

Aus dem Institut für Tierökologie & Zellbiologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und
der Abteilung Neuroanatomie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Etablierung der Isolierung, selektiven Anreicherung und Transfektion
adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen
zur Überexpression von FGF-2-Isoformen

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Christina Mauritz
aus Oldenburg

Hannover 2005

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Gerd Bicker
Prof. Dr. Claudia Grothe

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bicker
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Steinlechner

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juni 2005

Die vorliegende Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Gr 857/15-3, Prof. Dr. C. Grothe), die Kogge-Stiftung für veterinärmedizinische Forschung Gießen (Dr. K. Haastert) und durch ein Promotionsstipendium des Evangelischen Studienwerks e.V. Villigst (C. Mauritz).

Meiner Familie und meinen Freunden gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	4
1. Nervensystem und Nervengewebe.....	4
1.1 Schwann-Zellen.....	4
2. Verletzungen peripherer Nerven.....	6
3. Waller-Degeneration, axonale Regeneration und Neurombildung.....	9
4. Herkömmliche Therapien und „Tissue Engineering“.....	12
5. Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2).....	16
6. Konzeptioneller Hintergrund der vorliegenden Arbeit.....	18
7. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	18
III. Material und Methoden	20
1. Versuchstiere.....	20
2. Isolierung von Schwann-Zellen aus adulten Ratten.....	20
2.1 <i>In vivo</i> -Prädegeneration des Nervus (N.) ischiadicus adulter Ratten.....	20
2.2 Entnahme des N. ischiadicus bzw. des distalen N. ischiadicus-Stumpfes adulter Ratten.....	22
2.3 <i>In vitro</i> -Prädegeneration des N. ischiadicus adulter Ratten.....	23
2.4 Dissoziation des peripheren Nervenmaterials adulter Ratten.....	23
3. Isolierung von adulten Schwann-Zellen aus humanem Nervengewebe.....	25
3.1 Humanes Nervengewebe.....	25
3.2 Isolierung von Nervenfaszikeln aus humanem Nervengewebe.....	25
3.3 <i>In vitro</i> -Prädegeneration humaner Nervenfaszikel.....	26
3.4 Dissoziation humaner Nervenfaszikel.....	26
4. Kultivierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	26
4.1 Kulturplatten und -medium.....	26
4.2 Zellaussaat/Zelldichte.....	28
5. Selektive Anreicherung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	29
5.1 Methode 1: Dynabeads® Pan Mouse IgG.....	29
5.2 Methode 2: Cold jet.....	30

6. Immunzytochemie.....	31
6.1 Reinheit adulter Schwann-Zell-Kulturen.....	32
6.1.1 Markierung adulter Ratten-Schwann-Zellen	32
6.1.2 Markierung adulter humaner Schwann-Zellen	33
6.2 Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen	34
7. Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	35
7.1 Methode 1: Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion.....	35
7.2 Methode 2: Lipid-vermittelte Transfektion	36
7.3 Methode 3: Elektroporation	37
7.3.1 Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen	40
8. Quantifizierung der Kulturreinheit, der Proliferations- und Transfektionsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	41
9. Statistische Auswertung.....	42
IV. Ergebnisse	43
Ergebnisse A: adulte Schwann-Zellen der Ratte	43
1. Zellausbeute nach unterschiedlicher Vorbehandlung des Nervenmaterials adulter Ratten.....	43
2. Zellvitalität nach Dissoziation	44
3. Zellaussaat.....	45
4. Selektive Anreicherung adulter Ratten-Schwann-Zellen.....	46
5. Reinheit adulter Ratten-Schwann-Zell-Kulturen	47
6. Proliferationsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen.....	49
7. Transfektionsraten neonataler und adulter Ratten-Schwann-Zellen.....	50
7.1 Transfektion adulter Ratten-Schwann-Zellen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen.....	52
Ergebnisse B: adulte Schwann-Zellen des Menschen	53
1. Zellausbeute nach unterschiedlicher Vorbehandlung des humanen Nervenmaterials...	53
2. Qualität der Dissoziation in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.....	54
3. Zellvitalität nach Dissoziation	55
4. Zellaussaat.....	55
5. Reinheit adulter humaner Schwann-Zell-Kulturen.....	56
6. Proliferationsraten adulter humaner Schwann-Zellen.....	57

7. Transfektionsraten adulter humaner Schwann-Zellen	59
7.1 Transfektion adulter humaner Schwann-Zellen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen.....	60
V. Diskussion	62
1. Optimierung der Methoden zur Isolierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen aus peripherem Nervenmaterial	62
1.1 Direkte Dissoziation und <i>in vitro</i> -Prädegeneration des adulten peripheren Nervenmaterials	62
1.2 <i>In vivo</i> -Prädegeneration des peripheren Nervenmaterials adulter Ratten.....	64
1.3 Prädegeneration des peripheren Nervenmaterials als effiziente Isolierungs- methode.....	65
1.4 Auswirkung der unterschiedlichen Vorbehandlung von adultem peripheren Nervengewebe	66
2. Kultivierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	68
2.1 Beschichtung der Kulturplatten	68
2.2 Optimale Aussaatdichte	69
2.3 Selektive Kulturbedingungen unter Verwendung eines definierten serumfreien Kulturmediums	70
3. Reinheit adulter Schwann-Zell-Kulturen der Ratte und des Menschen.....	72
3.1 Charakterisierung adulter Schwann-Zellen anhand spezifischer Markerproteine...	72
3.2 Strategien zur selektiven Anreicherung adulter Schwann-Zellen.....	74
4. Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen	78
4.1 Verfahren zur Bestimmung der Proliferationsrate adulter Schwann-Zellen	78
4.2 Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des adulten peripheren Nervenmaterials und von den verwendeten Medienzusätzen	79
5. Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen.....	83
5.1 Etablierung der Elektroporation als effiziente Transfektionsmethode für adulte Schwann-Zellen	83
5.2 Produktion FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen.....	85
6. Schlussbetrachtung	86
VI. Zusammenfassung	93
VII. Summary	96
VIII. Literaturverzeichnis	98
Anhang	111

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ara-C	cytosine arabinoside
BPE	bovines Hypophysenextrakt
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-uridine
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Choleratoxin
Cy TM -2	Cyanin
Cy TM -3	Indocarbocyanin
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindole
DH	Dunkelheit
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DsRed	<i>Discosoma</i> Red Fluorescent Protein
EGF	epidermal growth factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
F	Farad
Fc	kristalline Fragmente
FCS	fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor-2
FGFR	hochaffine Tyrosinkinase-Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren
FK	Forskolin
g	Erdbeschleunigung
GGF	glial growth factor
GZZ	Gesamtzellzahl
HMW	höhermolekulare (21 und 23 kDa) Isoformen des FGF-2

[r]HRG	[rekombinantes] Heregulin
IgG	Immunglobulin G
kDa	KiloDalton
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
N.	Nervus
N-CAM	neural cell adhesion molecule
Nn.	Nervi
p75 ^{LNGFR}	niedrig affiner Nervenwachstumsfaktorrezeptor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	peripheres Nervensystem
PORN	Poly-L-Ornithin
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SE	seeding efficiency
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
U	Unit
vgl.	vergleiche
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTL	Zentrales Tierlabor

Statistische Größen

n	Anzahl der Versuche
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau)
SD	Standardabweichung
\bar{x}	Mittelwert

I. Einleitung

I. Einleitung

Verletzungen peripherer Nerven, verursacht unter anderem durch Verkehrsunfälle, die mit einer vollständigen Durchtrennung nervaler Strukturen und dem Funktionsausfall der entsprechenden Endorgane (Motorik, Hautsensibilität) einhergehen, zeigen normalerweise keine spontane Heilung. Die körpereigenen Regenerationskapazitäten reichen meistens nicht aus, die Distanz zwischen den entstandenen Nervenstümpfen zu überbrücken, so dass ohne einen operativen Eingriff die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung ausbleibt. Nach Verletzungen, die zu keinem oder nur zu einem geringen Substanzverlust geführt haben, wird eine direkte Anastomose der beiden Stümpfe über eine Nervennaht angestrebt. Größere Verluste an Nervengewebe machen eine solche, möglichst spannungsfreie Adaptation der Nervenstümpfe zunichte. In diesen Fällen wird autologes (körpereigenes) Nervenmaterial zur Überbrückung der Defektstrecken eingesetzt. Dieser Methode als Mittel der Wahl sind Grenzen gesetzt. Zum einen können Qualitätsunterschiede zwischen Spender- und Empfängernerv (motorisch/sensibel) bestehen und zum anderen führt die Autotransplantation zu einem Funktionsausfall des Spendernervens. Autologes Nervengewebe steht also nicht unbegrenzt zur Verfügung. Gerade bei großem Substanzverlust bzw. der gleichzeitigen Verletzung mehrerer Nerven wie z.B. bei Läsionen des Armnervengeflechtes (Plexus brachialis) ist diese Methode nicht umfassend anwendbar. Ein alternatives therapeutisches Konzept bildet die Implantation von Schwann-Zellen, welche eine große Rolle bei der körpereigenen Nervenregeneration spielen. Diese Zellen konnten experimentell aus Biotaten peripherer Nerven gewonnen, in Kultur expandiert und innerhalb artifiziell hergestellter Nerveninterponate zwischen die Stümpfe verletzter Nerven implantiert werden. Im Rahmen dieses so genannten „Tissue engineering“ führten im Tiermodell eingesetzte Schwann-Zellen zur erfolgreichen Regeneration großer, nicht spontan heilbarer Defektstrecken peripherer Nerven (ANSSELIN et al., 1997). Ähnliche Erfolge wurden durch die Freisetzung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2), einer neurotrophen Substanz, aus synthetischen Nerveninterponaten erzielt (AEBISCHER et al., 1989).

