

AUS DEM INSTITUT FÜR ANATOMIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

AUS DER ARBEITSGRUPPE PD DR. RER. NAT. C. ANDRESSEN

INSTITUTSDIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. M. KIPP

# DER EINFLUSS DER EXTRAZELLULARMATRIX AUF DAS DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN NEURALER STAMMZELLEN DER EMBRYONALEN RATTE

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doktor der Medizin*  
der Universitätsmedizin Rostock

## VORGELEGT VON

KEVIN ALBERS | GEB. AM 04.08.1994 | IN MÜNSTER

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00004468](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004468)

**Gutachter:** PD Dr. rer. nat. Christian Andressen  
Medizinische Fakultät OWL  
Universität Bielefeld

PD Dr. phil. nat. habil. Moritz Frech  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold  
Institut für Veterinär- Anatomie,-Histologie,- und Embryologie  
Universität Giessen

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2023

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Material	15
2.1.1	Zellen	15
2.1.2	Nährmedien	16
2.1.3	Gebrauchslösungen	16
2.1.4	Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte	16
2.1.5	Antikörperkonzentrationen	16
2.1.6	Verwendete Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.2	Experimenteller Ansatz	18
2.2.3	Durchführung der Kontrollansätze unter Verwendung der 96er Lochplatte	20
2.2.4	Durchführung der experimentellen Ansätze unter Verwendung von Cytodex	20
2.2.5	Zweidimensionale Adhäsionskultur	22
2.2.6	Herstellung von Kryostatschnitten	22
2.2.7	Immunhistochemie	22
2.2.8	Auswertung	23
2.2.9	Statistische Analyse	24
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Charakterisierung der striatalen Stammzellen in Adhäsionskulturen	25
3.2	Differenzierungsverhalten der striatalen Stammzellen im Neurosphärenverband	27
3.2.1	Differenzierungsverhalten unter Proliferationsbedingungen	28
3.2.2	Differenzierungsverhalten unter Verwendung von FCS-haltigen Medien	29
3.2.3	Differenzierungsverhalten unter chemisch definiertem Medium	32
3.3	Differenzierungsverhalten der Stammzellen unter Verwendung von Cytodex	34
3.3.1	Differenzierungsverhalten unter Proliferationsbedingungen	35
3.3.2	Differenzierungsverhalten unter Verwendung von FCS-haltigen Medien	37
3.3.3	Differenzierungsverhalten unter chemisch definiertem Medium	43
3.3.4	Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit vom Entwicklungstag	45
3.4	Differenzierungsverhalten in zweidimensionaler Kultur	47
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1	Einfluss unterschiedlicher löslicher Faktoren auf das Differenzierungspotenzial	49

4.2 Einfluss der Extrazellulärmatrrix auf das Differenzierungsverhalten der NPCs	54
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>Anhang</b>	<b>75</b>
<b>Anhang A: Material und Methoden</b>	<b>75</b>
Anhang A.1 Nährmedien	75
Anhang A.2 Gebrauchslösungen	76
Anhang A.3 Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte	77
Anhang A.4 Antikörperkonzentrationen	80
Anhang A.5 Verwendete Software	80
<b>Anhang B: Ergebnisse</b>	<b>81</b>
Anhang B.1 Auswertung GFAP <sup>+</sup> Zellen	81
Anhang B.2 Auswertung NCAM <sup>+</sup> Zellen	82
Anhang B.3 Auswertung $\beta$ III-Tubulin <sup>+</sup> Zellen	83
Anhang B.4 Auswertung GFAP <sup>+</sup> Zellen mit direktem Cytodexkontakt	84
Anhang B.5 Auswertung NCAM <sup>+</sup> und $\beta$ III-Tubulin <sup>+</sup> Zellen mit direktem Cytodexkontakt	84
Anhang B.6 Auswertung des Vergleiches der Entwicklungstage	85
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>86</b>
<b>Thesen</b>	<b>87</b>
<b>Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>89</b>

**Abbildungsverzeichnis**

---

ABB. 1: BEEINFLUSSUNG DES ZELLVERHALTENS DURCH DIE EXTRAZELLULARMATRIX: .....	11
ABB. 2: EXPERIMENTELLER ANSATZ: .....	19
ABB. 3: 96ER LOCHPLATTE KULTURSCHEMA: .....	20
ABB. 4: 24ER LOCHPLATTE KULTURSCHEMA: .....	21
ABB. 5: IMMUNFLUORESCENZBILD DER S13 ZELLEN IN KULTUR: .....	26
ABB. 6: STAMMZELLEN IN ZELLKULTUR 24H (A) UND 48 H (B) NACH PASSAGIEREN:.....	26
ABB. 7: NEUROSPHÄREN UNTER PROLIFERATIONSBEDINGUNGEN:.....	28
ABB. 8: NEUROSPHÄREN UNTER VERWENDUNG VON PROLIFERATIONSMEDIUM: .....	29
ABB. 9: NEUROSPHÄREN DER DREI ZELLINIEN UNTER 1ZU1-MEDIUM:.....	31
ABB. 10: NEUROSPHÄREN DER DREI ZELLINIEN UNTER DIFFERENZIERUNGSMEDIUM: .....	31
ABB. 11: NEUROSPHÄREN DER DREI ZELLINIEN UNTER STEMCELLMEDIUM: .....	33
ABB. 12: CYTODEX-ZELL-SUSPENSION UNTER VERWENDUNG VON 1ZU1-MEDIUM:.....	34
ABB. 13: CYTODEX-ZELL-SUSPENSION UNTER VERWENDUNG VON PROLIFERATIONSMEDIUM:....	36
ABB. 14: CYTODEX-ZELL-SUSPENSION UNTER VERWENDUNG VON 1ZU1-MEDIUM:.....	39
ABB. 15: DIREKTER CYTODEXKONTAKT DER ZELLEN DER CYTODEX-ZELL-SUSPENSION: .....	40
ABB. 16: CYTODEX-ZELL-SUSPENSION UNTER VERWENDUNG VON DIFFERENZIERUNGSMEDIUM: 42	
ABB. 17: CYTODEX-ZELL-SUSPENSION UNTER VERWENDUNG VON STEMCELLMEDIUM: .....	44
ABB. 18: HEATMAP:.....	45
ABB. 19: ZWEIDIMENSIONALE ADHÄSIONSKULTUR DER DREI ZELLINIEN: .....	47
ABB. 20: EINFLUSS DES DIREKTEN CYTODEXKONTAKTES:.....	60

**Tabellenverzeichnis**

---

TAB. 1: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
TAB. 2: PROLIFERATIONSMEDIUM .....	75
TAB. 3: DIFFERENZIERUNGSMEDIUM.....	75
TAB. 4: STEMCELLMEDIUM .....	75
TAB. 5: FIXIERLÖSUNG .....	76
TAB. 6: KRYOKONSERVIERUNGSLÖSUNG .....	76
TAB. 7: PERMEABILISIERUNGSLÖSUNG .....	76
TAB. 8: CHEMIKALIEN UND ENZYME .....	77
TAB. 9: GEBRAUCHSWAREN UND GERÄTE.....	78
TAB. 10: ANTIKÖRPERKONZENTRATION .....	80
TAB. 11: VERWENDETE SOFTWARE .....	80
TAB. 12: AUSWERTUNG GFAP <sup>+</sup> ZELLEN IM CYTODEX UND SPHÄRENEXPERIMENT .....	81
TAB. 13: AUSWERTUNG NCAM <sup>+</sup> ZELLEN IM CYTODEX UND SPHÄRENEXPERIMENT .....	82
TAB. 14: AUSWERTUNG BIII-TUBULIN <sup>+</sup> ZELLEN IM CYTODEX UND SPHÄRENEXPERIMENT .....	83
TAB. 15: GFAP EXPRESSION DER ZELLEN MIT DIREKTEM CYTODEXKONTAKT .....	84
TAB. 16: NCAM/BIII-TUBULIN EXPRESSION DER ZELLEN MIT DIREKTEM CYTODEXKONTAKT .....	84
TAB. 17: AUSWERTUNG DES VERGLEICHES DER ENTWICKLUNGSTAGE .....	85

**Abkürzungsverzeichnis**

---

Tab. 1: Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Abb.	Abbildung
aIP	Apical intermediate progenitor cell (engl.)
bIP	Basal intermediate progenitor cell (engl.)
BMP	Bone morphogenic protein (engl.)
CGE	Caudal ganglionic eminence (engl.)
CSPG	Chondrolierte sulfatierte Proteoglykane
D1-R	Dopaminrezeptor Typ 1
D2-R	Dopaminrezeptor Typ 2
DCC	Dots on the cell surface (engl.)
dMSN	Direct pathway MSN (engl.)
E13	Entwicklungstag 13
E16	Entwicklungstag 16
E19	Entwicklungstag 19
EGF	Epithelial growth factor (engl.)
Engl.	Englisch
EZM	Extrazellulärmatrrix
FCS	Fetal calf serum (engl.)
FGF	Fibroblast growth factor (engl.)
GABA	Gammaaminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (engl.)
GPC	Glia progenitor cell (engl.)
GPe	Globus pallidus externus

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
GPI	Globus pallidus internus
HD	Huntingtons Disease (engl.)
HSPG	Heparinisierte sulfatierte Proteoglykane
iMSN	Indirect pathway MSN (engl.)
LGE	Lateral ganglionic eminence (engl.)
M	Gewichtetes arithmetisches Mittel
MGE	Medial ganglionic eminence (engl.)
MSN	Medium spiny projection neuron (engl.)
n	Gesamtzellzahl
NCAM	Neural cell adhesion molecule (engl.)
NEP	Neuroepithelzellen
NPC	Neural progenitor cell (engl.)
NSC	Neural stem cell (engl.)
PBS	Phosphat-buffered-saline (engl.)
RG	Radiärgliazellen
SAP	Supapical progenitor cell (engl.)
SGZ	Subgranuläre Zone
SF	Standardfehler
Shh	Sonic hedgehog (engl.)
SNc	Substantia nigra Pars compacta
SNP	Short neural progenitor cell (engl.)
SNr	Substantia nigra pars reticularis
SVZ	Subventrikularzone
Tab.	Tabelle

---

## INHALTS-/ABBILDUNGS-/TABELLEN-/ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ (engl.)
VZ	Ventrikularzone
W-Differenz	Wahrscheinlichkeitsdifferenz
WF	Wachstumsfaktor
ZNS	Zentralnervensystem

---

## I. Einleitung

---

Als wichtiger Bestandteil der Basalganglien nimmt das Striatum eine Schlüsselrolle in der Exekutive des Frontalhirns ein. Dabei leitet es Informationen aus unterschiedlichen Regionen des zerebralen Cortex und des Thalamus, eingeschaltet in einen polysynaptischen Regelkreis, an Zentren von Hirnstamm und Thalamus weiter. Die Informationsverarbeitung innerhalb des Striatums wird durch diverse weitere Afferenzen wie dopaminerger Fasern der Substantia nigra pars compacta (SNc), cholinerges sowie serotonerges Fasern des Hirnstamms (und verschiedener anderer Verbindungen) in ihrer neuronalen Aktivität beeinflusst. Funktionell stellt das Striatum als Informationsvermittler und Modulator das Bindeglied auf- und absteigender Verbindungen zwischen den verschiedenen hoch spezialisierten Hirnregionen dar und spielt dabei nicht nur eine Rolle in Initiierung und Durchführung bewusstseinsgesteuerter motorischer Programme, sondern ermöglicht auch die Integration von Lernprozessen, Emotionen und Motivation in diese [1–3].

Entsprechend dieser zentralen/integrierenden Rolle resultiert aus pathologischen Veränderungen des Striatums oder mit ihm in Verbindung stehender Kerngebiete eine Störung entsprechender Regelkreise mit jeweils charakteristischen Dysfunktionen wie bspw. Dystonien [4–6] oder das Parkinson-Syndrom [7]. Funktionsstörungen lassen sich dabei teilweise auf einzelne Zellpopulationen oder histologische Kompartimente innerhalb des Striatums zurückführen [8]. So geht bei dem Krankheitsbild der Chorea Huntington (engl. Huntington's disease, HD) vorwiegend die Subpopulation mittelgroßer dornentragender Projektionsneurone (engl. medium spiny projection neurons, MSNs) zugrunde, die durch den Gehalt an Dopaminrezeptor Typ 2 (D<sub>2</sub>-R) charakterisiert sind, nicht jedoch die ebenfalls vorhandenen Dopaminrezeptor Typ 1 (D<sub>1</sub>-R) positiven MSNs [9, 10]. Diese D<sub>2</sub>-R positiven MSNs spielen eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Bewegungen, sodass bei ihrem Untergang als charakteristisches Merkmal die für HD typischen unwillkürlichen, unkoordinierten Bewegungen auftreten [11, 12]. Der präferenzielle Zelluntergang innerhalb eines definierten Kompartimentes, dem sogenannten Striosomenkompartiment, konnte auch bei Patienten nachgewiesen werden, die die für HD ebenfalls klassischen emotionalen Störungen schon früh im Krankheitsverlauf vor entsprechenden motorischen Dysfunktionen entwickelten [10].

Aus den o.g. Ausführungen zur Spezifität pathologischer Ausfälle zeigt sich die Bedeutung der Histologie in Zusammenhang mit einer Form-Funktions-Beziehung neuronaler Verschaltungsmuster. Damit kommt der genauen Einstellung und Regulation der Aktivität eines Neurons und seiner afferenten und efferenten Verbindungen innerhalb der sogenannten Basalganglienschleifen eine entscheidende Rolle für das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge zu. Um einzelne Erkrankungen wie z.B. die HD besser verstehen zu können, ist es essenziell nachzuvollziehen, wie sich trotz ähnlicher Morphologie

und elektrophysiologischer Funktion von Neuronenpopulationen (hier MSNs des Striatums) so unterschiedliche pathophysiologische Veränderungen entwickeln können. Hier bietet die Betrachtung der Embryonalentwicklung des Striatums einen Ansatz, um mit den verschiedenen Aspekten der Neurogenese in Form von Proliferation, Migration, Differenzierung und Reifung die entwicklungsbedingten Mechanismen einer funktionellen Diversifikation herauszuarbeiten, gerade auch im Hinblick auf die Bedeutung der Kompartimentierung dieses Kerngebietes. [10, 13].

Histologisch gesehen besteht das Striatum zu weit überwiegenden Teilen (>90 %) aus o.g. MSNs, die den Neurotransmitter Gammaaminobuttersäure (GABA) nutzen [8, 14]. Zu der großen Masse an dornentragenden Projektionsneuronen addiert sich eine geringe Anzahl von Populationen nicht-dornentragender Interneurone, die mit ihren Projektionen innerhalb des Striatums verbleiben. Diese Zellen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich Größe als auch ihrem Gehalt an Neurotransmittern. Es handelt sich dabei um Interneurone, die meist GABA, zum Teil den Neurotransmitter Acetylcholin in Kombination mit anderen neuroaktiven Substanzen wie Somatostatin und/oder Neuropeptid Y nutzen. Ihre weitere Charakterisierung kann dabei über ihren intrazellulären Gehalt bestimmter Proteine wie z.B. Parvalbumin [15] vorgenommen werden. Diese verschiedenen Typen von Interneuronen führen zu einer komplexen Verschaltung innerhalb des Striatums [8, 13, 16].

Dabei zeigt sich eine funktionelle Gliederung in der räumlichen Organisation dieser neuronalen Subtypen im dorsalen Striatum mit Nucleus caudatus und Putamen, die histologisch und hodologisch über die Verteilung der Projektionsneurone in zwei räumlich abgrenzbaren Kompartimenten deutlich zu erkennen ist. Das sogenannte Striosomenkompartiment (ca. 15 % des Striatums ausmachend) ist als labyrinthär angeordnete Zellpopulation in das sog. Matrixkompartiment (ca. 85 %) eingebettet [8, 17, 18]. Durch diese funktionell hochkomplexe Zytoarchitektur entstehen im histologischen Schnitt die Striosomeninseln innerhalb des umgebenden Matrixkompartimentes. Besonders in den Grenzbereichen der beiden Kompartimente finden sich viele Interneurone, die das komplexe Zusammenspiel von striosomalen und MSNs der Matrix ermöglichen [15, 19, 20]. Jede dieser beiden Populationen von Projektionsneuronen partizipiert in spezifischer Weise an zum Teil sich wechselseitig beeinflussenden Funktionsabläufen und trägt damit zur geordneten Verarbeitung von Afferenzen und Efferenzen (In- und Output) bei [8, 21, 22].

Das phylogenetisch und ontogenetisch ältere striosomale Kompartiment bezieht einen großen Informationsfluss aus ebenfalls phylogenetisch älteren Cortexarealen, insbesondere aus dem limbischen System (anterioren zingulärer und insulärer Cortex) sowie aus dem orbitofrontalen Cortex. Demgegenüber erhält das phylogenetisch und ontogenetisch jüngere

Matrixkompartiment afferente Impulse aus den entsprechend jüngeren (hier sensomotorischen und assoziativen) Cortexarealen [2, 23].

Efferenzen des dorsalen Striatums projizieren auf verschiedenen Wegen über weitere Anteile der Basalganglien (Globus pallidus, Substantia nigra pars reticularis (SNr)) zu Thalamus und Hirnstamm. Dabei wird ein direkter Weg, dem eine Motorik fördernde Funktion zugeschrieben wird, von einem indirekten Weg mit entsprechen inhibitorischer Funktion auf die Motorik unterschieden. Beim direkten Weg projizieren MSNs (engl. direct pathway MSNs, dMSNs) auf den internen Anteil des Globus pallidus (bei Nagetieren wird das interne Segment des Globus pallidus auch als Nucleus entopeduncularis bezeichnet) und inhibieren über ihren Transmitter Gammaaminobuttersäure (GABA) die tonisch aktive inhibitorische Funktion des Globus pallidus internus (GPi), die (konstitutiv über GABA vermittelt) auf motorische Anteile des Thalamus (insb. auf die Nuclei ventrales anteriores et laterales) wirkt. Durch diese Disinhibition tonisch aktiver exzitatorischer thalamischer Kerne kommt es zur Stimulation corticaler Areale, wodurch als Konsequenz des direkten Weges eine unterstützende Funktion bei der Bewegungsausführung resultiert [8, 24, 25].

Beim indirekten Weg projizieren MSNs zunächst inhibitorisch auf den externen Anteil des Globus pallidus (GPe), wodurch dessen tonisch inhibitorische Impulsweiterleitung über den Ncl. subthalamicus unterbleibt und als Folge dieser tonisch aktive Kern seinerseits das GPi exzitatorisch erregt. Damit erfolgt beim indirekten Weg durch die Aktivierung des GPi nachfolgend eine verstärkte Hemmung thalamischer Kerngebiete, was zu verminderter Unterstützung cortical gesteuerter Motorik innerhalb der Basalganglienschleife führt (engl. indirect pathway MSNs, iMSNs) [10, 25].

Um eine höchst präzise Feinmotorik sicherstellen zu können, ist es unerlässlich eine feine Balance zwischen direkten und indirekten Weg zu realisieren.

Bewegungsfördernde und hemmende Projektionswege finden sich in beiden Kompartimenten, wenn auch der relative Anteil bewegungsfördernder Projektionen stärker im Striosomenkompartiment vertreten ist. Eine Feinregulierung zwischen dMSNs und iMSNs innerhalb bzw. zwischen den beiden Kompartimenten erfolgt dabei zum Teil über die hohe Verschaltungsdichte von verschiedenen Interneurontypen, die die Aktivität benachbarter MSNs beeinflussen [8, 13, 16].

Einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität striataler Projektionsneurone spielt dabei das Dopamin. Die dopaminergen Fasern der SNc aktivieren über deren D<sub>1</sub>-R die MSNs des direkten bzw. inhibieren über deren D<sub>2</sub>-R die MSNs des indirekten Weges. Dabei wird die Aktivität der dopaminergen Neurone in großem Umfang auch durch reziproke Verbindungen der striosomalen MSNs mit der SNc beeinflusst. Mit dem Striosomenkompartiment als Efferenz des limbischen System wird dem limbostriatalen Funktionskreis eine einzigartige

---

modulatorische Rolle bei der Kontrolle von Motorik zuteil, dem ergänzend Informationen aus dem sensomotorischen und assoziativen Cortex durch das umgebende Matrixkompartiment hinzugefügt wird [8, 10, 26].

Aber wie entsteht das Striatum mit seiner histologisch und funktionell komplexen Architektur? Wie werden die Abläufe dieser Histogenese mit der komplexen Verschaltung von Inter- und Projektionsneuronen in den beiden Kompartimenten realisiert? Und welche Bedeutung haben Unterschiede in der räumlichen-zeitlichen Entstehung von Striosomen und Matrix auch im Hinblick auf Basalganglien-assoziierte Erkrankungen, die durch unterschiedliche Vulnerabilitätsmuster dieser beiden Kompartimente charakterisiert sind?

Untersuchungen über die genauen molekularen und zellulären Mechanismen der Entstehung dieser beiden Kompartimente können diesbezüglich nicht nur einen Beitrag zum Verständnis der Neurogenese dieser subkortikalen Hirnregion liefern, sondern ebenfalls dem erweiterten Verständnis angeborener Störungen der extrapyramidalen Motorik dienen. Dabei können über das Verständnis der Neurogenese Rückschlüsse auf mögliche pathophysiologische Veränderungen gezogen werden. Dieser Ansatz ist Ausgangspunkt der hier vorgelegten Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang soll hier kurz die Entwicklung des Nervensystems im Allgemeinen sowie die Neurogenese des Striatums genauer betrachtet werden.

Den Beginn der Entwicklung des Nervensystems stellt die Differenzierung des Ektoderms in das Neuroektoderm mit Bildung der Neuralplatte dar. Das entstandene Neuroektoderm proliferiert und aus der Neuralplatte entsteht durch Faltung entlang der Longitudinalachse die von Neurfalten umgebene Neuralrinne bzw. -grube. Durch dorsale Verschmelzung der Falten kommt es zur Bildung des Neuralrohrs [27–30]. Das junge Neuralrohr besteht am Anfang noch aus einem mehrreihigen Epithel, welches mit zunehmender Teilungsaktivität histologisch eine kernhaltige Ventrikularzone (VZ) als Ort der Mitose erster Stammzellen und eine näher zur prospektiven Piaoberfläche gelegenen kernärmere Marginalzone erkennen lässt [31, 32]. Nach Schluss des Neuralrohrs kommt es neben dem sprunghaften Anstieg der Teilungsrate und der damit einhergehenden Verdickung des Epithels zur morphologischen Transformation der Neuroepithelzellen (NEP) im zeitlichen Zusammenhang mit der Entstehung erster Neurone. Zu Beginn der Neurogenese geht infolge asymmetrischer Teilung aus den Neuroepithelzellen als primäre neurale Stammzellen (engl. neural stem cell, NSC) eine erste Population von postmitotischen Neuroblasten hervor, die aus ihrer ventrikulären Bildungszone hinaus in Richtung der Hirnoberfläche migrieren. Anteilig finden sich nun zunehmend Stammzellen, die mit ihren Somata in der ventrikulären Zone verbleiben, deren nach außen gerichtete basale Zellausläufer jedoch weiterhin Kontakt zur prospektiven Piaoberfläche besitzen [33, 34]. Durch die Zunahme der Anzahl der Nervenzellen und eine

---

durch deren Ansiedlung unterhalb der Hirnoberfläche bedingte Verdickung der Wand des Neuralrohrs „strecken“ sich die an der Oberfläche inserierenden Fortsätze der Stammzellen. Mit dieser morphologischen Transformation nach außen gerichteter Fortsätze werden die Neuroepithelzellen zu Radiärgliazellen (RG), die mit ihrem Gerüst-artigen Aufbau die Funktion einer physikochemischen Leitstruktur für die nachfolgend gebildeten Neuroblasten übernehmen [32, 34, 35]. Durch diese Leitstruktur gelangen während der weiteren Neurogenese die Neuroblasten aus der ventrikulären Bildungszone entlang der Fortsätze der RG durch eine nach außen gerichtete Migration in ihre Zielgebiete (radiale Migration) und bilden mit einer mehr oder weniger oberflächennahen Position die primitive Mantelzone. Nach Erreichen dieser Zielgebiete differenzieren sie sich in Neurone [31, 33, 36].

Corticale Regionen entstehen, indem diese ersten Neuronen unmittelbar unterhalb der Hirnoberfläche zu liegen kommen und über die transienten Strukturen von Präplatte, Subplatte und Corticalplatte die oberflächennahe graue Substanz mit ihrer spezifischen Schichtung entstehen lassen. Durch zunehmende Differenzierung und Massenzunahme von Nervenzellen mit ihren auf- und absteigenden Verbindungen entsteht unterhalb der Rinde die weiße Substanz. Die Mantelzone der späteren Kerngebiete zeigt dagegen eine weniger oberflächennahe Lage. Zudem werden diese Kerngebiete im weiteren Verlauf der Hirnentwicklung durch eine außen gelegenen Schicht aus afferenten und efferenten Fasern bedeckt und erscheinen durch diese mehr oder weniger stark ausgeprägte weiße Substanz „in die Tiefe“ verlagert [31, 37, 38].

Für eine schon bald nach der Entstehung erster Neurone einsetzenden starke Massenzunahme des Nervengewebes reicht die proliferative Kapazität der primären Stammzellen im Bereich der VZ nicht mehr aus und es kommt zur Erweiterung der neurogenen Matrix mit der Bildung hochproliferativer Tochterzellen. Durch die Ansammlung dieser sekundären Stammzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zur VZ entsteht die außen anliegende Subventrikularzone (SVZ). Im Zuge ihrer Entstehung kommt es neben der Translokation der Somata dieser sekundären Stammzellen in die SVZ zudem auch zu einem Kontaktverlust dieser Zellen zur äußeren Oberfläche des ZNS. Neben den zuvor geschilderten RGs existiert in der SVZ damit eine weitere Stammzellpopulation [36, 39].

Der Übergang einer RG in eine sekundäre Stammzelle während der Embryogenese kann als Einzelereignis nicht scharf bestimmt werden. Deshalb werden unter funktionellen Aspekten alle undifferenzierten teilungsfähigen Zellen mit neuronalem und/oder glialem Differenzierungspotenzial (d.h. primäre und sekundäre Stammzellen sowie alle aus ihnen hervorgehende undifferenzierten teilungsfähigen Zellen) im Folgenden in Übereinstimmung mit Smith (2006) als engl. neural progenitor cells (NPCs) bezeichnet. NPCs umfassen also alle teilungsfähigen Zellen unabhängig vom Nachweis ihrer Fähigkeit der Selbsterneuerung.

---

Obwohl häufig synonym verwendet mit dem englischen Begriff bzw. Terminus der engl. neural precursor cells ist dieser Begriff weniger scharf definiert und wird im Folgenden nicht verwendet.

Im subpallialen Telencephalon kommt es durch die massive Vergrößerung der SVZ mit Bildung einer sekundären Matrixzone proliferativer Zellen zur Entstehung der Ganglienhügel als Vorwölbung zeldichten Materials in den Seitenventrikel [31]. Dabei erstreckt sich diese Proliferationszone innerhalb des primitiven Vorderhirns über den Bereich des Foramen interventrikuläre bis in den angrenzenden dritten Ventrikel als mögliches Ausgangsmaterial späterer diencephaler Kerngebiete wie dem Globus pallidus. Durch anhaltende Massenzunahme kann im weiteren Verlauf der Hirnentwicklung eine Einteilung in einen medialen (engl. medial ganglionic eminence, MGE) und lateralen (engl. lateral ganglionic eminence, LGE) Abschnitt erfolgen. Beide Abschnitte zeigen im kaudalen Bereich eine Verschmelzung (engl. caudal ganglionic eminence, CGE). Aus diesen verschiedenen Anteilen der Matrixzone gehen die Neuroblasten großer subcortikaler Anteile des Vorderhirns (insbesondere das Striatum und der Globus pallidus) sowie neuronale Subpopulationen des kortikalen Endhirns hervor [31, 38, 39].

Dabei entstehen die im Striatum zum großen Teil vorkommenden mittelgroßen dornentragenden Projektionsneurone aus Neuroblasten, die per radialer Migration aus dem LGE in die striatale Anlage einwandern, während die Interneurone über den Vorgang der tangential orientierten Migration aus dem MGE dazustoßen [38, 40].

Anders als die MSNs entstammen die striatalen Interneurone also nicht dem LGE, sondern dem daran angrenzenden MGE [38, 40]. Dieser dient als Geburtsort nicht nur für den Großteil der GABAergen Interneurone des Striatums, sondern ebenfalls für die des Cortex. Die hier generierten Zellen wandern als Neuroblasten tangential zur ventrikulären Oberfläche, um aus dem MGE an ihren jeweiligen Zielort zu gelangen. Dabei organisieren sich die Interneuronvorläufer an der pialwärtigen Oberflächen der Matrixzone zu Zellketten, indem sie über engl. neural cell adhesion molecule (NCAM) vermittelte Zell-Zell-Kontakte ausbilden, um dann in orthogonaler Orientierung zwischen den Fortsätzen der RG hindurchzuwandern und das primitive Striatum respektive den primitiven Cortex zu besiedeln. Nach Erreichen ihres Zielgebietes bilden sie mit den Projektionsneuronen des Striatums, aber auch untereinander synaptische Verknüpfungen aus [13, 38, 41]. Aufgrund ihrer ektopen Entstehung im MGE sind die NPCs der Interneurone in der vorliegenden Arbeit nicht Gegenstand der Untersuchung. Bedingt durch die Isolation und Verwendung von NPCs aus der Matrixzone des LGE liegt das Augenmerk dieser Arbeit ausschließlich auf Vorgängen zur Entwicklung der Projektionsneurone als Hauptzellmasse des Striatums.

