroprotektiv bei Excitotoxizität (Carlson et al., 1999) Wird im degenerierenden peripheren Nerven von Fibroblasten und Makrophagen exprimiert (Reichert et al., 1996)
IL-8/CXCL8	Wirkt chemoattraktiv und aktivierend auf Neutrophile (Baggiolini et al., 1989) Fördert Proliferation und Überleben von Endothelzellen (Li et al., 2003) Begünstigt die Reepithelialisierung und verringert die Wundkontraktion (Rennekampff et al., 2000)
MCP-1/CCL2	Wird von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten als Chemoattraktant für Monozyten bei einer Entzündungsreaktion produziert (Gibran et al., 1997) Fördert Migration von Endothelzellen und induziert Angiogenese (Salcedo et al., 2000) Wirkt chemoattraktiv auf T-Lymphozyten (Carr et al., 1994) Wird von Schwannzellen nach einer Nervenläsion produziert (Taskinen und Røyttä, 2000)
MCP-3/CCL7	Wirkt chemoattraktiv und aktiviert Monozyten und Neutrophile (Xu et al., 1995) Wirkt chemotaktisch auf Makrophagen (Xuan et al., 2015)
MIF/GIF/DER6	Wirkt als pro-inflammatorischer Mediator, da es von vielen Immunzellen exprimiert wird, viele Prozesse der angeborenen Immunantwort reguliert und die pro-inflammatorische Immunantwort induziert (Calandra und Roger, 2003) Beschleunigt die periphere Nervenregeneration und verhindert Apoptose von Schwannzellen (Nishio et al., 2002)
Osteopontin	Ist eine Komponente der EZM von Knochen, aber auch in diversen anderen Geweben, z. B. Schweißdrüsen vorhanden Interagiert mit Integrinen und kann somit Bindung und Migration vermitteln (Sodek et al., 2000)

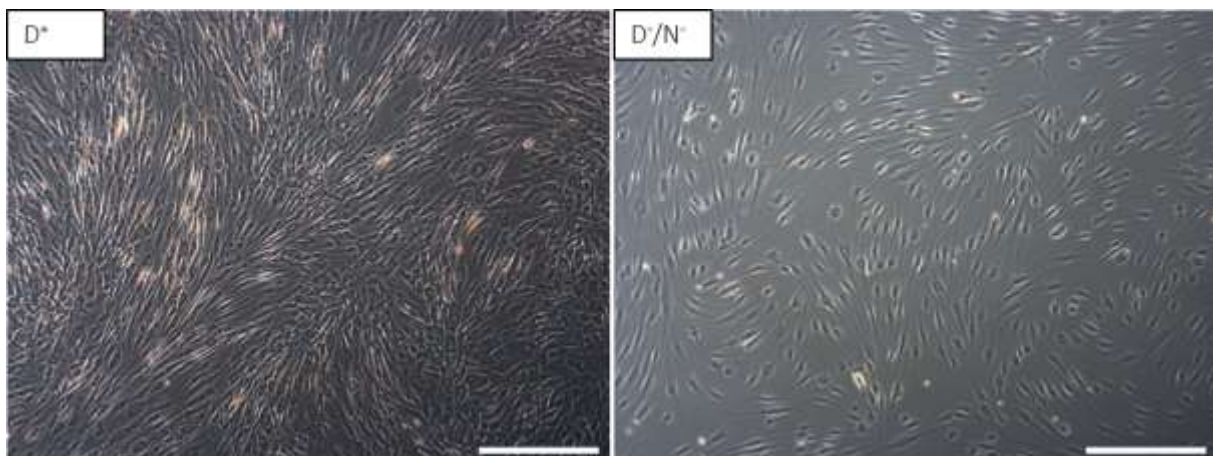
	Schützt Epithelzellen vor Apoptose (Scatena et al., 1998)
Pentraxin-3/TSF-14	Aktiviert Komplement, erkennt und bindet Mikroorganismen, steigert Phagozytose-Aktivität von Makrophagen (Garlanda et al., 2002, 2005)
SDF-1alpha/CXCL12	Steuert die Migration von Stammzellen bei Organogenese und Regeneration (Ma et al., 1998) Wirkt chemoattraktiv auf Lymphozyten und blockiert HIV- Eintritt (Bleul et al., 1996)
Serpin E1/PAI-1	Reguliert Fibrinolyse und EZM-Umbau (Declerck und Gils, 2013) Reguliert Migration von Epithelzellen während der Wundheilung (Providence und Higgins, 2004) Wird in peripheren Nerven nach einer Nervenläsion hochreguliert (Yamanaka et al., 2005)
ST2/IL1 R4	Befindet sich als lösliche Form des Rezeptors im Blutkreislauf. Erhöhte Konzentration bei entzündlichen Erkrankungen und Herzerkrankungen. Wirkt als Decoy-Rezeptor für IL-33 (Shah und Januzzi, 2010)
Thrombospondin-1	Verhindert Tumorprogression durch Inhibition der Angiogenese. (Lawler, 2002)
uPAR	Die lösliche Form des Rezeptors korreliert mit aktiviertem Immunsystem und Gewebeumbauprozessen (Smith und Marshall, 2010) Wird von Osteopontin induziert (Vaschetto et al., 2015)
VEGF	Reguliert Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen und induziert Angiogenese (Cross und Claesson-Welsh, 2001) Fördert die Regeneration peripherer Nerven (Mohammadi et al., 2013) Begünstigt die Heilung chronischer Wunden (Yan et al., 2010)