I. Einleitung

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Claudia Grothe befasst sich neben Untersuchungen zu den spezifischen biologischen Funktionen der kommerziell erhältlichen 18 kDa-Isoform und der im eigenen Labor hergestellten höhermolekularen 21 und 23 kDa (HMW)-Isoformen des FGF-2 auch mit therapeutischen Konzepten zur Wiederherstellung peripherer Nerven. Hierzu wurde ein Regenerationsmodell bei der adulten Ratte etabliert, in dem die Effekte der Überexpression von FGF-2-Isoformen durch transplantierte neonatale Schwann-Zellen der Ratte auf die periphere Nervenregeneration bei einer großen Nervenunterbrechung von 15 mm untersucht werden. So sollen die regenerationsfördernden Eigenschaften von Schwann-Zellen mit denen eines neurotrophen Faktors (FGF-2-Isoformen) kombiniert werden. Die hierfür benötigten Schwann-Zellen werden aus dem Nervus ischiadicus neugeborener Ratten gewonnen, hoch aufgereinigt und im nächsten Schritt genetisch so verändert (transfiziert), dass sie die FGF-2-Isoformen überexprimieren. Der regenerationsfördernde Effekt der HMW-FGF-2-Isoformen auf die periphere Nervenregeneration konnte so gezeigt werden (TIMMER et al., 2003; LIPOKATIC et al., 2004).

Für eine spätere klinische Anwendung dieses Regenerationsmodells sollten die verwendeten Schwann-Zellen optimalerweise autolog (körpereigen) sein, das heißt, sie sollten aus einem peripheren Nervenbiopat des betroffenen Patienten (häufig junge Erwachsene nach Motorradunfällen) gewonnen und nach Vermehrung und Transfektion in Kultur reimplantiert werden. Die Verwendung autologer Schwann-Zellen würde keine Abstoßungsreaktionen nach sich ziehen, zudem stehen neonatale humane Schwann-Zellen in der Regel nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund ist es von großer Relevanz, auch Schwann-Zellen von Erwachsenen (adulte Schwann-Zellen) in ausreichender Menge kultivieren und transfizieren zu können.

Die Schwierigkeiten bei der Kultivierung adulter Schwann-Zellen liegen zum einen in der Kontamination der Kulturen durch stark proliferierende Bindegewebszellen, den Fibroblasten, und zum anderen in der fehlenden Teilungsaktivität der postmitotischen Schwann-Zellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Versuche an Schwann-Zellen der adulten Ratte durchgeführt und die gewonnenen Erfahrungen auf adulte humane Schwann-Zellen übertragen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die

I. Einleitung

Etablierung der Isolierung, selektiven Anreicherung und Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen. Berücksichtigt wurde dabei vor allem die klinische Anwendbarkeit der Methoden. Zudem lag der Fokus auf einer möglichen Verkürzung der Kultivierungsphase, um durch eine frühe Reimplantation der Schwann-Zellen die Regenerationsdauer nach peripherer Nervenverletzung zu verkürzen und dadurch irreversible Degenerationsprozesse (Zerfall intramuskulärer Nervenscheiden, Muskelatrophie) verhindern zu können.

II. Literaturübersicht

II. Literaturübersicht

1. Nervensystem und Nervengewebe

Das Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Die Summe aller animaler und vegetativer Nerven einschließlich der peripheren Nervenzellansammlungen (sensible und vegetative Ganglien) außerhalb des ZNS bildet das periphere Nervensystem (PNS) (LEONHARDT, 1990).

Nervengewebe besteht aus Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen. Neurone besitzen Fortsätze (Axone und Dendriten), die durch spezifische Zellkontakte (Synapsen) mit anderen Neuronen, mit Rezeptoren (Sensoren) oder mit Effektoren („Befehlsempfängern“, z.B. Muskelfasern) verbunden sind. Ein besonderes Merkmal des Neurons besteht darin, dass eine durch physikalische oder chemische Reize induzierte elektrische Erregung der Plasmamembran entlang eines Fortsatzes rasch über lange Strecken fortgeleitet und mittels Synapsen auf andere Neurone übertragen werden kann (LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

Es gibt etwa zehnmals mehr Gliazellen als Neurone. Die Gliazellen sind für den Erhalt und die Funktion der Nervenzellen zuständig. Die unterschiedlichen Typen von Gliazellen besitzen, je nach Lokalisation im zentralen oder peripheren Nervensystem, spezifische Aufgaben (LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

1.1 Schwann-Zellen

Schwann-Zellen sind Gliazellen des PNS. Sie umhüllen innerhalb der peripheren Nerven somato- und viszeromotorische und somato- und viszerosensible Axone. Die Axone sind periphere Fortsätze der Neurone des ZNS bzw. der Ganglien und innervieren die Gewebe und Organe. Die Einheit aus Axon und zugehöriger Gliahülle wird als Nervenfasern bezeichnet. Die einzelnen Nervenfasern werden von einem Kollagenfasern führenden Bindegewebe, dem Endoneurium umhüllt. Bündel von Nervenfasern werden durch das straffe Bindegewebe des Perineuriums zu Faszikeln zusammengefasst. Außen verbindet

II. Literaturübersicht

das aus lockerem Bindegewebe bestehende Epineurium die Faszikel zu einem einheitlichen Nerven (LEONHARDT, 1990; LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

Die Schwann-Zellen existieren in zwei verschiedenen Formen: myelinisierend oder nicht-myelinisierend. Nicht-myelinisierende Schwann-Zellen umhüllen gleichzeitig mehrere dünne Axone (marklose Nervenfasern). Ab einem bestimmten Durchmesser werden einzelne Axone von einer Myelin- oder Markscheide umhüllt (markhaltige Nervenfasern). Die Myelinscheide ist aus zahlreichen konzentrischen Lipid-Protein-Lamellen aufgebaut und entsteht dadurch, dass myelinisierende Schwann-Zellen das Axon mit einem breitflächigen Ausläufer spiralig umwickeln. Dabei umhüllt jede Schwann-Zelle jeweils nur ein Axon entlang einer bestimmten Strecke, dem Internodium. Die Myelinsegmente sind in regelmäßigen Abständen durch kurze myelinfreie Zonen, den Ranvier-Schnürringen, unterbrochen. Die internodale Plasmamembran des Axons ist gegenüber der Umgebung isoliert, im Bereich der Schnürringe fehlt die Isolierung. Die Myelinscheide liefert die physikalische Voraussetzung für die rasche Erregungsleitung entlang eines Axons. Die elektrische Erregungsleitung springt von einem Schnürring zum nächsten (saltatorische Erregungsleitung) und pflanzt sich dadurch auf myelinisierten Axonen mit viel höherer Geschwindigkeit fort als auf marklosen Axonen (LEONHARDT, 1990; LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

Die axonalen Signale bestimmen, zu welchem Phänotyp (myelinisierend oder nicht-myelinisierend) sich die unreife Schwann-Zelle postnatal entwickelt (MIRSKY u. JESSEN, 1999; MIRSKY et al., 2002). Die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps ist reversibel. Durch den Verlust des axonalen Kontaktes, z.B. nach einer Nervenverletzung, dedifferenzieren die Schwann-Zellen, um dann Kontakt zu den wieder auswachsenden Axonen aufzunehmen. Sie besitzen die Kapazität, erneut entweder den myelinisierenden oder den nicht-myelinisierenden Phänotyp auszubilden. Letzteres wird wiederum über Signale des assoziierten Axons vermittelt (BUNGE, 1993).

Der Nervus (N.) ischiadicus von männlichen Wistar Ratten besteht aus ca. 27.000 Axonen, davon sind 6 % myelinisierte motorische Axone, 23 % myelinisierte und 48 % nicht-myelinisierte sensible Axone und 23 % unmyelinisierte sympathische Fasern (SCHMALBRUCH, 1986).

II. Literaturübersicht

Die Axone der präganglionären Neurone des vegetativen Nervensystems sind von Markscheiden umhüllt, während die der postganglionären Neurone marklos sind (ZILLES u. REHKÄMPER, 1994).

2. Verletzungen peripherer Nerven

Läsionen peripherer Nerven können durch mechanische Einwirkungen verursacht werden. Es wird dabei zwischen scharfen und stumpfen Gewalteinwirkungen unterschieden. Erstere führen zu Stich-, Schnitt- und Sägeverletzungen, letztere zu Druck- und Dehnungsschäden verursacht durch Unfall, Operation oder Lagerung (STÖHR u. KRAUS, 2002). Daneben können Schädigungen peripherer Nerven auch durch Tumorbildung, virale Infektionen oder Entzündungen hervorgerufen werden (STOLL u. MULLER, 1999; SCHLOSSHAUER et al., 2003).

Neben der Verletzung einzelner peripherer Nerven können auch ganze Nervengeflechte betroffen sein. Als Beispiel seien Traumata des Armnervengeflechtes (Plexus brachialis) genannt, die am häufigsten durch Verkehrsunfälle entstehen. Zu ca. 80-90 % handelt es sich dabei um Motorradunfälle. Unfälle bei der Arbeit, beim Fahrradfahren und als Fußgänger sind weniger häufig. Die betroffenen Patienten sind überwiegend jung, zwischen 16-25 Jahre (CARVALHO et al., 1997; MILLESI, 1997).

Bei Plexus brachialis-Läsionen können Kontinuitätsunterbrechungen von Nervenstrukturen im Bereich der Nervenwurzeln, der Spinalnerven, der Trunci und Fasciculi des Plexus und der aus dem Plexus entspringenden Nerven auftreten (NIKKHAH et al., 1997b; SAMII et al., 1997). Meistens sind Plexus brachialis-Läsionen Teil eines polytraumatischen Geschehens mit Knochenbrüchen, Gefäßverletzungen, Weichteilverletzungen im Bereich der oberen Extremität und Verletzungen am Schädel, Thorax und den unteren Extremitäten (MILLES, 1997; NIKKHAH et al., 1997b). Als erstes ist die Versorgung der lebensbedrohlichen Verletzungen angezeigt. Eine chirurgische Exploration von Plexus brachialis-Läsionen ist innerhalb der ersten Tage nach dem Unfall am einfachsten durchzuführen, aber etwa nur die Hälfte der Patienten kommt aufgrund der multiplen Verletzungen für eine frühe rekonstruktive Operation in Betracht (VAN DER

II. Literaturübersicht

WERKEN u. DE VRIES, 1993). Die Plexus brachialis-Verletzung wird also in der Regel zunächst konservativ behandelt und erst nach Besserung des Allgemeinbefindens kann eine genaue Diagnose über Ausmaß und Lokalisation der Läsion gestellt und über weitere Behandlungsmaßnahmen (konservativ oder operativ) entschieden werden (MILLES, 1997).