Die Projektionsneurone entstehen aktueller Ansicht nach aus verschiedenen, von der RG abstammenden Vorläuferzellen des LGE [39, 42]. Analog zum Vorgang der Entstehung der Neocortexschichten findet sich auch bei der Bildung der Zellpopulationen/NPCs des Striatums aus dem Ganglienhügel eine zeitliche Achse, bei der sequenziell die Projektionsneurone der verschiedene Kompartimente entstehen [13, 21, 39, 43]. Dabei werden die Vorläuferzellen anhand ihrer Lage in apikale und basale intermediäre Vorläuferzellen unterschieden (engl. apical intermediate progenitor cell, aIP/ basal intermediate progenitor cell, bIP). Unter den aIPs werden die engl. subapical progenitor cells (SAPs) sowie die engl. short neural progenitor cells (SNPs) zusammengefasst. Durch Abstammungs- oder Schicksalskartierungsanalysen ist es möglich, die Entwicklungslinie von der initial markierten RG als Ursprungs- oder Startzelle bis hin zu den daraus hervorgehenden neuronal differenzierten MSNs von Striosomen und Matrixkompartiment nachzuvollziehen. In einem frühen Stadium gehen aus den RG zunächst aIPs hervor, die sich im weiteren Verlauf in die striosomalen MSNs entwickeln [21, 36]. So findet sich bei Rattenembryonen um den Entwicklungstag 13 (E13) eine kompakte, striosomale Gruppe von Projektionsneuronen [13, 43]. Nachfolgend generieren RGs eine zweite Vorläuferzellgeneration, die bIPs. Diese differenzieren sich im weiteren Verlauf in die Vorläuferzellen der wesentlich zahlreicheren Matrixprojektionsneurone, die ab Entwicklungstag 16 (E16) nach Einwandern in die zunächst kompakt organisierte Striosomenpopulation diese auflockern und zunehmend in kleinere, funktionelle Einheiten inselartig unterteilen. Zuletzt lassen die RGs bIPs entstehen, die MSNs bilden, die sich in der Matrix mit peristriosomal Lokalisation anordnen und vermutlich eine Verbindung zwischen beiden Kompartimenten aufbauen [21]. Neben den Vorläuferzellen für verschiedene Neuronenpopulationen wie den MSNs von Striosomen und Matrixkompartiment [44] gehen zudem auch gliale Vorläuferzellen (engl. glia progenitor cell, GPC) aus den RGs hervor, aus denen ihrerseits zumeist Vorläuferzellen fibrillärer und protoplasmatischer Astrozyten sowie Oligodendrozyten entstehen [45].

Aus einer theoretisch abzuleitenden Multipotenz der RG in Verbindung mit einer in zeitlicher Abfolge stattfindenden Spezifizierung ihrer direkten Tochterzellen und/oder deren weiterer neuronalen Differenzierung ergeben sich die zentralen Fragen der Stammzellbiologie. Ausgangspunkt bilden dabei die Aspekte der Potenz der Stammzelle und ihrer (möglichen) Realisation durch die Vorgänge von Induktion, Determination und Differenzierung.

Über welche Mechanismen ist die RG als Mutterzelle in der Lage die unterschiedlichen Subpopulationen von NPCs und GPCs hervorzubringen? Bleibt die RG als primäre Stammzelle auch nach mehreren Teilungsschritten während aufeinander folgender Phasen der Entwicklung der striatalen Anlage in ihrer prospektiven Potenz erhalten? Oder kommt es im Verlauf der Vermehrung früher RGs über Induktionsvorgänge bereits frühzeitig zu einer fortschreitenden Einschränkung ihrer jeweiligen prospektiven Potenz, die sich in Determination

und begrenzter Differenzierungsmöglichkeiten ihrer Nachkommen auf der Ebene der NPCs niederschlägt?

Die neuronale und gliale Entwicklung *in vivo* verläuft in einer räumlich-zeitlich spezialisierten Region, die als embryonale bzw. adulte neurogene Stammzellnische bezeichnet wird. In dieser Nische wird durch multifaktorielle Einflüsse nicht nur bestimmt, ob eine NPC in einem ruhenden oder proliferierenden Zustand vorliegt, in ihm verbleibt oder wechselt, sondern auch, ob sie sich durch asymmetrische Teilung spezifiziert/differenziert [32]. Um mögliche Einflussfaktoren auf die Proliferations- und Differenzierungsvorgänge primärer Stammzellen erfassen zu können, ist neben einer detaillierten Analyse extrinsischer Faktoren in Form der Bestandteile der Umgebung der NPCs auch ein Blick auf die intrinsischen Eigenschaften notwendig.

In Transplantationsexperimenten lassen sich die intrinsischen Eigenschaften der NPCs außerhalb ihrer ursprünglichen Nische betrachten. In einzelnen dieser Experimente konnten entsprechende Hinweise auf eine endogene Prägung proliferierender NPCs gefunden werden. Nach Transplantation von NPCs aus der SVZ des basalen Endhirns in den Hippocampus junger und älterer Ratten als ektope, aber neuropermissive Umgebung zeigte sich für mehrere Monate auch in kortikaler Lokalisation eine mit dem Ursprungsort vergleichbare Proliferation dieser Zellen sowie eine Differenzierung zu striatalen Nervenzellen, aber auch zu Astro- und Oligodendrozyten. Hinsichtlich der Proliferation ist ein endogener/intrinsischer Effekt dadurch anzunehmen, dass die Teilungsrate transplanteder Zellen unabhängig vom Alter der Empfängertiere war, bei denen die subgranuläre Zone (SGZ) alter Tiere im Vergleich zu jungen Tieren eine geringere Proliferation ortstypischer Stammzellen aufweist. Zudem zeigt sich in der Differenzierung transplanteder Zellen zu GABAergen Neuronen eine Unabhängigkeit von Einflüssen der Umgebung, in der die endogenen proliferierenden NPCs des Gyrus dentatus ausschließlich glutamaterge Körnerzellen bilden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die intrinsischen Eigenschaften in diesen Fällen unabhängig von ihrer ursprünglichen Stammzellnische und von ihrem Transplantationsort Proliferation und Differenzierung der NPCs bestimmen [46].

Viele neuere Untersuchungen relativieren diesen Erklärungsansatz aufgrund widersprechender Beobachtungen und räumen unter Berücksichtigung molekular- und zellbiologischer Untersuchungen extrinsischen Modulatoren mehr Raum ein.

So konnten in einzelnen Abstammungsanalysen NPCs des Hippocampus nachgewiesen werden, die als homogene Ausgangspopulationen nicht nur während der embryonalen, sondern auch während der postnatalen sowie adulten Neurogenese kontinuierlich Körnerzellen des Gyrus dentatus hervorbringen. Dabei weisen diese Vorläuferzellen eine Gemeinsamkeit hinsichtlich ihrer Abstammung und molekularen Expressionssignatur auf, die

---

sie von anderen NPCs des sich entwickelnden Gyrus dentatus unterscheidet. Dennoch weisen sie eine mit zunehmendem Alter zu beobachtende abnehmende Proliferationsrate auf, welche aber über extrinsische Mechanismen gesteuert wird. So zeigen sich z.B. durch lernbedingte Einflüsse erhöhte Zahlen neuer Nervenzellen. Zumindest in Bezug auf die Proliferation würden externen Stimuli in diesem konzeptionellen Ansatz mehr Gewicht eingeräumt werden. In diesem als „kontinuierliches Modell“ bezeichneten Erklärungsansatz muss allerdings (zumindest für die hippocampale Neurogenese) von einem frühen Zeitpunkt der Spezifizierung von Vorläuferzellen mit permanentem Erhalt ihrer prospektiven Bedeutung als Ausgangspopulation von Körnerzellen im Verlauf der embryonalen bis hin zur adulten Neurogenese ausgegangen werden [47].

Demgegenüber zeigen Arbeiten zu NPCs des LGE Indizien für eine alters- bzw. entwicklungsabhängige Spezifizierung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen mit orts- und zeitspezifischer Veränderung ihrer prospektiven Bedeutung. So konnte in Experimenten unter Verwendung retroviral markierter RGs des embryonalen Gehirns durch Nachverfolgung der Tochterzellen zu späteren Zeitpunkten gezeigt werden, dass sich schon früh innerhalb der Neurogenese NPCs mit unterschiedlicher prospektiver Bedeutung als Ausgangsmaterial unterschiedlicher Nervenzellpopulationen etablieren. Dabei gehen durch asymmetrische Teilung u.a. bereits während der Embryogenese RGs als Tochterzellen hervor, die eine wesentlich geringere Teilungsrate als ihre Geschwisterzellen zeigen und durch Expression des negativen Zellzyklusmodulators p57<sup>kip2</sup> charakterisiert sind. Diese Zellen sind als ruhende Vorläuferzellen der adulten NPCs anzusprechen, während jene proliferierenden NPCs für die Neurogenese im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung des Striatums sorgen. Damit besteht also bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Hirnentwicklung eine Vielfalt von Vorläuferzellen, von denen einige ausschließlich eine Bedeutung für die adulte Neurogenese haben [48]. Die Steuerung ihrer mitotischen Aktivität wie auch die Realisierung ihrer prospektiven Bedeutung erfolgt bei diesen also in orts- und zeitspezifischer Weise. Diese als auch in weitere Arbeiten zur Entwicklung des LGE gemachten Beobachtungen [48] bilden die Grundlage dieser als engl. set-aside-Modell bezeichneten Annahme einer frühen Spezifizierung von NPCs, deren Differenzierung in hohem Maße von äußeren Faktoren bestimmt wird. Nach Generierung kortikaler, striataler und septaler Neurone während der frühen embryonalen Neurogenese (bei Mäusen bis um Entwicklungstag 14) kristallisieren sich zwei Vorläuferzellpopulationen heraus, von denen die eine im Verlauf der fortschreitenden Entwicklung weiterhin Neurone und Gliazellen produziert. Die zweite Population von NPCs dient als Reservoir von Vorläuferzellen der adulten NPCs, die mitotisch zunächst im Ruhezustand verbleiben, um als adulte NPCs bis zum Erreichen der Adoleszenz das Ausgangsmaterial für die postnatale Neurogenese mit Generierung von Subpopulationen von Interneuronen des Bulbus olfactorius zu bilden [49, 50].

Fasst man diese teilweise kontroversen Beobachtungen zu Vorgängen von Induktion und Determination während der Neurogenese zusammen, so bleiben die genauen Abläufe mit Erlangen einer Identität der Vorläuferzellen bzw. deren genaue Abstammungslinie unklar. Ein Grund für diese divergierenden Ergebnisse ist teilweise in einem Mangel an verlässlichen Markierungsmöglichkeiten von NPCs *in vivo* begründet, um ihr genaues zukünftiges Zellschicksal nachvollziehen zu können. Zudem ist davon auszugehen, dass das Proliferations- als auch Differenzierungsverhalten der NPCs als ein multifaktorielles Wechselspiel intrinsischer und extrinsischer Parameter stets experimentell beeinflusst wird [47].

Um der Frage nach der räumlich-zeitlichen Spezifizierung von NPCs und der Realisierung ihrer prospektiven Potenz *in vitro* weiter nachzugehen, wird im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit eine mögliche altersbedingte Spezifizierung der NPCs der SVZ während der Striatogenese der Ratte experimentell untersucht. In einem *in vitro* Ansatz soll dazu unter Verwendung von proliferierenden Zellen aus dem lateralen Ganglienhügel embryonaler Ratten der Entwicklungstage E13, E16 und Entwicklungstag 19 (E19) der Einfluss exogener Faktoren (verschiedene Medien und Wachstumsfaktoren in Kombination mit Komponenten der Extrazellulärmatrix als artifizieller Ersatz einer Stammzellnische) auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der NPCs bestimmt werden.

Die Stammzellnische als eine räumliche Struktur besteht aus sich wechselseitig beeinflussenden Zellen sowie einer diese umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM) mit löslichen und geformten Bestandteilen [51–54]. Dabei stellt diese Mikroumgebung ein dynamisches Konstrukt dar, welches innerhalb der Embryogenese diversen Veränderungen unterliegt und zunehmend an Komplexität hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus gewinnt. Innerhalb der Nische befinden sich zahlreiche lösliche Faktoren, die entweder in der extrazellulären Flüssigkeit selbst bzw. speziell auch im primitiven Liquor zu finden sind. Darüber hinaus können viele dieser löslichen Faktoren den NPCs auch in gebundener Form durch benachbarte Zellen sowie der EZM präsentiert werden [32, 55, 56].

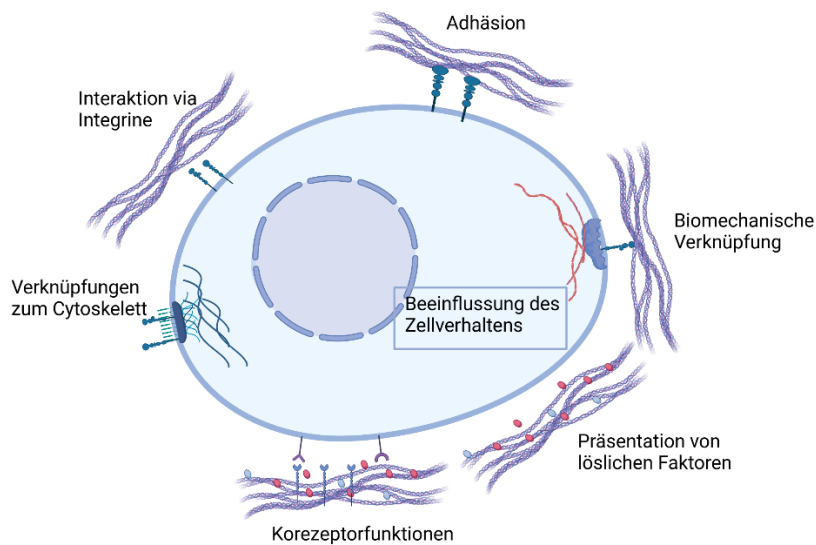


Abb. 1: Beeinflussung des Zellverhaltens durch die Extrazellulärmatrix:

Dargestellt finden sich hier exemplarisch einige Möglichkeiten, durch die die Extrazellulärmatrix das Zellverhalten beeinflussen kann. Quelle: Created with biorender.com

Zu den wichtigen löslichen Stoffen der Nische zählen Wachstumsfaktoren (WF), Morphogene, Chemokine als auch Neurotransmitter [57]. Innerhalb der Gruppe der WF spielt die Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (engl. fibroblast growth factor, FGF) eine wesentliche Rolle. FGFs sind an zahlreichen Faktoren wie dem generellen Überleben von Neuronen im Vorderhirn beteiligt [58]. Für *in vitro* Versuche wird routinemäßig FGF-2 als auch der epidermale WF (engl. epidermal growth factor, EGF) verwendet, die dafür sorgen, dass NPCs in einem Stammzellzustand verbleiben [59, 60]. Eine andere Gruppe stellen die Morphogene dar, wie die verschiedenen Mitglieder der Knochenwachstumsfaktoren (engl. bone morphogenic protein, BMP) [55] aus der Familie der transformierenden WF (engl. transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) die bei experimentell verursachter Überexpression während der Embryonalentwicklung des ZNS zu einer verminderten Proliferation mit frühzeitiger sowie ausgeprägter Reifung von NPCs führen [61]. Ein Morphogen mit induktiver Bedeutung der striatalen Entwicklung stellt der WF engl. sonic hedgehog (Shh) dar [62]. Dieser findet sich als Transkriptionsfaktor zur Steuerung der „Ventralisierung“ des ZNS nicht nur in der frühen Entwicklung des Rückenmarks, sondern ebenfalls im Verlauf der Spezifizierung subpallialer Abschnitte während der neuralen Entwicklung des Telencephalons [63, 64]. Den funktionellen Gegenspieler stellt der Transkriptionsfaktor Wnt dar mit seiner induktiven Bedeutung für die Spezifizierung der Neurogenese in den dorsalen bzw. pallialen Anteilen des Endhirns. Dieser Wnt-Signalweg vermittelt über die Translokation des zyttoplasmatischen Proteins  $\beta$ -Catenin in

den Kern die Expression von Zielgenen und verursacht damit eine „Dorsalisierung“ dieser telencephalen Strukturen mit einer einhergehenden Rindenbildung [65].

Mit diesen teils antagonistisch wirksamen Mechanismen einer räumlich-zeitlichen Spezifizierung entsteht eine Möglichkeit feinabgestimmter regionaler Diversifizierung von NPCs. Durch Sezernierung bestimmter löslicher Faktoren von Zellpopulationen in definierten Regionen entstehen sogenannte Signalzentren. Je nachdem, wann und wo sich eine NPC innerhalb eines dorsoventralen oder craniocaudalen Konzentrationsgefälles teilweise antagonistischer oder synergistisch wirksamer Faktoren befindet, erhält diese eine definierte positionelle Information über die Induktion einer orts- und zeitspezifischen Differenzierung [66].

Die über Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte mit benachbarten Zellen in Verbindung stehende Zielzelle wird aber nicht in einfacher Korrelation mit der Konzentration ihrer löslichen Moleküle in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Entfernungen von den Signalzentren bestimmt. Vielmehr wird das Verhalten der Zielzelle auf komplexe Weise beeinflusst [55, 64]. So löst die bloße Anwesenheit eines bestimmten Stoffes wie z.B. eines Morphogens keine stereotype Zellantwort in konzentrationsabhängiger Stärke aus, stattdessen werden über unterschiedliche Konzentrationsschwellen des gleichen Morphogens unterschiedliche Mengen an Genen aktiviert und dadurch die Möglichkeit der Modifikation der Zellantwort deutlich erweitert. Zudem können Signalzentren selbst über Rückkopplungsmechanismen in ihrer Aktivität beeinflusst werden. In Verbindung mit den o.g. teilweise antagonistisch wirksamen Signalmolekülen (z.B. Shh und Wnt) ergibt sich eine Komplexität mit fein abgestimmter Beeinflussung zur Modulation der Zellantworten in räumlich hochaufgelösten Regionen der Stammzellnischen [67].

Neben den zuvor geschilderten Mechanismen über rein löslichen Komponenten sind für das Verständnis zellulären Antwortverhaltens auch mechanische Faktoren in Form von Zell-Zell- (sowohl Interaktionen mit neuronal als auch mit nicht neuronalen Zellen) und Zell-Matrix-Interaktionen entscheidend [32]. Die Funktion kann einerseits darin bestehen, die Zielzelle über Adhäsionsmechanismen zunächst an einem spezifischen Ort oder einem spezifischen Zellverband zu halten [68], z.B. als Voraussetzung für den Austausch parakrin bzw. direkt über Nexus oder engl. gap junctions vermittelter Informationen bzw. für die Induktion des koordinierten Verhaltens einer Zellpopulation [69]. Die Kanalfunktion von gap junctions spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation, Migration als auch der Differenzierung von NPCs [70–72]. Einen Einfluss auf die Migration nehmen Komponenten der Nische nicht nur über anziehende, sondern auch über abstoßende oder repellente Eigenschaften, wie sie z.B. für Matrixprotein Netrin-1, während der Striatogenese beschrieben wurden. Dabei besteht ein apiko-basaler Konzentrationsgradient innerhalb des LGE mit der höchsten Expression in der VZ. Es veranlasst Zellen der SVZ im Bereich der striatalen Übergangszone, ihre

---

Germinalzone zu verlassen und nach basal in Richtung ihrer Ziel- bzw. Differenzierungsgebiete zu migrieren [13, 73].

Wichtige Komponenten der EZM sind neben den geformten Bestandteilen wie dem fibrillären Kollagen insbesondere die Moleküle der amorphen Grundsubstanz. Dazu gehören neben Tenascin-C auch die adhäsiven Glycoproteine wie Laminine, Fibronectine und Nidogen, die in Kombination mit sulfatierten Glycosaminoglycanen als Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) vorliegen [57]. Um ihre komplexe (synergistische wie antagonistische) Wirkung und ihre Bedeutung für die Stammzellnische herauszustellen, werden sie unter dem Begriff der „Fraktone“ als funktionelle Einheit zusammengefasst [74].

Als Bestandteile der amorphen Grundsubstanz spielen Laminin und Fibronectin (als dominierende extrazelluläre Liganden) in Zell-Matrix-Interaktionen bzw. in der Kommunikation eine wichtige Rolle. Sie dienen als Adhäsionsproteine der Bindung der Zellen an die EZM, die über verschiedene Transmembranproteine wie den Integrinen vermittelt werden. Integrine sind Heterodimere mit extrazellulären Bindungsstellen für verschiedene Komponenten des EZM als Liganden. Deren Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls mit Adapterprotein-vermittelter Übertragung auf das Zytoskelett. Umgekehrt können Veränderungen des Zytoskeletts die Integrin-vermittelte Bindung an die Komponenten der Matrix beeinflussen [75, 76].

Die Vielfalt der Integrin-Subtypen bedingt die Heterogenität der Interaktion mit den verschiedenen Komponenten der EZM. Von den Integrinen mit Vorkommen im ZNS gehören die Dimere mit Beteiligung der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit zu den am besten untersuchten. [74, 77] Sie beeinflussen neben der neuralen Migration [78, 79] wie auch CSPGs [80] die Ausbildung des axonalen Wachstumskegels und damit die phänotypische Reifung differenzierender Neurone [81, 82].

Neben dieser mechanischen Bedeutung liegt eine weitere Funktion der EZM und ihrer Interaktion mit der zellulären Umgebung darin, lösliche Faktoren zu binden und einer Zielzelle zu präsentieren. Durch Bindung von WF an Komponenten der EZM wird nicht nur deren lokale Konzentration erhöht, vielmehr potenziert sie durch Schutz vor deren enzymatischem Abbau ihre biologische Verfügbarkeit. Zudem ermöglicht die EZM über Korezeptorfunktionen weitere modulatorische Effekte auf das Verhalten der Zielzelle [57]. So stabilisieren bspw. HSPGs als Komponenten der amorphen Grundsubstanz den FGF-Ligand-Rezeptorkomplex und erhöhen somit lokal die Konzentration und entsprechend auch die Wirkung des FGF-2 auf das Proliferationsverhalten der NPC [83, 84]. Die modulatorische Relevanz einer Korezeptorfunktion zeigt sich auch für Perlekan, durch dessen Abwesenheit FGF-2 bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden nicht auszulösen vermag [74, 85, 86]. Proteoglykane spielen

damit eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung des Verhaltens von NPC, indem sie mechanische und chemische Signale des Extrazellularraums mit intrazellulären Kaskaden und Änderung der Zytoskelett-organisation verbinden [87–89].

Neben der amorphen Grundsubstanz finden sich mit Kollagenen auch geformte Anteile der EZM. Zu der großen, heterogenen Gruppe von Kollagenen zählen viele verschiedene Formen mit jeweils bestimmten Funktionen [90]. Im Nervensystem kommen als Bestandteil der Fraktone hauptsächlich Kollagene der Typen I, IV und XVII vor [86, 91]. Dabei reichen ihre Funktionen von der Adhäsion residenter Zellen bis zur Präsentation löslicher Stoffe und ergänzen damit vielfach die Mechanismen der Signalmodulation die auch für die amorphe Grundsubstanz beschrieben wurden [92]. Wichtige Hauptinteraktionsmöglichkeiten für Kollagen und Kollagen-assoziierte-Proteine stellen die erwähnten Integrine dar [90]. Der Einfluss der Kollagene auf die Neurogenese kann dabei einerseits direkt über Integrine [93] oder über die Präsentation von löslichen Stoffen [94] vermittelt sein.

Indem das Kollagen direkt oder indirekt einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von neuronalen Stammzellen nimmt [75, 94, 95], wird über die Zusammensetzung der geformten und amorphen Grundsubstanz der Matrix als spezifischer Modulator der Signalvermittlung in Kombination mit löslichen Faktoren ein jeweilig hochspezifisches ortstypisches Verhalten residenter Zellen der Nische induziert.

Mithilfe der vergleichenden Betrachtung der neuronalen Entwicklung *in vitro* unter verschiedenen Kulturbedingungen hinsichtlich löslicher Faktoren und Bestandteilen der EZM soll mit der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zum verbesserten Verständnis der Neurogenese striataler Projektionsneurone geleistet werden. Durch die Verwendung von NPCs verschiedenen embryonalen Entwicklungsalters sollen zudem Schlüsselkomponenten mit ihrer jeweiligen stadienspezifischen Bedeutung für eine gerichteten Neurogenese striataler Projektionsneurone identifiziert werden.

Daraus ergeben sich vier Hypothesen als Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen:

1. Die verschiedenen Medien unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.
2. Die EZM beeinflusst das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.
3. Die löslichen Faktoren in Kombination mit der EZM zeigen einen komplexen, unterschiedlich großen Einfluss auf die Neuro- und Gliogenese der NPCs.
4. Es bestehen alters- bzw. stadienspezifische Unterschiede hinsichtlich des neuronalen und makroglialen Differenzierungspotenzials der NPC in komplexer Abhängigkeit von löslichen Faktoren und EZM.

## II. **Material und Methoden**

---

In diesem Kapitel werden im ersten Abschnitt die in den Experimenten verwendeten Materialien (Chemikalien, Reagenzien, Laborwaren, Geräte, Software und Zellmaterial) genannt. Für weitere Informationen wird jeweils auf die detaillierten Angaben im Anhang verwiesen. Im zweiten Abschnitt finden sich Angaben zur Versuchsdurchführung mit Protokollen der Zellkultur, der Materialgewinnung und -aufarbeitung, der durchgeführten Analyse hinsichtlich der verwendeten Techniken (Spinnerkultur mit/ohne Cytodex, Trägermaterial, Fixation, Anfertigen von Kryostatschnitten und Durchführung der Immunhistochemie) sowie der statistischen Auswertung.

### 2.1 **Material**

---

#### 2.1.1 **Zellen**

Die verwendeten neuronalen Stammzellen wurden im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit aus dem lateralen Ganglienhügel der embryonalen Ratte als transiente Struktur des embryonalen ventralen Telencephalons bereits entnommen [96]. Die Isolation erfolgte dabei in Übereinstimmung mit dem Vorgehen, wie es für die Isolation entsprechender Zellen des humanen LGE beschrieben wurde [97]. Aufgrund des präparatorischen Vorgehens beinhaltete das so gewonnene Zellmaterial sowohl proliferative Stammzellen der primären Matrixzone aus der VZ/SVZ als auch deren teilungsaktive Tochterzellen aus der sekundären Matrixzone. Die hier verwendeten Zellen wurden aus Kulturen klonaler Dichte als sogenannte Einzelzellkulturen *in vitro* unter Zusatz von Wachstumsfaktoren als proliferierende Zelllinien isoliert. Diese so gewonnenen Zellen können sich nach Mitogenentzug in Nerven- und Gliazellen differenzieren. Sie werden deshalb als (teilungsfähige) neurale Vorläuferzellen (NPCs) bezeichnet [98]. Die Gewinnung dieser Zellen als Ausgangspopulation striataler Projektionsneurone führte zu deren Bezeichnung als striatale NPCs (S-Zelllinie). Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Zelllinien stammen von Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien, deren Bezeichnung als S13-, S16- sowie S19-Zellen den jeweiligen embryonalen Entwicklungstagen entsprechen, die den kritischen Zeitpunkten der striatalen Entwicklung in Patch- und Matrixkompartiment abbilden [13, 21].

### **2.1.2 Nährmedien**

Die Zusammensetzung der einzelnen Nährmedien nach Angaben der Hersteller und die Angaben zu den verwendeten Zusätzen findet sich in tabellarischer Form im Anhang A.1. Bei den genutzten Medien handelt es sich um:

Proliferationsmedium

1zu1-Medium (50 % Proliferationsmedium und 50 % Differenzierungsmedium)

Differenzierungsmedium

Stemcellmedium

### **2.1.3 Gebrauchslösungen**

Die Zusammensetzung der einzelnen Gebrauchslösungen findet sich in tabellarischer Form im Anhang A.2. Bei den genutzten Lösungen handelt es sich um:

Fixierlösung

Kryokonservierungslösung

Permeabilisierungslösung

### **2.1.4 Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte**

Eine Liste der Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte findet sich in tabellarischer Form im Anhang A.3.

### **2.1.5 Antikörperkonzentrationen**

Eine Liste der Antikörperkonzentrationen findet sich in tabellarischer Form im Anhang A.4.

### **2.1.6 Verwendete Software**

Eine Liste der verwendeten Software findet sich in tabellarischer Form im Anhang A.5.

## 2.2 Methoden

---

### 2.2.1 Zellkultur

Die unter 2.1.1. beschriebenen Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> auf adhäsiven Kulturschalen kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium zu 50 % durch neues Proliferationsmedium ausgetauscht. Vor Erreichen eines konfluierenden Bewuchses erfolgte das Passagieren mit Transfer suspendierter Zellen auf neue Kulturschalen.

Um eine entsprechende Passage der Zellen durchzuführen, wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die sich am Boden der Schale befindenden Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. phosphat-buffered-saline, PBS) gewaschen. Nach erneutem Waschkvorgang wurden die Zellen zur Ablösung von der Kulturschale mit Trypsin für drei Minuten inkubiert. Nach erfolgten Ablösen der Zellen wurde zum Abstoppen des tryptischen Vorgangs der Ansatz mit einem Überschuss an (Serumprotein-haltigen) Differenzierungsmedium versehen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt um bei 1600/min für fünf Minuten zentrifugiert zu werden. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit 1zu1-Medium resuspendiert. 10 % der Zellen wurden auf die neue Petrischale unter Zugabe von 1zu1-Medium weitergeführt.