## VII.4.5. Ergänzende Aufnahmen von hSGSCs



**Abbildung 45: Nestin-positive hSGSCs**

Der Marker Nestin wurde stets in über 80 % der Zellen exprimiert. Marker für hSGSCs: Nestin (rot), Marker für Zellkerne: DAPI (blau), Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

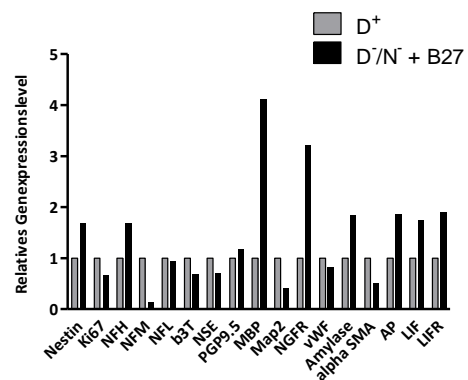
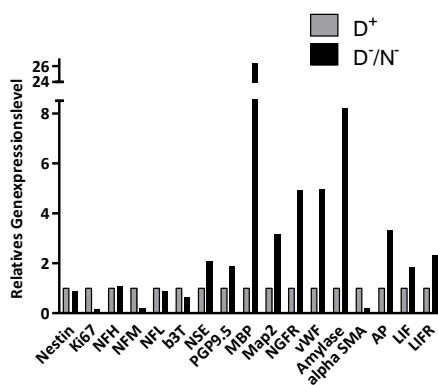
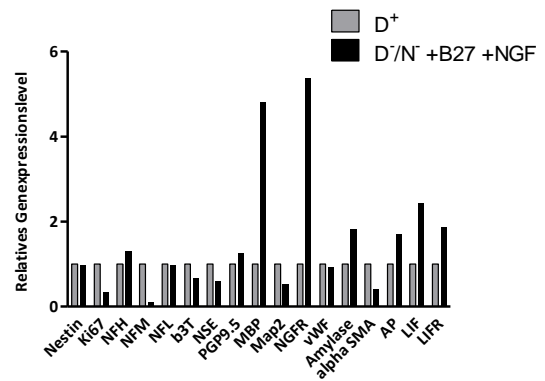
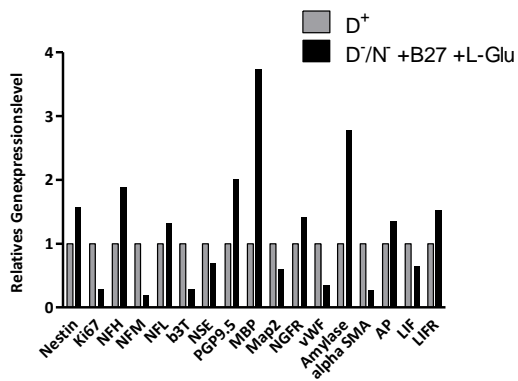
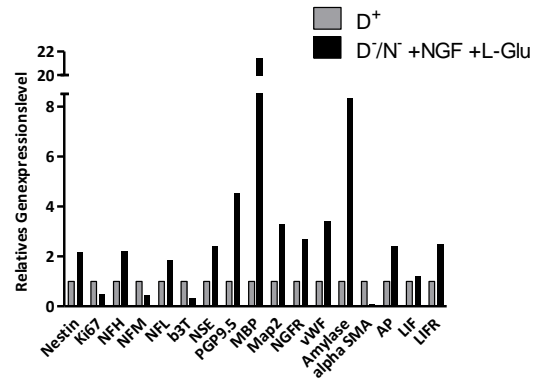
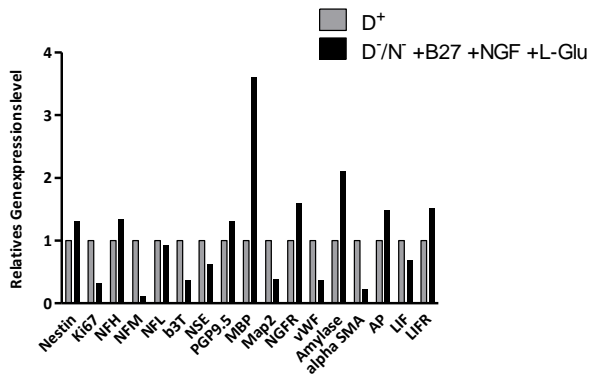