Die Zeitspanne zwischen der Entstehung der Läsion und dem chirurgischen Eingriff spielt dabei eine große Rolle im Hinblick auf das operative Endergebnis. SAMII et al. (1997) haben gezeigt, dass Patienten, die sich einer Operation 12 Monate nach der Verletzung unterzogen, ein schlechteres Ergebnis bezogen auf die Wiederherstellung der Armfunktionen zeigten als Patienten, die früher (1-6 Monate) behandelt wurden.

Nicht nur bei den meist jungen Erwachsenen, sondern auch bei Neugeborenen kann es zu Verletzungen des Plexus brachialis kommen. Eine solche geburtstraumatische Läsion tritt in 0,05-0,3 % der Geburten auf. Als Prädisposition kommen ein Geburtsgewicht des Kindes von über 4000 g, eine Steißlage, anatomische Varianten im Bereich des Geburtsweges der Frau und Notfallsituationen während der Geburt mit Bedrohung für Kind und/oder Mutter in Frage (BERGER et al., 1997).

Bei Kleintieren treten Verletzungen peripherer Nerven u.a. nach Autounfällen, Frakturen, Schussverletzungen, Bisswunden oder iatrogen bedingt auf. Berichtet wird von Plexus brachialis-Läsionen, Verletzungen des N. ischiadicus und der Nerven des Sakrozygealbereiches (WELCH, 1996).

Nervenschädigungen wurden nach SEDDON (1943) in drei verschiedene Schweregrade eingeteilt: unter Neurapraxie wird eine funktionelle Blockade der Axonleitfähigkeit verstanden, die Axonotmesis beschreibt eine Kontinuitätsunterbrechung der Axone unter Erhalt der äußeren Nervenhülle und bei der Neurotmesis ist die Kontinuität des gesamten Nervens unterbrochen. Die Neurapraxie hat eine günstige Prognose, es kommt in der Regel innerhalb von Stunden bis Wochen zu einer kompletten funktionellen Wiederherstellung, Restitutio ad integrum. Auch bei einer Axonotmesis kann eine spontane Regeneration stattfinden, welche aber wesentlich langsamer verläuft als bei einer Neurapraxie. Führt eine Verletzung zu einer vollständigen Durchtrennung eines Nervens (Neurotmesis) ist normalerweise keine spontane Regeneration mehr möglich. Eine

II. Literaturübersicht

Erweiterung der Klassifizierung nach SEDDON (1943) wurde von SUNDERLAND (1951) vorgenommen. Er bezeichnete Neurapraxia und Axonotmesis als Grad I bzw. Grad II, Neurotmesis als Grad V und fügte einen Grad III und IV hinzu. Beim Grad III werden Axon und Endoneurium zerstört, während das Perineurium erhalten bleibt. Es kommt zu spontaner Reinnervation, die mit möglichen Fehlaussprossungen aufgrund einer fehlenden Leitstruktur (Endoneurium) einhergehen kann. Grad IV umfasst eine Läsion des Axons, des Endo- und des Perineuriums mit Aufhebung der Faszikelstruktur. Die spontane Regeneration und die Funktionsrückkehr sind deutlich eingeschränkt oder können ganz ausbleiben (NIKKHAH et al., 1997b; MUMENTHALER et al., 1998).

Nach Läsionen, die zu einer vollständigen Nervendurchtrennung geführt haben, ist die Fähigkeit der Axone funktionelle Kontakte wiederherzustellen von der Distanz abhängig, über die hinweg sie auswachsen müssen, um den Nervendefekt zu überbrücken (NAVARRO et al., 2003).

LUNDBORG et al. (1982) zeigten als erste, dass Axone durch ein leeres Silikonröhrchen, implantiert zwischen die Stümpfe des durchtrennten N. ischiadicus der adulten Ratte, regenerieren konnten, wenn der Abstand zwischen dem proximalen und dem distalen Stumpf 10 mm betrug. Wurde die Nervenlücke auf 15 mm erhöht, fand keine spontane Regeneration mehr statt. Der distale Stumpf beeinflusste dabei die proximale Regeneration nur über eine begrenzte Distanz hinweg.

Bei adulten Mäusen wurde die beste Regenerationsrate des N. ischiadicus nach der Implantation von Silikonröhrchen bei einem Abstand der Nervenstümpfe von 4 mm beobachtet, war der Abstand 8 mm oder größer, fand keine erfolgreiche Regeneration mehr statt (BUTI et al., 1996). MACKINNON u. DELLON (1990) berichteten von der Regeneration eines 30 mm großen Defektes des N. ulnaris von adulten Primaten, wenn leere synthetische Nerveninterponate eingesetzt wurden. Wurde die Größe der Nervenlücke auf 50 mm erhöht, war die Regeneration stark reduziert.

Verletzungen peripherer Nerven resultieren je nach Ausmaß in partieller oder totaler Beeinträchtigung motorischer und sensibler Funktionen des animalen und vegetativen Nervensystems (NAVARRO et al., 2003). Die Durchtrennung von motorischen Axonen führt zur Denervierung und anschließender Atrophie der betroffenen Muskulatur. Für die

II. Literaturübersicht

proximalen Muskelgruppen des Menschen liegt die maximal tolerierbare Zeitspanne zwischen Nervendurchtrennung und Wiederherstellung der neuromuskulären Kontakte zwischen 12 und 18 Monaten. Das Risiko, dass vor der Reinnervation Muskelatrophie und Sehnenkontrakturen auftreten, ist umso höher, je größer die Distanz zwischen dem Ort der Nervenverletzung und dem Endorgan (Muskel) ist (WELCH, 1996). Weit proximal gelegene Nervenverletzungen gehen zudem mit einer erhöhten Neuronensterblichkeit einher (IJKEMA-PAASSEN et al., 2002).

Die Regeneration von verletzten peripheren Nerven mit anschließender Funktionswiederherstellung ist also abhängig vom Zeitpunkt der Diagnose und des Therapiebeginns (SAMII et al., 1997) und vom Ort und der Art der Verletzung (NAVARRO et al., 2003).

3. Waller-Degeneration, axonale Regeneration und Neuombildung

Durchtrennungen einzelner Nervenfasern oder ganzer Nerven lösen einen Prozess aus, den man als Waller-Degeneration bezeichnet und der mit einer anterograden Degeneration des distalen Axonabschnittes einhergeht. Die Fragmentation der Axone beginnt am Ort der Faserdurchtrennung und verläuft nach distal mit einer Geschwindigkeit, die der Dicke und der Internodallänge der betroffenen Faser umgekehrt proportional ist. Mit der Auflösung der Axone kommt es auch zum Zerfall der Markscheiden. Der Abbau der Markscheiden erfolgt durch die Schwann-Zellen selbst, in zunehmendem Maße aber auch durch einwandernde Makrophagen. Bereits 10 bis 21 Tage nach der Durchtrennung erstreckt sich die Waller-Degeneration bis zum Endorgan, z.B. der motorischen Endplatte, und die Muskelfasern im Zielgebiet werden infolge der Denervierung atrophisch (MUMENTHALER et al., 1998). Durch den Verlust des axonalen Kontaktes dedifferenzieren myelinisierende Schwann-Zellen zu einem nicht-myelinisierenden Phänotyp, welches sich in der differentiellen Regulation bestimmter Faktoren, z.B. der Runterregulierung von protein zero (Bestandteil des Myelins) oder der Hochregulierung des niedrig affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptors ($p75^{LNGFR}$), äußert (STOLL u. MULLER, 1999).

II. Literaturübersicht

Parallel zum Axon- und Markscheidenzerfall proliferieren die Schwann-Zellen, ordnen sich innerhalb des verbliebenen Neurilemms (bindegewebige Nervenfasershülle) linear an und bilden die so genannten Büngner-Bänder. Diese dienen als eine Art Leitschiene für die regenerierenden Axone in Richtung des zu reinnervierenden Erfolgsorgans. Die Regeneration geht von intakt gebliebenen Axonen im proximalen Stumpf aus. Letzterer ist im Gegensatz zum distalen Stumpf mit den Perikaryen der Nervenzellen weiterhin verbunden und bleibt somit erhalten. Die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration ist dabei abhängig von der Art der Nervenverletzung, vom Typ der verletzten Nervenfasern, vom Alter und der Spezies des betroffenen Individuums. Die Ausprossungsgeschwindigkeit der Axone ist nach einer Verletzung mit intakt gebliebener Nervenöhle größer im Vergleich zu der nach einer vollständigen Nervendurchtrennung. Außerdem werden schnellere Regenerationsgeschwindigkeiten in proximalen Nervenabschnitten festgestellt, die mit zunehmender Distanz vom neuronalen Zellkörper progressiv langsamer werden. Zudem ist die Regenerationsgeschwindigkeit in jungen Individuen höher. In der Literatur gemachte Angaben über die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration schwanken zwischen 1-5 mm/Tag. Sobald die Axonsprossen den distalen Stumpf erreicht haben, dringen sie in die Büngner-Bänder ein (FU u. GORDON, 1997; MUMENTHALER et al., 1998).

Die Schwann-Zellen stellen ein neurotrophes, d.h. die axonale Regeneration förderndes, Milieu bereit, indem sie einen Cocktail aus Wachstumsfaktoren wie z.B. nerve growth factor, brain derived neurotrophic factor (FU u. GORDON, 1997; EVANS, 2001) oder auch Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) produzieren (GROTHE et al., 2001). Der Kontakt zu den wieder auswachsenden Axonen wird über Adhäsionsmoleküle wie z.B. L1, N-cadherin und neural cell adhesion molecule (N-CAM) hergestellt, welche auf der Oberfläche der Schwann-Zellen exprimiert werden (FANSA et al., 1999a; STOLL u. MULLER, 1999; EVANS, 2001).

Die axonale Regeneration führt zur Redifferenzierung der Schwann-Zellen, welche in einer proximo-distalen Richtung von der Stelle der Nervenverletzung aus fortschreitet. In den Schwann-Zellen werden dabei die Dedifferenzierungsmarker wie z.B. L1, N-CAM und p75^{LNGFR} wieder herunterreguliert (STOLL u. MULLER, 1999). Die

II. Literaturübersicht

Remyelinisierung der regenerierenden Axone wird durch den Kontakt zwischen Axolemm (Plasmamembran des Axons) und Schwann-Zelle ausgelöst. Diese Interaktion induziert die Bildung von myelin-assoziierten Proteinen in den Schwann-Zellen und die Spiralisierung der Myelinscheide (FU u. GORDON, 1997).