Zur Sicherung der Vergleichbarkeit wurden von jeder Versuchsreihe Zellen paralleler Ansätze eingefroren. Hierzu wurde ein Teil des zur Passage anstehenden Zellmaterials analog zur Zellpassage für eine Kryokonservierung aufbereitet, das Zellpellet in einer Einfrierlösung (Cryomed) resuspendiert und in einer Dichte von ca. zwei Millionen Zellen in 1,5 ml Lösung in zwei Schritten eingefroren. Dabei wurden die Zellen zunächst auf -20° C herunter gekühlt. Nach zwei Stunden erfolgte die Überführung auf -80° C zur mittelfristigen Lagerung der Zellen.

### **2.2.2 Experimenteller Ansatz**

Eine mögliche entwicklungsabhängige Bedeutung der Matrixkomponente Kollagen für das stadienspezifische Differenzierungsverhalten wurde durch die Verwendung von Ziellinien zeitlich unterschiedlicher embryonaler Herkunft untersucht. Dazu wurden drei Zelllinien eingesetzt und kultiviert. In Parallelexperimenten wurde das Differenzierungsverhalten dieser neuronalen Vorläuferzellen in einem dreidimensionalen Zellverband (Neurosphäre) mit einem Ansatz verglichen, in dem die Zellen auf einem Kollagen-haltigen Trägermaterial (Cytodex-Ansatz) als Suspensionskultur kultiviert wurden.

In Hinblick auf einen Einfluss der Kollagenmatrix auf das Differenzierungsverhalten wurde in einem weiteren Schritt ihre Rolle bei der Vermittlung der Wirkung unterschiedlicher löslicher Faktoren unter Verwendung von vier Kulturmedien verschiedener Zusammensetzung evaluiert.

Im Kontrollversuch wurden die Zellen als Suspensionskultur unter Verwendung nicht-adhäsiver 96er Lochplatten zur Neurosphärenbildung für 14 Tage kultiviert. Im Cytodexansatz wurden die Zellen zur Besiedlung der Cytodexträger als Suspension zunächst sieben Tage (in 1zu1-Medium) in einer Spinnerkultur gehalten. Nach diesen sieben Tagen wurden die mit Zellen besiedelten Cytodexkugeln parallel zum Kontrollansatz in einer 24er Lochplatte überführt und in den jeweiligen Kulturmedien mit unterschiedlichem Gehalt an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für weitere sieben Tagen kultiviert (siehe Abb.2). Während der gesamten 14 Tage des Experimentes erfolgte eine tägliche lichtmikroskopische Inspektion zur Überprüfung der Vitalität der Zellen anhand des Wachstums sowie der morphologischen Differenzierung der Zellen.

Am Ende der 14-tägigen Kultur wurden die Sphären und die Cytodex-Zell-Suspensionen fixiert und für Kryoschnitte und Immunfluoreszenz vorbereitet. Zur weiteren Auswertung wurden die Zellen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop auf Unterschiede ihrer Expressionsprofile von Differenzierungsmarkern neuronaler und glialer Entwicklungslinien untersucht.

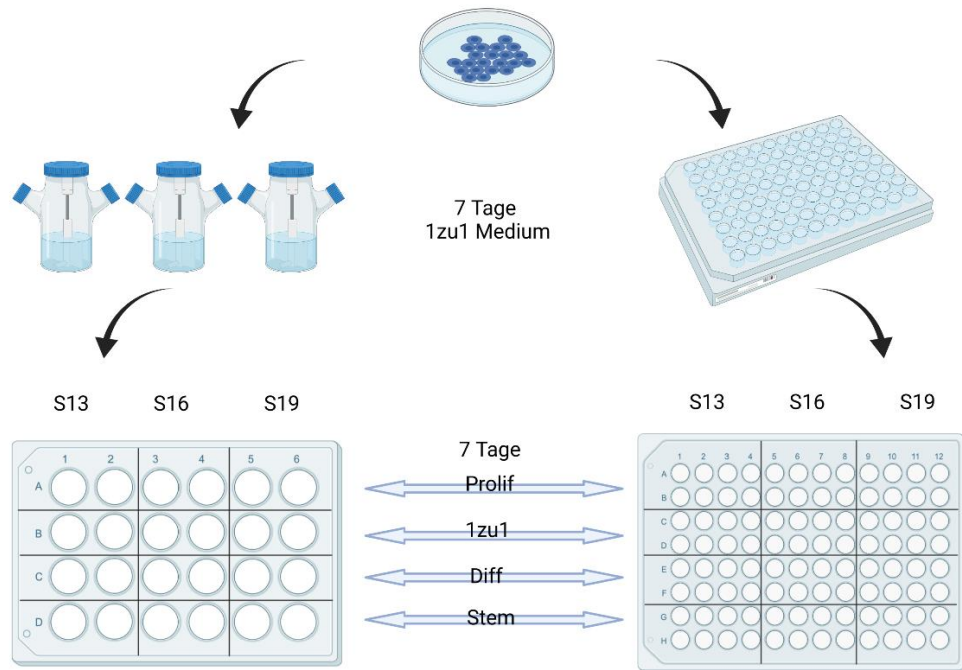


Abb. 2: Experimenteller Ansatz:

Cytodexansatz links im Bild, Neursphärenansatz (Kontrollansatz) rechts, 1. Überführung der Zellen aus Petrischalen in die Spinnerkulturflaschen mit Cytodex (links) und in 96 Lochplatte (rechts), 2. sieben Tage unter 1zu1-Medium, 3. Überführen der mit Zellen bewachsenen Cytodexkugeln in die 24er Lochplatte (links), 4. sieben Tage unter unterschiedlichen Medium, Prolif.: Proliferationsmedium, 1zu1: 1zu1-Medium, Diff.: Differenzierungsmedium, Stem: Stemcellmedium, Quelle: Created with biorender.com

### 2.2.3 Durchführung der Kontrollansätze unter Verwendung der 96er Lochplatte

Für die Durchführung der Kontrollansätze wurde nach Resuspension des wie unter 2.2.1 beschriebenen nach der Zellpassage entstandenen Zellpellet durch Auszählung in der Neubauer Zählkammer die Zellzahl/ $\mu\text{l}$  ermittelt. In jeder der Vertiefungen der nicht-adhäsiven 96er-Lochplatte befanden sich anfangs 5000 Zellen in 100  $\mu\text{l}$  1zu1-Medium, um eine optimale Sphärengöße zu generieren. Die Platten wurden analog zu der Zellkultur 2.2.1 unterhalten. Nach dem Schema siehe Abb. 3 fand im Verlauf der regelmäßige Mediumwechsel statt, bei dem 50 % des Mediums gegen neues ausgetauscht wurde.

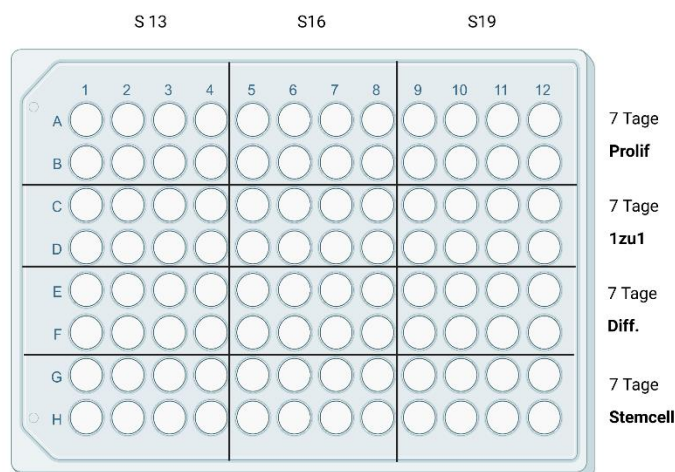


Abb. 3: 96er Lochplatte Kulturschema:

Darstellung des Kulturschemas der 96erLochplatte. Diese ist dabei aufgeteilt in 12 Ansätze auf drei verschiedene Zelllinien und vier verschiedene Kulturmedien, Prolif.: Proliferationsmedium, 1zu1: 1zu1-Medium, Diff.: Differenzierungsmedium, Stemcell: Stemcellmedium, Quelle: Created with biorender.com

### 2.2.4 Durchführung der experimentellen Ansätze unter Verwendung von Cytodex

Das in den Versuchen verwendete Cytodex 3 besteht aus einer Schicht von denaturiertem Kollagen, welches an eine Dextranmatrix gekoppelt ist. Die ca. 150  $\mu\text{m}$  großen Partikel mussten zunächst vorbereitet werden, bevor sie für die Zellversuche geeignet waren. Dafür wurde das Cytodex, welches zunächst in Pulverform vorlag, durch die Zugabe von 100 ml PBS/g Cytodex zum Quellen gebracht. Unter Verwendung von Tween 20 wurde die Oberflächenspannung des PBS so weit reduziert, dass alle Cytodexkugeln mit ihrer gesamten Hülle mit Flüssigkeit benetzt waren. Nach der Quellphase von ca. drei Stunden erfolgten mehrere Waschgänge mit PBS. Den Herstellerangaben entsprechend konnte das Cytodex nun in die späteren Kulturfleichen überführt werden, um gemeinsam mit den Kulturbedeuten sterilisiert zu werden [99].

Um das Gefäß der Spinnerkultur für den Transfer der Zellen vorzubereiten, wurde das präparierte Cytodex hinzugefügt und gemeinsam mit diesem sterilisiert. Nach diesem Vorgang wurde die überschüssige Flüssigkeit der so aufbereiteten Spinnerkulturflasche mit dem Cytodex-Inhalt zunächst abgesaugt und durch warmes 1zu1-Medium ausgetauscht und damit ein letztes Mal gewaschen.

Vor der Hinzugabe der unter 2.1.1. beschriebenen Zellen befanden sich in dem Behältnis 0,375 g Cytodex verdünnt in 37,5 ml 1zu1-Medium. Es wurden ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen/Spinnerflasche beigefügt. Danach wurde der Versuchsansatz bei 37° C und 5 % CO<sup>2</sup> inkubiert. Zunächst blieb das 125ml fassende Gefäß mit 30 ml befüllt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde die Kultur am ersten Tag in einer statischen Phase ohne Rotation und wenig Medium belassen. Am folgenden Tag wurde das Gefäß mit 1zu1-Medium auf 62,5 ml aufgefüllt. Die Kulturflasche wurden auf der Spinnereinheit platziert und die Einstellungen so vorgenommen, dass alle 30 min der Rotor die Cytodex-Zell-Suspension für fünf Minuten bei 20 Umdrehungen pro Minute in Bewegung brachte, um so eine dauerhafte Sedimentation und Aggregation der einzelnen Cytodexkugeln zu unterbinden. Nach weiteren zwei Tagen wurde auf 125 ml 1zu1-Medium aufgefüllt und alle zwei Tage ein 50 % 1zu1-Mediumwechsel durchgeführt.

Nach sieben Tagen wurde die Suspension der Cytodex-Träger mit ihrem Zellbewuchs von der Spinnerflasche auf eine nicht-adhäsive 24er Lochplatte transferiert (2 ml Suspension). Ein regelmäßiger 50 % Mediumwechsel erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 2.

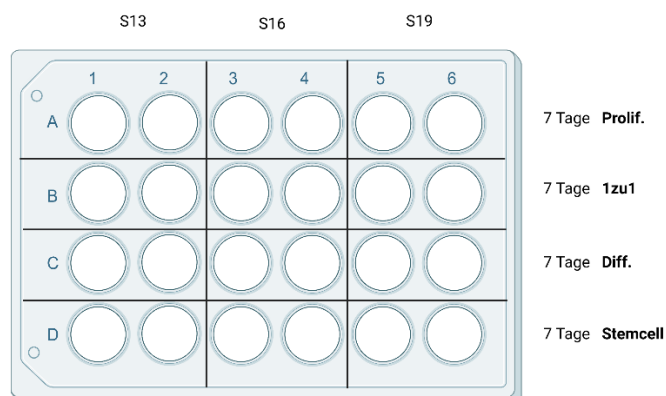


Abb. 4: 24er Lochplatte Kulturschema:

Darstellung des Kulturschemas der 24erLochplatte. Diese ist dabei aufgeteilt in 12 Ansätze auf drei verschiedene Zelllinien und vier verschiedene Kulturmedien, Quelle: Created with biorender.com

### **2.2.5 Zweidimensionale Adhäsionskultur**

In einem Nebenversuch einer zweidimensionalen Kultur erfolgte ebenfalls die Untersuchung des Differenzierungsverhaltens und die visuelle Begutachtung der Ausbildung von Zellfortsätzen.

Die Zellen wurden aus der Zellkultur 2.2.1 entnommen und mit 1zu1-Medium für zwei Tage auf adhäsiven Kulturplättchen angezchtet. Nach der anfänglichen Adhäsionsphase erfolgte für sieben Tage ein 50 % Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium. Am Ende wurden die Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit dem konfokalen Lasermikroskop untersucht.

### **2.2.6 Herstellung von Kryostatschnitten**

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung musste das Zellmaterial aus den Versuchsansätzen fixiert und für das Anfertigen von Schnitten am Kryostat vorbereitet werden. Um die Sphären bzw. die Cytodex-Zell-Suspension einfrieren zu können, wurden diese zunächst aus den Lochplatten in 70 µm große Zellsiebe überführt. Mit kaltem PBS wurde das restliche Medium abgewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte zunächst die Fixierung mittels der Fixierlösung für ca. 30 min. Dieses musste nach der Einwirkzeit in drei PBS Spülvorgängen wieder abgewaschen werden. Im letzten Schritt wurden die Präparate für zehn Minuten in Kryokonservierungslösung gegeben und damit die Vorbereitung zur Kryokonservierung abgeschlossen.

Die fertigen Substrate konnten anschließend in das Gefriermedium (Tissue Tec) als Trägermaterial überführt werden. Auf den Sockeln der Kryostatschnittplatten wurde zunächst eine breite Basis Tissue Tec aufgetragen, auf dem dann die Proben in Gefriermedium eingebettet wurden. Nachdem das Zellmaterial durch das umgebende Trägermaterial mechanisch stabilisiert wurde, konnten die Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt werden. Die Schnitte wurden im letzten Schritt auf Objektträger gezogen und kühl bis zur Immunhistochemie gelagert.

### **2.2.7 Immunhistochemie**

Die zuvor angefertigten Kryostatschnitte mussten zu Beginn der Immunhistochemie von dem Gefriermedium befreit werden. Hierfür wurden die Objektträger zur besseren Bindung des Schnittes nach Überführen in Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit PBS gewaschen. Um eine optimale Penetration der Primäantikörper zur Detektion zytoplasmatischer Proteine zu gewährleisten, wurden die Schnitte in einer Permeabilisierungslösung für 30 min eingelegt. Die Ausnahme bildete die Vorbereitung der Immunhistochemie unter Verwendung des NCAM Primäantikörper zur Detektion membranständiger Oberflächenantigene. Dabei wurden die Schnitte jeweils nur für drei

Minuten mittels der Permeabilisierungslösung gewaschen, um die Oberfläche der Zellen für die NCAM-AK möglichst intakt zu halten, gleichzeitig aber die gegen intrazelluläre Proteine gerichteten Primärantikörper einsetzen zu können. Das in der Permeabilisierungslösung enthaltene Triton wurde im nächsten Schritt in drei jeweils fünfminütigen Waschgängen in PBS wieder entfernt. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit erfolgte das Auftragen der Inkubationslösungen mit den jeweiligen Primärantikörpern, die jeweils eine Stunde in dunkler Umgebung bei Raumtemperatur binden konnten (AK-Konzentrationen Tab. 10). Die Inkubationslösung mit nicht gebundenen Primärantikörper wurden in drei jeweils fünfminütigen Waschgängen in PBS entfernt. Anschließend wurden für die Aufbringung des Sekundärantikörpers die Schritte entsprechend mit Einwirkzeit und anschließendem Waschen wiederholt. Zum Abschluss der Immunhistochemie wurde das „Mounting Medium with DAPI-Hard set“ auf den Schnitt aufgetragen und der Objektträger mit einem Deckglas versehen.

### **2.2.8 Auswertung**

Die Auswertung und Anfertigung von Bildern erfolgte mit der EZ-C1 Viewer Software unter Verwendung des konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Nikon Eclipse 400). Mithilfe der ImageJ Software wurden die für einen Immunfluoreszenzmarker positiven Zellen ausgezählt. Dabei wurden nur Zellen mit deutlicher Fluoreszenz als positiv gewertet. Pro Bild erfolgte so die Auszählung aller Zellen anhand der DAPI positiv gefärbten Zellkerne. Die Quantifizierung einer (neuronalen oder glialen) Differenzierung erfolgte über die Bestimmung  $\beta$ III-Tubulin und engl. glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunpositiver Zellen. Ebenso erfolgte die Ermittlung der Zahl an NCAM<sup>+</sup> Zellen. NCAM findet sich als Zelladhäsionsprotein u.a. an der Oberfläche von mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen [100, 101]. Gliazellen bzw. Astrozyten, RGs als auch Bergmann-Glia sind durch ihren Gehalt an GFAP, einem Intermediärfilament vom Typ 3 charakterisiert [102, 103]. Das  $\beta$ III-Tubulin findet sich in differenzierten Neuronen wieder [104, 105].

### **2.2.9 Statistische Analyse**

Zunächst erfolgte die Erfassung der erhobenen Daten in Microsoft Excel. Erfasst wurden die Gesamtzellzahl pro Bild, die Anzahl an Zellen mit direktem Kontakt zum Cytodex sowie jeweils die Anzahl positiver Zellen für einen Immunfluoreszenzmarker.

Um eine möglichst korrekte Darstellung der Ergebnisse und Statistik durchzuführen, erfolgte eine Beratung durch das Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock.

Es erfolgte die Erhebung der deskriptiven Statistik, wobei das gewichtete arithmetische Mittel und für diesen Wert der Standardfehler bestimmt wurden. Die Wahl fiel auf das gewichtete arithmetische Mittel, um die schwankende Gesamtzellzahl pro Bild zu berücksichtigen. Durch die zuvor geschilderten Versuchsansätze aus Cytodex, Sphäre, den Kulturmedien sowie den drei Zelllinien ergab sich eine Einteilung in 24 Gruppen pro Fluoreszenzmarker. Gegenübergestellt wurden jeweils Cytodex und Sphärenansatz innerhalb eines Mediums und unter Verwendung einer Zelllinie.

Mit der SPSS-Software (Version 27) wurde die Unterschiede der Gruppen analysiert und hierfür das verallgemeinerte lineare Modell herangezogen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel. Die Wahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen den jeweils zu vergleichenden Gruppen wurde jeweils mit der entsprechenden Signifikanz angegeben. Dabei wurde ein  $p < .05$  als signifikant,  $p < .01$  als sehr signifikant und ein  $p < .001$  als höchst signifikant angesehen. Um eine Alphafehler-Kumulierung zu korrigieren, wurden für multiples Testen die ermittelten p-Werte nach der Bonferoni-Holm Korrektur adjustiert [106]

### **III. Ergebnisse**

---

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt. Dabei erfolgt zunächst die vitalmikroskopische und immunzytochemische Charakterisierung der striatalen Stammzellen und ihrer Differenzierungspotenz (Abschnitt 3.1). Anschließend werden die Ergebnisse des Differenzierungsverhaltens der Stammzellen im dreidimensionalen Kulturansatz als Neurosphären unter den vier genutzten Kulturmedien dargestellt (Abschnitt 3.2). Daraufhin werden diese Ergebnisse mit denen unter Verwendung eines Trägermaterial (Cytodex) als artifizielle Matrix verglichen (Abschnitt 3.3). Am Ende dieses Kapitels wird der explorative Ansatz einer zweidimensionalen Kultur der verwendeten Zellen präsentiert. Er dient der ergänzenden Beurteilung neuronaler Entwicklung in Abhängigkeit der verwendeten Medien (Abschnitt 3.4). Eine Auflistung der statistischen Auswertung der Ergebnisse findet sich im Anhang B.

#### **3.1 Charakterisierung der striatalen Stammzellen in Adhäsionskulturen**

---

Die der LGE der embryonalen Ratte um den E13, E16 und E19 entstammenden Zellen wiesen unter Kulturbedingung in Proliferationsmedium ein starkes Wachstum auf. Wie exemplarisch für die Zelllinie S13 gezeigt, konnten die Zellen durch den immunzytochemischen Nachweis der Expression von Vimentin als Stammzellen identifiziert werden, von denen viele den Proliferationsmarker ki67 als Zeichen ihrer mitotischen Aktivität exprimierten (siehe Abb. 5).

Nach einer Passage zeigten sich in der Mikroskopie der Kulturen zunächst einzelne adhäsive Zellen, die sich im Verlauf in mehreren Proliferationszentren organisierten. Die Zellen imponierten morphologisch durch einen neuroepithelialen Charakter (Abb. 6). Unter Proliferationsbedingungen zeigten sich vereinzelt differenzierte Zellen, die teilweise längere Zellausläufer besaßen. Schon vor Erreichen einer Konfluenz zeigten sich lokal proliferierende dreidimensionale Aggregate von Zellverbänden hoher Dichte (Abb. 6).

Diese spontane dreidimensionale Ausbildung von Neurosphären als weiteres Stammzellcharakteristikum unter nicht adhäsiven Kulturbedingungen bildete die Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen [107].

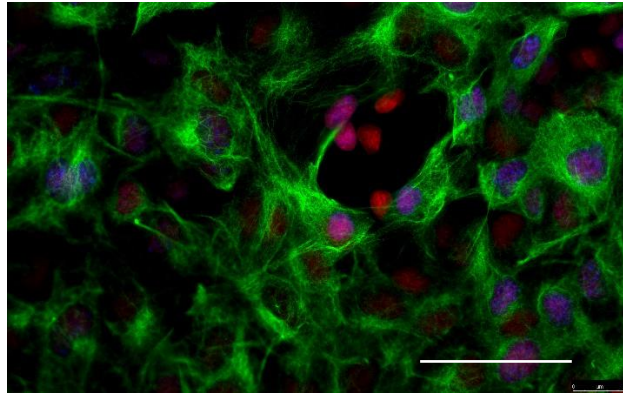


Abb. 5: Immunfluoreszenzbild der S13 Zellen in Kultur:

Exemplarische Darstellung eines Immunfluoreszenzbildes der S13 Zelllinie mit der Expression von Vimentin (grün), ki67 (rot), DAPI (blau), Maßstabbalken = 25 µm

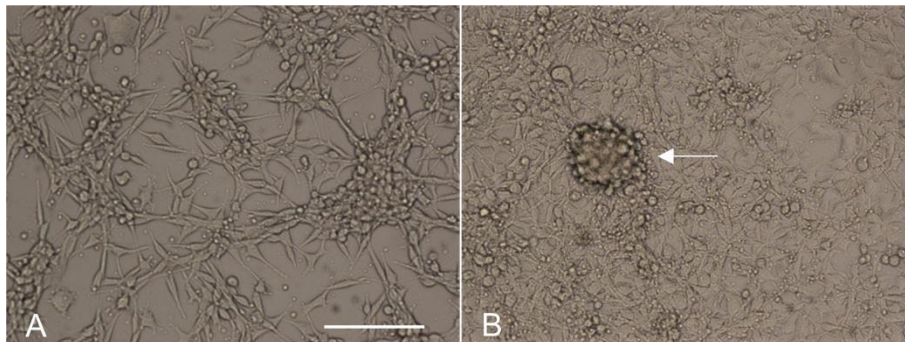


Abb. 6: Stammzellen in Zellkultur 24h (A) und 48 h (B) nach Passagieren:

Exemplarische Darstellung zweier lichtmikroskopischer Aufnahmen der S13 Zelllinie in Kultur. Zu erkennen ist die Zunahme der Zellen mit fortschreitender Inkubationszeit. A: Zellkultur nach 24 h, B: Zellkultur nach 48 h. Der Pfeil markiert ein Proliferationszentrum mit Zellaggregat kurz vor dem Passagieren, Maßstabbalken = 200 µm

### 3.2 Differenzierungsverhalten der striatalen Stammzellen im Neurosphärenverband

---

Die Zellen wurden unter nicht-adhäsiven Kulturbedingungen unter Verwendung von 96-Lochplatten für 14 Tage kultiviert. Unter einer siebentägigen Kultur mit 1zu1-Medium wurde eine Ausgangspopulation von 5000 Zellen zur Bildung von Zellaggregaten kultiviert. Anschließend erfolgte ein Wechsel der Kulturbedingungen unter Verwendung der verschiedenen Medien. In allen vier Ansätzen waren am Ende des 14-tägigen Experimentes intakte, typisch radiärsymmetrische Neurosphären vorhanden. Nach morphologischen Kriterien zeigte sich lichtmikroskopisch, dass die Neurosphären der S13 Zelllinie größer waren als die beiden anderen Zelllinien, die sich kaum unterschieden. Dagegen fanden sich bei allen drei Linien Unterschiede hinsichtlich Sphärenform und -größe in Abhängigkeit der vier verwendeten Medien. Dabei waren vor allem die Neurosphären größer, die unter Proliferationsmedium und 1zu1-Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen mit der deskriptiven Statistik bzw. der Vergleich zweier Gruppen wurden nach folgendem Schema dargestellt:

1. Name der Zelllinie (2. gewichtetes arithmetisches Mittel ( $M$ ) der für einen Immunfluoreszenzmarker positiven Zellen aller Bilder einer Gruppe, 3. Standardfehler ( $SF$ ) des  $M$ , 4. Gesamtzellzahl ( $n$ ) innerhalb einer Gruppe). Bei Vergleich zweier Gruppen wurde folgendes Schema verwendet: 1. Name der Zelllinie (2.  $M$ , 3.  $SF$ , 4. Differenz der gewichteten arithmetischen Mittel zwischen Gruppe A und Gruppe B in Bezug auf die Expression eines Immunfluoreszenzmarkers ( $W$ -Differenz), 5. Signifikanz des Unterschieds ( $p$ )).

### 3.2.1 Differenzierungsverhalten unter Proliferationsbedingungen

Unter Verwendung von Proliferationsmedium zeigten sich am Ende der 14-tägigen Kultur Neurosphären mit kompakter, typischer radiärsymmetrischer Morphologie. Innerhalb des Zellverbandes waren Zellen unterschiedlicher Größe zu finden. Im Randbereich der Neurosphären fanden sich einige freie Zellen als Hinweis auf eine Lösung aus dem Zellverband. Bei stärkerer Vergrößerung zeigten sich diese mit unterschiedlicher Morphologie. Diese Zellen spielten in der immunzytochemischen Auswertung keine Rolle mehr, da sie im Rahmen der Sphärenextraktion in mehreren Waschgängen ausgesiebt wurden.

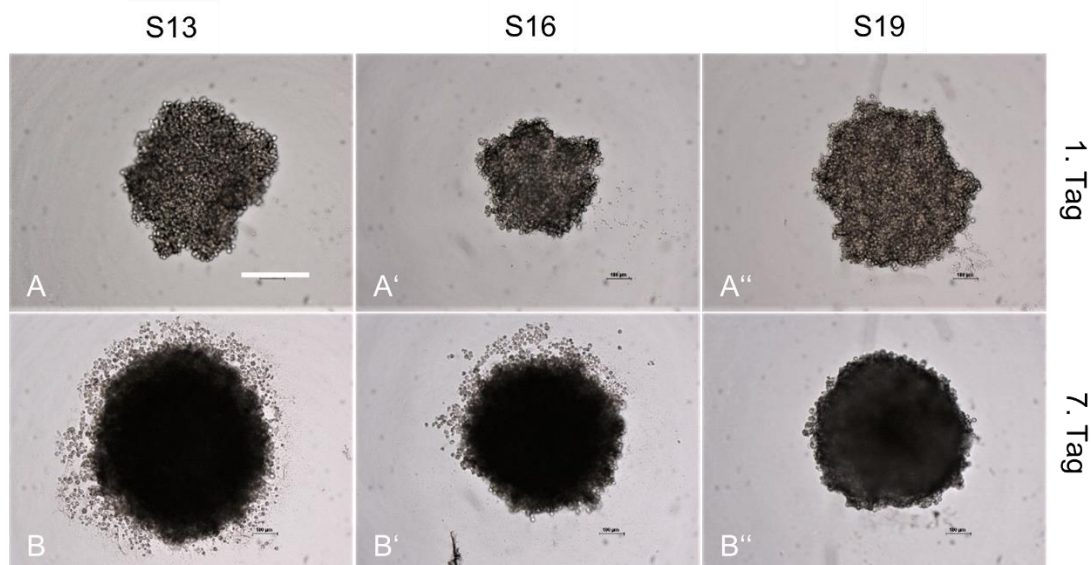


Abb. 7: Neurosphären unter Proliferationsbedingungen:

Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung der Neurosphärenkultur der drei Zelllinien. Reihe A: achter Tag der Kultur, erster Tag unter Proliferationsbedingungen; Reihe B: 14. Tag der Kultur insgesamt, davon sieben Tage unter Proliferationsbedingungen, Maßstabsbalken = 200  $\mu$ m

Bei immunhistochemischer Färbung zeigte sich ein nahezu vollständiges Ausbleiben einer fortgeschrittenen neuronalen Differenzierung. Nur unter der S19 Zelllinie ( $M = .02$ ,  $SF = .002$ ,  $n = 4339$ ) konnten einige NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten als Hinweis auf ein frühes Stadium einer neuronalen Differenzierung nachgewiesen werden. Die Neuroblasten waren dabei in Zellnestern organisiert.