**Abbildung 46: Ergänzung zur Abbildung 33: hSGSCs 7 Tage nach Neu-Aussaat in  $D^+$  und  $D^-/N^-$**

Nach Kultivierung von hSGSCs für 24 h in Standard-Zellkulturmedium ( $D^+$ ) wurde in  $D^-/N^-$  gewechselt und für 48 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch durch Trypsin abgelöst und neu ausgesät. Eine Neu-Aussaat erfolgte in  $D^+$  und in  $D^-/N^-$ . In beiden Medien adhärten die Zellen. Die Morphologie in  $D^-/N^-$  war typisch abgerundet und die Zelldichte war geringer als in  $D^+$ . In  $D^+$  proliferierten die Zellen wieder (siehe Abb. 33, IV.4.2). Dieses Verhalten ist nach 7 Tagen gleichbleibend. Maßstab = 500  $\mu\text{m}$



VII.4.6. Ergänzende Daten der qPCR Analysen



#### **Abbildung 47: Relative Genexpression von hSGSCs unter Kultivierung mit verschiedenen Medienzusammenstellungen im Vergleich zur Genexpression von hSGSCs in Standard-Zellkulturmedium**

Die Genexpression von hSGSCs wurde jeweils relativ zur Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin gemessen. Es wurden verschiedene Medienzusammenstellungen jeweils mit dem Standard-Zellkulturmedium  $D^+$  verglichen. Die Grundlage der Testmedien bildete  $D^-/N^-$ . Verschiedene Medienzusätze, die in  $N^+$  vorhanden sind (B-27, NGF, L-Glu) wurden in Kombinationen verwendet um den Einfluss einzelner Komponenten auf die Genexpression zu untersuchen. Eine auffällige Beobachtung war die starke Hochregulierung einiger Markergene in den Ansätzen, in denen kein B-27 vorhanden war und somit Serum- und Serumersatz-frei kultiviert wurde. Diese Ergebnisse liefern die Grundlage für die in IV.4. durchgeführten Versuche zur Serum- und Serumersatz-freien Kultivierung von hSGSCs.  $n = 1$ , es erfolgte keine statistische Auswertung

#### **VII.5. Video der Zeitraffermikroskopie**

Video: siehe DVD

#### VII.6. **Eidesstattliche Versicherung**

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

Lübeck, den

## VII.7. Wissenschaftliche Publikationen

### **Artikel, Peer-Reviewed:**

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

**Mehnert JM**, Kisch T, Brandenburger M

Co-culture systems of human sweat gland derived stem cells and peripheral nerve cells: an in vitro approach for peripheral nerve regeneration

Cell Physiol Biochem 2014;34(4):1027-37

Weitere Publikationen:

**Mehnert JM**, Brandenburger M, Grunow B

Electrophysiological characterization of spontaneously contracting cell aggregates obtained from rainbow trout larvae with multielectrode arrays

Cell Physiol Biochem. 2013;32(5):1374-85

Kisch T, **Klemens JM**, Hofmann K, Liodaki E, Gierloff M, Moellmeier D, Stang F, Mailaender P, Habermann J, Brandenburger M

Collection of wound exudate from human digit tip amputations does not impair regenerative healing: A randomized trial