Regenerierte Nervenfasern zeigen meist einen Funktionsverlust. So erreicht die Erregungsleitung in den regenerierten Axonen nicht mehr die Geschwindigkeit wie in unverletzten Axonen. Dies kann durch die abnormal kurze internodale Distanz zwischen den Myelinscheiden erklärt werden, die auf die 3fache Erhöhung der Schwann-Zell-Zahl im distalen Stumpf nach Nervenverletzung zurückzuführen ist (FU u. GORDON, 1997). Zusätzlich spielt der zeitliche Abstand zwischen der Durchtrennung eines peripheren Nervens und der Reinnervation des Erfolgsorgans eine große Rolle im Hinblick auf eine vollständige Funktionswiederherstellung. Nach einer Langzeitdenervierung ist die Anzahl der motorischen Axone, welche Muskelfasern reinnervieren, hochgradig reduziert. Dies wird auf den Verfall der intramuskulären Nervenscheiden zurückgeführt. Zudem bleibt eine vollständige Regeneration der atrophierten Muskelfasern aus, so dass die volle Muskelkraft nach der Reinnervation nicht wiedererlangt wird (FU u. GORDON, 1995). Eine Regeneration mit zielgerichteter Reinnervation ist außerdem nur dann gegeben, wenn die Axone ihre originalen Schwann-Zell-Säulen in den Büngner-Bändern antreffen. Gelangen die regenerierenden Axone nicht in die zugehörige „Leitschiene“, erreichen sie ein falsches Zielgebiet, wodurch paradoxe Innervationsmuster entstehen. (MUMENTHALER et al., 1998).

Infolge einer vollständigen Durchtrennung eines Nervens kommt es häufig, aufgrund der längselastischen Eigenschaften des Epi- und Perineuriums, zu einer beträchtlichen Distanz zwischen den entstandenen Stümpfen. Erfolgt kein operativer Eingriff, gelingt es den proximal auswachsenden Axonen beim Menschen meistens nicht, den distalen Stumpf zu erreichen. Die regenerierenden Fasern verlieren dann bei Fehlen einer „Leitschienenstruktur“ ihre proximodistale Ausrichtung, verirren sich im Narbenbindegewebe, wachsen knäuelartig durcheinander und bilden mit dem Narbengewebe einen kleinen derben Tumor, das Narbenneurom (MUMENTHALER et al., 1998).

II. Literaturübersicht

4. Herkömmliche Therapien und „Tissue Engineering“

Nach Verletzungen peripherer Nerven, die zu einer glatten Durchtrennung bzw. zu geringem Substanzverlust des Nervengewebes geführt haben, ist die direkte spannungslose Anastomose der Nervenstümpfe über eine Epineuralnaht oder die Verbindung einzelner Faszikel (Perineuralnaht) das Mittel der Wahl. Dieser Methode sind Grenzen gesetzt, wenn durch große Substanzverluste oder durch Nervenretraktion eine spannungsfreie direkte End-zu-End-Naht nicht mehr möglich ist. In diesen Fällen müssen Transplantate zur Überbrückung des Nervendefektes eingesetzt werden (FLORES et al., 2000; IJKEMA-PAASSEN et al., 2002; NAVARRO et al., 2003).

Es ist bekannt, dass Kontinuitätsunterbrechungen peripherer Nerven bisher am erfolgreichsten durch autologes (körpereigenes) Nervenmaterial überbrückt werden können, da dieses immunkompatibel ist und sich auf ähnliche Weise wie der distale Stumpf eines verletzten Nervens, also regenerationsfördernd verhält. Die Problematik besteht hierbei, neben der Notwendigkeit eines zweiten chirurgischen Eingriffs, in dem verursachten Funktionsausfall des Spendernervens, den Qualitätsunterschieden zwischen Spender- und Empfängerneuron und der dadurch insgesamt begrenzten Verfügbarkeit autologen Materials. Gerade bei ausgeprägtem Substanzverlust bzw. der gleichzeitigen Verletzung mehrerer Nerven wie z.B. bei Plexus brachialis-Läsionen ist diese Methode nicht ausreichend anwendbar (FLORES et al., 2000; IJKEMA-PAASSEN et al., 2002; NAVARRO et al., 2003).

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung allogenen Nervenmaterials (aus einem genetisch differenten Spender derselben Spezies). Der Nachteil liegt hierbei in dem indizierten Einsatz von Immunsuppressiva, um Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus zu unterdrücken. Sekundäre Begleiterscheinungen können den Erfolg einer solchen Transplantation zunichte machen (FLORES et al., 2000; EVANS, 2001; NAVARRO et al., 2003).

Eine weitere mögliche Behandlungsmethode stellt die Verlagerung eines peripheren (insbesondere motorischen) Nervens in ein neues Zielgebiet (Muskel) dar. Dieser Nerventransfer kommt zur funktionellen Wiederherstellung von Armfunktionen bei

II. Literaturübersicht

zervikalen Wurzelaustritten als Folge von posttraumatischen Armplexusläsionen zum Einsatz. In diesen Fällen werden gesunde Spendernerven (am häufigsten die Interkostalnerven) peripher durchtrennt und mit den distalen Nervenstämmen des Plexus brachialis anastomosiert. Diese so genannte Neurotisation ist ein Verfahren der zweiten Wahl, da nach einer erfolgreichen Reinnervation eine Verknüpfung von nicht synergistischen Nervenbahnen entsteht und die Patienten mit den neurotisierten Nerven neue Funktionen übernehmen müssen, was eines intensiven Trainings bedarf (NIKKHAH et al., 1997a).

Trotz des Fortschrittes auf dem Gebiet der Neurochirurgie ist die Heilung peripherer Nervenverletzungen nicht immer zufrieden stellend. Besonders nach komplexen Plexus brachialis-Läsionen bleibt die funktionelle Wiederherstellung auf die Hauptarmfunktionen beschränkt (SAMII et al., 1997). Die Verwendung von autologem Nervenmaterial zur spannungslosen Überbrückung der Defekte hat bei einer Vielzahl der Patienten zu einer nützlichen und andauernden Wiederherstellung der proximalen Schulterbewegungen und einer gewissen Schutzsensibilität für die distal gelegenen Armbereiche geführt. Hand- und Fingerbewegungen lassen sich hingegen mit den derzeitigen operativen Möglichkeiten funktionell nicht wiederherstellen (NIKKHAH et al., 1997b). Dies hat weitreichende Konsequenzen für die meist jungen Erwachsenen sowohl im beruflichen als auch im privaten Leben.

Die Prognose für Verletzungen des Plexus brachialis bei kleinen Haustieren ist ebenfalls eher schlecht, und da die Wiederherstellung der Funktion nur in wenigen Fällen gelingt, wird binnen vier bis sechs Monaten zur Amputation des betroffenen Vorderbeines geraten (WELCH, 1996).

Seitdem LUNDBORG et al. (1982) tierexperimentell zeigen konnten, dass bereits der Einsatz eines leeren Silikonröhrchens erfolgreich die periphere Nervenregeneration unterstützt, scheint die Verwendung artifizieller Nervenimplantate bei Läsionen peripherer Nerven mit größeren Substanzverlusten vielversprechend zu sein. In den letzten Jahren haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem so genannten „Tissue engineering“ beschäftigt und die verschiedensten artifiziellen Nervenimplantate hergestellt mit dem Ziel, diese als Alternative zu den begrenzt zur Verfügung stehenden autologen

II. Literaturübersicht

Nerventransplantaten in der Nervenregeneration einzusetzen (SCHACHNER, 2000). Solche „tissue engineered products“ sollten dem Aufbau natürlicher Nerventransplantate möglichst nahe kommen und aus vier wichtigen Komponenten bestehen: dem Gerüst (schlauch- oder röhrenförmiges Interponat) für gerichtetes axonales Wachstum, regenerationsunterstützenden Zellen (z.B. Schwann-Zellen), Wachstumsfaktoren und einer extrazellulären Matrix (EVANS, 2001).

Das Gerüst für ein solches Transplantat kann aus natürlichen oder synthetischen Materialien hergestellt werden. Die verschiedensten natürlichen Materialien wie z.B. Kollagen (MACKINNON u. DELLON, 1990; ANSSELIN et al., 1997; UDINA et al., 2004), Venen oder azelluläre Muskulatur (FANSA et al., 1999a; FANSA et al., 2001) wurden bisher experimentell untersucht. Der Vorteil von natürlichen Materialien liegt u.a. in der erhöhten Biokompatibilität und in der Reduzierung toxischer Effekte, handelt es sich dabei aber um nicht-autologes Gewebe, muss mit einer unerwünschten Immunantwort gerechnet werden (EVANS, 2001). Die Verwendung von Interponaten aus synthetischen Materialien bietet die Möglichkeit, diese in Bezug auf ihre Form und Größe, ihre Durchlässigkeit und ihre Degradation zu gestalten (EVANS, 2001). Man unterscheidet nicht-resorbierbare Materialien wie z.B. Silikon (LUNDBORG et al., 1982; CHEN et al., 2000) von resorbierbaren wie z.B. poly(DL-lactide-ε-caprolactone) (MEEK et al., 1997). Nicht-resorbierbare Materialien bringen ein höheres Risiko für Infektionen mit sich, rufen leichter eine chronische Entzündung hervor und haben das Potential, den regenerierenden Nerv zu komprimieren (SCHMIDT u. LEACH, 2003). Aus diesem Grund werden für klinische Ansätze resorbierbare Materialien bevorzugt, die zusätzlich den Vorteil bieten, dass keine weitere Operation zur Entfernung des Interponats nötig ist (RUTKOWSKI u. HEATH, 2002).

Ein häufig herangezogenes Modell zur Untersuchung der regenerationsunterstützenden Wirkung artifizieller Nerventransplantate ist die Durchtrennung des N. ischiadicus der erwachsenen Ratte oder der Maus und die Implantation von Interponaten zwischen die Nervenstümpfe für einen bestimmten Zeitraum mit anschließender Kontrolle der morphologischen und funktionellen Regeneration.