Vereinzelt fanden sich unter den S13 Sphären GFAP<sup>+</sup> Gliazellen ( $M = .02$ ,  $SF = .005$ ,  $n = 1037$ ) (Abb. 8).

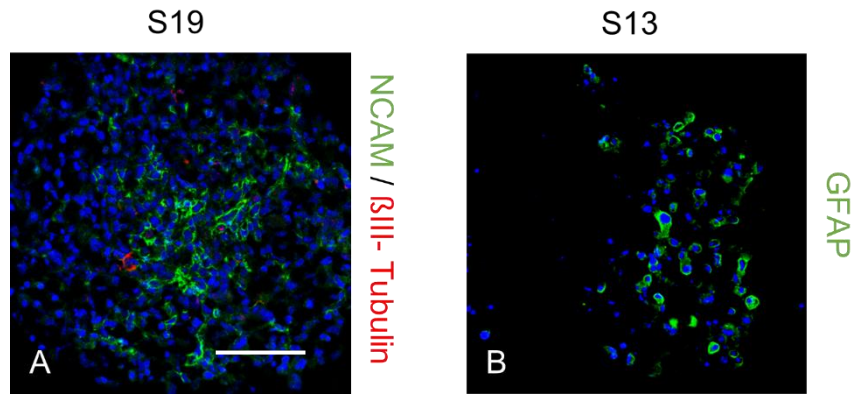


Abb. 8: Neurosphären unter Verwendung von Proliferationsmedium:

Exemplarische Darstellung zweier Immunfluoreszenzbilder. A: S19 Neurosphäre mit Expression von NCAM (grün)/  $\beta$ III-Tubulin (rot), B: S13 Neurosphäre mit Expression von GFAP (grün), DAPI (blau), Maßstabbalken = 100  $\mu$ m

### 3.2.2 Differenzierungsverhalten unter Verwendung von FCS-haltigen Medien

Um eine Differenzierung der Stammzellen zu induzieren, wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, FCS-haltiges Differenzierungsmedium eingesetzt. Dazu wurde zum einen das Differenzierungsmedium mit einem Gehalt von 10 % FCS verwendet. Zum anderen wurde das 1zu1-Medium verwendet, welches je zur Hälfte aus Proliferations- und Differenzierungsmedium bestand. Es enthielt somit nur die Hälfte der Menge an FCS im Vergleich zum reinen Differenzierungsmedium.

Unter beiden FCS-haltigen Medien präsentierten sich Neurosphären mit deutlicher Radiärsymmetrie. Diese waren im Vergleich zu den Neurosphären aus FCS-freiem Medium größer, homogener und zeigten eine deutlich kompaktere Zellbegrenzung der Sphärenoberfläche. Entsprechend fanden sich hier wenige Zellen außerhalb des Zellverbandes.

Anders als unter dem Proliferationsmedium konnten unter Verwendung des 1zu1-Mediums immunhistochemisch einige morphologisch differenzierte Neurone nachgewiesen werden. Diese waren überwiegend in Nestern organisiert und zeigten wenige und kurze Zellausläufer. Während unter dem Proliferationsmedium keine  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen zu finden waren, fanden sich diese unter dem 1zu1-Medium in der S13 Zelllinie in einer Häufigkeit von ca. 4 % ( $M = .04$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 3455$ ) und in der S16 Zelllinie von ca. 2 %. ( $M = .02$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 2927$ ). Diese  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen fanden sich häufiger in der Nähe von NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten. Diese Neuroblasten waren ebenfalls fokal akkumuliert über die gesamte Sphäre zu finden. Im Vergleich zum Proliferationsmedium fand sich ein fünfmal größerer Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten in der S16 Zelllinie ( $M = .05$ ,  $SF = .004$ ,  $n = 2927$ ) und ein doppelt so großer in der S19 Zelllinie ( $M = .05$ ,  $SF = .004$ ,  $n = 6617$ ).

Neben der neuronalen Differenzierung präsentierten sich auch einige makroglial differenzierte GFAP<sup>+</sup> Astrozyten, die meist bandartig organisiert am äußeren Teil der Neurosphären zu finden waren. Der Anteil solcher Zellen war unter dem 1zu1-Medium in der S13 Zelllinie ( $M = .08$ ,  $SF = .005$ ,  $n = 2720$ ) viermal so groß wie unter Proliferationsbedingungen. Fanden sich unter dem Proliferationsmedium keine GFAP<sup>+</sup> Astrozyten, so konnte unter dem 1zu1-Medium in der S16 Zelllinie ( $M = .03$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 2353$ ) 3 % und in der S19 Zelllinie ( $M = .05$ ,  $SF = .004$ ,  $n = 3741$ ) 5 % der Gesamtzellzahl als astrozytäre Gliazellen identifiziert werden (Abb. 9).

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbung konnten auch unter dem Differenzierungsmedium  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus fanden sich NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten. Diese beiden Zellpopulationen waren dabei topographisch ähnlich organisiert wie unter dem 1zu1-Medium. Allerdings zeigte sich im Vergleich zu diesem nur ein halb so großer Anteil an Neuronen, während sich der Anteil an Neuroblasten in der S13 Zelllinie ( $M = .02$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 2464$ ) verdoppelte. In der S16 Zelllinie ( $M = .10$ ,  $SF = .005$ ,  $n = 3616$ ) fand sich ebenfalls ein zweimal größerer Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten, sodass 10 % der Zellen positiv waren.

Auch GFAP<sup>+</sup> Astrozyten konnten nachgewiesen werden. Im Vergleich zum 1zu1-Medium war deren relatives Vorkommen jedoch in allen drei Zelllinien reduziert (Abb. 10).

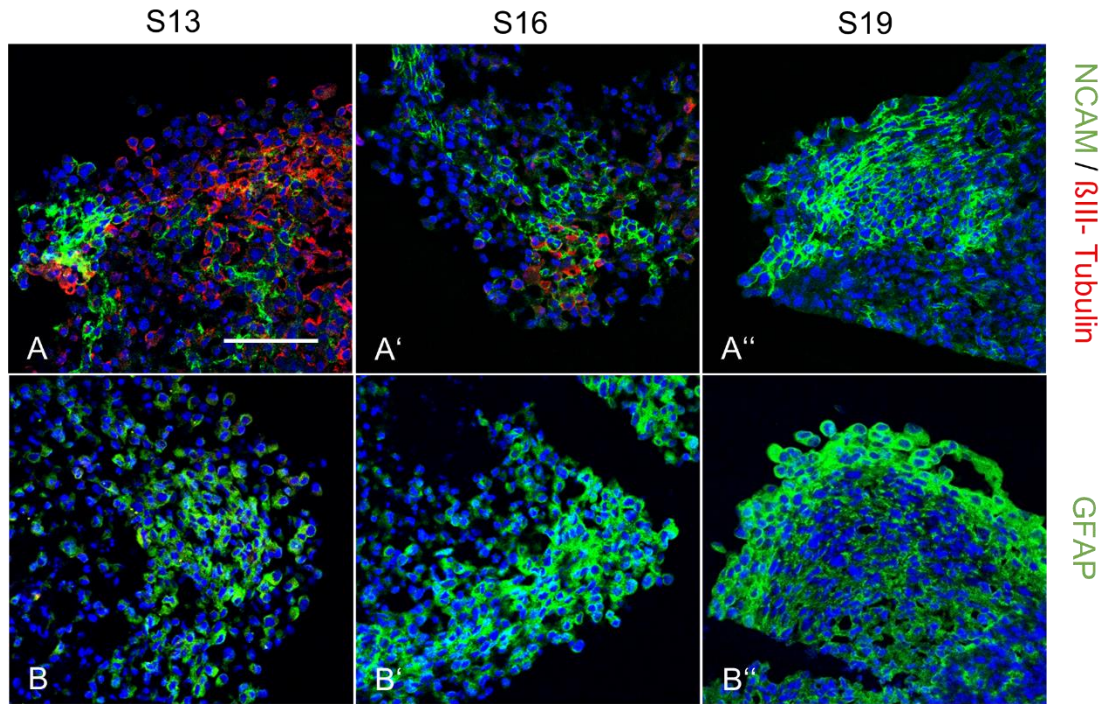


Abb. 9: Neurosphären der drei Zelllinien unter 1zu1-Medium:

Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenzbildern der Neurosphärenversuche der drei Zelllinien unter 1zu1-Medium, Reihe A: Expression von NCAM (grün) und  $\beta$ III-Tubulin (rot), Reihe B: Expression von GFAP, DAPI (blau), Maßstab Balken = 100  $\mu$ m

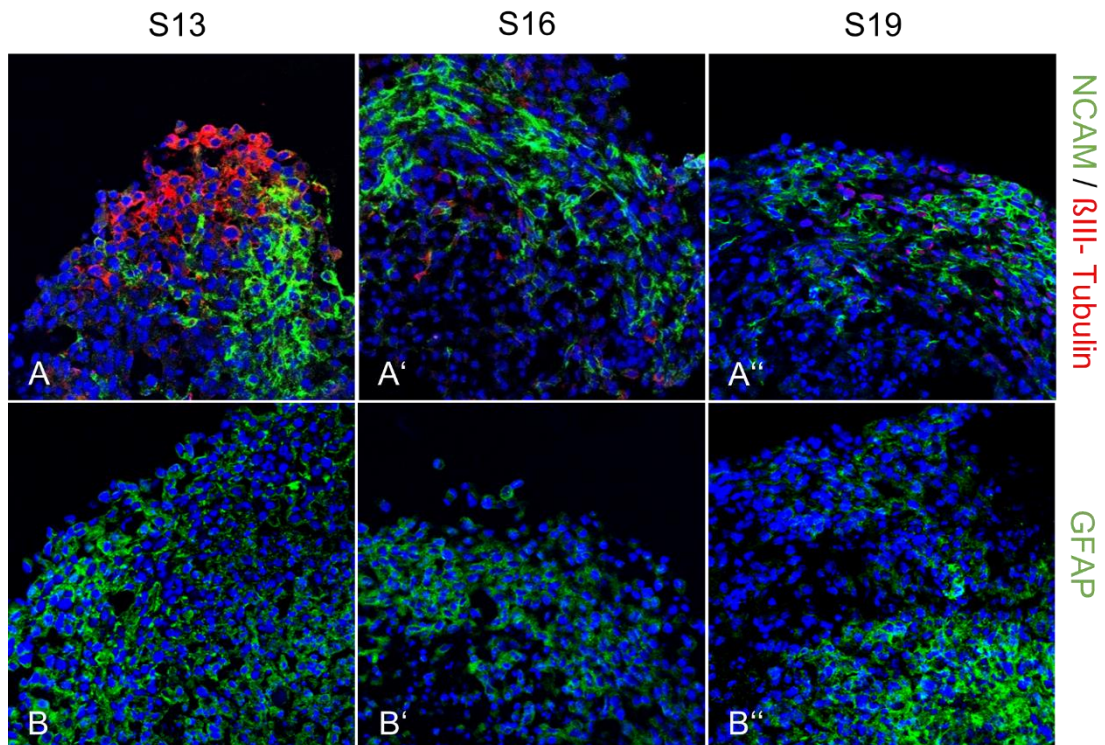


Abb. 10: Neurosphären der drei Zelllinien unter Differenzierungsmedium:

Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenzbildern der Neurosphärenversuche der drei Zelllinien unter Differenzierungsmedium, Reihe A: Expression von NCAM (grün) und  $\beta$ III-Tubulin (rot), Reihe B: Expression von GFAP, DAPI (blau), Maßstab Balken = 100  $\mu$ m

### **3.2.3 Differenzierungsverhalten unter chemisch definiertem Medium**

Anders als das 1zu1- und das Differenzierungsmedium beinhaltet das Stemcellmedium kein FCS. Hier wurde ein kommerziell erhältliches synthetisches Medium mit unbekannter Zusammensetzung verwendet, welches laut Herstellerangaben die neuronalen Stammzellen zur Differenzierung anregen soll.

Am Ende der 14-tägigen Kultur zeigten sich dichte Neurosphären, die jedoch in den Randbereichen Adhäsionsverluste oberflächlich lokalisierter Zellen aufwiesen. Damit ähnelte die Morphologie der Neurosphären denen unter Proliferationsbedingungen.

Unter dem Stemcellmedium konnten sowohl  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> differenzierte Neurone als auch NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten nachgewiesen werden. Dabei waren diese weniger zentral lokalisiert, sondern vielmehr im Randbereich der Neurosphären zu finden. Im Vergleich zu den anderen verwendeten Kulturmedien lag die Anzahl an Neuronen unter der S13 Zelllinie ( $M = .04$ ,  $SF = .004$ ,  $n = 3148$ ) ebenso hoch wie unter dem 1zu1-Medium, während unter der S16 Zelllinie ( $M = .03$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 4635$ ) mit 3 % und der S19 Zelllinie ( $M = .02$ ,  $SF = .002$ ,  $n = 3080$ ) mit 2 % der größte prozentuale Anteil an  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen im Vergleich aller Kulturmedien zu finden waren. NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten konnten unter der S16 ( $M = .06$ ,  $SF = .004$ ,  $n = 4635$ ) und der S19 Zelllinie ( $M = .02$ ,  $SF = .002$ ,  $n = 3080$ ) nachgewiesen werden, während die S13 Kulturen bei hohem Anteil neuronaler Differenzierung kaum Neuroblasten zeigten. Mit 2 % lag der Anteil der NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten ähnlich hoch wie unter Proliferationsbedingungen.

Der Grad der glialen Differenzierung lag unter der S13 ( $M = .02$ ,  $SF = .002$ ,  $n = 3247$ ) sowie S19 Zelllinie ( $M = .02$ ,  $SF = .003$ ,  $n = 2120$ ) im Vergleich zum Differenzierungsmedium ähnlich hoch, während unter der S16 Zelllinie kaum gliale Differenzierung stattfand.

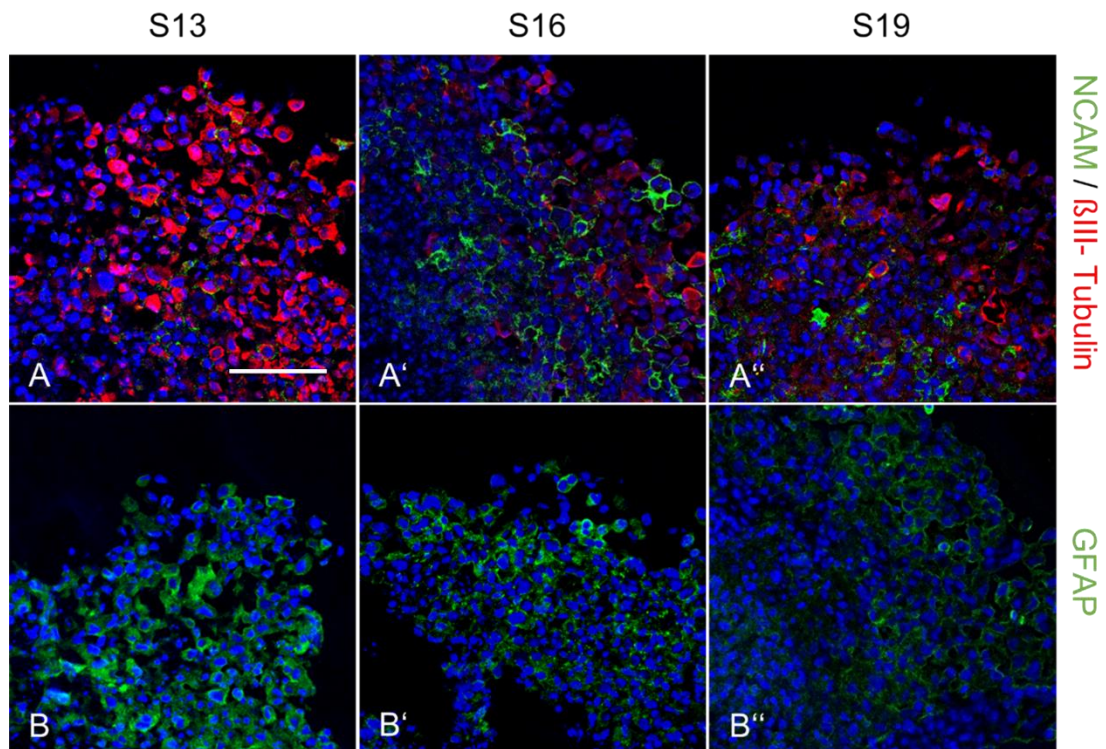


Abb. 11: Neurosphären der drei Zelllinien unter Stemcellmedium:

Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenzbildern der Neurosphärenversuche der drei Zelllinien unter Stemcellmedium, Reihe A: Expression von NCAM (grün) und βIII-Tubulin (rot), Reihe B: Expression von GFAP, DAPI (blau), Maßstabballen = 100 μm

### 3.3 Differenzierungsverhalten der Stammzellen unter Verwendung von Cytodex

Das Differenzierungsverhalten der Neurosphären der drei verwendeten Zelllinien zeigte deren unterschiedliches Differenzierungspotential in Abhängigkeit verschiedener Medien. Im folgenden Teil werden diese Untersuchungen ergänzt durch zusätzliche Versuchsansätze unter Verwendung eines Trägermaterials (Cytodex) als Möglichkeit der Analyse eines Einflusses der Zell-Matrix-Interaktion auf das Differenzierungsverhalten. Dazu wurden Suspensionskulturen unter Verwendung von Cytodex mit herkömmlichen Neurosphärenversuchen hinsichtlich einer stattfindenden Differenzierung verwendeter NPCs verglichen.

Wie unter 2.2.4 beschrieben wurden die NPCs zunächst sieben Tage unter 1zu1-Medium in der Spinnerkultur gehalten, bevor sie nach Besiedlung der Cytodexkugeln mit diesen aus der Spinnerkultur in eine 24er Lochplatte überführt wurden. Hier erfolgte die Kultivierung der Zellen mit den vier unterschiedlichen Medien sowie die tägliche vitalmikroskopische Begutachtung (Abb. 12). Parallel zum Neurosphärenversuch wurden nach insgesamt 14-tägiger Kultur die Cytodex-Zell-Aggregate fixiert und immunhistochemisch aufgearbeitet.

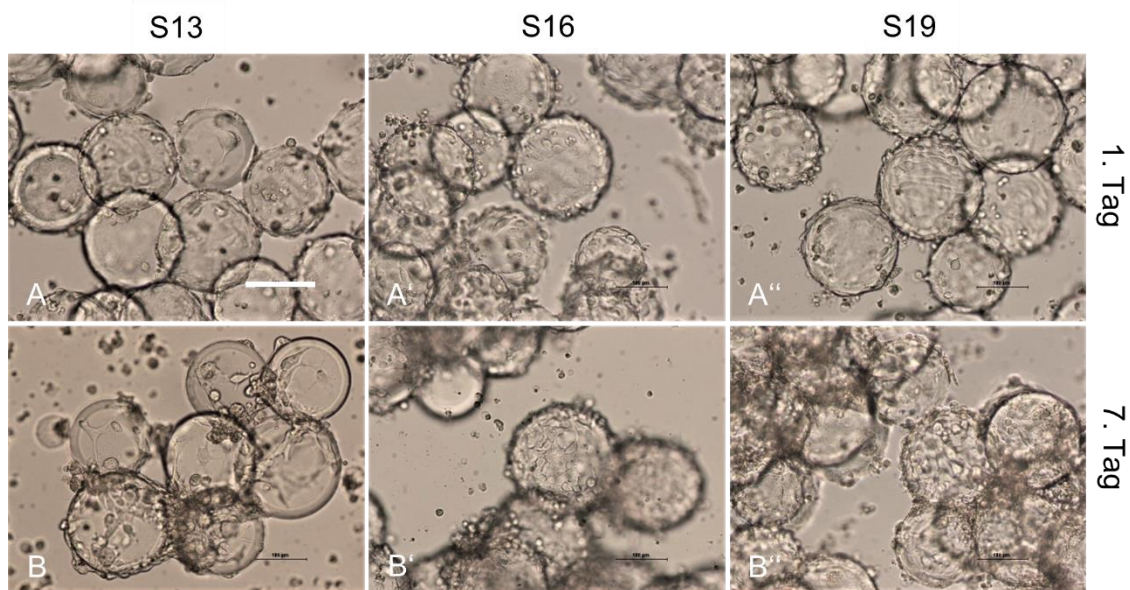


Abb. 12: Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von 1zu1-Medium:

Exemplarische Darstellung lichtmikroskopischer Bilder der drei Zelllinien im Cytodexversuch, Reihe A: achter Tag der Kultur insgesamt, erster Tag in 24er Lochplatte; Reihe B: 14. Tag der Kultur insgesamt, siebter Tag in 24er Lochplatte, Maßstab Balken = 100 µm

### **3.3.1 Differenzierungsverhalten unter Proliferationsbedingungen**

Nachdem die Cytodex-Zell-Aggregate aus der Spinnerkultur in die Lochplatte überführt wurden, konnte nach zwei bis drei Tagen ein deutlicher Adhäsionsverlust der Zellen am Trägermaterial detektiert werden. Mit fortlaufender Kultur lösten sich immer mehr Zellen von der Cytodexmatrix ab. Am Ende der siebentägigen Kultur befanden sich nur noch wenige Zellen auf den Cytodexkugeln. Stattdessen waren die Zellen als irregulär geformte Zellaggregate ähnlich wie Neurosphären organisiert.

Da im Versuchsansatz unter Verwendung der Cytodex-Matrix am Ende des Experiments unter Proliferationsbedingungen nur wenige Zellen direkt in Kontakt zur Oberfläche des Trägermaterials nachgewiesen werden konnten, beziehen sich die vergleichenden Angaben zu den Experimenten auf diese Aggregate in der Cytodex-Zell-Suspension.

In der Kontrollgruppe (Neurosphären ohne Verwendung von Cytodex) (siehe 2.2.2) fand sich unter Proliferationsbedingungen am Ende der Kultivierungszeit eine Suspension mit deutlicher Proliferation unter Bildung von Neurosphären. Unmittelbar an der Neurosphärenoberfläche zeigte sich ein schmaler, wenig kompakter Zellsaum als mögliches Korrelat sich lösender Zellen.

Im Parallelansatz formierten sich die von der Matrix gelösten Zellen zu Aggregaten, in denen sich immunhistochemisch eine große Anzahl differenzierter  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone sowie NCAM exprimierender Neuroblasten vorfanden. Sowohl Nervenzellen als auch die Neuroblasten waren diffus innerhalb der Aggregate verteilt. Während sich im Kontrollansatz der S13 und S16 Zelllinie keine  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen nachweisen ließen, waren unter Verwendung von Cytodex 6 % der Zellen der S13 Zelllinie ( $M = .06$ ,  $SF = .016$ , W-Differenz = .06) und 11 % der Zellen der S16 Zelllinie ( $M = .11$ ,  $SF = .010$ , W-Differenz = .11) positiv auf  $\beta$ III-Tubulin. Statistisch fand sich ein signifikanter Unterschied auch für die S19 Zelllinie mit 4 %  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen ( $M = .04$ ,  $SF = .013$ , W-Differenz = .03,  $p = .041$ ) während sich im Kontrollansatz nur vereinzelt Neurone fanden. Zudem lag auch die Anzahl an Neuroblasten in allen drei Zelllinien über denen der Kontrollgruppe, wobei sich der größte Unterschied unter der S19 Zelllinie fand, in der der Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten dreimal größer war.

Im Hinblick auf eine gliale Entwicklung zeigte sich für alle drei Zelllinien eine astrozytäre Differenzierung. Dabei waren unter der S16 Zelllinie 11 % der Zellen und unter der S19 Zelllinie ( $M = .09$ ,  $SF = .026$ , W-Differenz = .09,  $p = .001$ ) 9 % der Zellen positiv für GFAP. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (S16 Zelllinie keine und unter der S19 Zelllinie < 1 %) war dieser Unterschied dabei sehr signifikant. Unter der S13 Zelllinie ( $M = .05$ ,  $SF = .021$ , W-Differenz = .03,  $p = .343$ ) war der relative Anteil GFAP<sup>+</sup> Gliazellen mehr als doppelt so groß.

---

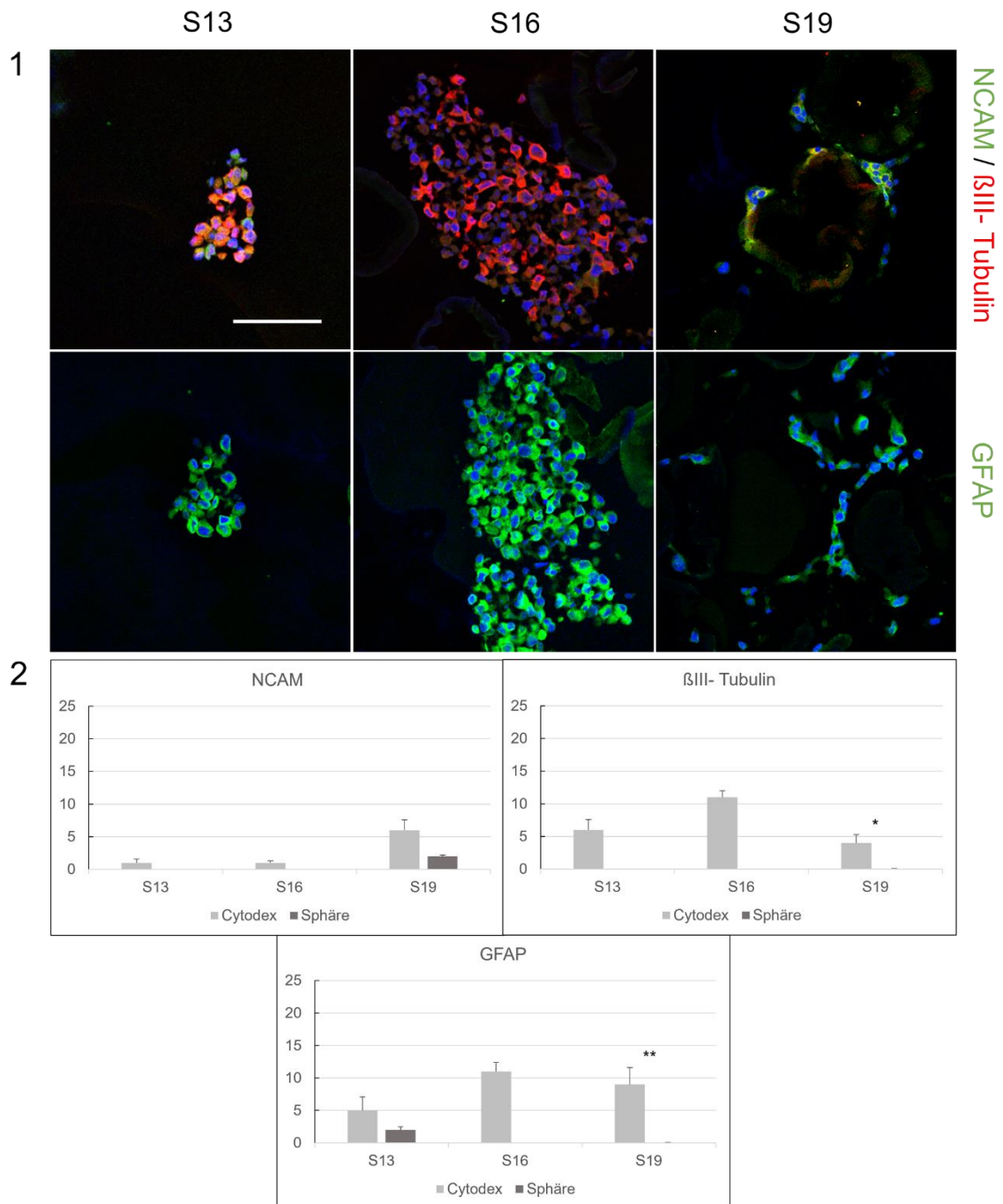


Abb. 13: Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Proliferationsmedium:

Darstellung der Ergebnisse der Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Proliferationsmedium, 1: Immunfluoreszenzbilder der Expression von NCAM (grün),  $\beta$ III-Tubulin (rot) in der oberen Reihe und GFAP (grün) sowie DAPI (blau) in der unteren Reihe, der drei Zelllinien mit Cytodex, 2: Diagramme zur Expression von NCAM,  $\beta$ III-Tubulin und GFAP der drei Zelllinien mit dem Vergleich von Cytodex und Neurosphärenansatz; Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in %, Fehlerindikator: Standardfehler, Signifikanzen: \*  $p < .05$ . \*\*  $p < .01$ . \*\*\*  $p < .001$ , Maßstabballen = 100  $\mu$ m

### **3.3.2 Differenzierungsverhalten unter Verwendung von FCS-haltigen Medien**

Im Vergleich zum Neurosphärenansatz zeigten die Stammzellen auch im Cytodexansatz unter Verwendung von FCS-haltigen Medium eine größere Adhäsion als unter FCS-freien Medium. Unter dem 1zu1-Medium fanden sich die Zellen sowohl auf der Cytodex-Matrix als auch in aggregierter Form zwischen den Cytodexkugeln. Zudem lagen die Cytodexkugeln und Aggregate „quervernetzt“ als größere Cytodex-Zell Konglomerate vor (siehe Abb. 12). Unter dem Differenzierungsmedium mit 10 % FCS fand sich eine hauptsächlich die Cytodexoberfläche bewachsende Kultur. Dabei wiesen die Zellen dieses Ansatzes im Vergleich zum Ansatz unter Verwendung von 1zu1-Medium eine höhere morphologische Differenzierung und geringere Zellzahl auf, entsprechend war die Anzahl größerer Zellaggregate in Suspension gering.

