

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zielsetzung.....	1
2 Literatur.....	3
2.1 Stammzellen	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Vorkommen.....	4
2.1.3 Gewinnung	5
2.1.4 Charakterisierung	6
2.2 Neuronale Stammzellen <i>in vivo</i>	8
2.2.1 Im Embryo.....	8
2.2.2 Im adulten Organismus	12
2.2.3 Die Rolle der Gliazellen	14
2.3 Kultivierung und Differenzierung neuronalen Gewebes <i>in vitro</i>	15
2.3.1 Kulturbedingungen von Neuronen und Gliazellen.....	17
2.3.2 Differenzierung von Stammzellen in die neuronale Richtung	25
2.3.3 Differenzierung von Stammzellen in die gliale Richtung.....	32
2.4 Bildung von Sphäroiden zur Einleitung der neuronalen Differenzierung.....	33
2.4.1 Definition Sphäre	34
2.4.2 Kulturbedingungen.....	36
2.5 Anwendung labortechnischer Methoden zur Untersuchung von Sphäroiden	41
2.5.1 Metrische Untersuchungen.....	41
2.5.2 Vitalität.....	42
2.5.3 Morphologie.....	43
2.5.4 Nachweis spezifischer Marker	44
2.6 Weiterdifferenzierung der Sphäroide	47
2.6.1 Oberflächenbeschichtungen	47
2.6.2 Medien und Medienzusätze.....	48
2.7 Anwendung labortechnischer Methoden zur Untersuchung der weiterdifferenzierten Zellen	49
2.7.1 Morphologie.....	50
2.7.2 Nachweis spezifischer Marker	51
3 Materialien.....	53

3.1	Geräte und Laborhilfen.....	53
3.2	Glas-, Plastik und Verbrauchsware	55
3.3	Chemikalien.....	56
3.3.1	Verwendete Chemikalien für die Charakterisierung der MSCs.....	56
3.3.2	Verwendete Chemikalien für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....	57
3.3.3	Verwendete Chemikalien und Enzyme für die PCR.....	57
3.3.4	Verwendete Chemikalien für die Elektronenmikroskopie.....	58
3.3.5	Verwendete Chemikalien für den Western Blot	59
3.3.6	Sonstige Chemikalien.....	59
3.4	Medien, Medienzusätze und Wachstumsfaktoren.....	59
3.5	Primer	61
3.6	Antikörper.....	61
3.6.1	Verwendete Antikörper für den Western Blot	61
3.6.2	Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz	62
3.7	Verwendete Software	62
3.8	Probenmaterial.....	63
3.9	Verwendete Zelllinien	63
4	Methoden	64
4.1	Kultivierung der MSCs im Monolayer.....	64
4.1.1	Isolierung der MSCs.....	64
4.1.2	Passagieren, Kryokonservierung und Auftauen der MSCs.....	65
4.1.3	Charakterisierung der MSCs	67
4.2	Neuronale Prädifferenzierung innerhalb einer Sphäroidkultur	71
4.2.1	Antiadhäsive Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten mit Agarose	71
4.2.2	Antiadhäsive Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten mit Poly-HEMA	72
4.2.3	Antiadhäsive Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten mit Silikon	72
4.2.4	Kultivierung in serumfreiem Medium.....	74
4.2.5	Bestimmung der Anzahl, Größe und Zellzahl der Sphären	76
4.2.6	Propagation der Sphären	77
4.2.7	MTT-Test	77
4.2.8	Propidiumiodid-Färbung	78
4.2.9	Ki-67-Färbung.....	79
4.2.10	Transmissionselektronenmikroskopie.....	81

4.3	Neuronale Differenzierung der Sphären.....	82
4.3.1	Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin	82
4.3.2	Oberflächenbeschichtung der Zellkulturplatten mit Gelatine	83
4.3.3	Zeitraffermikroskopie der adhäsiven Sphären (Life Cell Imaging).....	83
4.4	Charakterisierung der Genexpression.....	84
4.4.1	RNA-Isolation	84
4.4.2	Photometrische Messung des RNA-Gehalts	85
4.4.3	Gewinnung der komplementären DNA (cDNA) mittels reverser Transkription	85
4.4.4	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	87
4.4.5	Primerdesign.....	88
4.4.6	Gelelektrophorese.....	88
4.4.7	RT-qPCR.....	89
4.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	91
4.6	Western Blot.....	93
4.6.1	Gewinnung des Zelllysats	93
4.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	94
4.6.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	94
4.6.4	Blotten	95
4.6.5	Immunodetektion	96
4.7	Statistische Auswertung	97
5	Ergebnisse.....	99
5.1	Charakterisierung der MSCs	99
5.1.1	Nachweis der Expression spezifischer Oberflächenantigene.....	99
5.1.2	Nachweis der Differenzierbarkeit der MSCs	101
5.2	Neuronale Prädifferenzierung durch Induktion der Sphärenbildung	103
5.2.1	Kultivierung von Sphäroiden auf Agarose.....	103
5.2.2	Kultivierung von Sphäroiden auf Poly-Hema	104
5.2.3	Kultivierung von Sphäroiden auf Silikon.....	105
5.2.4	Sphärenbildung unter Zugabe verschiedener Medienzusätze	106
5.2.5	Beschaffenheit der Sphären.....	115
5.2.6	Vitalität der Sphären.....	117
5.2.7	Ultrastrukturelle Morphologie der Sphären	121
5.3	Weiterdifferenzierung der Sphären	125

5.3.1	Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf das Auswanderungsverhalten der Zellen aus den Sphären	126
5.3.2	Morphologie und Auswanderungsverhalten der Zellen	127
5.4	Nachweis einiger Marker auf mRNA- und Proteinebene während der Prädifferenzierung und Weiterdifferenzierung der Zellen	131
5.4.1	Hinweise auf eine beginnende neuronale Differenzierung	132
5.4.2	Hinweise auf eine fortschreitende neuronale Differenzierung	143
5.4.3	Hinweise auf eine Differenzierung in glialer Richtung	148
6	Diskussion	150
6.1	Diskussion der Fragestellung	150
6.2	Diskussion der Methoden	151
6.2.1	Kultivierung und Charakterisierung der cMSCs	151
6.2.2	Prädifferenzierung der cMSCs durch Bildung von Sphären	153
6.2.3	Untersuchung der Beschaffenheit und Vitalität der Sphären	156
6.2.4	Neuronale Differenzierung der Sphären	158
6.2.5	Untersuchung der Expression neuronaler Marker	159
6.3	Diskussion der Ergebnisse	161
6.3.1	Charakterisierung der cMSCs	161
6.3.2	Kultivierung der Sphären	162
6.3.3	Beschaffenheit und Vitalität der Sphären	165
6.3.4	Kultivierung während der neuronalen Differenzierung der Sphären	168
6.3.5	Zellmorphologie während der neuronalen Differenzierung der Sphären	169
6.3.6	Expression neuronaler Marker	169
6.4	Ausblick	173
7	Zusammenfassung	175
8	Summary	179
9	Literaturverzeichnis	183
	Abbildungsverzeichnis	217
	Tabellenverzeichnis	219
	Anhang	221
	Danksagung	233