II. Literaturübersicht

Es hat sich gezeigt, dass artifizielle Nerven­transplantate, die mit regenerationsfördernden Substanzen (Bestandteilen der extrazellulären Matrix, neurotrophen Faktoren) und/oder Zellen befüllt waren, bessere Resultate in der peripheren Nervenregeneration erbrachten als leere Nerven­transplantate (LUNDBORG et al., 1982; ANSSELIN et al., 1997; CHEN et al., 2000; FINE et al., 2002). Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin und Fibronectin wurden von CHEN et al. (2000) erfolgreich als Füllmaterial eingesetzt. Die Verwendung neurotropher Faktoren wie z.B. glial cell line-derived neurotrophic factor (FINE et al., 2002) oder FGF-2 (AEBISCHER et al., 1989) erwiesen sich sogar bei einem großen Nervendefekt von 15 mm Abstand zwischen den Nervenstümpfen adulter Ratten als regenerationsfördernd, während in den als Kontrolle herangezogenen leeren Röhrchen keine Nervenregeneration beobachtet werden konnte. Die Verwendung von Schwann-Zellen als zelluläre Komponente eines artifiziellen Nerven­transplantates stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Nicht zuletzt basieren die Methoden der direkten Anastomose und der autologen Nerven­transplantation ebenfalls auf der Anwesenheit von Schwann-Zellen und deren regenerationsfördernden Eigenschaften (GUENARD et al., 1992).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in ihren tierexperimentellen Studien zeigen, dass der Einsatz von Schwann-Zellen in artifiziellen Interponaten die Regeneration peripherer Nerven unterstützt. Man muss hierbei zwischen der autologen, der syngen­en und der allogenen Transplantation differenzieren. Bei der autologen Transplantation werden Schwann-Zellen aus dem Gewebe eines Tieres entnommen, in Kultur vermehrt und anschließend reimplantiert. Unter der syngen­en Transplantation versteht man die Verwendung von genetisch identischen (desselben Inzuchtstammes) Spender- und Empfängertieren. Die allogene Transplantation beschreibt die Übertragung von Schwann-Zellen aus einem Spender- auf ein genetisch unterschiedliches Empfängertier derselben Spezies (JANEWAY u. TRAVERS, 1995).

GUENARD et al. (1992) fanden so heraus, dass syngene adulte Schwann-Zellen die periphere Nervenregeneration verbessern. Demgegenüber war der Erfolg der axonalen Regeneration bei der Transplantation allogener adulter Schwann-Zellen aufgrund einer starken Immunantwort vermindert. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass eine

II. Literaturübersicht

erfolgreiche Regeneration von der immunologischen Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger abhängig ist. Eine Arbeit von ANSSELIN et al. (1997) zeigte, dass der Einsatz syngener adulter Schwann-Zellen im N. ischiadicus-Modell der Ratte auch die Regeneration einer großen Nervenlücke (18 mm) bewirken kann.

Letztendlich wurden die besten Ergebnisse mit der Transplantation von autologen adulten Schwann-Zellen gefolgt von isogenen (Transplantation zwischen Geschwistertieren) und syngenen Schwann-Zellen im Modell zur Regeneration des N. ischiadicus der Maus nach großen Substanzverlusten (6 mm) erzielt, vergleichbar mit denen nach der Transplantation von autologem Nervenmaterial (NAVARRO et al., 2003).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ergibt sich für eine klinische Anwendung die Notwendigkeit, genügend autologe adulte humane Schwann-Zellen zu gewinnen. Es wurde bereits beschrieben, dass aus adulten humanen peripheren Nerven isolierte Schwann-Zellen, die in immundefiziente Ratten oder Mäuse transplantiert wurden, die axonale Regeneration im peripheren Nervensystem verstärkten und zudem weiterhin die Kapazität besaßen, regenerierte Axone zu myelinisieren (LEVI u. BUNGE, 1994; LEVI et al., 1994).

5. Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) gehört zur FGF-Familie, welcher derzeit 23 verschiedene Polypeptide zugeordnet werden. Die FGFs haben während der embryonalen Entwicklung unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen. Im erwachsenen Organismus spielen sie eine Rolle in der Aufrechterhaltung und der Regeneration der Gewebe. (GROTHER u. NIKKHAH, 2001; ORNITZ u. ITOH, 2001; MALECKI et al., 2004).

Bei der Ratte sind drei Isoformen von FGF-2 beschrieben: eine kommerziell erhältliche mit niedrigem Molekulargewicht (18 kDa-Isoform) und zwei mit hohem Molekulargewicht (21 und 23 kDa [HMW]-Isoformen). Hierbei handelt es sich um unterschiedliche Translationsprodukte derselben messengerRNA (CLAUS et al., 2003).

II. Literaturübersicht

FGF-2 und seine hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptoren (FGFR) zeigen eine spezifische Verteilung im PNS vor und nach Nervenverletzung. FGF-2 und FGFR werden in gesunden Dorsalwurzelganglien (FGFR 1-4) und in peripheren Nerven (FGFR 1-3) auf niedrigem Level exprimiert und nach Nervenverletzung hochreguliert. In den Dorsalwurzelganglien werden FGF-2 und seine Rezeptoren außer in sensorischen Neuronen auch von Satelittenzellen (Gliazellen) exprimiert. In peripheren Nerven werden FGF-2 und FGFR 1-3 überwiegend von Schwann-Zellen, aber auch von einwandernden Makrophagen gebildet. Es wird ein auto- und parakriner Wirkungsmechanismus des FGF-2-Systems angenommen. Als mögliche Funktionen des FGF-2-Systems im PNS wurden die Stimulation der Schwann-Zell-Proliferation nach einer peripheren Nervenverletzung und die Inhibierung der Myelinisierung während der axonalen Regeneration postuliert (GROTHE u. NIKKHAH, 2001). Außerdem verhinderte die Applikation von exogenem FGF-2 am proximalen Stumpf eines axotomierten (durchtrennten) N. ischiadicus von Ratten den läsionsbedingten Tod sensorischer Neurone (OTTO et al., 1987) und unterstützte das Wachstum und die Vaskularisierung der regenerierenden Nervenfasern (DANIELSEN et al., 1988; AEBISCHER et al., 1989).

Die Isoformen von FGF-2 werden nach Nervenverletzung in der adulten Ratte unterschiedlich reguliert. Die 18 kDa-Isoform wird bereits 5 h nach einer Nervenverletzung im proximalen und distalen Nervenstumpf vermehrt exprimiert, während die HMW-Isoformen eine verstärkte Hochregulierung erst 7 Tage nach der Läsion erfahren (MEISINGER u. GROTHE, 1997; GROTHE et al., 2000). Da die Isoformen von FGF-2 *in vitro* unterschiedliche Effekte auf die Proliferation und die Morphologie von neuronal differenzierten Zellen (PC12-Zellen) und auch von immortalisierten Schwann-Zellen zeigten (MULLER-OSTERMEYER et al., 2001), und sie zudem distinkte intrazelluläre Verteilungsmuster aufwiesen (CLAUS et al., 2003), kann davon ausgegangen werden, dass sie spezifische biologische Funktionen besitzen.

II. Literaturübersicht

6. Konzeptioneller Hintergrund der vorliegenden Arbeit

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Claudia Grothe befasst sich zum einen mit der Aufdeckung der spezifischen Funktionen der FGF-2-Isoformen im PNS und zum anderen mit der experimentellen Weiterentwicklung therapeutischer Konzepte zur Wiederherstellung peripherer Nervenfunktionen.

Hierzu wurde ein Regenerationsmodell bei der adulten Ratte etabliert, in dem die Effekte der Überexpression von FGF-2-Isoformen durch transplantierte neonatale Schwann-Zellen der Ratte auf die periphere Nervenregeneration bei einem großen Nervendefekt von 15 mm untersucht werden. So sollen die regenerationsfördernden Eigenschaften von Schwann-Zellen mit denen eines neurotrophen Faktors (FGF-2-Isoformen) kombiniert werden. Die hierfür benötigten Schwann-Zellen werden aus dem N. ischiadicus neugeborener Ratten gewonnen, hoch aufgereinigt und im nächsten Schritt genetisch so verändert, dass sie die FGF-2-Isoformen überexprimieren. In ersten Untersuchungen steigerten Schwann-Zellen, welche die HMW-FGF-2-Isoformen überexprimierten, 4 Wochen nach Transplantation die Anzahl und Länge regenerierter myelinisierter Axone im Vergleich zu den Kontrollgruppen (TIMMER et al., 2003). Neuere Untersuchungen bestätigen in diesem Modell den positiven Effekt von HMW-FGF-2-Isoformen auf die periphere Nervenregeneration auch nach längeren Beobachtungszeiträumen (LIPOKATIC et al., 2004).

7. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Gewinnung, Aufreinigung und Transfektion neonataler Ratten-Schwann-Zellen für ihren weiteren Einsatz *in vivo* (TIMMER et al., 2003) oder *in vitro* (HAASTERT et al., 2005) ist in der Arbeitsgruppe etabliert.

Für einen späteren Einsatz neuartiger Transplantationsstrategien in der rekonstruktiven Nerven Chirurgie ist es von großer Relevanz, auch (autologe) adulte Schwann-Zellen in ausreichender Menge kultivieren und transfizieren zu können. Nicht zuletzt, weil neonatale humane Schwann-Zellen nur begrenzt zur Verfügung stehen (u.a. aus ethischen

II. Literaturübersicht

Gründen) und die Verwendung autologer Schwann-Zellen bei den meist erwachsenen Patienten keine Abstoßungsreaktionen nach sich ziehen würde. Dabei gilt es als schwieriger, ausreichend viele proliferierende Schwann-Zellen aus adulten Nerven als aus embryonalen oder perinatalen Nerven zu gewinnen. Der Grund hierfür ist, dass adulte periphere Nerven ein gut entwickeltes umhüllendes Bindegewebe besitzen, das reich an Fibroblasten ist. Die Ausbeute an Schwann-Zellen ist gering und zudem sind die Kulturen mit proliferierenden Fibroblasten kontaminiert, welche eliminiert werden müssen (MORRISSEY et al., 1991). Des Weiteren befinden sich die adulten Schwann-Zellen im Gegensatz zu embryonalen oder perinatalen Schwann-Zellen in einem differenzierten postmitotischen Zustand, so dass sie erneut zur Teilung angeregt werden müssen (ANSSELIN et al., 1995).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von Methoden, mit denen proliferierende adulte Schwann-Zellen der Ratte in ausreichender Menge gewonnen, angereichert und genetisch verändert werden können. In einer zweiten Phase sollten die aus den Versuchen mit den Schwann-Zellen der Ratte gewonnenen Erfahrungen auf adulte menschliche Schwann-Zellen übertragen werden. Endziel war die Transfektion ausreichender Mengen gut proliferierender adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen. Dabei sollte für die verwendeten Methoden unbedingt ihre spätere klinische Anwendbarkeit berücksichtigt werden und außerdem eine möglichst kurze Gesamtkultivierungsdauer angestrebt werden, um autologe Schwann-Zellen in einer späteren klinischen Anwendung frühestmöglich reimplantieren zu können.