Immunhistochemisch zeigten sich unter Verwendung des 1zu1-Mediums in Kombination mit der Cytodex-Matrix einige differenzierte  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone und eine große Zahl von NCAM exprimierenden Neuroblasten. Im Vergleich zum Kontrollansatz konnten ähnlich viele Neurone in der S13 sowie S16 Zelllinie beobachtet werden. Den Beobachtungen der Vitalmikroskopie entsprechend war bei dieser immunzytochemischen Analyse ein hochsignifikanter Unterschied gegeben und der prozentuale Anteil  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen der S19 Zelllinie ( $M = .04$ ,  $SF = .005$ ,  $W$ -Differenz =  $.04$ ,  $p < .001$ ) zwölfmal größer als unter dem Kontrollansatz. Auch der Unterschied in der Menge an Neuroblasten zur Kontrollgruppe präsentierte sich unter allen drei Zelllinien als hoch signifikant. Dabei war der relative Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe in der S13 Zelllinie ( $M = .09$ ,  $SF = .004$ ,  $W$ -Differenz =  $.08$ ,  $p < .001$ ) dreimal, in der S16 Zelllinie ( $M = .09$ ,  $SF = .006$ ,  $W$ -Differenz =  $.05$ ,  $p < .001$ ) mehr als doppelt und S19 Zelllinie ( $M = .22$ ,  $SF = .010$ ,  $W$ -Differenz =  $.17$ ,  $p < .001$ ) mehr als viermal so groß. Innerhalb der Cytodex-Zell- Aggregate waren die differenzierten Neurone häufig nah beieinander zu finden. Vielfach fanden sich diese  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone in unmittelbarer Nähe zu NCAM<sup>+</sup> Zellen, die vorzugsweise in „Neuroblastennestern“ organisiert waren.

Es wurde ebenfalls die Zellzahl und relative Häufigkeit (positiver Zellen für einen Immunfluoreszenzmarker) der Zellen ermittelt, die direkt mit dem Cytodex in Kontakt standen. Im direkten Kontakt mit der Cytodex-Matrix zeigte sich eine noch größere Dichte NCAM<sup>+</sup> und  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen. Im statistischen Vergleich der drei Zelllinien wuchs dabei der Anteil von Neuroblasten von der S13 bis zur S19 Zelllinie an, sodass sich unter der S19 Zelllinie ( $M = .46$ ,  $SF = .025$ ,  $n = 403$ ) fast die Hälfte der Zellen in unmittelbarer Nähe zur Matrix positiv für NCAM zeigten (Abb. 15 ). Bei Betrachtung nur der Zellen mit direkten Cytodexkontakt war der Anteil  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone unter der S16 Zelllinie siebenmal und unter der S19 Zelllinie doppelt so groß.

In allen drei Zelllinien fanden sich ebenfalls zahlreiche Astrozyten. Dabei lag die Zahl GFAP<sup>+</sup> Zellen in jeder Zelllinie über denen der Kontrollgruppe. Unter der S16 Zelllinie ( $M = .06$ ,  $SF = .006$ ,  $W$ -Differenz = .03,  $p < .001$ ) war der Anteil GFAP<sup>+</sup> Astrozyten doppelt und unter der S19 Zelllinie ( $M = .14$ ,  $SF = .008$ ,  $W$ -Differenz = .09,  $p < .001$ ) fast dreimal so groß. Unter diesen beiden Zelllinien war dies ein hoch signifikanter Unterschied. Der Anteil von Astrozyten lag bei Betrachtung des direkten Cytodexkontaktes unter der S13 Zelllinie ( $M = .43$ ,  $SF = .027$ ,  $n = 340$ ) bei 43 % und unter der S19 Zelllinie ( $M = .24$ ,  $SF = .023$ ,  $n = 348$ ) bei 24 % und damit noch höher.

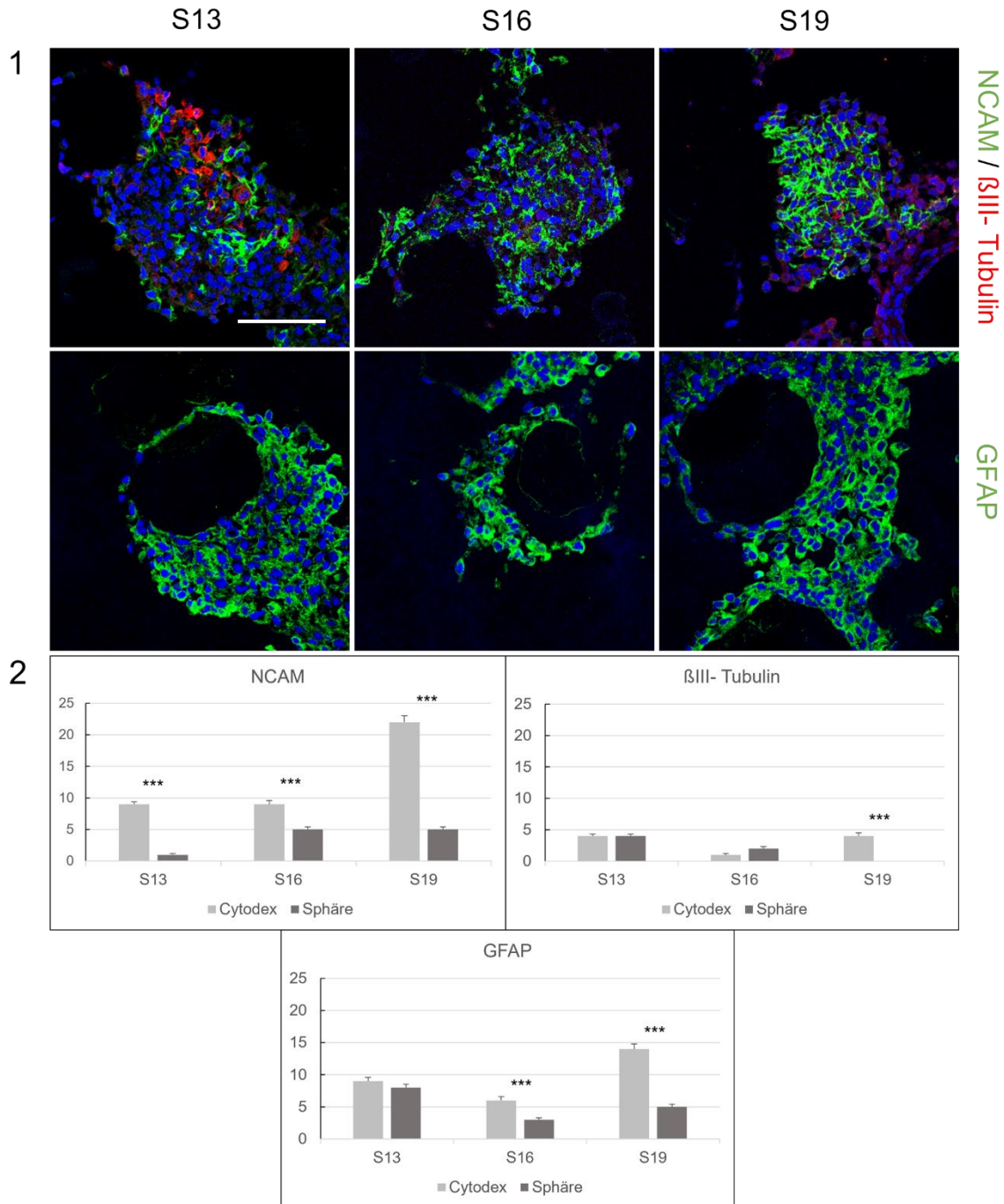


Abb. 14: Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von 1zu1-Medium:

Darstellung der Ergebnisse der Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von 1zu1-Medium, 1: Immunfluoreszenzbilder der Expression von NCAM (grün),  $\beta$ III-Tubulin (rot) in der oberen Reihe und GFAP (grün) sowie DAPI (blau) in der unteren Reihe, der drei Zelllinien mit Cytodex, 2: Diagramme zur Expression von NCAM,  $\beta$ III-Tubulin und GFAP der drei Zelllinien mit dem Vergleich von Cytodex und Neurosphärenansatz; Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in %, Fehlerindikator: Standardfehler, Signifikanzen: \*  $p < .05$ . \*\*  $p < .01$ . \*\*\*  $p < .001$ , Maßstabballen = 100  $\mu$ m

Unter dem Differenzierungsmedium fand sich eine große Anzahl an differenzierten  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen. Unter allen drei Zelllinien lag die Menge  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen deutlich über der der Kontrollgruppe und es zeigte sich unter jeder Zelllinie im Vergleich zum Neurosphärenansatz ein hoch signifikanter Unterschied. Dabei fand sich mit 24 % ein zwölffach höherer Anteil  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone unter der S13 Zelllinie ( $M = .24$ ,  $SF = .012$ ,  $W$ -Differenz =  $.22$ ,  $p < .001$ ), sowie sechsmal mehr unter der S16 Zelllinie ( $M = .06$ ,  $SF = .005$ ,  $W$ -Differenz =  $.05$ ,  $p < .001$ ) und siebenmal mehr unter der S19 Zelllinie ( $M = .07$ ,  $SF = .007$ ,  $W$ -Differenz =  $.07$ ,  $p < .001$ ). Daneben waren auch zahlreiche NCAM exprimierende Neuroblasten zu beobachten. Deren Anzahl war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Ausnahme der S13 Zelllinie größer. Hier waren nur halb so viele Neuroblasten zu finden. Unter der S16 Zelllinie ( $M = .13$ ,  $SF = .007$ ,  $W$ -Differenz =  $.04$ ,  $p < .001$ ) waren es 3 % mehr und unter der S19 Zelllinie ( $M = .23$ ,  $SF = .012$ ,  $W$ -Differenz =  $.19$ ,  $p < .001$ ) war der prozentuale Anteil fast sechsmal so hoch.

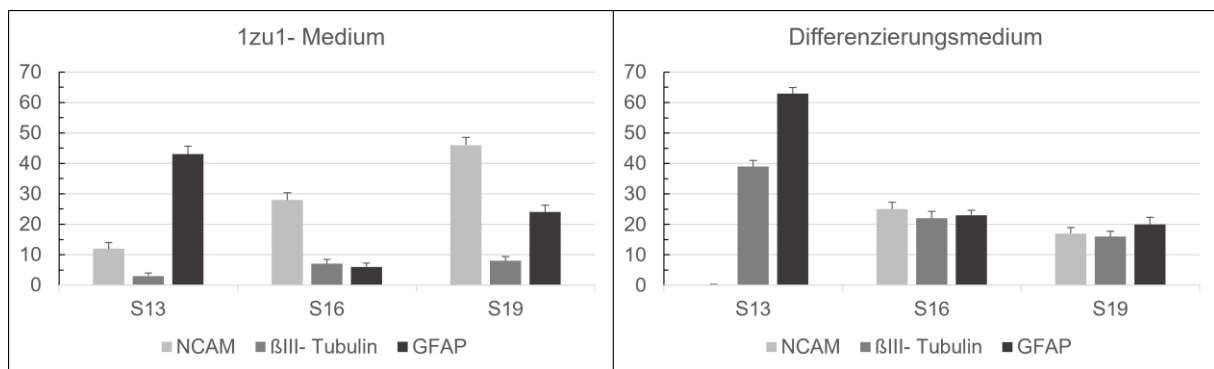


Abb. 15: Direkter Cytodexkontakt der Zellen der Cytodex-Zell-Suspension:

Darstellung der Ergebnisse der Expression von NCAM,  $\beta$ III-Tubulin und GFAP bei direktem Cytodexkontakt der drei Zelllinien unter 1zu1- Medium (links) und unter Differenzierungsmedium (rechts), Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in %, Fehlerindikator: Standardfehler

Bei Betrachtung des direkten Cytodexkontaktes waren 39 % der Zellen unter der S13 Zelllinie ( $M = .39$ ,  $SF = .020$ ,  $n = 601$ )  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Nervenzellen. Der prozentuale Anteil unter der S16 Zelllinie war mit 22 % fast viermal und unter der S19 Zelllinie mit 16 % mehr als doppelt so hoch (Abb. 15). Die beobachteten Neurone wiesen dabei teils lange Zellausläufer auf, die sich entlang der Matrixoberfläche finden ließen.

Im Hinblick auf die gliale Differenzierung fanden sich unter allen Zelllinien auch zahlreiche GFAP<sup>+</sup> Gliazellen. Unter diesen Differenzierungsbedingungen zeigte sich unter der S13 Zelllinie ( $M = .35$ ,  $SF = .015$ ,  $W$ -Differenz =  $.32$ ,  $p < .001$ ) die höchste Anzahl an Astrozyten, die unter allen Medien und Zelllinien überhaupt gefunden werden konnte. Der prozentuale Anteil war mehr als siebzehnmal so groß im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Unter der S16 Zelllinie ( $M = .08$ ,  $SF = .005$ ,  $W$ -Differenz =  $.06$ ,  $p < .001$ ) war der Anteil mit 8 % viermal und

unter der S19 Zelllinie ( $M = .11$ ,  $SF = .010$ ,  $W$ -Differenz =  $.08$ ,  $p < .001$ ) mit 11 % mehr als dreimal so groß.

In der S13 Zelllinie ( $M = .63$ ,  $SF = .023$ ,  $n = 440$ ) waren fast zwei Drittel der Zellen mit direktem Cytodexkontakt GFAP<sup>+</sup>. Der Anteil war vergleichend mit allen Zellen also auch denen ohne Cytodexkontakt mit 23 % unter der S16 Zelllinie fast dreimal und unter der S19 Zelllinie mit 20 % fast doppelt so hoch unter Betrachtung des direkten Cytodexkontaktes.

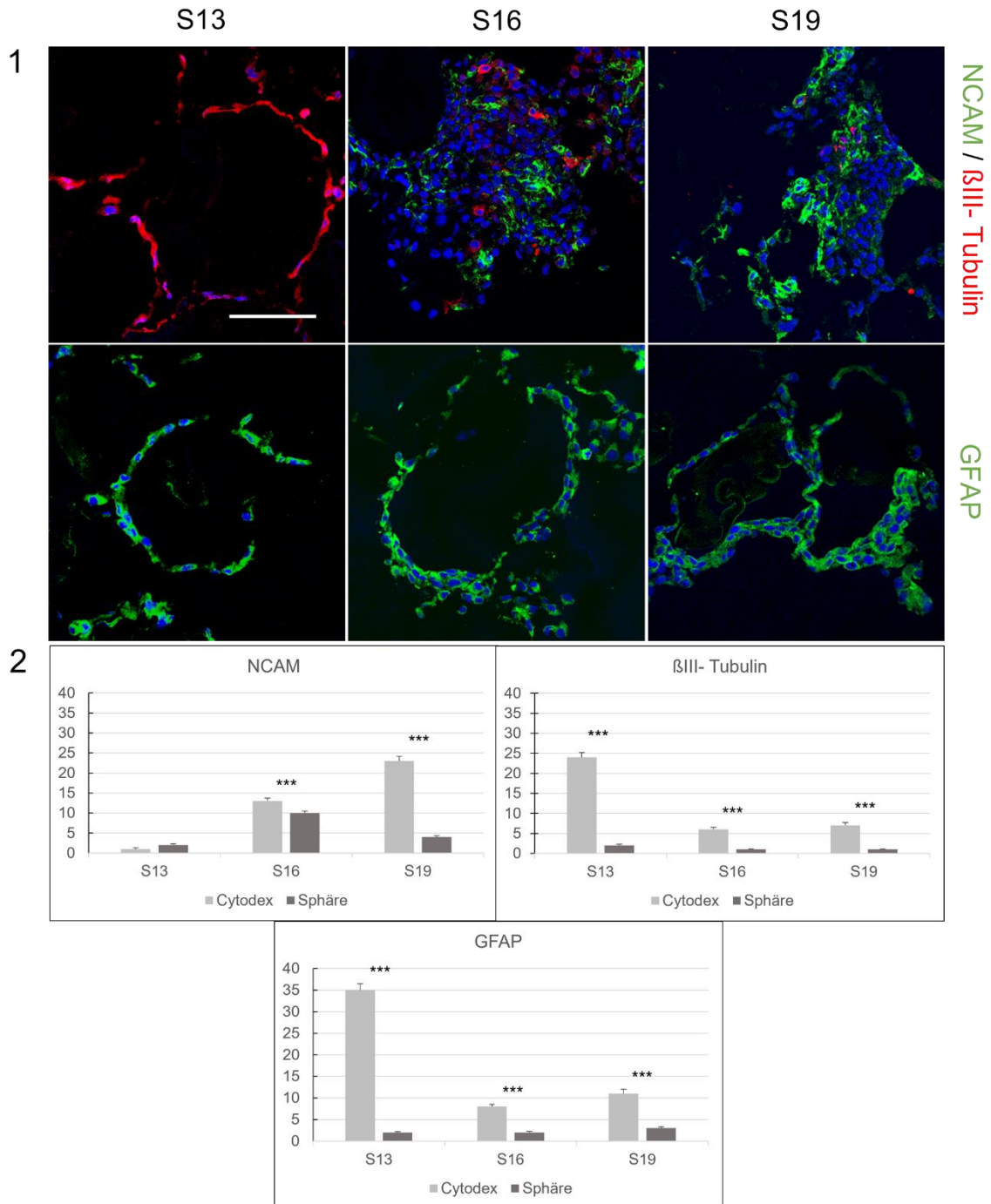


Abb. 16: Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Differenzierungsmedium:

Darstellung der Ergebnisse der Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Differenzierungsmedium, 1: Immunfluoreszenzbilder der Expression von NCAM (grün), βIII-Tubulin (rot) in der oberen Reihe und GFAP (grün) sowie DAPI (blau) in der unteren Reihe, der drei Zelllinien mit Cytodex, 2: Diagramme zur Expression von NCAM, βIII-Tubulin und GFAP der drei Zelllinien mit dem Vergleich von Cytodex und Neurosphärenansatz; Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in %, Fehlerindikator: Standardfehler, Signifikanzen: \*  $p < .05$ . \*\*  $p < .01$ . \*\*\*  $p < .001$ , Maßstabballen = 100  $\mu\text{m}$

### **3.3.3 Differenzierungsverhalten unter chemisch definiertem Medium**

Auch unter dem Stemcellmedium kam es nach zwei bis drei Tagen zu einem Adhäsionsverlust vieler Zellen an den Cytodexkugeln. Ein Großteil dieser abgelösten Zellen bildete erneut Neurosphären-ähnliche Aggregate aus. Nur ein vergleichsweise kleiner Anteil der Zellen verblieb über den Beobachtungszeitraum auf der Matrix.

Unter dem Stemcellmedium fanden sich unter allen drei Zelllinien morphologisch differenzierte Neurone. Während der Anteil unter der S13 Zelllinie im Vergleich zum Kontrollansatz mit 4 % gleich groß war, war der prozentuale Anteil unter der S16 Zelllinie ( $M = .06$ ,  $SF = .004$ ,  $W\text{-Differenz} = .03$ ,  $p < .001$ ) doppelt und unter der S19 Zelllinie ( $M = .16$ ,  $SF = .016$ ,  $W\text{-Differenz} = .14$ ,  $p < .001$ ) achtmal so groß im Vergleich zum Kontrollansatz (siehe Abb. 17). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten.

Innerhalb der Cytodex-Zell-Aggregate fanden sich zahlreiche Astrozyten. Dabei zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied in der Anzahl GFAP<sup>+</sup> Zellen unter allen drei Zelllinien gegenüber den Neurosphären. Der prozentuale Anteil der S13 Zelllinie ( $M = .06$ ,  $SF = .006$ ,  $W\text{-Differenz} = .04$ ,  $p < .001$ ) war dreimal und unter der S19 Zelllinie ( $M = .17$ ,  $SF = .013$ ,  $W\text{-Differenz} = .15$ ,  $p < .001$ ) mit 17 % mehr als achtmal so groß im Vergleich zum Kontrollansatz.

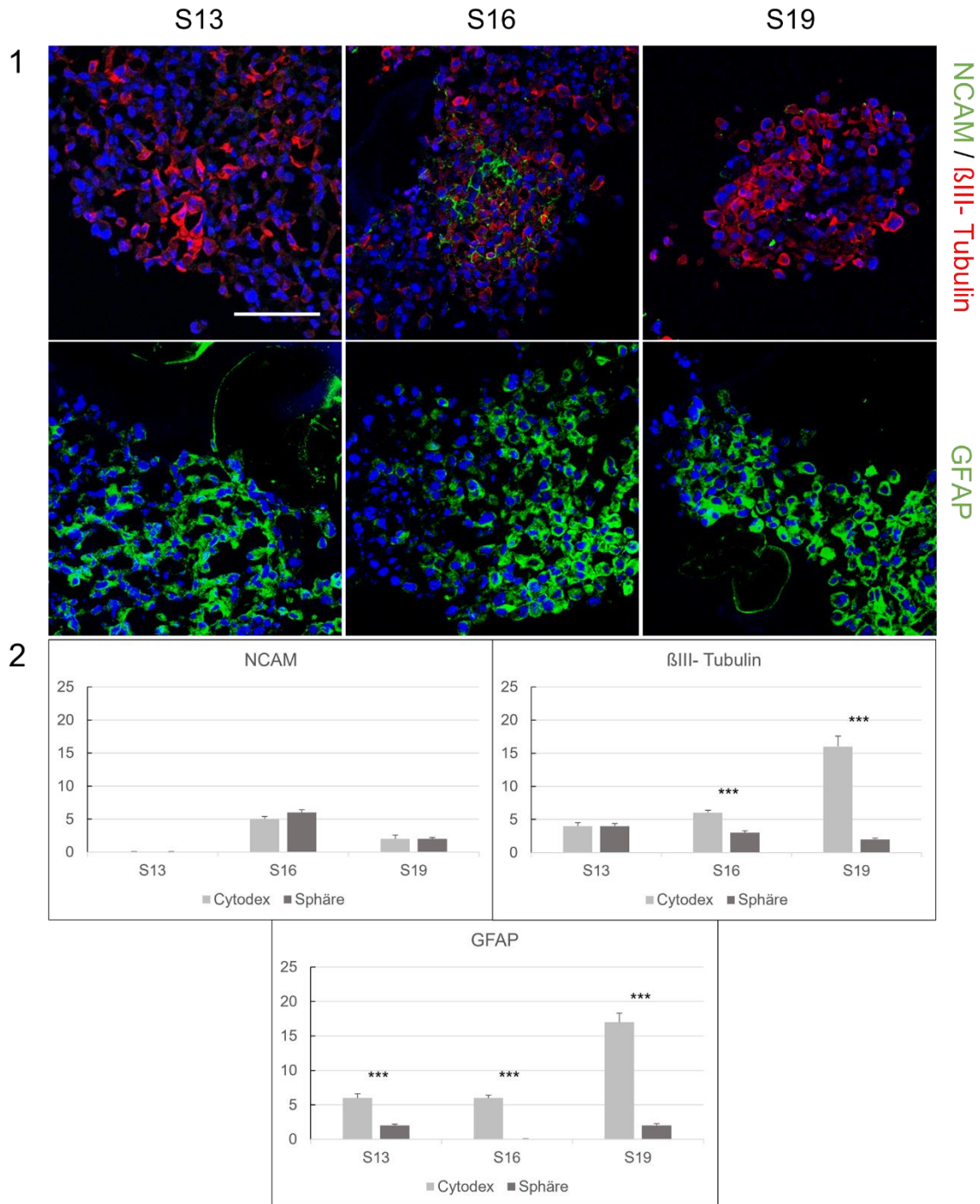


Abb. 17: Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Stemcellmedium:

Darstellung der Ergebnisse der Cytodex-Zell-Suspension unter Verwendung von Stemcellmedium, 1: Immunfluoreszenzbilder der Expression von NCAM (grün), βIII-Tubulin (rot) in der oberen Reihe und GFAP (grün) sowie DAPI (blau) in der unteren Reihe, der drei Zelllinien mit Cytodex, 2: Diagramme zur Expression von NCAM, βIII-Tubulin und GFAP der drei Zelllinien mit dem Vergleich von Cytodex und Neurosphärenansatz; Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in %, Fehlerindikator: Standardfehler, Signifikanzen: \*  $p < .05$ . \*\*  $p < .01$ . \*\*\*  $p < .001$ , Maßstabbalken = 100  $\mu\text{m}$

### 3.3.4 Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit vom Entwicklungstag

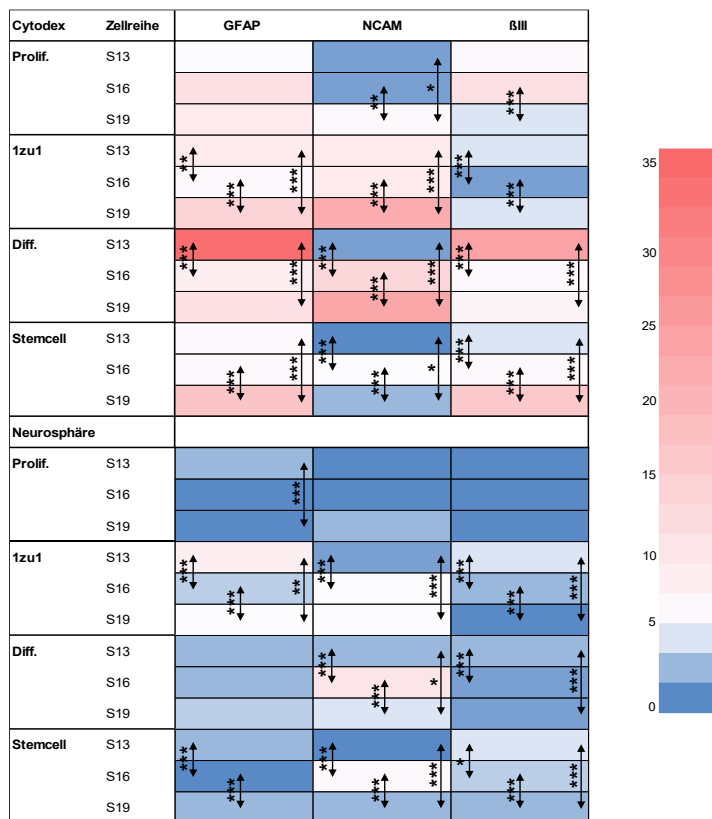


Abb. 18: Heatmap:

Darstellung der Expression von GFAP, NCAM und βIII-Tubulin jeweils mit dem Vergleich der drei Zelllinien innerhalb eines Kulturmediums (links) im Cytodex (oben) und Neurosphärenversuch (unten); Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels in % farbcodiert als Heatmap, rechts befindet sich die Farbskala. Die Pfeile zeigen zwischen welchen beiden Zelllinien ein Vergleich aufgestellt wird. Signifikanzen: \*  $p < .05$ . \*\*  $p < .01$ . \*\*\*  $p < .001$

Neben dem Vergleich der neuronalen und glialen Differenzierung der NPCs in Abhängigkeit des verwendeten Mediums als Cytodex und Neurosphärenversuch wurde das Differenzierungsverhalten der verwendeten Zellen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag auf ihre möglichen stadienspezifischen Unterschiede untersucht als Hinweis auf eine intrinsische Prägung der jeweiligen Zelllinie. Dieser Vergleich der hier verwendeten Zelllinien, die an unterschiedlichen Entwicklungstagen entnommen wurden, zeigte neben Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede im Hinblick auf das Differenzierungsverhalten der striatalen NPCs sowohl im Neurosphärenversuch als auch im Cytodexversuch.

Für alle Zelllinien wird aus der Heatmap ersichtlich, dass Differenzierungsvorgänge präferenziell im Cytodexversuch ablaufen. Wie durch die einzelnen Vergleiche zwischen den Zelllinien innerhalb der Heatmap gezeigt, bestehen signifikante Unterschiede im Differenzierungsverhalten sowohl im Neurosphären- als auch Cytodexversuch. Viele hoch signifikante Unterschiede innerhalb der drei Zelllinien finden sich unter den FCS-haltigen Medien und hier führend unter dem Differenzierungsmedium. Deutlich wird hier vor allem die

sich reduzierende Zahl an  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen mit steigenden Zellalter und parallel ein Abfall innerhalb der Neuroblastenzahl. Ein Anstieg innerhalb der Anzahl GFAP<sup>+</sup> Astrozyten mit steigenden Zellinienalter findet sich unter dem Stemcellmedium.

### 3.4 Differenzierungsverhalten in zweidimensionaler Kultur

Neben den dreidimensionalen Versuchen zum Differenzierungsverhalten von Neurosphären und der Ansätze unter Verwendung von Cytodex wurde in explorativen Ansätzen unter Verwendung zweidimensionaler Kulturen das Verhalten unter Differenzierungsbedingungen ergänzend beobachtet. Dieser Ansatz erlaubt in Ergänzung der entsprechende Auswertung dreidimensionaler Kulturen einen methodisch einfacheren Weg zur Abschätzung des Differenzierungsverhaltens hinsichtlich Fortsatzbildung bzw. -länge in zweidimensionaler Anordnung.

Dazu wurden über eine Zeitspanne von sieben Tagen die Stammzellen in adhäsiven Kulturschalen inkubiert. Nach immunhistochemischer Färbung präsentierten sich für alle verwendeten Zelllinien in Übereinstimmung mit der embryonalen Herkunft  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone mit morphologisch ausgeprägtem Differenzierungsgrad als multipolare Neurone mit zum Teil langen Zellausläufern, die sich häufig in Zellnestern organisierten.