Medicine. 2015 Oct;94(41):e1764

Kohn C, **Klemens JM**, Kascholke C, Murthy NS, Kohn J, Brandenburger M, Hacker MC

Tubular conduits from oligomer-cross-linked gelatin hydrogels - Potential nerve guidance materials

(Eingereicht 04/2016: Advanced Healthcare Materials)

### **Vorträge:**

Pharmacological characterization of spontaneously contracting cell aggregates from rainbow trout larvae. YOUMARES 3, 14.09.2012, Lübeck

Pharmacological characterization of spontaneously contracting cell aggregates from rainbow trout larvae. 1<sup>st</sup> Symposium: Application and conservation of wildlife cell cultures, 30.08.2013, Hamburg

Sweat Gland-Derived Stem Cells For Peripheral Nerve Regeneration. 5th Lübeck Regenerative Medicine Symposium, 14.06.2014, Lübeck

Characterisation of sweat gland-derived stem cells for the application in peripheral nerve regeneration. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Peripheral Nerve Regeneration, 24.09.2015, Hannover

**Posterpräsentationen:**

**Mehnert JM**, Becker T, Stang F, Kisch T, Brandenburger M

Skin derived precursors for peripheral nerve repair. 4th Lübeck Regenerative Medicine Symposium - Wound healing: Turning knowledge into technology, 27-28.6.2013, Lübeck

**Mehnert JM**, Becker T, Brandenburger M

Glandular stem cells for regeneration of peripheral nerve lesions. World conference on regenerative medicine, 23-25.10.2013, Leipzig

**Mehnert JM**, Brandenburger M

Glandular stem cells for regeneration of peripheral nerve lesions. 8th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, 19-22.04.2014, Magdeburg

**Mehnert JM**, Kisch T, Brandenburger M

Co-culture systems of human sweat gland derived stem cells and peripheral nerve cells. Fraunhofer Life Science Symposium, 09-10.10.2014, Leipzig

**Klemens JM**, Becker T, Brandenburger M

In vitro characterization of human sweat gland derived stem cells for their application in peripheral nerve regeneration. 6<sup>th</sup> Annual Meeting: Industrial Cell Technology Symposium, 10-11.09.2015, Lübeck

VII.8. Lebenslauf

## VII.9. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Charli Kruse für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der Fraunhofer EMB anzufertigen. Vielen Dank für die Bereitstellung dieses spannenden und vielfältigen Themengebietes in der regenerativen Medizin und das Vertrauen in meine Arbeit.

Dr. Matthias Brandenburger danke ich für die Betreuung in den drei Jahren meiner Doktorandenzeit, für die wertvollen Korrekturen meiner Arbeit und den freundschaftlichen Umgang miteinander.

Ein großer Dank gilt meinen wundervollen Kollegen der EMB, insbesondere der Arbeitsgruppe Zelldifferenzierung, für den guten Zusammenhalt und die gegenseitige Hilfe in allen Fragestellungen. Besonders danke ich auch Carolin Wienke und Tanja Zuhl für die Unterstützung im Labor und am Mikroskop und Dr. Tim Becker für die gemeinsamen Experimente mit der Zeitraffermikroskopie.

Tanja Lüneburg danke ich für Ihre Mitarbeit im Rahmen Ihres Praktikums an der EMB. Die gemeinsame Zeit hat mir viel Spaß bereitet und wir haben in guter Teamarbeit viele neue Erkenntnisse gewonnen.

Für die anregenden Gespräche und die hervorragende Zusammenarbeit danke ich Dr. Tobias Kisch aus der Plastischen Chirurgie und Handchirurgie des Universitätsklinikums Lübeck.

Die Kooperation mit Dr. Michael Hacker und Caroline Kohn vom Lehrstuhl Pharmazeutischen Technologie aus dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig hat mir Freude bereitet und mir Einblicke in ein neues interessantes Themengebiet ermöglicht. Dafür und auch für das freundschaftliche Verhältnis zueinander, danke ich den beiden.

Bei Dennis Wendt bedanke ich mich für die Herstellung vieler kleiner 3D-Druck Modelle, die mir die Arbeit sehr erleichtert haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern danke ich, dass sie mich während des Studiums und der Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt, ermutigt und mir in allen Situationen mit gutem Rat beigestanden haben. Oli danke ich für die liebevolle und geduldige Unterstützung in allen Lebenslagen und für die vielen Stunden, die er mir und den Korrekturen meiner Arbeit geschenkt hat.