III. Material und Methoden

1. Versuchstiere

70 weibliche und 10 männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden im Rahmen des unter dem Aktenzeichen 509i-42502-991221 von der Bezirksregierung Hannover genehmigten Tierversuchsvorhabens „Studien zur Läsion und Rekonstruktion peripherer Nerven und von Nervenwurzeln des Plexus brachialis bei der Ratte“ vom Zentralen Tierlabor (ZTL) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) oder von Charles River (Wiga) Deutschland GmbH bezogen. Zu Beginn des Versuches waren die Tiere im Schnitt $58 \pm 6,8$ Tage alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von $211 \pm 24,1$ g. Die Ratten wurden im ZTL in Gruppen von 2-3 Tieren bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einem Belichtungszeitraum von 6.00–18.00 h MEZ in Makrolon-Käfigen (Typ III) auf Standardeinstreu für Labortiere (Altromin, Altrogge, Lage, BRD) gehalten. Die Tiere erhielten Altromin-Haltungsfutter (Altrogge, Lage, BRD) und Wasser ad libitum.

2. Isolierung von Schwann-Zellen aus adulten Ratten

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Isolierung adulter Schwann-Zellen aus peripheren Nerven beschrieben. In der vorliegenden Arbeit kamen die direkte Dissoziation nicht-prädegenerierter Nerven (SCARPINI et al., 1988), die *in vivo*-Prädegeneration (ANSSELIN et al., 1995; KEILHOFF et al., 1999) und die *in vitro*-Prädegeneration zur Anwendung (MORRISSEY et al., 1991).

2.1 *In vivo*-Prädegeneration des Nervus (N.) ischiadicus adulter Ratten

Am Operationstag wurden die linken Nervi (Nn.) ischiadici von 2-3 der unter III.1. genannten Ratten zur Einleitung der *in vivo*-Prädegeneration durchtrennt. Die jeweils zu operierende Ratte wurde durch eine einminütige Zufuhr von Kohlendioxid (CO₂) in den

III. Material und Methoden

Tierkäfig kurzzeitig betäubt und 370 mg Chloralhydrat (Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD)/kg Körpergewicht wurden intraperitoneal injiziert. Nach dem Eintritt der Narkosewirkung wurde der linke Oberschenkel der Ratte mit einem Einmalrasierer gründlich rasiert. Danach wurde das Tier auf einem beheizten Operationsplatz gelagert. Die rasierte Stelle wurde mit 70%igem Alkohol gereinigt und anschließend mit Rivanol[®] (Chinosolfabrik, Seelze, BRD) desinfiziert. Dann wurde das Tier in Bauchlage fixiert und der linke Oberschenkel leicht hochgelagert. Das Operationsbesteck wurde zur Keimabtötung vor der Operation für ca. 10 min in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Die Durchtrennung der Haut fand auf 2-3 cm Länge kaudal und parallel des Femurs mittels eines Skalpells (No. 21, Medizin AG, Köln, BRD) statt. Nach dem Trennen der Muskelbäuche unter Einsatz einer gebogenen Metzenbaum-Schere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD) und einer chirurgischen Pinzette (No. 08-231-130, Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, BRD) wurde der N. ischiadicus in der Tiefe freigelegt. Die weitere Operation wurde unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (OPMI 9, Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD) durchgeführt. Nachdem der N. ischiadicus mittels zweier Uhrmacher-Pinzetten (Dumont No. 5, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD) von seiner bindegewebigen Hülle befreit wurde, wurde er möglichst weit proximal mit einer Vannas-Mikroschere (No. 15003-08, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, BRD) durchtrennt. Anschließend wurde ein ca. 2 mm großes Stück vom distalen Stumpf entfernt, um ein Wiederauswachsen der beiden N. ischiadicus-Stümpfe zu verhindern. Der distale Stumpf wurde in seiner ursprünglichen Lage belassen und die Muskulatur der Hintergliedmaße über Einzelhefte mit resorbierbarem Faden (3/0, Dexon[®], B. Braun-Dexon GmbH, Spangenberg, BRD) adaptiert. Der Verschluss der Haut fand über Einzelhefte modifiziert nach Donati mit nicht-resorbierbarem Faden (4/0, Ethilon[®] II, Ethicon GmbH, Norderstedt, BRD) statt.

Die Ratte wurde während der Aufwachphase warm gehalten. Nahrungsaufnahme und Kotabsatz wurden postoperativ kontrolliert.

In den folgenden 10-12 Tagen wurde die Waller-Degeneration (s. II.3.) im durchtrennten N. ischiadicus abgewartet (ANSSELIN et al., 1995).

III. Material und Methoden

2.2 Entnahme des N. ischiadicus bzw. des distalen N. ischiadicus-Stumpfes adulter

Ratten

Für die Entnahme des N. ischiadicus bzw. des distalen N. ischiadicus-Stumpfes wurden die Ratten einzeln durch Einleitung von CO₂ in den Tierkäfig getötet und zur Nervenentnahme auf dem Operationsplatz in Seitenlage verbracht. Es erfolgte die Entnahme des distalen Stumpfes des prädegenerierten N. ischiadicus von der linken Körperhälfte und gegebenenfalls die Entnahme des unbehandelten N. ischiadicus von der rechten Seite. Der jeweilige Oberschenkel wurde großzügig mit Alkohol gereinigt. Das Operationsbesteck wurde zur Keimabtötung vor der Nervenentnahme für ca. 10 min in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Distal vom Knie wurde die Haut mit einer chirurgischen Schere (No. 04-124-145, Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, BRD) eröffnet und nach proximal in Richtung Wirbelsäule vom Oberschenkel abpräpariert. Mittels einer gebogenen Metzenbaum-Schere wurde zunächst die Muskelnäht durchtrennt. Anschließend konnten die Muskelbäuche am Oberschenkel stumpf getrennt und in der Tiefe der N. ischiadicus kaudal des Femurs freigelegt werden. Die weitere Gewebeatnahme wurde mit Hilfe des Operationsmikroskopes durchgeführt. Unter Einsatz einer Vannas-Mikroschere und einer Uhrmacher-Pinzette wurde der N. ischiadicus (wenn unbehandelt) bzw. der distale Stumpf des *in vivo*-prädegenerierten N. ischiadicus von seiner bindegewebigen Hülle befreit, durch einen Schnitt weit distal (und zusätzlich proximal beim unbehandelten N. ischiadicus) entnommen und in eine Falcon[®]-Petrischale (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) mit Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) überführt. Anschließend wurde unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 6, Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD) mittels der Vannas-Mikroschere und der Uhrmacher-Pinzette das Epineurium entfernt, modifiziert nach KEILHOFF et al. (1999).

Jedes Nervenexplantat wurde vor der Weiterverarbeitung einzeln auf einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen, BRD) gewogen. Die distalen Nervenstümpfe aus der *in vivo*-Prädegeneration wurden direkt dissoziiert. Die unbehandelten Nn. ischiadici wurden

III. Material und Methoden

entweder direkt der Dissoziation zugeführt oder für die *in vitro*-Prädegeneration inkubiert (s. III.2.3).

2.3 *In vitro*-Prädegeneration des *N. ischiadicus* adulter Ratten

Für die *in vitro*-Prädegeneration wurden unbehandelte (nicht *in vivo*-prädegenerierte) Nn. ischiadici verwendet. Dazu wurden die frisch explantierten Nerven nach dem Entfernen des Epineuriums unter eine sterile Werkbank (Microflow, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, BRD) verbracht, mit DMEM gespült und auf einer 6-well-Platte (Nunclon™ Surface, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, BRD) für 14 Tage in Prädegenerationsmedium (s.u.) inkubiert, modifiziert nach CASELLA et al. (1996) und HANEMANN et al. (1998). Es wurden zwei verschiedene Prädegenerationsmedien miteinander verglichen: *Medium I*: DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD), 1 % Pen/Strep und 2 µM Forskolin (FK, Merck Biosciences, Nottingham, UK);

Medium II: Kulturmedium der adulten Schwann-Zellen (s. III.4.1) mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep.

Zweimal pro Woche fand ein Mediumwechsel statt.

2.4 Dissoziation des peripheren Nervenmaterials adulter Ratten

Die Dissoziation erfolgte, unabhängig von der Vorbehandlung des Nervenmaterials (nicht-prädegeneriert, *in vivo*- und *in vitro*-prädegeneriert) einheitlich. Pro Ansatz wurden meistens 2-3 Nerven von verschiedenen Ratten zusammen, nur selten 1 Nerv alleine, dissoziiert, um aus diesen eine Primärkultur zu gewinnen.

Zunächst wurde das Gewebe mit enzymatischer Dissoziationslösung, bestehend aus DMEM mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 0,125 % Kollagenase (Typ IV, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) und 1,25 U/ml Dispase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD), für 20 h inkubiert (37°C und 5 % CO₂ [CO₂-Inkubator, Sanyo, Bad Nenndorf, BRD]), modifiziert nach KEILHOFF et al. (1999). Danach wurde die Dissoziationslösung, in der neben den Zellen auch noch Nervenfragmente enthalten waren, in ein 15 ml-Falcon®-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) überführt. Durch die

III. Material und Methoden

Verdünnung mit Hank's balanced salt solution (Magnesium und Kalzium frei, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) konnte die enzymatische Dissoziation verlangsamt und die Zell-Zell-Kontakte weiter aufgelöst werden. Im Anschluss erfolgte eine mechanische Dissoziation, bei der die verbliebenen Gewebeverbände mit einer eng geschmolzenen Glas-Pasteur-Pipette (230 mm, Brand, Wertheim, BRD) bis zur Entstehung einer optisch homogenen Suspension trituriert wurden. Die Zellsuspension wurde bei 235 x g (Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech, Hanau, BRD) und 21°C für 5 min zentrifugiert und das dabei entstandene Pellet in einem definierten Volumen an Kulturmedium (s. III.4.1) resuspendiert.