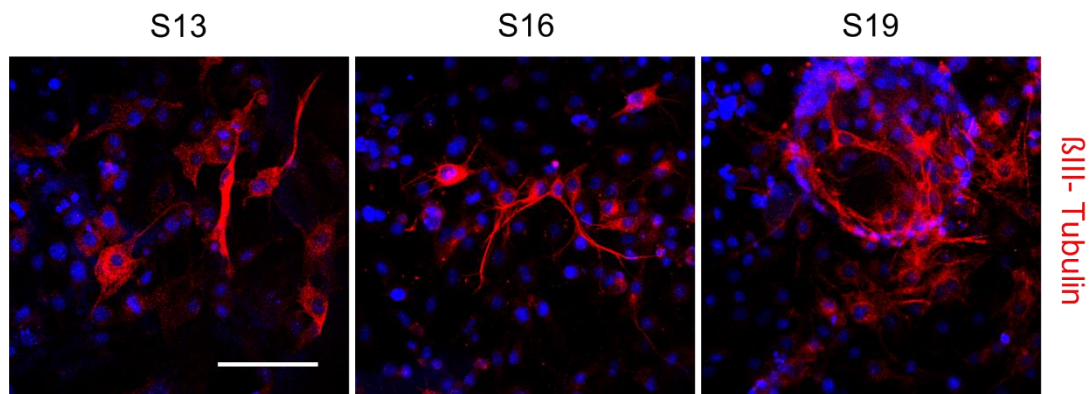


Abb. 19: Zweidimensionale Adhäsionskultur der drei Zelllinien:

Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenzbildern mit der Expression von  $\beta$ III-Tubulin (rot), DAPI (blau) der drei Zelllinien unter Differenzierungsmedium, Maßstabbalken = 50  $\mu$ m

#### IV. Diskussion

---

Als Beitrag zu der Frage nach der räumlich-zeitlichen Spezifizierung von neuronalen Stammzellen wurden in der hier vorgelegten Arbeit in einem *in vitro* Ansatz Zelllinien aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Striatogenese hinsichtlich ihrer neuronalen und makrogliastrozytären Differenzierungspotenziale untersucht. Als mögliche Faktoren einer differentiellen Interaktion mit den hier verwendeten neuronalen Vorläuferzellen der Ratte wurden verschiedene Nährmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung ihrer löslichen Komponenten verwendet. Der experimentelle Ansatz wurde erweitert durch deren Verwendung in Kombination mit einem kollagenhaltigen zelladhäsiven Substrat als Simulation einer Extrazellulärmatrix.

Im folgenden Abschnitt sollen vor dem Hintergrund der gewonnenen Erkenntnisse die anfangs aufgestellten Hypothesen diskutiert werden:

1. Die verschiedenen Medien unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.
2. Die EZM beeinflusst das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.
3. Die löslichen Faktoren in Kombination mit der EZM zeigen einen komplexen, unterschiedlich großen Einfluss auf die Neuro- und Gliogenese der NPCs.
4. Es bestehen alters- bzw. stadienspezifische Unterschiede hinsichtlich des neuronalen und makrogliastrozytären Differenzierungspotenzials der NPC in komplexer Abhängigkeit von löslichen Faktoren und EZM.

Die Versuchsergebnisse zeigen die Neurogenese verschiedener Populationen von neuronalen Vorläuferzellen *in vitro* als multifaktorielles Ereignis das neben intrinsischen Eigenschaften der Zellen entscheidend durch den experimentellen Aufbau insbesondere durch die Kulturbedingungen beeinflusst wurde. Im Fokus der Diskussion steht zu Beginn die Analyse der Ergebnisse zu den unterschiedlichen Effekten der löslichen Faktoren auf das Differenzierungspotential der NPC, bevor in einem zweiten Schritt der Einfluss der EZM bzw. die Kombination löslicher Faktoren mit der EZM hinsichtlich einer möglichen (astrozytären oder neuronalen) Linienspezifität auf diese diskutiert wird. Dabei werden stets die stadien- bzw. altersspezifischen Unterschiede im Hinblick auf eine intrinsische Prägung neuronaler Stammzellen der Entwicklungstage E13, E16 und E19 unter der Verwendung der unterschiedlichen Kulturbedingungen beleuchtet.

#### 4.1 Einfluss unterschiedlicher löslicher Faktoren auf das Differenzierungspotenzial

---

Die drei verwendeten Zelllinien stammen von unterschiedlichen, kritischen Zeitpunkten der neuralen Entwicklung des Striatums. Während sich um den E13 bei der Ratte zunächst hauptsächlich Vorläuferzellen der striosomalen Projektionsneurone finden lassen, können zu den späteren Zeitpunkten E16 und E19 in verschiedener Menge Vorläuferzellen der Matrixneurone sowie Gliazellen beobachtet werden [13, 108]. Diese *in vivo* beobachteten stadien- bzw. altersspezifischen Unterschiede sollen im Folgenden unter dem Einfluss der verschiedenen löslichen Faktoren mit den *in vitro* Beobachtungen dieser Experimente verglichen werden.

Unter Proliferationsmedium kultivierte Neurosphären wiesen eine typische radiärsymmetrische Morphologie auf und waren am Ende der 14-tägigen Kultur im Schnitt um die 500-600  $\mu\text{m}$  groß. Gemessen an der Sphärengröße fand sich mit zunehmendem Alter der Zelllinie (von S13 bis S19) eine abnehmende Proliferationsrate. Diese Beobachtungen zeigen damit eine Übereinstimmung mit Befunden zur striatalen Entwicklung bei der Maus und bei der Ratte. Für diese Spezies konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer sequenziellen Entstehung der verschiedenen MSNs aus unterschiedlichen Subpopulationen des Ganglienhügels kommt und NPCs späterer Zeitpunkte geringere Proliferationsraten aufweisen, so z.B. im Kontext der Entwicklung peristriomaler MSNs [13, 21].

Unter Verwendung des Proliferationsmediums kam es mit zunehmender Kulturdauer zur Lösung einzelner Zellen aus dem Zellverband, welches sich durch freie Zellen in Sphärennähe zeigte. In vergleichbaren Sphärenexperimenten finden sich in der Literatur variierende Angaben zur Kulturdauer (3-21 Tage) jedoch ähnliche Sphärengrößen im Bereich von 170  $\mu\text{m}$  bis zu 700  $\mu\text{m}$  wieder [109, 110]. Als Ursache der gelösten Zellen im Randbereich scheint die Sphärengröße als wenig wahrscheinlicher Parameter, da als Ausdruck einer problematischen Diffusionsstrecke vermehrt ein zentraler Zelluntergang beobachtet werden müsste [75]. Da es sich bei der Bildung von Neurosphären um eine typische NPC-Eigenschaft handelt [107], könnte es sich bei den gelösten Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um bereits initial differenzierte neurale Zellen handeln, die sich aufgrund veränderter Oberflächeneigenschaften aus dem kompakten Zellverband der Sphären gelöst haben. Diese Beobachtung einer spontan ablaufenden Differenzierung der NPC auch unter Proliferationsbedingungen sollte in zukünftigen Experimenten zur vertiefenden Betrachtung einer möglichen linienspezifischen glialen bzw. neuronalen Differenzierung weiter untersucht werden. Offen bleibt auch, ob es sich trotz vorsichtiger Handhabung, um ein apparativ bedingtes Artefakt handeln könnte, das durch mechanische Kräfte während des Mediumwechsels induziert wurde.

---

Innerhalb des Zellverbandes der Neurosphäre fanden sich unter diesen Kulturbedingungen nahezu keine neuronal oder glial ausdifferenzierten Zellpopulationen. Organisiert als kompakte Gruppe oder Nester konnten jedoch vereinzelt Neuroblasten innerhalb der Sphären der S19 Zelllinie identifiziert werden. Diese Beobachtungen entsprechen den Beobachtungen zur regionalen Spezifizierung der neuronalen Vorläuferzellen in Neurosphären mit kompakt organisierten, innerhalb der Neurosphäre lokalisierten Zentren neuronal bzw. glial differenzierter Zellen [107]. Diese Ergebnisse unterstützen die oben genannte Vermutung, dass sich trotz Verwendung eines Proliferationsmediums mit Verwendung von WF einzelne NPCs der Neurosphäre aufgrund lokaler Faktoren in Richtung von Neuro- bzw. Glioblasten entwickeln können. Dabei kann es sich innerhalb der Sphäre um primär zellulär vermittelte Phänomene handeln, bei denen spontan differenzierte NPC als „Kristallisationspunkt“ die umliegenden Zellen hinsichtlich ihrer Differenzierung in die gleiche Richtung beeinflussen und somit lokal die Konzentration von Neuroblasten erhöhen [66]. Ob und in welchem Umfang eine mögliche lokale Beeinflussung über parakrine Signale oder direkt über Nexus bzw. gap junctions vermittelt wird, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen [69].

In der geringen Anzahl ausdifferenzierter Nerven und Gliazellen unter den geschilderten Proliferationsbedingungen zeigt sich die Neuro- bzw. Gliogenese als Ergebnis eines multifaktoriellen Wechselspiels intrinsischer und extrinsischer Faktoren. Proliferierende NPCs benötigen externe Stimuli, damit sie sich aus ihrer mitotisch aktiven Form über Tochterzellen zu postmitotischen Neuronen oder Gliazellen entwickeln können [32, 47, 54, 111]. Die im Proliferationsmedium vorkommenden Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 sorgen als positives Selektionsmerkmal quantitativ für einen proliferierenden Zustand und erlauben damit nur eine geringere Differenzierung. Damit entspricht das Verhalten der Zellen in Kulturbedingungen der Situation *in vivo*. Besonders FGF-2 sorgt *in vitro* für das Verbleiben der NPCs in ihrem Stammzellzustand und findet sich daher auch in der Stammzellnische wieder [59].

Während unter der Nutzung von Proliferationsmedium zusammenfassend nur eine geringe Differenzierung zu sehen ist, sollten Differenzierungsvorgänge der hier verwendeten NPCs verstärkt unter Kulturbedingungen mit verringerter Konzentration oder dem Fehlen von EGF/FGF-2 in den Kulturmedien zu erwarten sein (Negativselektion der NPC). Zudem kann die Neurogenese *in vitro* durch den Einsatz neurogener Faktoren erhöht werden (positive Selektion). Ein solcher Ansatz ergibt sich bei der Verwendung von FCS. Es handelt sich dabei um einen weit verbreiteten Medienzusatz bei *in vitro* Untersuchungen von neuronalen Differenzierungs- und Reifungsvorgängen. Dabei ist FCS durch seinen hohen Gehalt an neuroinduktiven WF sowie weiteren neuroprotektiven Stoffen charakterisiert [112].

---

Unter den in dieser Arbeit genutzten FCS-haltigen Medien finden sich nicht nur in allen drei Zelllinien NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten wieder, vielmehr können auch morphologisch differenzierte  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone und einige GFAP<sup>+</sup> Gliazellen beobachtet werden. Bedingt durch den dreidimensionalen experimentellen Ansatz zeigen diese Neurone in den hier untersuchten Schnittpräparaten der Sphären überwiegend nicht das vollständige Bild ihrer Differenzierung (mit nur darzustellenden Soma-nahen Zellausläufer) und erlauben daher weniger morphologische Beurteilung als konventionelle Adhäsionskulturen unter Verwendung von Kulturschalen.

Als entscheidender Vorteil der hier durchgeführten Untersuchung der Differenzierungsvorgänge von NPCs in dreidimensionalen Sphären erweist sich die Betrachtung räumlich-zeitlicher Abläufe. In diesem Zusammenhang ist das präferentielle Vorkommen von  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen in unmittelbarer Nähe zu Neuroblasten zu erwähnen. Während die NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten innerhalb des Zellverbandes lokal als „Zellnester“ akkumulieren, finden sich die differenzierten Nervenzellen überwiegend an dessen Randbereichen wieder. Diese Beobachtung deckt sich mit der bereits diskutierten Vermutung des Vorkommens von lokalen Signalzentren, in denen sich die jeweilige Konzentration verschiedener proneurogener Faktoren durch gegenseitige (zellulär oder humoral vermittelte) Beeinflussung von NPCs erhöhen könnte, in dessen Folge sich vermehrt Tochterzellen als Neuroblasten entwickeln und damit in ihrer Nachbarschaft die Zahl von morphologisch differenzierten Neuronen ansteigen lässt [66, 69].

Enthalten im 1zu1-Medium findet sich neben den Faktoren des Proliferationsmediums (EGF, FGF-2) auch das FCS wieder. Dieses sollte durch enthaltenen neuroinduktiven Stoffe zu einer vermehrten Differenzierung führen [112]. Unter der Annahme eines linearen konzentrationsabhängigen Effektes sollte eine Konzentrationserhöhung des FCS durch Nutzung des Differenzierungsmediums auch in einer größeren Anzahl differenzierte Zellen resultieren. Ein solcher Effekt lässt sich jedoch nicht beobachten, wobei die Ursache dafür unklar bleibt. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte im Fehlen weiterer löslicher und mechanischer Komponenten der Stammzellnische liegen.

Die Bedeutung der in ihrer genauen Zusammensetzung unbekanntem Faktoren des FCS zeigt sich auch unter Verwendung des rein synthetischen Stemcellmediums. Es finden sich mehr Nervenzellen unter der S16 sowie S19 Zelllinie als unter allen anderen Medien, jedoch ohne den Nachweis entsprechender Mengen an Neuroblasten. Atypisch im Vergleich zu den beiden FCS-haltigen Medien liegen die Neurone jedoch vermehrt im Randbereich und nicht wie in Kultivierungsansätzen unter Verwendung serumhaltiger Medien in der Sphärenmitte [107]. Begleitend kommt es wie auch unter dem Proliferationsmedium zu einem Adhäsionsverlust einiger Zellen im Randbereich der Sphären. Ungeklärt bleibt, ob die oberflächennahe Lage der

---

differenzierten Nervenzellen durch vorangegangene Ablösung ehemals randständiger Zellen begründet sein könnte, wodurch vormals zentralwärts gelegene Schichten mehr nach außen gelangen würden. Allerdings zeigen die Ergebnisse die ausgeprägte neurodifferenzierungsfördernde Wirkung des Mediums in Kombination mit einer geringeren Zahl immunzytochemisch nachweisbarer NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich unter diesen Kulturbedingungen, die NPCs unter verkürzter Übergangszeit als Neuroblasten vermehrt in Neurone differenziert haben.

Das chemisch definierte Medium bietet sich damit aufgrund der definierten, d.h. reproduzierbaren Zusammensetzung an proneurogenen Stoffen als Medium der Wahl bei Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung *in vitro* an. Variation der Zelldifferenzierungen durch chargenspezifische Unterschiede der im FCS enthaltenen Stoffen können so vermieden werden[112].

Zusammenfassend kann die erste Hypothese: „Die verschiedenen Medien unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.“ nicht verworfen werden, da sich diesbezüglich große statistisch hochsignifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Medium feststellen lassen.

Zudem zeigen diese Beobachtungen, dass zwar alle drei Zelllinien das Differenzierungspotential besitzen, Neuroblasten und Nervenzellen sowie Gliazellen hervorzubringen, unter den gleichen Kulturbedingungen jedoch teilweise stadien- bzw. altersspezifische Unterschiede im Hinblick auf Menge und Zusammensetzung differenzierter Zellen bestehen.

Vor diesem Hintergrund ist von intrinsischen Unterschieden der Zelllinien auszugehen. Dabei ist anzunehmen, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien späterer embryonaler Herkunft durch eine bereits *in vivo*, also vor Isolierung eingesetzte, ortstypische Spezifizierung in ihrer Potenz von denen früherer Herkunft unterscheiden, sie also nicht mehr in der Lage sind, differenzierte Zellen in vergleichbarem Ausmaß hervorzubringen wie die NPCs jüngeren Embryonalalters (S13 Zelllinie). Damit entsprechen diese Beobachtungen vergleichbaren Untersuchungen unter Verwendung von NPCs der Maus. Innerhalb verschiedener aufeinanderfolgender Phasen der Striatogenese entstehenden aus den NEP des LGE unterschiedlichen Subpopulationen von NPCs, aus denen zeitlich gestaffelt die MSNs des Striosomen- und Matrixkompartiments hervorgehen [39, 113]. Dabei werden in diesen Untersuchungen vor allem zwei NPC-Populationen unterschieden, die anhand ihrer Lokalisation in Bezug auf den primitiven Ventrikel in apikale (aIPs) und basale Intermediäre Vorläuferzellen (bIPs) unterschieden werden. Sequenziell entstehen zunächst aus aIPs die striosomalen MSNs und zu einer späteren Phase der striatalen Entwicklung aus bIPs die MSNs des Matrixkompartiments [21, 43, 114].

Obwohl unter einem weniger komplexen Einfluss durch lösliche und zelluläre Stoffe als in der *in vivo* Stammzellnische stehend, zeigen die hier untersuchten Zellen ein jeweiliges Verhalten, dass mit der Annahme stadienspezifischer Charakteristika korreliert. Ohne dass das komplexe multifaktorielle Wechselspiel aus intrinsischen und extrinsischen Faktoren *in vivo* in gleichen Umfang bei den hier durchgeführten *in vitro* Ansätzen abgebildet wird, dienen die hier vorgestellten Ergebnisse als weiterer Schritt zum vertieften Verständnis intrinsischer Mechanismen des Differenzierungsverhaltens striataler NPCs verschiedenen Entwicklungsalters.

## 4.2 Einfluss der Extrazellulärmatrix auf das Differenzierungsverhalten der NPCs

---

Nachdem im vorherigen Abschnitt der Einfluss löslicher Faktoren auf das Differenzierungsverhalten der NPCs diskutiert wurde, wird im folgenden Teil dieser Ansatz durch zusätzliche Verwendung eines dreidimensionalen, kollagenhaltigen Trägermaterials (Cytodex) erweitert. Hintergrund eines solchen Ansatzes stellen Versuche zur Etablierung eines artifiziellen Ersatzes einer Stammzellnische dar.

*In vivo* ist diese innerhalb der VZ und SVZ durch das Vorkommen einer komplexen EZM [115–118] in Kombination mit diversen löslichen Faktoren charakterisiert, die Neuro- und Gliogenese regulieren [119, 120]. Neben der Bedeutung der EZM für die Effekte löslicher Faktoren durch Aufbau von Gradienten [121], Präsentation sowie Korezeptorfunktionen spielt ebenfalls die mechanische Interaktion [68, 122] mit Stamm- und Tochterzellen eine Rolle hinsichtlich Zellzyklus und Differenzierungsverhalten [51, 53, 54, 117].

Die hier durchgeführten Versuche bestätigen die Bedeutung des Kollagens als Bestandteil der EZM [68] für das Verhalten der verwendeten NPCs und ihrer Tochterzellen hinsichtlich ihrer spezifischen Wirkung auf Adhäsion und Differenzierungsverhalten [75].

Bevor im folgenden Abschnitt auf die genaueren Ergebnisse der Experimente unter Verwendung von Cytodex eingegangen und diese im Kontext von Befunden aus der Literatur betrachtet werden sollen, werden zunächst die charakteristischen kardinalen Unterschiede zu den Parallelansätzen ohne Matrixkomponenten vorgestellt. Unter Verwendung von Cytodex zeigte sich für die überwiegende Mehrheit der verwendeten Kulturmedien bzw. Zelllinien prozentual deutlich mehr differenzierte Zellen als im matrixfreien Parallelansatz. Dabei war insbesondere die Zahl an GFAP<sup>+</sup> Gliazellen unter jedem Kulturmedium unabhängig von der Zelllinie größer als im entsprechenden parallelen Neurosphärenversuch. Mit einzelnen Ausnahmen war dies auch für die NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten und  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone der Fall. Im Zusammenhang mit der Vergleichbarkeit dieser Vorgänge der Neurogenese mit der *in vivo* ablaufenden Striatogenese bestätigen diese Ergebnisse die Validität der hier erhobenen Befunde einer intrinsischen Prägung der NPCs verschiedenen Entwicklungsalters.

Geordnet nach den genutzten Medien (Proliferationsmedium, FCS-haltige Medien mit und ohne WF [1zu1-/Differenzierungsmedium], Stemcellmedium) sollen in den anschließenden Abschnitten systematisch die Unterschiede zum matrixfreien Parallelansatz sowie deren Diskussion vor dem Hintergrund bereits gewonnener Erkenntnisse mit der Literatur diskutiert werden. Dabei wird jeweils zunächst die neuronale und in einem zweiten Schritt die gliale Differenzierung diskutiert, bevor zusammenfassend eine Aussage zu stadienspezifischen Unterschieden erfolgt.

---

Bereits unter Proliferationsbedingungen zeigte sich im Vergleich mit den Ergebnissen der matrixfreien Kontrollversuche ein deutliches Differenzierungspotenzial. Mit einem Anteil von 4-11 % an  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen und 5-11 % an GFAP<sup>+</sup> Gliazellen an der Gesamtpopulation konnten unter der Cytodexkultur prozentual deutlich mehr differenzierte Neurone und Gliazellen als im parallelen Neurosphärenversuch beobachtet werden. Da es wie bereits zuvor geschildert mit fortschreitender Kulturdauer zum Kontaktverlust der Zellen mit der Matrixoberfläche kam und gegen Ende der 14-tägigen Kultur nur noch eine geringe Anzahl an Zellen direkten Kontakt zum Cytodex besaßen, war der Matrixeffekt dabei auf ein kürzere Zeitdauer als die Gesamtkulturzeit beschränkt. Der Kontaktverlust der Zellen unter Proliferationsbedingungen beschränkte sich dabei nicht nur auf die differenzierten, sondern auch die undifferenzierten Zellen. Die noch adhäsiven Zellen waren jedoch zu weit überwiegenden Teilen differenzierte Zellen. Unter Einbeziehung dieser Untersuchungen lassen die hier erhobenen *in vitro* Beobachtungen den Schluss zu, dass bereits der passagere Kontakt von NPCs zu Bestandteilen der EZM ausreichen kann, um ihre vermehrte Differenzierung zu induzieren.

Das wirft die Frage auf, wie die Interaktion der NPCs in den vorliegenden Untersuchungen zum Cytodex erfolgt ist. Aus den *in vivo* Beobachtungen zu Untersuchungen der SVZ zeigt sich, dass vermittelt über EZM-Bestandteile wie HSPGs [123] und Perlecan [124] die Effekte löslicher Faktoren [121] verstärkt werden können. Dies kann wie im Beispiel von FGF-2 darüber vermittelt werden, dass der FGF-2-Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert wird und/oder darüber, dass über Adapterproteine vermittelte Korezeptorfunktionen wahrgenommen werden [83, 84, 115]. FGF-2 sorgt quantitativ für einen proliferierenden Stammzellzustand [59]. Allerdings zeigte sich mit Blick auf die Verwendung von Kollagen und FGF-2 in den hier vorgestellten Untersuchungen keine Verstärkung der FGF-2 vermittelten Wirkung im Sinne der Konservierung des proliferierenden Stammzellzustandes, da es vermehrt zu Differenzierungsvorgängen kam. Vergleichend mit Befunden aus der aktuellen Literatur kann FGF-2 allerdings auch alleine einen neuroinduktiven Effekt ausüben und Neuroblasten zur morphologischen Differenzierung anregen [125, 126]. Mit Rückblick auf den parallelen Neurosphärenversuch muss dieser Effekt bei den hier verwendeten NPCs jedoch verneint werden, sodass es wenig wahrscheinlich erscheint, dass die vermehrte Differenzierung allein durch FGF-2 induziert wurde. Denkbar wäre jedoch, dass der erhöhte Anteil differenzierter Zellen ein Effekt des Cytodex und somit des Kollagens bzw. des Kollagens in Kombination mit den enthaltenden Wachstumsfaktoren EGF/FGF-2 ist. Als Teil der geformten Grundsubstanz der EZM interagiert Kollagen *in vivo* teils indirekt über Anteile der amorphen Grundsubstanz wie Fibronectine und Laminine [115] als auch direkt in Integrin-vermittelter Weise mit den neuralen Stammzellen [93, 127]. Prinzipiell bliebe noch die Möglichkeit, dass es über die Induktion via löslicher Stoffe wie z.B. des FGF-2 zu

---

intrazellulären Veränderungen kommt, die eine Beeinflussung der Zelle durch weitere äußere Stimuli empfänglicher macht. So könnte beispielsweise über die Induktion von bestimmten Enzymen [125], gefolgt von Konformationsänderungen von Rezeptoren eine Interaktion mit fibrillären Bestandteilen der EZM z.B. über Integrin-Kollagen-Interaktionen begünstigt werden [76]. Jedoch findet sich vergleichend mit Angaben aus der Literatur kein Anhalt auf eine direkte Interaktion von Kollagen und FGF-2.

Fasst man in diesem Kontext die erhobenen Ergebnisse und Befunde der Literatur zusammen, ist der Unterschied im höheren Anteil differenzierter Zellen in den durchgeführten Versuchen mit Proliferationsmedium am ehesten durch den Versuchsaufbau bedingt. In den ersten sieben Tagen der Kultur bestand durch Nutzung des 1zu1-Mediums eine Adhärenz und somit ein Kontakt zur Matrix bzw. dem Kollagen. Somit scheint dies ein Cytodex-vermittelter Effekt zu sein, denn vergleichend mit dem matrixfreien Parallelansatz zeigt sich unter den initialen sieben Tagen der Kultur kaum Differenzierung. Nach anfänglichem Kontakt zum Cytodex löste sich in den folgenden Tagen der Kultur der Großteil der Zellen wieder von der Matrixoberfläche, sodass die Zellen hauptsächlich mit dem Proliferationsmedium, wenig proneurogenen Faktoren und nicht bzw. kaum mit der EZM in Kontakt standen. Die im 1zu1-Medium enthaltene Stoffe ermöglichten eine Interaktion der Zellen mit der EZM und deren Adhäsion, wobei deren dauerhafte Anwesenheit notwendig war, um den entsprechenden Kontakt zur Matrix aufrecht zu erhalten. Interessant wäre eine zukünftige Analyse, in der man die Menge differenzierter Zellen nach siebentägiger und 14-tägiger Kultur immunzytochemisch untersucht. Dabei könnte analysiert werden, wie viele differenzierte Zellen sich nach diesen ersten sieben Tagen in der Kultur zeigen und in einem zweiten Schritt, ob in den folgenden sieben Tagen überhaupt noch weitere dazukommen, um den Effekt des Proliferationsmediums noch besser von dem des 1zu1-Mediums abzugrenzen.

Hinsichtlich der Fragestellung nach altersabhängigen Unterschieden intrinsischer Eigenschaften zeigten sich bei Verwendung des Proliferationsmediums in Kombination mit Cytodex stadienspezifische Unterschiede insofern, als dass der relative Anteil an neuronaler Differenzierung gegenüber der makroglial-astrozytären Differenzierung mit zunehmenden Embryonalalter der NPCs abnahm. Damit entspricht diese stadienspezifische Veränderung des Differenzierungsverhaltens den *in vivo* Beobachtungen, dass die Gliogenese bei der Entwicklung des Striatums der Neurogenese „hinterherläuft“ [13, 128].

Zusammenfassend kann unter der Berücksichtigung dieser und der unter 4.1. beschriebenen stadienspezifischen Unterschiede auch die vierte Arbeitshypothese „Es bestehen alters- bzw. stadienspezifische Unterschiede hinsichtlich des neuronalen und makroglialen Differenzierungspotenzials der NPC in komplexer Abhängigkeit von löslichen Faktoren und EZM.“ nicht verworfen werden. Dementsprechend ist unter Berücksichtigung signifikanter

---

Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien (siehe Abb. 18) von intrinsischen, d.h. von ihrem Entwicklungsalter bedingten Unterschieden im Differenzierungsverhalten der verwendeten NPCs auszugehen.

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der FCS-haltigen Medien zunächst mit WF (also 1zu1-Medium) und folgend ohne WF (Differenzierungsmedium) vergleichend mit Angaben aus aktueller Literatur diskutiert.

Anders als unter dem Proliferationsmedium blieben die Zellen unter Verwendung von 1zu1-Medium in hoher Zahl in Kontakt mit der Matrixoberfläche. Gleichzeitig zeigten unter diesem Medium die Zellen bei noch vorhandenen Wachstumsfaktoren weiter Zellproliferation. Zwar blieben die Cytodexkugeln selbst bewachsen, ein Großteil der Zellen wies jedoch keinen direkten Kontakt mehr zur Matrixoberfläche auf, vielmehr entstanden Cytodex-Zell-Aggregate. Hinsichtlich der Adhäsion bestätigen die Versuche somit die Bedeutung des FCS für die Ausbildung der Adhäsion proliferierender Zellen via Zell-Matrix-Kontakte, wie bereits ältere Untersuchungen gezeigt haben [129, 130]. Der zu beobachtende Anteil an Neuroblasten wuchs sowohl im Vergleich zum Proliferationsmedium als auch zum matrixfreien Parallelansatz, während der relative Anteil  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neurone im Vergleich zur Kultur unter Proliferationsmedium weitestgehend identisch blieb. Die Neurone, die sich unter diesen Bedingungen fanden, waren meist im direkten Kontakt oder in unmittelbarer Nähe zum Cytodex lokalisiert.

Im Vergleich zum Neurosphärenversuch zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede im relativen Anteil differenzierter Zellen. Aufgrund der Besonderheit der präferentiellen Verteilung von NPCs in sekundären Sphären und ihren differenzierten Tochterzellen in Kontakt zur Matrix wurde an dieser Stelle unterschieden, ob die Zellen sich im direkten Kontakt zur Matrixoberfläche oder sich lediglich in Nachbarschaft (bzw. nicht im direkten Kontakt) dazu befanden. Sofern sich unter diesem Kulturmedium differenzierte Zellen zeigten, so waren diese an der Matrix lokalisiert. Fast die Hälfte der S19 Zellen mit direktem Kontakt waren NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten, ebenso wie knapp 43% der S13 Zellen mit direktem Kontakt Gliazellen darstellten. Differenzierte Zellen in Nachbarschaft (bzw. ohne direkten Kontakt) zum Cytodex profitierten am ehesten davon, dass sich Zellen mit direktem Kontakt bereits differenziert hatten. Diese könnte wie anfangs bereits geschildert einen „Kristallisationspunkt“ darstellen [66], von dem aus durch Freisetzung weiterer proneurogener Faktoren durch differenzierte Zellen angrenzende NPCs zur Differenzierung angeregt wurden. Fand sich vergleichend mit dem matrixfreien Parallelansatz einer solcher „Kristallisationspunkt“ dort örtlich zufällig innerhalb der Neurosphäre wieder, so ist durch das Cytodex ein solcher Punkt örtlich definiert. Zusammenfassend fand sich unter der 14-tägigen Kultur mit 1zu1-Medium, d.h. bei einer verlängerten Kontaktzeit der NPCs zum Cytodex bei gleichzeitiger Anwesenheit von

neuroinduktiven Wachstumsfaktoren in Form des FCS im Vergleich zum Proliferationsmedium zunächst nur ein größerer Effekt auf den relativen Anteil an Neuroblasten, nicht jedoch auf den relativen Anteil von Neuronen und Gliazellen. Ob nun die Konzentration von FCS noch nicht ausreichend war oder das Vorhandensein von proliferationsstimulierenden WF zu einem im Vergleich zum Cytodexansatz unter Proliferationsbedingungen geringeren Unterschied im Anteil an Neuronen und Gliazellen geführt hat, könnte zukünftig weiter untersucht werden.

Die stadienspezifischen Unterschiede fanden sich vor allem in einem mit zunehmendem Entwicklungsalter ansteigenden Anteil an Neuroblasten (sowohl unter Betrachtung aller Zellen als auch bei Untersuchung des direkten Kontaktes) wieder. Entsprechend der Vorgänge *in vivo* zeigte sich insbesondere die Gliogenese unter der S19 Zelllinie am stärksten ausgeprägt und bestätigt so die Beobachtung unter Verwendung des Proliferationsmediums [13, 128].

Nachfolgend werden nun die Ergebnisse des FCS-haltigen Differenzierungsmediums diskutiert. Unter Verwendung dieses Mediums in Kombination mit der kollagenhaltigen Matrix zeigte sich als Ausdruck der fehlenden Wachstumsfaktoren eine geringe Proliferationsrate sowie wenige und kleine Cytodex-Zell-Aggregate. Durch die geringere Proliferation und den höheren Grad der Differenzierung waren die Cytodexkugeln teilweise nur durch eine singuläre Zellschicht bedeckt. Die beobachteten Zellen wiesen eine morphologische Differenzierung mit Fortsatzbildung auf, was sich immunzytochemisch in einem verringerten Anteil NCAM<sup>+</sup> Neuroblasten und einem deutlich erhöhten Anteil an  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen sowie GFAP<sup>+</sup> Gliazellen im Vergleich zum 1zu1-Medium zeigte. Unter allen untersuchten Bedingungen und Zelllinien war mit einem Anteil von 24 % unter der S13 Zelllinie der größte Anteil an Neuronen und mit einem Anteil von 35 % auch an Gliazellen zu finden. Generell war der prozentuale Anteil an Neuronen und Gliazellen im Vergleich zum matrixfreien Parallelansatz mindestens viermal höher. Vor allem in den Zelllinien späteren embryonalen Entwicklungsalters waren mehr Gliazellen als im matrixfreien Kontrollversuch zu finden. Lag der Anteil unter der S16 Zelllinie nur doppelt so hoch, war er unter der S19 Zelllinie sogar fast dreimal so groß.

Unter diesem Kulturmedium zeigten sich nahezu keine von der Matrixoberfläche gelösten Zellen. Die teilweise nur durch eine Zellschicht bewachsene Matrixoberfläche konnte ihren Effekt auf die während der gesamten Kulturdauer adhäsiven Zellen durch die lange Kontaktzeit besonders stark ausüben und es zeigte sich ein sehr hoher Differenzierungsgrad. Mit einem relativen Anteil von durchschnittlich 39%  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen auf einer Cytodexkugel fand sich keine andere Kulturbedingung, unter der sich ein vergleichbar hoher Grad an Differenzierung zeigte. Daneben war auch der Anteil von GFAP<sup>+</sup> Gliazellen mit durchschnittlich 63% so groß, dass sich keine andere Kulturbedingung fand, unter der sich ein höherer prozentualer Anteil an Differenzierung zeigte (siehe Abb. 20). Interessant war an dieser Stelle,

dass sich bei fast allen bewachsenen Cytodexkugeln entweder eine Neuronen- oder Gliazelldominanz zeigte. Nur selten fanden sich beide Populationen differenzierter Zellen auf einer Cytodexkugel. Wahrscheinlich beeinflussten differenzierte Zellen einer Zellpopulation ihre Mikroumgebung und schafften so verbesserte homotypische Differenzierungsmöglichkeiten [66]. Als „Kristallisationspunkt“ könnte dies zur Dominanz einer Zellpopulation pro Cytodexkugel geführt bzw. umliegende Zellen zur selben Differenzierung angeregt haben.

Zusammenfassend zeigten sich bedingt durch den Versuchsaufbau nach einer initialen siebentägigen Kultur mit 1zu1-Medium und folgender siebentägiger mit Differenzierungsmedium während der gesamten Kulturdauer adhäsive NPCs. Vergleichend mit dem 1zu1-Medium war die Kontaktzeit zur Matrixoberfläche somit gleich, wenngleich die NPCs unter dem Differenzierungsmedium nicht nur ohne Einfluss proliferationsfördernder WF waren, sondern zusätzlich einer doppelt so hohen FCS-Konzentration ausgesetzt waren. Anders als im Vergleich der beiden FCS-haltigen Medien im matrixfreien Parallelansatz zeigte sich unter Differenzierungsmedium ein konzentrationsabhängiger Effekt des FCS. Dessen Konzentration scheint unter diesen Kulturbedingungen mit einer Verdopplung der Konzentration auf 10 % einen Schwellenwert überschritten zu haben, der in einer deutlich erhöhten Differenzierung resultiert. Die alleinige Präsenz von FCS reicht somit bei allen verwendeten Zelllinien keinesfalls für das Auslösen einer Differenzierung als stereotype Zellantwort aus [67]. An dieser Stelle bieten sich weiterführende Untersuchungen an, in denen die Verringerung oder der Wegfall von Wachstumsfaktoren im Proliferationsmedium als differenzierungshemmende Faktoren analysiert würde. Solche agonistisch- bzw. antagonistischen Effekte in Bezug auf die Differenzierung wurden *in vivo* für einzelne Signalwege innerhalb der Stammzellnische bereits beschrieben, so u.a. für die Shh und Wnt-Signalwege [62, 65, 67].

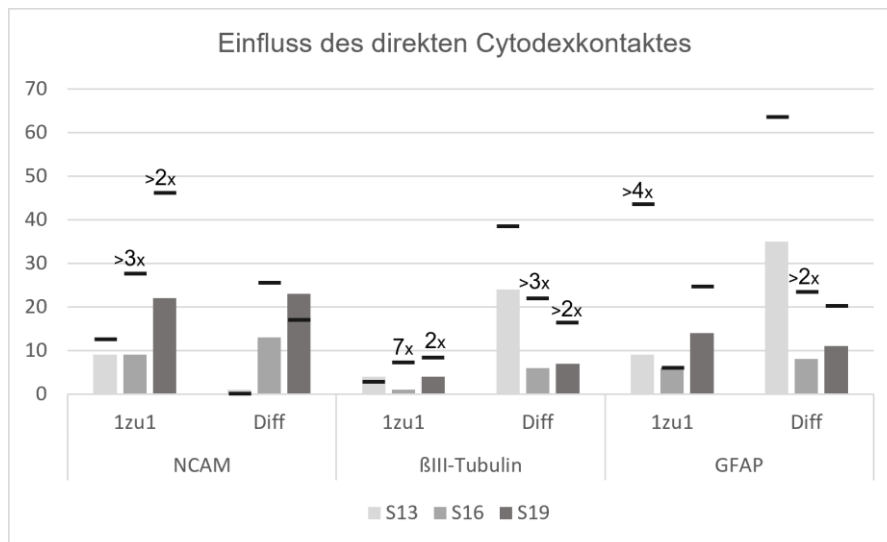


Abb. 20: Einfluss des direkten Cytodexkontaktes:

Vergleich der Ergebnisse der gesamten Expression mit der Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt von NCAM,  $\beta$ III-Tubulin und GFAP der drei Zelllinien, Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels der gesamten Expression in % (in Form der Balkendiagramme), Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels der Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt in % (in Form der Balken), ab einem zweifach höheren Anteil findet sich über dem jeweiligen Vergleich der Faktor, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium

An dieser Stelle kann somit auch die zweite Arbeitshypothese „Die EZM beeinflusst das Differenzierungsverhalten der NPC der Ratte.“ nicht verworfen werden. Das Cytodex führt unter fast allen Bedingungen zu einer vermehrten Differenzierung der NPCs.

Unter Verwendung des Differenzierungsmediums fanden sich erneut stadienspezifische Unterschiede. Zusammen mit dem konzentrationsabhängigen Effekt des FCS und der langen Kontaktzeit zum Cytodex zeigten die NPCs der S13 Zelllinie eine starke Neurogenese (S13  $M = .24$ ), wohingegen die der Zelllinien späterer embryonaler Herkunft (S16  $M = .06$ , S19  $M = .07$ ) deutlich weniger neuronal differenzierte Zellen aufwiesen. Damit stehen diese Beobachtungen im Konsens mit den *in vivo* Beobachtungen, dass zu Beginn der Striatogenese in einem kurzen Zeitfenster eine verstärkte Neurogenese abläuft, bevor diese im weiteren abgelöst wird von der Bildung der Nervenzellen der MSNs der Matrix, die sich über einen längeren Zeitraum erstreckt [21]. Mit zunehmendem Entwicklungsalter zeigte sich umgekehrt eine Abnahme des relativen Anteils an Neuroblasten, was die ausgeprägte Neurogenese in Zelllinien frühen Entwicklungsalter widerspiegelt. Anders als in den o.g. Versuchen unter Verwendung von Wachstumsfaktoren war die Gliogenese unter dem Differenzierungsmedium für die S13 Zelllinie so stark, dass die Zahl astrozytär differenzierter Zellen, die an Neuronen überstieg. Dies unterscheidet sich von der Gliogenese *in vivo* im Rahmen der Striatogenese, da diese vor allem zu späteren, überwiegend postnatalen Zeitpunkten zu beobachten ist [13, 128].

Ein Erklärungsansatz für die beobachtete verstärkte Gliogenese der S13 Zelllinie unter Differenzierungsmedium könnte wiederum auf ein komplexes Wechselspiel synergistisch-antagonistischer Signalwege in der Stammzellnische verweisen, wie es in Zusammenhang mit dem BMP bereits beschrieben wurde. Über das Noggin findet sich innerhalb der frühen Striatogenese ein inhibitorischer Faktor auf die Gliogenese wieder. Dieses supprimiert die Freisetzung des BMP, welches seinerseits typischerweise eine astrogliale Differenzierung fördert und die Neurogenese unterdrückt [131–133]. Denkbar wäre somit in der *in vivo* Nische, dass durch eine mit fortlaufender Striatogenese abnehmende Sekretion von Noggin die Disinhibition auf die Gliogenese reduziert wird und somit zu späteren Zeitpunkten mehr Gliazellen beobachtet werden können. Insgesamt scheint das Cytodex auf die Gliogenese einen noch größeren Effekt zu haben als auf die Neurogenese.

Unter dem Stemcellmedium in Kombination mit der EZM zeigte sich zwar kein Effekt auf den relativen Anteil an NCAM<sup>+</sup>-Neuroblasten im Vergleich zum matrixfreien Parallelansatz, jedoch war der Effekt auf den Anteil differenzierter Neurone und Gliazellen sehr ausgeprägt. Dabei war der Anteil für die S13 Zelllinie mit 4 % am geringsten, während die Kulturbedingungen unter Verwendung der S16 Zelllinie für einen doppelt so hohen und der S19 Zelllinie sogar für einen achtmal höheren Anteil an  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Neuronen im Vergleich zum matrixfreien Parallelansatz sorgten. Unter jeder Zelllinie lag der Anteil an Gliazellen mindestens dreimal so hoch wie im Neurosphärenversuch. Wie für das Proliferationsmedium beschrieben, kam es auch unter Verwendung des Stemcellmediums zu einem Kontaktverlust der meisten Zellen zur Matrixoberfläche, sodass der Effekt der kollagenhaltigen Matrix auf die NPCs auch hier auf eine kürzere Zeit als die Gesamtkulturdauer beschränkt war. Dennoch scheint auch hier die Matrix ausschlaggebend für den sprunghaften Anstieg des Differenzierungspotenzials im Vergleich zum Neurosphärenversuch zu sein. Interessant wären zukünftige Untersuchungen, in denen das Stemcellmedium mit FCS kombiniert würde, um den positiven Effekt auf die Gliogenese durch eine längere Kontaktzeit zur Matrixoberfläche zu verstärken.

Besonders unter der S19 Zelllinie, also unter der Zelllinie der ältesten embryonalen Herkunft fanden sich vermehrt differenzierte Gliazellen und hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Neurosphärenversuch. Anders als zuvor für das Differenzierungsmedium beschrieben, werden die stadienspezifischen Verhältnisse der *in vivo* Bedingungen der Gliogenese durch die Kombination aus chemisch definiertem Medium und dem Cytodex besser abgebildet.

Abschließend kann somit auch die dritte und letzte Arbeitshypothese „Die löslichen Faktoren in Kombination mit der EZM zeigen einen komplexen, unterschiedlich großen Einfluss auf die Neuro- und Gliogenese der NPCs.“ nicht verworfen werden.

## V. Zusammenfassung

---

Als wichtiger Bestandteil innerhalb polysynaptischer Regelkreise des ZNS spielt das Striatum eine Schlüsselrolle innerhalb der Exekutive des Frontalhirns. Kenntnisse funktioneller Zusammenhänge des Zellverhaltens und des histologischen Aufbaus sind somit entscheidend für das Verständnis charakteristischen Dysfunktionen infolge verschiedener Erkrankungen. Besonders wichtig erscheint daher, die Funktionszusammenhänge als Ergebnis entwicklungsbiologischer Vorgänge mit sequenzieller Entstehung verschiedener Zellpopulationen unter Berücksichtigung ihrer Abstammung zu verstehen. Vor diesem Hintergrund sind die Kenntnisse über die Abläufe innerhalb der Stammzellnische mit ihren Regulationsmechanismen für Zellproliferation, Zellspezifizierung und Zellmigration von entscheidender Bedeutung. Diese Stammzellnische stellt dabei ein dynamisches Konstrukt dar, welches durch das komplexe Wechselspiel extrinsischer Faktoren in Form von Bestandteilen der EZM und löslicher Bestandteile der Interstitialflüssigkeit charakterisiert ist. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines *in vitro* Ansatz der Frage nach dem Verhältnis von extrinsischen Schlüsselfaktoren der Stammzellnische und intrinsischen Eigenschaften von NPCs in Bezug auf deren Differenzierungsverhalten nachgegangen. Die Zellen stammten aus der ventrikulären bzw. subventrikulären Matrixzone embryonaler Ratten zu kritischen Zeitpunkten der striatalen Entwicklung. Neben der Berücksichtigung löslicher Faktoren als Bestandteile routinemäßig verwendeter Medien stand besonders das Kollagen als Bestandteil der Extrazellulärmatrix im Mittelpunkt der vorgelegten Arbeit. Dabei wurde neben ihrer jeweils isolierten Betrachtung auch der Einfluss von EZM und löslichen Faktoren in Kombination untersucht. Von großem Interesse innerhalb des Verständnisses von Stammzellverhalten war daher auch, ob intrinsische Unterschiede der entnommenen Zelllinien vorliegen und inwiefern mit fortlaufendem Entwicklungsalter differentielle Spezifizierungen der Zellen über extrinsische Signale stattfinden.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass lösliche Komponenten des FCS und Komponenten des Stemcellmediums einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Stammzellen nehmen. Besonders in Kombination mit der EZM zeigte sich ein signifikant höherer Anteil sowohl neuronal als auch glial differenzierter Zellen an der Gesamtpopulation. Insgesamt überwiegte vor allem der positive Effekt auf die Gliogenese. Als weiteres Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die zu kritischen Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung des Striatums entnommenen Zellen intrinsische Unterschiede hinsichtlich ihres Differenzierungsverhaltens, die einige Parallelen zu den Beobachtungen der *in vivo* Entwicklung aufwiesen.

Damit dienen die hier präsentierten Ergebnisse dem erweiterten Verständnis der Mechanismen einer räumlich-zeitlichen Spezifizierung neuraler Vorläuferzellen und der

---

Realisierung ihrer prospektiven Potenz bzw. ihrer prospektiven Bedeutung. Perspektivisch dienen sie auch einem erweiterten Verständnis einer altersbedingten Veränderung adulter Stammzellnischen *in vitro* und einer damit einhergehenden Reduktion ihres regenerativen Potenzials. Ein Zugewinn an Informationen über die Regulation der Neurogenese in der embryonale Stammzellnische über die Kombination löslicher Faktoren und fester Bestandteile der EZM mit Rückschlüssen auf die Mikroumgebung der adulten Stammzellnische ermöglicht zudem die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, bei dem unter Verwendung eines Trägermaterials aus mehrere EZM-Komponenten bestimmte Differenzierungsrichtungen der endogenen NPCs in ihrer Nische induziert werden könnten [134].

**VI. Literaturverzeichnis**

---

1. Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851>
  2. Hikosaka O, Kim HF, Yasuda M et al. (2014) Basal ganglia circuits for reward value-guided behavior. *Annu Rev Neurosci* 37:289–306. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013924>
  3. Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008) Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *European Journal of Neuroscience* 28:1437–1448. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06422.x>
  4. Mink JW (2018) Basal ganglia mechanisms in action selection, plasticity, and dystonia. *Eur J Paediatr Neurol* 22:225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.005>
  5. Phukan J, Albanese A, Gasser T et al. (2011) Primary dystonia and dystonia-plus syndromes: clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 10:1074–1085. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70232-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70232-0)
  6. Wichmann T (2008) Commentary: Dopaminergic dysfunction in DYT1 dystonia. *Experimental Neurology* 212:242–246. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.020>
  7. Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318:876–880. <https://doi.org/10.1056/NEJM198804073181402>
  8. Ribot B, Aupy J, Vidailhet M et al. (2019) Dystonia and dopamine: From phenomenology to pathophysiology. *Prog Neurobiol* 182:101678. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101678>
  9. Tippett LJ, Waldvogel HJ, Thomas SJ et al. (2007) Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. *Brain : a journal of neurology* 130:206–221. <https://doi.org/10.1093/brain/awl243>
  10. Crittenden JR, Graybiel AM (2011) Basal Ganglia Disorders Associated with Imbalances in the Striatal Striosome and Matrix Compartments. *Front Neuroanat* 5:59. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00059>
  11. Reiner A, Albin RL, Anderson KD et al. (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5733–5737. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5733>
  12. DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences* 13:281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-v](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-v)
-

13. Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S et al. (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Research Reviews* 41:1–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00216-3)
  14. Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7:179–191. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90159-2)
  15. Eskow Jaunarajs KL, Bonsi P, Chesselet MF et al. (2015) Striatal cholinergic dysfunction as a unifying theme in the pathophysiology of dystonia. *Prog Neurobiol* 127-128:91–107. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.02.002>
  16. Muñoz-Manchado AB, Bengtsson Gonzales C, Zeisel A et al. (2018) Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Rep* 24:2179-2190.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.053>
  17. Gerfen CR (2003) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *Neuroscientist* 9:455–462. <https://doi.org/10.1177/1073858403255839>
  18. Gerfen CR (1985) The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *the journal of comparative neurology* 236:454–476. <https://doi.org/10.1002/cne.902360404>
  19. Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908–4923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-11-04908.1993>
  20. Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 10:508–519. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00508.1990>
  21. Kelly SM, Raudales R, He M et al. (2018) Radial Glial Lineage Progression and Differential Intermediate Progenitor Amplification Underlie Striatal Compartments and Circuit Organization. *Neuron* 99:345-361.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.021>
  22. Flaherty AW, Graybiel AM (1994) Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J Neurosci* 14:599–610. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00599.1994>
  23. Ragsdale CWJ, Graybiel AM (1988) Fibers from the basolateral nucleus of the amygdala selectively innervate striosomes in the caudate nucleus of the cat. *the journal of comparative neurology*:506–522
  24. Freeze BS, Kravitz AV, Hammack N et al. (2013) Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci* 33:18531–18539. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013>
-

25. Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences* 12:366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
  26. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL et al. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
  27. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A et al. (2017) Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 144:552–566. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>
  28. Lawson A, Schoenwolf GC (2009) Neurulation. In: Squire LR (ed) *Encyclopedia of neuroscience*. Academic Elsevier, London, pp 1107–1113
  29. Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S et al. (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21:445–477. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.445>
  30. Copp AJ, Greene, N. D. E. (2013) Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2:213–227. <https://doi.org/10.1002/wdev.71>
  31. Chen VS, Morrison JP, Southwell MF et al. (2017) *Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5*. *Toxicol Pathol* 45:705–744. <https://doi.org/10.1177/0192623317728134>
  32. Regalado-Santiago C, Juárez-Aguilar E, Olivares-Hernández JD et al. (2016) Mimicking Neural Stem Cell Niche by Biocompatible Substrates. *Stem Cells Int* 2016:1513285. <https://doi.org/10.1155/2016/1513285>
  33. Temple S, Shen Q (2013) Cell Biology of Neuronal Progenitor Cells. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*, vol 41. Elsevier, pp 261–283
  34. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA et al. (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580–587. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.6.580>
  35. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
  36. Götz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
  37. Ullfig N, Neudörfer F, Bohl J (2000) Transient structures of the human fetal brain: Subplate, thalamic reticular complex, ganglionic eminence. *Histolgy and Histopathology* 15:771–790
-

38. Molnár Z, Métin C, Stoykova A et al. (2006) Comparative aspects of cerebral cortical development. *The European journal of neuroscience* 23:921–934. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04611.x>
  39. García MT, Harwell C (2017) Radial Glia in the Ventral Telencephalon. *FEBS Lett* 591:3942–3959. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12829>
  40. Olsson M, Björklund A, Campbell K (1998) Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84:867–876. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00532-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00532-0)
  41. Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214–222. <https://doi.org/10.1038/nature09611>
  42. Pilz G, Shitamukai A, Reillo I et al. (2013) Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat Commun* 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3125>
  43. Fishell G, van der Kooy D (1987) Pattern Formation in the Striatum: Developmental Changes in the Distribution of Striatonigral Neurons. *the journal of neuroscience* 7:1969–1978
  44. Sousa VH, Fishell G (2010) Sonic hedgehog functions through dynamic changes in temporal competence in the developing forebrain. *Current Opinion in Genetics & Development* 20:391–399. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.04.008>
  45. Mai JK, Krajewski S, Ashwell KWS et al. (2003) A CD15-Immunoreactive Subpopulation of Radial Glial Cells in the Developing Human Lateral Ganglionic Eminence. *Neuroembryology* 2:64–71. <https://doi.org/10.1159/000071022>
  46. Shetty AK, Hattiangady B (2016) Grafted Subventricular Zone Neural Stem Cells Display Robust Engraftment and Similar Differentiation Properties and Form New Neurogenic Niches in the Young and Aged Hippocampus. *Stem Cells Transl Med* 5:1204–1215. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0270>
  47. Berg DA, Su Y, Jimenez-Cyrus D et al. (2019) A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. *Cell* 177:654-668.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.010>
  48. Falk S, Götz M (2017) Glial control of neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 47:188–195. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.025>
  49. Furutachi S, Miya H, Watanabe T et al. (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 18:657–665. <https://doi.org/10.1038/nn.3989>
  50. Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI et al. (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644–1655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>
-

51. Illes S, Theiss S, Hartung H et al. (2009) Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC Neurosci* 10:93. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-93>
  52. Conover JC, Notti RQ (2008) The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res* 331:211–224. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0503-6>
  53. Joddar B, Ito Y (2013) Artificial niche substrates for embryonic and induced pluripotent stem cell cultures. *Journal of Biotechnology* 168:218–228. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.021>
  54. Morante-Redolat JM, Porlan E (2019) Neural Stem Cell Regulation by Adhesion Molecules Within the Subependymal Niche. *Front Cell Dev Biol* 7:102. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00102>
  55. Kazanis I, Lathia J, Moss L et al. (2008) The neural stem cell microenvironment. In: Kazanis I, Lathia J, Moss L et al. (eds) *StemBook* [Internet]. Harvard Stem Cell Institute
  56. Lathia JD, Rao MS, Mattson MP et al. (2007) The microenvironment of the embryonic neural stem cell: Lessons from adult niches? *Developmental Dynamics* 236:3267–3282. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21319>
  57. Wade A, McKinney A, Phillips JJ (2014) Matrix regulators in neural stem cells functions. *Biochim Biophys Acta* 1840:2520–2525. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.017>
  58. Murphy M, Drago J, Bartlett PF (1990) Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *Journal of neuroscience research* 25. <https://doi.org/10.1002/jnr.490250404>
  59. Zeng WR, Fabb SRA, Haynes JM et al. (2011) Extended periods of neural induction and propagation of embryonic stem cell-derived neural progenitors with EGF and FGF2 enhances Lmx1a expression and neurogenic potential. *Neurochemistry International* 59:394–403. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.002>
  60. Conti L, Pollard SM, Gorba T et al. (2005) Niche-Independent Symmetrical Self-Renewal of a Mammalian Tissue Stem Cell. *PLOS Biology* 3:e283. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030283>
  61. Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ (1998) Neuronal Differentiation of Precursors in the Neocortical Ventricular Zone Is Triggered by BMP. *the journal of neuroscience* 18:8853–8862. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08853.1998>
  62. Bertrand N, Dahmane N (2006) Sonic hedgehog signaling in forebrain development and its interactions with pathways that modify its effects. *Trends in Cell Biology* 16:597–605. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.007>
  63. Takahashi H, Liu F (2006) Genetic Patterning of the mammalian telencephalon by morphogenetic molecules and transcription factors. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 78:256–266. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20077>
-

64. Danesin C, Peres JN, Johansson M et al. (2009) Integration of Telencephalic Wnt and Hedgehog Signaling Center Activities by Foxg1. *Developmental Cell* 16:576–587. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.007>
  65. Wrobel CN, Mutch CA, Swaminathan S et al. (2007) Persistent expression of stabilized  $\beta$ -catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol* 309:285–297. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.013>
  66. Shimogori T, Banuchi V, Ng HY et al. (2004) Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131:5639–5647. <https://doi.org/10.1242/dev.01428>
  67. Grove EA, Monuki ES (2013) Chapter 2 - Morphogens, Patterning Centers, and their Mechanisms of Action. In: Rubenstein JL, Rakic P (eds) *Patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS: Comprehensive developmental neuroscience*, First edition. Academic Press, Amsterdam, pp 25–44
  68. Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA et al. (2020) Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 584:535–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>
  69. Talukdar S, Emdad L, Das SK et al. (2022) GAP junctions: multifaceted regulators of neuronal differentiation. *Tissue Barriers* 10:1982349. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1982349>
  70. Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901–907. <https://doi.org/10.1038/nature06063>
  71. Cheng A, Tang H, Cai J et al. (2004) Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol* 272:203–216. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.031>
  72. Naus CC, Aftab Q, Sin WC (2016) Common mechanisms linking connexin43 to neural progenitor cell migration and glioma invasion. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 50:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.12.008>
  73. Stuckmann I, Weigmann A, Shevchenko A et al. (2001) Ephrin B1 Is Expressed on Neuroepithelial Cells in Correlation with Neocortical Neurogenesis. *the journal of neuroscience* 21:2726–2737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02726.2001>
  74. Nascimento MA, Sorokin L, Coelho-Sampaio T (2018) Fractone Bulbs Derive from Ependymal Cells and Their Laminin Composition Influence the Stem Cell Niche in the Subventricular Zone. *J Neurosci* 38:3880–3889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3064-17.2018>
  75. Layrolle P, Payoux P, Chavanas S (2022) Message in a Scaffold: Natural Biomaterials for Three-Dimensional (3D) Bioprinting of Human Brain Organoids. *Biomolecules* 13. <https://doi.org/10.3390/biom13010025>
-