Mittels einer 1:1-Verdünnung der Zellsuspension mit Trypan Blau (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD) konnte in einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl und gleichzeitig der Anteil an lebenden bzw. toten Zellen ermittelt werden. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl 0,4%iger Trypan Blau-Lösung vermischt. 10 µl dieser Mischung wurden in eine Neubauer-Zählkammer verbracht. In 4 Großquadraten wurden die Zellen im mikroskopischen Phasenkontrast (Mikroskop Olympus CK30-F200, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, BRD) gezählt. Zur Ermittlung der vorhandenen Gesamtzellzahl wurde die gezählte Zellzahl mit 2 multipliziert (Ausgleich der 1:1-Verdünnung) und anschließend durch 4 dividiert (Reduktion auf Zellzahl/Großquadrat). Zum Erhalt der Gesamtzellzahl musste die so errechnete Zahl noch mit 10^4 und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml multipliziert werden. Trypan Blau kann nur Membranen toter Zellen passieren, lebende Zellen stellten sich im Phasenkontrast klein, rund und leuchtend-weiß (Trypan Blau-negativ) dar, tote Zellen schwellen an und wurden dunkelblau (Trypan Blau-positiv). Im Anschluss wurden die Zellen ausgesät (s. III.4.2), wobei in die Berechnung der gewünschten Zelldichte nur die Zahl der vitalen Zellen einfluss.

Diese Methode der Zellzählung wurde auch beim weiteren Passagieren der Ratten-Schwann-Zellen und ebenfalls bei jeder Zählung der humanen Schwann-Zellen verwendet.

III. Material und Methoden

3. Isolierung von adulten Schwann-Zellen aus humanem Nervengewebe

3.1 Humanes Nervengewebe

Die Arbeit mit adulten humanen Schwann-Zellen wurde unter der Nr. 3072 und dem Titel „Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des FGF-2-Systems bei der Regeneration peripherer Nerven“ von der Ethik-Kommission der MHH genehmigt.

Dank der Kooperation mit Frau Prof. Dr. Cordula Matthies aus der Klinik für Neurochirurgie des Klinikums Hannover Nordstadt wurde humanes Nervengewebe von Patienten, die sich einer rekonstruktiven Chirurgie des Plexus brachialis unterziehen mussten, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich zum größten Teil um N. suralis- (n = 22), aber auch um N. supraclavicularis- (n = 3) und N. ulnaris- (n = 1) Gewebestücke von weiblichen (n = 5) und männlichen (n = 21) Patienten im Alter von 13-60 Jahren (durchschnittliches Alter: 32 Jahre). Das Nervengewebe kam sofort nach der Gewinnung in DMEM und wurde darin bei 4°C für mehrere h aufbewahrt. Anschließend wurden die Nervenstücke aus organisatorischen Gründen bei -80°C in DMEM, versetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) und 1 % bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) eingefroren oder direkt für weitere Untersuchungen verwendet.

3.2 Isolierung von Nervenfaszikeln aus humanem Nervengewebe

Eingefrorenes humanes Nervengewebe wurde vor der weiteren Behandlung im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut. Sowohl aufgetautes als auch frisches Nervengewebe wurde unter einer sterilen Werkbank mit DMEM gespült und in eine Petrischale mit DMEM und 1 % Pen/Strep überführt. Unter dem Stereomikroskop wurden zunächst die größeren Gewebestücke mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend konnten die einzelnen Nervenfaszikeln mit Hilfe zweier Uhrmacher-Pinzetten (No. 5) vom interfaszikulären Epineurium, in Anlehnung an HANEMANN et al. (1998), isoliert und in eine neue Petrischale mit DMEM und 1 % Pen/Strep verbracht werden. Nach dem Wiegen auf einer

III. Material und Methoden

Feinwaage wurden die so gewonnenen Faszikel entweder sofort der Dissoziation zugeführt oder 14 bzw. 7 Tage *in vitro*-prädegeneriert.

3.3 *In vitro*-Prädegeneration humaner Nervenfaszikel

Die Nervenfaszikel wurden unter einer sterilen Werkbank mit DMEM gespült und vor der Dissoziation 14 bzw. 7 Tage auf einer 6-well-Platte in Prädegenerationsmedium inkubiert. Dieses Prädegenerationsmedium bestand aus dem Kulturmedium für adulte Schwann-Zellen (s. III.4.1), versetzt mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep. Zweimal pro Woche fand ein Mediumwechsel statt.

3.4 Dissoziation humaner Nervenfaszikel

Das Vorgehen entsprach weitestgehend dem unter III.2.4 beschriebenen. Zu Beginn der enzymatischen Dissoziation aber wurden die humanen Nervenfaszikel mit einem Skalpell in ca. 2-4 mm große Gewebestücke zerkleinert, modifiziert nach HANEMANN et al. (1998).

In den darauf folgenden 20 h fand die Dissoziation in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 0,125 % Kollagenase und 1,25 U/ml Dispase bei 37°C und 5 % CO₂ statt, modifiziert nach KEILHOFF et al. (1999). Außerdem wurden die dissoziierten Zellen, nachdem sie durch Zentrifugation gesammelt worden waren, in DMEM gewaschen und danach nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium (s. III.4.1) resuspendiert. Nach der Zellzählung (s. III.2.4) wurden die Zellen in Kultur genommen (s. III.4.).

4. Kultivierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

4.1 Kulturplatten und -medium

Suspensionen der Ratten- und Menschen-Schwann-Zellen wurden jeweils auf sterilen 6-well, 12-well oder 24-well-Platten (Nunclon™ Surface, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, BRD) kultiviert. Vor der Aussaat der Zellen wurden die Platten unter sterilen Kautelen mit Poly-L-Ornithin (PORN, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)

III. Material und Methoden

und Laminin (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) doppelbeschichtet. Dazu wurde die Stocklösung (1 mg PORN/ml destilliertes Wasser [Aqua dest., Ampuwa® Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, BRD]) 1:10 mit Aqua dest. weiter verdünnt und diese Lösung auf Eis gestellt. Das bei -80°C gelagerte Laminin wurde auf Eis langsam aufgetaut und als nächstes mit der eiskalten PORN-Wasser-Lösung verdünnt (Endkonzentration des Laminins: 6 µg/ml). Im Anschluss wurden die wells mit dem PORN-Laminin-Gemisch soweit befüllt, dass der gesamte Boden der wells ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Beschichtung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für ca. 24 h. Um einer Verdunstung des PORN-Laminin-Gemisches und damit einer unzureichenden Benetzung/Beschichtung vorzubeugen, wurden die Platten in Aluminiumfolie verpackt.

Als definiertes serumfreies Kulturmedium wurde für die Kultivierung der adulten Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen Melanozyten-Wachstumsmedium (PromoCell GmbH, Heidelberg, BRD), versetzt mit 2 µM FK, 10 ng/ml Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2, 18 kDa-Isoform; aus dem hiesigen Labor, MULLER-OSTERMEYER et al., 2001), und 5 µg/ml bovinem Hypophysenextrakt (BPE-26, PromoCell GmbH, Heidelberg, BRD), verwendet, Applikation der Zusätze angelehnt an das Protokoll von GUENARD et al. (1992). Das Melanozyten-Wachstumsmedium selbst enthielt folgende Wachstumsfaktoren und Antibiotika: 0,4 % BPE, 1 ng/ml FGF-2, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml Phorbol-Myristate-Acetate, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin.

Dem Kulturmedium wurde bei der primären Aussaat 1 % BSA zur Verbesserung der Zelladhäsion an die Kulturplattenoberfläche hinzugefügt. Die humanen Zellkulturen erhielten zudem bei der Primäraussaat und bei jedem Mediumwechsel 2,5 ng/ml frisch zugesetztes Insulin (vom Rind, Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD), modifiziert nach HANEMANN et al. (1998). Humane Schwann-Zell-Kulturen, die Medium mit und ohne 10 nM rekombinantem humanen Neuregulin1-β1/Heregulin-β1 epidermal growth factor (EGF) domain (eine die EGF-ähnliche Domäne enthaltendene DNA-Sequenz des Heregulin-β1 mit den Aminosäureresten 176-246 [rHRG-β1₁₇₆₋₂₄₆], exprimiert durch

III. Material und Methoden

E. coli; R & D Systems, Wiesbaden, BRD) erhielten, wurden miteinander verglichen, modifiziert nach CASELLA et al. (1996) und HANEMANN et al. (1998).

4.2 Zellaussaat/Zelldichte

Die optimale Zelldichte und damit die Anzahl der auszusäenden vitalen Zellen auf der jeweiligen Kulturplatte wurde vor allem durch Beobachtungen im mikroskopischen Phasenkontrast ermittelt. Geachtet wurde auf die Verteilung und die Morphologie der Schwann-Zellen (Aussaat der optimalen Zellzahl auf der jeweiligen Kulturplatte s. Ergebnisteil).

Bei der primären Aussaat (d.h. die Aussaat direkt nach der Dissoziation) wurde zusätzlich der Anteil adhäsiver Zellen an der ausgesäten Gesamtzellzahl (engl.: seeding efficiency, SE) ermittelt. Anhand der adulten Ratten-Schwann-Zellen wurde untersucht, ob sich die SE je nach Anzahl der ausgesäten Zellen verändert. Dazu wurden in einem Versuch jeweils 1×10^6 , $0,75 \times 10^6$ und $0,5 \times 10^6$ Zellen in einem 6-well ausgesät. 24 h nach der primären Aussaat wurden die Zellen, die sich tatsächlich abgesetzt hatten, mit Hilfe eines Zählgitters im mikroskopischen Phasenkontrast ausgezählt. Der Durchmesser (d) und die Kulturoberfläche (O) des 6-wells waren bekannt (Herstellerangaben). Als nächstes musste die Fläche des Zählgitters (A) in der jeweils verwendeten mikroskopischen Vergrößerung ermittelt werden. Hierzu wurde zunächst ausgezählt, wie oft das Zählgitter bei der eingestellten Vergrößerung quer in das well passte (Q). Mittels der Formel $d/Q = x$ und $x \times x = A$ konnte die Fläche des Zählgitters (A) berechnet werden. Mit der Formel $O/A = M$ erhielt man danach den Multiplikationsfaktor (M). Die absolute Anzahl der adhäsiven Zellen (a) ergab sich nach der Formel $M \times b/c = a$ aus dem Multiplikationsfaktor, der Anzahl gezählter Zellen (b) und der Anzahl verwendeter Zählgitter (c). Die SE wurde dann aus dem Verhältnis der Anzahl adhäsiver Zellen zur ausgesäten Zellzahl berechnet. Die optimale Zellmenge, die pro cm^2 Kulturoberfläche ausgesät werden musste, wurde durch die SE und das morphologische Bild der kultivierten adhäsiven Zellen bestimmt.