76. Park YK, Goda Y (2016) Integrins in synapse regulation. *Nat Rev Neurosci* 17:745–756. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.138>
  77. Andressen C, Adrian S, Fässler R et al. (2005) The contribution of beta1 integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *European journal of cell biology* 84. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.017>
  78. Kearns SM, Laywell ED, Kukekov VK et al. (2003) Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Experimental Neurology* 182:240–244. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00124-9)
  79. Andressen C, Arnhold S, Puschmann M et al. (1998)  $\beta$ 1 integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell derived neurons. *Neuroscience Letters* 251:165–168. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00535-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00535-7)
  80. Treloar HB, Nurcombe V, Key B (1996) Expression of extracellular matrix molecules in the embryonic rat olfactory pathway. *Journal of neurobiology* 31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199609\)31:1<41:AID-NEU4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199609)31:1<41:AID-NEU4>3.0.CO;2-F)
  81. McKerracher L, Chamoux M, Arregui CO (1996) Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol Neurobiol* 12. <https://doi.org/10.1007/BF02740648>
  82. Condic ML, Letourneau PC (1997) Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 389:852–856. <https://doi.org/10.1038/39878>
  83. Chuang CY, Lord MS, Melrose J et al. (2010) Heparan sulfate dependent signaling of fibroblast growth factor (FGF) 18 by chondrocyte-derived perlecan. *Biochemistry* 49:5524–5532. <https://doi.org/10.1021/bi1005199>
  84. Ford-Perriss M, Guimond SE, Greferath U et al. (2002) Variant heparan sulfates synthesized in developing mouse brain differentially regulate FGF signaling. *Glycobiology* 12. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwf072>
  85. Kerever A, Mercier F, Nonaka R et al. (2014) Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res* 12:492–505. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.12.009>
  86. Mercier F (2016) Fractones: extracellular matrix niche controlling stem cell fate and growth factor activity in the brain in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 73:4661–4674. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2314-y>
  87. Beauvais DM, Rapraeger AC (2010) Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation. *J Cell Sci* 123:3796–3807. <https://doi.org/10.1242/jcs.067645>
  88. Echtermeyer F, Baciuc PC, Saoncella S et al. (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci* 112 (Pt 20)
-

89. Greene DK, Tumova S, Couchman JR et al. (2003) Syndecan-4 Associates with  $\alpha$ -Actinin\*. *Journal of Biological Chemistry* 278:7617–7623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207123200>
  90. Wilems T, Vardhan S, Wu S et al. (2019) The influence of microenvironment and extracellular matrix molecules in driving neural stem cell fate within biomaterials. *Brain Res Bull* 148:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.004>
  91. Kerever A, Schnack J, Vellinga D et al. (2007) Novel Extracellular Matrix Structures in the Neural Stem Cell Niche Capture the Neurogenic Factor Fibroblast Growth Factor 2 from the Extracellular Milieu. *Stem Cells* 25:2146–2157. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0082>
  92. Egawa EY, Kato K, Hiraoka M et al. (2011) Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor. *Biomaterials* 32:4737–4743. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.033>
  93. Que RA, Arulmoli J, Da Silva NA et al. (2018) Recombinant collagen scaffolds as substrates for human neural stem/progenitor cells. *Journal of biomedical materials research. Part A* 106:1363. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36343>
  94. Ma W, Fitzgerald W, Liu Q-Y et al. (2004) CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Experimental Neurology* 190:276–288. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.016>
  95. Ali SA, Pappas IS, Parnavelas JG (1998) Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Developmental Brain Research* 110:31–38. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00091-1)
  96. Arnhold S, Hilgers M, Lenartz D et al. (2003) Neural precursor cells as carriers for a gene therapeutical approach in tumor therapy. *Cell transplantation* 12. <https://doi.org/10.3727/000000003771000174>
  97. Buttler D, Mai JK, Ashwell KWS et al. (2013) Clonogenic CD15 immunoreactive radial glial cells from the developing human lateral ganglionic eminence. *Current pharmaceutical biotechnology* 14:29–35
  98. Smith A (2006) A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441:S. 1060. <https://doi.org/10.1038/nature04954>
  99. Healthcare GE (2018) Cytodex 1, 3. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjgru2qgPHtAhU6QEEAHQQZDFUQFjABegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.gelifesciences.co.kr%2Fwp-content%2Fuploads%2F2020%2F04%2FUser-manual-AE-Cytodex-13-1.pdf&usg=AOvVaw0iIWsdgNLsqfUtZQa4BktU>. Accessed 04 Dec 2019
-

100. Marković-Lipkovski J, Müller CA, Klein G et al. (2007) Neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells. *Nephrol Dial Transplant* 22:1558–1566. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm006>
101. Mao X, Schwend T, Conrad GW (2012) Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:1234–1243. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8834>
102. Moeton M, Stassen, O. M. J. A., Sluijs JA et al. (2016) GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. *Cell Mol Life Sci* 73:4101–4120. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2239-5>
103. Lin N, Messing A, Perng M (2017) Characterization of a panel of monoclonal antibodies recognizing specific epitopes on GFAP. *PLoS ONE* 12:e0180694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180694>
104. Stricker PEF, Souza Dobuchak D, Irida AC et al. (2021) Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on the Natural Membrane to Neurospheres for Cholinergic-like Neurons. *Membranes* 11:598. <https://doi.org/10.3390/membranes11080598>
105. Gunewardene N, van Bergen N, Crombie D et al. (2014) Directing human induced pluripotent stem cells into a neurosensory lineage for auditory neuron replacement. *Biores Open Access* 3:162–175. <https://doi.org/10.1089/biores.2014.0019>
106. Gaetano J (2013) Holm-Bonferroni sequential correction: An EXCEL calculator (1.2)[Microsoft EXCEL workbook]
107. Campos LS, Leone DP, Relvas JB et al. (2004)  $\beta$ 1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 131:3433–3444. <https://doi.org/10.1242/dev.01199>
108. Reddington AE, Rosser AE, Dunnett SB (2014) Differentiation of pluripotent stem cells into striatal projection neurons: a pure MSN fate may not be sufficient. *Front Cell Neurosci* 8:398. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00398>
109. Moors M, Rockel TD, Abel J et al. (2009) Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect* 117:1131–1138. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800207>
110. Song K, Yang Y, Li S et al. (2014) In vitro culture and oxygen consumption of NSCs in size-controlled neurospheres of Ca-alginate/gelatin microbead. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 40:197–203. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.028>
111. Konstantinides N, Desplan C (2020) Neuronal differentiation strategies: insights from single-cell sequencing and machine learning. *Development* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.193631>
-

112. Mannello F, Tonti GA (2007) Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! Stem cells (Dayton, Ohio) 25:1603–1609. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0127>
113. Graybiel AM, Hickey TL (1982) Chemospecificity of ontogenetic units in the striatum: demonstration by combining 3Hthymidine neuronography and histochemical staining. Proc Natl Acad Sci U S A 79:198–202. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.1.198>
114. Newman H, Liu F, Graybiel AM (2015) Dynamic ordering of early generated striatal cells destined to form the striosomal compartment of the striatum. Journal of Comparative Neurology 523:943–962. <https://doi.org/10.1002/cne.23725>
115. Mouw JK, Ou G, Weaver VM (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. Nat Rev Mol Cell Biol 15:771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
116. Cruz Walma DA, Yamada KM (2020) The extracellular matrix in development. Development 147. <https://doi.org/10.1242/dev.175596>
117. Kerever A, Arikawa-Hirasawa E (2021) Optimal Extracellular Matrix Niches for Neurogenesis: Identifying Glycosaminoglycan Chain Composition in the Subventricular Neurogenic Zone. Front Neuroanat 15:764458. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.764458>
118. Dankovich TM, Rizzoli SO (2022) The Synaptic Extracellular Matrix: Long-Lived, Stable, and Still Remarkably Dynamic. Front Synaptic Neurosci 14:854956. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.854956>
119. Milošević NJ, Judaš M, Aronica E et al. (2014) Chapter 7 - Neural ECM in laminar organization and connectivity development in healthy and diseased human brain. In: Dityatev A, Wehrle-Haller B, Pitkänen A (eds) Progress in Brain Research: Brain Extracellular Matrix in Health and Disease, vol 214. Elsevier, pp 159–178
120. Samanipour R, Tahmooressi H, Nejad HR et al. (2022) A review on 3D printing functional brain model. Biomicrofluidics 16:11501. <https://doi.org/10.1063/5.0074631>
121. Kajtez J, Nilsson F, Fiorenzano A et al. (2021) 3D biomaterial models of human brain disease. Neurochemistry International 147:105043. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105043>
122. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL et al. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 126:677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
123. Condomitti G, Wit Jd (2018) Heparan Sulfate Proteoglycans as Emerging Players in Synaptic Specificity. Front Mol Neurosci 11:14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00014>
124. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. Nature 446:1030–1037. <https://doi.org/10.1038/nature05817>
-

125. Singh M, Kakkar A, Sharma R et al. (2017) Synergistic Effect of BDNF and FGF2 in Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from human Mesenchymal Stem Cells. *Sci Rep* 7:10378. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11028-z>
126. Nandy SB, Mohanty S, Singh M et al. (2014) Fibroblast Growth Factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. *Journal of Biomedical Science* 21:83. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0083-1>
127. Bergström T, Holmqvist K, Tararuk T et al. (2014) Developmentally regulated collagen/integrin interactions confer adhesive properties to early postnatal neural stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1840:2526–2532. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.021>
128. van der Kooy D, Fishell G (1987) Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res* 401:155–161. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91176-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91176-0)
129. Norrgren G, Ebendal T, Gebb C et al. (1983) The use of Cytodex 3 microcarriers and reduced-serum media for the production of nerve growth promoters from chicken heart cells. *Developments in biological standardization* 55:43–51
130. Clark JM, Gebb C, Hirtenstein MD (1981) Serum supplements and serum-free media: applicability for microcarrier culture of animal cells. *Developments in biological standardization* 50:81–91
131. Cho S, Benraiss A, Chmielnicki E et al. (2007) Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation* 117:2889–2902. <https://doi.org/10.1172/JCI31778>
132. Gross RE, Mehler MF, Mabie PC et al. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17:595–606. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80193-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80193-2)
133. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM et al. (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
134. Conway A, Schaffer DV (2014) Biomaterial Microenvironments to Support the Generation of New Neurons in the Adult Brain. *STEM CELLS* 32:1220–1229. <https://doi.org/10.1002/stem.1650>

**Anhang**

---

**Anhang A: Material und Methoden**

---

**Anhang A.1 Nährmedien**

Tab. 2: Proliferationsmedium

---

DMEM/Ham's F12 (1:1)

1 % Nichtessenzielle Aminosäuren

1 % N1 Supplement

1 % Penicillin/ Streptomycin

50 µl EGF

50 µl FGF

---

Tab. 3: Differenzierungsmedium

---

DMEM /Ham's F12 (1:1)

10 % FCS

1 % Penicillin/ Streptomycin

1 % Nichtessenzielle Aminosäuren

---

Tab. 4: Stemcellmedium

---

20000 µl Stemcell Differenzierung Basismedium

1600 µl Differenzierung Supplement A

200 µl Supplement B

40 µl Supplement C

---

**Anhang A.2 Gebrauchslösungen**

Tab. 5: Fixierlösung

---

86 % Vol. Phosphat-buffered-saline

14 % Vol. Aqua dest.

30 g/l Paraformaldehyd

---

Tab. 6: Kryokonservierungslösung

---

Aqua dest.

30 % Saccharose

---

Tab. 7: Permeabilisierungslösung

---

Phosphat-buffered-saline

0,1 % Vol. Triton-X-100

---

**Anhang A.3 Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte**

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme

<b>Chemikalien/Enzyme /AK/KIT</b>	<b>Firma</b>	<b>Kennung</b>
AK- $\beta$ III-Tubulin	Abcam	ab18207
AK-GFAP	SIGMA	G3893
AK-NCAM	SIGMA	C9672
AK-ki67	Abcam	Ab15580
AK-Vimentin	SIGMA	V2258
Cryo-SFM	PromoCell	
Cytodex Microcarrier	GE Healthcare	17-0485-01
Cy2 ms	Dianova	715-545-151
Cy3 rb	Dianova	715-165-152
Mountin medium DAPI Hard set	Vector	CA 94010
DMEM/Ham's F12 (1:1)	SIGMA	D8437
Ethanol	ZAP	
FCS	SIGMA	F 7524
N1-Supplement	SIGMA	N6530
Nicht essenzielle Aminosäuren	SIGMA	M 7145
Paraformaldehyde (3 %)	SIGMA	16005
Phosphate-buffered saline	SIGMA-ALDRICH	D8537
Penicillin/Streptomycin	SIGMA	P 4333
Stemdiff Basalmedium	Stemcell	08504
Stemdiff Supplement A	Stemcell	08501
Stemdiff Supplement B	Stemcell	08502
Stemdiff Supplement C	Stemcell	08503
Sterillium	Bode	97660
Tissue Tek	Leica	19AACFI7754F1Z6
Triton-X-100	SIGMA	T8787
Trypsin	SIGMA	T 4299
Tween 20	SIGMA	P 74299
Wachstumsfaktor EGF	Immuno Tools	11343406
Wachstumsfaktor FGF	Immuno Tools	130093638

Tab. 9: Gebrauchswaren und Geräte

<b>Gebrauchsware/Gerät</b>	<b>Firma</b>
Autoclav/Varioclav	H+P Labortechnik
Biological Safety Cabinets	NUAIRE
Brutschrank Binder CB160	Binder CB160
Cellstrainer	SPL
Cellspin/Cellroll Controlpanel	IBS
Cellspin/Cellroll Stiring Unit	IBS
Cellspin Rotor	IBS
Cellspin Spinnergefäß	IBS
Coverslips	SARSTEDT
Deckgläser	MENZEL-Gläser
Digital Sight	Nikon
Eppendorfröhrchen 2 ml	Eppendorf AG
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr-Premium
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo
Handstückzähler	ROTH
Kühl- /Gefrierschrank	Liebherr
Labofuge 200	Heraeus
Leica Kryostat	Leica
Microtom Klängen	Leica
Mikroküvetten	ROTH
Mikroskop Licht	LEICA
Mikroskop Licht Eclipse	Nikon
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Nikon
Neubauzählkammer	Marienfeld
Pasteurpipetten Glas 230 mm	ROTH
Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipettus-akku	Hirschmann
Rütteltisch	Heidolph
Serologische Pipetten 5 ml	Nerbe plus

<b>Gebrauchsware/Gerät</b>	<b>Firma</b>
Serologische Pipetten 10 ml	Nerbe plus
Serologische Pipetten 25 ml	Nerbe plus
Vacuboy	IBS
Waage Adventurer Pro	OHAUS
Wasserbad	Memmert
Zellkultur Mikrowellplatten 24er zellabweisend	Greiner
Zellkultur Mikrowellplatten 96er zellabweisend	Greiner
Zellkulturplatten 3 ml	Thermo
Zellkulturplatten 6 ml	Thermo
Zellkulturplatten 10 ml	Thermo

---

**Anhang A.4 Antikörperkonzentrationen**

Tab. 10: Antikörperkonzentration

<b>Maus-AK</b>	<b>Kaninchen-AK</b>
<i>Primärantikörper</i>	
Vimentin 1:100	Ki-67 1:100
NCAM 1:50	βIII-Tubulin 1:1000
GFAP 1:100	
<i>Sekundärantikörper</i>	
Cy 2 1:100	Cy 3 1:100

**Anhang A.5 Verwendete Software**

Tab. 11: Verwendete Software

<b>Produkt (Version)</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Biorender	BioRender.com	Abbildungssoftware
EZ-C1 Viewer (4.1)	Nikon	Mikroskopiesoftware
ImageJ	Wayne Rasband	Auswertung
Microsoft Excel (365)	Microsoft	Datendokumentation
Microsoft PowerPoint (365)	Microsoft	Präsentation Verteidigung
Microsoft Word (365)	Microsoft	Schreibprogramm
SPSS Statistics (27)	IBM	Statistische Analyse

**Anhang B: Ergebnisse**

**Anhang B.1 Auswertung GFAP<sup>+</sup> Zellen**

Tab. 12: Auswertung GFAP<sup>+</sup> Zellen im Cytodex und Sphärenexperiment

Medium	Zelllinie	$N_{\text{Cytodex}}$	GFAP Cytodex	GFAP Sphäre	$N_{\text{Sphäre}}$	p-Wert	W- Differenz
			$M (SF)$	$M (SF)$			
Prolif	S13	106	.05 (.021)	.02 (.005)	1037	.344	.02
	S16	505	.11 (.014)	0	997		
	S19	128	.09 (.026)	.00 (.001)	1924	.001**	.09
1zu1	S13	2498	.09 (.006)	.08 (.005)	2720	.344	.01
	S16	1461	.06 (.006)	.03 (.003)	2353	< .001***	.03
	S19	1749	.14 (.008)	.05 (.004)	3741	< .001***	.09
Diff	S13	969	.35 (.015)	.02 (.002)	3892	< .001***	.32
	S16	2627	.08 (.005)	.02 (.003)	2093	< .001***	.06
	S19	904	.11 (.010)	.03 (.003)	3744	< .001***	.08
Stemcell	S13	1876	.06 (.006)	.02 (.002)	3247	< .001***	.04
	S16	3414	.06 (.004)	.00 (.001)	4335	< .001***	.06
	S19	847	.17 (.013)	.02 (.003)	2120	< .001***	.15

*Anmerkung.* Darstellung des Vergleiches des gewichteten arithmetischen Mittels der GFAP-Expression des Cytodex und Neurosphärenversuches unter allen vier Medien pro Zelllinie (links);  $N_{\text{Cytodex}}$  = Gesamtzellzahl im Cytodexversuch.  $N_{\text{Sphäre}}$  = Gesamtzellzahl im Neurosphärenversuch, M = gewichtetes arithmetisches Mittel, SF = Standardfehler, p-Wert korrigiert nach Bonferoni-Holm, W-Differenz = Wahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen den beiden gewichteten Mittelwerten (Cytodex-Sphäre), Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium, Signifikanzen entsprechend: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

**Anhang B.2 Auswertung NCAM<sup>+</sup> Zellen**

Tab. 13: Auswertung NCAM<sup>+</sup> Zellen im Cytodex und Sphärenexperiment

Medium	Zelllinie	$N_{\text{Cytodex}}$	NCAM Cytodex	NCAM Sphäre	$N_{\text{Sphäre}}$	p-Wert	W-Differenz
			$M(SF)$	$M(SF)$			
Prolif	S13	225	.01(.006)	0	1738		
	S16	992	.01(.003)	0	425		
	S19	218	.06(.016)	.02(.002)	4339	.056	.04
1zu1	S13	4769	.09(.004)	.01(.002)	3455	< .001***	.08
	S16	2780	.09(.006)	.05(.004)	2927	< .001***	.05
	S19	1617	.22(.010)	.05(.004)	6617	< .001***	.17
Diff	S13	1209	.01(.003)	.02(.003)	2464	.056	-.01
	S16	2153	.13(.007)	.10(.005)	3616	< .001***	.04
	S19	1323	.23(.012)	.04(.003)	4377	< .001***	.19
Stemcell	S13	1714	.00(.001)	.00(.001)	3148	1	
	S16	3414	.05(.004)	.06(.004)	4635	.197	-.01
	S19	507	.02(.006)	.02(.002)	3080	1	

*Anmerkung.* Darstellung des Vergleiches des gewichteten arithmetischen Mittels der NCAM-Expression des Cytodex und Neurosphärenversuches unter allen vier Medien pro Zelllinie (links);  $N_{\text{Cytodex}}$  = Gesamtzellzahl im Cytodexversuch.  $N_{\text{Sphäre}}$  = Gesamtzellzahl im Neurosphärenversuch,  $M$  = gewichtetes arithmetisches Mittel,  $SF$  = Standardfehler, p-Wert korrigiert nach Bonferoni-Holm, W-Differenz = Wahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen den beiden gewichteten Mittelwerten (Cytodex-Sphäre), Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium, Signifikanzen entsprechend: \*  $p < .05$ , \*\*  $p < .01$ , \*\*\*  $p < .001$

**Anhang B.3 Auswertung  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen**Tab. 14: Auswertung  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen im Cytodex und Sphärenexperiment

Medium	Zelllinie	$N_{\text{Cytodex}}$	$\beta$ III Cytodex	$\beta$ III Sphäre	$N_{\text{Sphäre}}$	p-Wert	W-Differenz
			$M (SF)$	$M (SF)$			
Prolif	S13	225	.06(.016)	0	1738		
	S16	992	.11(.010)	0	425		
	S19	218	.04(.013)	.00(.001)	4339	.041*	.03
1zu1	S13	4769	.04(.003)	.04(.003)	3455	.948	.00
	S16	2780	.01(.002)	.02(.003)	2927	.070	-.01
	S19	1617	.04(.005)	.00(.000)	6617	< .001***	.04
Diff	S13	1209	.24(.012)	.02(.003)	2464	< .001***	.22
	S16	2153	.06(.005)	.01(.001)	3616	< .001***	.05
	S19	1323	.07(.007)	.01(.001)	4377	< .001***	.07
Stemcell	S13	1714	.04(.005)	.04(.004)	3148	.490	-.01
	S16	3414	.06(.004)	.03(.003)	4635	< .001***	.03
	S19	507	.16(.016)	.02(.002)	3080	< .001***	.14

*Anmerkung.* Darstellung des Vergleiches des gewichteten arithmetischen Mittels der  $\beta$ III-Tubulin-Expression des Cytodex und Neurosphärenversuches unter allen vier Medien pro Zelllinie (links);  $N_{\text{Cytodex}}$  = Gesamtzellzahl im Cytodexversuch.  $N_{\text{Sphäre}}$  = Gesamtzellzahl im Neurosphärenversuch, M = gewichtetes arithmetisches Mittel, SF = Standardfehler, p-Wert korrigiert nach Bonferoni-Holm, W-Differenz = Wahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen den beiden gewichteten Mittelwerten (Cytodex-Sphäre), Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium, Signifikanzen entsprechend: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

**Anhang B.4 Auswertung GFAP<sup>+</sup> Zellen mit direktem Cytodexkontakt**

Tab. 15: GFAP Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt

Zelllinie			
Medium		GFAP (M, (SF))	N
Prolif	S13	0	0
	S16	.23 (.117)	13
	S19	0	0
1zu1	S13	.43(.027)	340
	S16	.06(.013)	357
	S19	.24(.023)	348
Diff	S13	.63(.023)	440
	S16	.23(.016)	664
	S19	.20(.023)	299
Stemcell	S13	.24(.085)	25
	S16	.00(.000)	119
	S19	.04(.016)	135

*Anmerkung.* Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels der GFAP-Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt unter allen vier Medien pro Zelllinie (links);  $N_{\text{Cytodex}}$  = Gesamtzellzahl im Cytodexversuch,  $N_{\text{Sphäre}}$  = Gesamtzellzahl im Neurosphärenversuch, M = gewichtetes arithmetisches Mittel, SF = Standardfehler, Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium

**Anhang B.5 Auswertung NCAM<sup>+</sup> und  $\beta$ III-Tubulin<sup>+</sup> Zellen mit direktem Cytodexkontakt**

Tab. 16: NCAM/ $\beta$ III-Tubulin Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt

Zelllinie				N
Medium		NCAM (M, (SF))	$\beta$ III (M, (SF))	
Prolif	S13	.02(.022)	.00(.000)	46
	S16	.20(.068)	.00(.000)	35
	S19	.25(.082)	.11(.058)	28
1zu1	S13	.12(.020)	.03(.010)	274
	S16	.28(.023)	.07(.014)	376
	S19	.46(.025)	.08(.014)	403
Diff	S13	.00(.003)	.39(.020)	601
	S16	.25(.023)	.22(.022)	338
	S19	.17(.019)	.16(.018)	411
Stemcell	S13	0	0	0
	S16	.37(.121)	.00(.000)	16
	S19	.00(.000)	.33(.050)	89

*Anmerkung.* Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels der NCAM/ $\beta$ III-Tubulin Expression der Zellen mit direktem Cytodexkontakt unter allen vier Medien pro Zelllinie (links);  $N$  = Gesamtzellzahl im Cytodexversuch, M = gewichtetes arithmetisches Mittel, SF = Standardfehler, Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium

**Anhang B.6 Auswertung des Vergleiches der Entwicklungstage**

Tab. 17: Auswertung des Vergleiches der Entwicklungstage

Cytodex	Medium	M, (SF)				p-Wert			W-Differenz		
		S13	S16	S19	S13-S16	S13-S19	S16-S19	S13-S16	S13-S19	S16-S19	
Zelllinien											
Prolif											
GFAP		.05 (.021)	.11 (.014)	.09 (.026)	.064	.474	1	-.06	-.05	.02	
NCAM		.01 (.006)	.01 (.003)	.06 (.016)	1	.013*	.008**	.00	-.05	-.05	
βIII		.06 (.016)	.11 (.010)	.04 (.013)	.054	.428	< .001***	-.05	.03	.07	
1zu1											
GFAP		.09 (.006)	.06 (.006)	.14 (.008)	.001**	< .001***	< .001***	.03	-.05	-.08	
NCAM		.09 (.004)	.09 (.006)	.22 (.010)	1	< .001***	< .001***	.00	-.12	-.12	
βIII		.04 (.003)	.01 (.002)	.04 (.005)	< .001***	.500	< .001***	.02	.00	-.03	
Diff											
GFAP		.35 (.015)	.08 (.005)	.11 (.010)	< .001***	< .001***	.131	.26	.24	-.03	
NCAM		.01 (.003)	.13 (.007)	.23 (.012)	< .001***	< .001***	< .001***	-.12	-.21	-.10	
βIII		.24 (.012)	.06 (.005)	.07 (.007)	< .001***	< .001***	.132	.19	.17	-.02	
Stemcell											
GFAP		.06 (.006)	.06 (.004)	.17 (.013)	1	< .001***	< .001***	.00	-.11	-.11	
NCAM		.00 (.001)	.05 (.004)	.02 (.006)	< .001***	.023*	< .001***	-.05	-.02	.03	
βIII		.04 (.005)	.06 (.004)	.16 (.016)	< .001***	< .001***	< .001***	-.02	-.12	-.10	

*Anmerkung.* Darstellung des Vergleiches der drei Zelllinien, Darstellung des gewichteten arithmetischen Mittels der Expression von GFAP, NCAM und βIII-Tubulin unter allen vier Kulturmedien (linke Spalte), Darstellung des p-Wertes korrigiert nach Bonferoni Holm des Vergleiches der beiden oben in der Tabellenspalte dargestellten Zelllinien (mittlere Spalte), Darstellung der Wahrscheinlichkeitsdifferenz der beiden oben in der Tabellenspalte dargestellten Zelllinien (rechte Spalte), M = gewichtetes arithmetisches Mittel in %, SF = Standardfehler, W-Differenz = Wahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen den beiden untersuchten Zelllinien, Prolif = Proliferationsmedium, 1zu1 = 1zu1-Medium, Diff = Differenzierungsmedium, Stemcell = Stemcellmedium, Signifikanzen entsprechend: \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001

**Curriculum Vitae**

---

DER LEBENSLAUF IST IN DER ONLINE PUBLIZIERTEN VERSION NICHT VERFÜGBAR.

**Der Einfluss der Extrazellulärmatrix auf das Differenzierungsverhalten neuraler Stammzellen der embryonalen Ratte**

Als Beitrag zu der Frage nach der räumlich-zeitlichen Spezifizierung von neuronalen Stammzellen wurden in der hier vorgelegten Arbeit in einem *in vitro* Ansatz Zelllinien aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Striatogenese hinsichtlich ihrer neuronalen und makroglial-astrozytären Differenzierungspotenziale untersucht. Im experimentellen Ansatz wurden hierfür verschiedene Nährmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung ihrer löslichen Komponenten und deren Verwendung in Kombination mit Cytodex, einem kollagenhaltigen zelladhäsiven Substrat als Simulation einer Extrazellulärmatrix, verwendet.

1. Durch Nutzung verschiedener Medien kann der Einfluss unterschiedlicher lösliche Faktoren auf die neuronale Differenzierung untersucht werden. Vor allem unter Nutzung FCS-haltiger Medien zeigten sich positive Auswirkungen auf die Menge differenzierter Zellen.
2. Die EZM besitzt einen modulierenden Einfluss auf die Differenzierung der NPCs der embryonalen Ratte, was durch Nutzung eines kollagenhaltigen, dreidimensionalen Trägermaterials gezeigt werden konnte.
3. Unter Verwendung verschiedener Zelllinien, die zu kritischen Zeitpunkten der Striatogenese Rattenembryonen aus dem LGE entnommen wurden, konnten alters- bzw. stadienspezifische Unterschiede im neuronalen und glialen Differenzierungspotenzial nachgewiesen werden und somit kann von intrinsischen Unterschieden der Zellen ausgegangen werden.
4. Es besteht ein unterschiedlich großer Einfluss von Cytodex und den verschiedenen Medien auf Neuro- und Gliogenese. Die Nutzung der kollagenhaltigen Matrix führte insbesondere zu einer verstärkten Gliogenese.

## **Danksagung**

---

Meiner allererster Dank geht an Herrn PD. Dr. rer. nat. C. Andressen, für die Vergabe des Themas der Promotion und der Möglichkeit der Durchführung der Experimente. Er stand mir nicht nur jederzeit mit praktischem Rat sowie hilfreichen Anregungen zum experimentellen Teil der Arbeit zur Verfügung, sondern auch mit seiner Bereitschaft zur Diskussion der hier erhobenen Befunde im Kontext aktueller Forschung auf dem Gebiet der Neuroembryologie. Ich möchte mich an dieser Stelle für unsere lange Zusammenarbeit von ganzem Herzen bedanken.

Außerdem standen mir am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock mit Frau Jana Weißmüller sowie Herrn Johannes Wurm (MSc) motivierte KollegInnen zur Seite, die mir wertvolle praktische Unterstützung in der Zeit im Labor haben zukommen lassen. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Paul Schlüter, der als mein Kommilitone und Laborpartner stets für einen teils nötigen Motivationsschub gesorgt hat.

Trotz dieser ganzen Unterstützung bin ich im besonderen Maße meiner Familie dankbar, die mir vor allem Mut und Durchhaltevermögen zugesprochen haben. Ohne sie wäre das nicht möglich gewesen.

**Eidesstattliche Versicherung**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

**Münster**

---

**Kevin Albers**

---