5. Selektive Anreicherung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

Aufgrund der Kontamination der adulten Schwann-Zell-Kulturen mit Fibroblasten musste eine Aufreinigung der Kulturen bzw. eine selektive Anreicherung der Schwann-Zellen durchgeführt werden. Für die Eliminierung der Fibroblasten aus den Schwann-Zell-Kulturen zunächst nur der adulten Ratte wurden zwei verschiedene Verfahren miteinander verglichen. Die beste Methode im Hinblick auf Effizienz und Durchführbarkeit wurde anschließend für alle weiteren Aufreinigungen (auch von humanen Schwann-Zell-Kulturen) verwendet.

5.1 Methode 1: Dynabeads[®] Pan Mouse IgG

Dynabeads[®] Pan Mouse IgG (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, BRD) sind kleine Magnetkügelchen gekoppelt an monoklonale Antikörper, die spezifisch an die kristallinen Fragmente (Fc-Fragmente) aller Maus-Immunglobuline G (IgG) binden.

Vor ihrem Einsatz mussten die Dynabeads[®] gewaschen werden. Dazu wurden jeweils 10 µl der Dynabeads[®] Pan Mouse IgG-Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD) mit 1000 µl Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom AG, Berlin, BRD) und 0,1 % BSA überführt und mehrmals trituriert. Anschließend wurde ein Magnet von außen an das Eppendorf-Gefäß gehalten, wodurch die Dynabeads[®] angezogen vom Magneten zur Wand des Gefäßes wanderten und der Überstand abgenommen und verworfen werden konnte. Noch zweimal wurde diese Waschprozedur wiederholt. Danach wurden die gewaschenen Dynabeads[®] in 300 µl anti-Thy1-Antikörper-Lösung (monoklonal, Maus, 20 µg/ml, gerichtet gegen das Oberflächenantigen Thy1 auf Ratten-Fibroblasten, von Herrn PD Dr. K. Wewetzer zur Verfügung gestellt) resuspendiert. Die Eppendorf-Gefäße wurden fest verschlossen, mit Parafilm umwickelt und in ein mit Eis befülltes 50 ml-Falcon[®]-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) überführt. Dieses Röhrchen wurde dann für 30 min in einem Multifunktionsmischer Roto-Shake Genie[®] (Scientific Industries, über Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD) rotiert, um die Bindung der Dynabeads[®] Pan Mouse IgG an die anti-Thy1-Antikörper zu unterstützen.

III. Material und Methoden

In der Zwischenzeit wurde die Schwann-Zell/Fibroblasten-Mischkultur von der Kulturplatte abgelöst. Dazu wurde die Kulturplatte mit PBS gespült und im Anschluss für 5 min Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) auf die Zellen gegeben. Zur Verlangsamung der Trypsinierung wurde, im gleichen Volumen wie zuvor das Trypsin/EDTA, Kulturmedium hinzugefügt. Die Zellsuspensionen von jeweils zwei 6-wells wurden in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt und bei 235 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 400 µl Kulturmedium resuspendiert.

Nach der 30-minütigen Inkubation im Multifunktionsmischer wurden die nun an die anti-Thy1-Antikörper gekoppelten Dynabeads[®] dreimal mit 1000 µl PBS und 0,1 % BSA gewaschen. Nachdem der Überstand des letzten Waschschrilles abgenommen und verworfen wurde, wurden jeweils 400 µl Zellsuspension auf die verbliebenen Dynabeads[®] eines Eppendorf-Gefäßes gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Eppendorf-Gefäße mit Zellen und Dynabeads[®] wurden erneut 30 min in Eis geschüttelt. Während dieses Vorganges sollten die an die Dynabeads[®] gekoppelten anti-Thy1-Antikörper an das auf der Oberfläche der Fibroblasten befindliche Thy1-Antigen binden. Nach der Inkubation erfolgte die Separation der so gebundenen Fibroblasten von den Schwann-Zellen. Dazu wurde der Magnet von außen an die Eppendorf-Gefäße gehalten. Die an Dynabeads[®] gebundenen Fibroblasten (s. Abb. 1 im Anhang) wanderten angezogen vom Magneten zur Wand und die Überstände mit den ungebundenen Schwann-Zellen konnten abgenommen, in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt und anschließend durch Zentrifugation (235 x g, 5 min) gesammelt werden. Die Resuspension des Zellpellets fand in Kulturmedium statt. Nach dem Auszählen der vitalen Zellen (s. III.2.4) wurden diese auf PORN-Laminin beschichteten Kulturplatten (s. III.4.1) ausgesät.

5.2 Methode 2: Cold jet

Die Aufreinigung der Schwann-Zell-Kulturen mit Cold jet, modifiziert nach JIRSOVA et al. (1997), basiert auf den unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der Schwann-Zellen und Fibroblasten, wenn sie einem Temperaturschock ausgesetzt werden.

III. Material und Methoden

Die Zellkulturen wurden zunächst mit eiskaltem PBS (1 ml für ein 6-well) gewaschen, dazu wurde das PBS langsam hinzugegeben und danach sofort wieder abpipettiert. Dann erfolgte die Ablösung der Schwann-Zellen über die Zugabe eisgekühlten Kulturmediums (1 ml für ein 6-well), welches mittels einer blauen 1 ml-Pipettenspitze (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD) im Strahl auf die Zellen gegeben und anschließend mehrere Male auf- und abpipettiert wurde, wobei besonders die dicht besetzten Bereiche des wells gespült wurden. Das Ablösen der Zellen wurde im mikroskopischen Phasenkontrast kontrolliert. Wenn nötig, wurde diese Prozedur mit neuem Medium ein- bis zweimal wiederholt, bis sich möglichst alle Schwann-Zellen abgelöst hatten, während die Fibroblasten vorwiegend auf der Kulturplatte sitzen blieben. Die Suspension flotierender Zellen wurde dann in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen verbracht, zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert, ausgezählt (s. III.2.4) und auf PORN-Laminin beschichteten Kulturplatten (s. III.4.1) ausgesät.

6. Immunzytochemie

Die adulten Schwann-Zellen konnten entweder über einen Primärantikörper gerichtet gegen den auf der Zelloberfläche befindlichen niedrig-affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptor p75^{LNGFR} (YASUDA et al., 1987; DONG et al., 1997; LI et al., 1998; VROEMEN u. WEIDNER, 2003) oder gerichtet gegen das intrazelluläre Kalziumbindende Protein S100 (MORRISSEY et al., 1991; LEVI et al., 1995; RUTKOWSKI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; LI et al., 1998; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002) identifiziert werden. Die Fibroblasten der Ratte wurden durch die Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Zelloberflächenprotein Thy1 (BROCKES et al., 1979; ASSOULINE et al., 1983; VROEMEN u. WEIDNER, 2003) markiert.

Die Proliferationsraten der adulten Schwann-Zellen wurden über die Inkorporation von 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) in die DNA sich teilender Zellen und die anschließende Markierung des eingebauten BrdU durch einen anti-BrdU-Antikörper (Primärantikörper) ermittelt (s. III.6.2).

III. Material und Methoden

Zur Sichtbarmachung der spezifischen Bindung der Primärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper aufgetragen, welche gegen die Fc-Fragmente der Primärantikörper gerichtet waren.

Allen Antikörperlösungen wurde 1 % BSA zugesetzt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern.

Eine Kernfärbung der immunzytochemisch markierten Zellen wurde zum Abschluss über eine 20-30-minütige Inkubation (bei Raumtemperatur [RT] und Dunkelheit [DH]) mit Bisbenzimid H 33258 (Riedel de Haën AG, Seelze, BRD) in methanolischer Gebrauchslösung (Stammlösung: 1 mg Bisbenzimid in 10 ml PBS, Gebrauchslösung: Stammlösung 1:1000 in Methanol) oder mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD; 1:1000 in PBS) erzielt.

Zur Konservierung der markierten Zellen wurden die wells im Anschluss an die immunzytochemische Färbung mit 80%igem Ethanol aufgefüllt.

Die Fluoreszenz der markierten Zellen ließ sich im Fluoreszenzmikroskop (s. III.8.) beobachten und auswerten.

6.1 Reinheit adulter Schwann-Zell-Kulturen

Die Reinheit der adulten Schwann-Zell-Kulturen wurde nach jeder Passage mehrmals über eine immunzytochemische Markierung ermittelt. Hierzu wurden Aliquots (durchschnittliche Aussatzzahl s. Ergebnisteil) pro well einer mit PORN-Laminin beschichteten 24-well-Platte ausgesät und frühestens 24 h nach der Aussaat immunzytochemisch gefärbt (s. III.6.1.1/6.1.2).

6.1.1 Markierung adulter Ratten-Schwann-Zellen

Als erstes wurden anti-p75^{LNGFR}-Antikörper (monoklonal, Maus, 20-35 µg/ml, von Herrn PD Dr. K. Wewetzer zur Verfügung gestellt) dem Kulturmedium vorsichtig hinzugefügt und im Verhältnis 1:3 mit diesem verdünnt. Zur Kontrolle wurden bei einigen Ansätzen die Fibroblasten mit anti-Thy1-Antikörpern (monoklonal, Maus, 20 µg/ml) gefärbt. In diesen Fällen wurde dem Medium einer Schwesterkultur anti-Thy1-Antikörper im Verhältnis 1:5 zugegeben. Die anti-p75^{LNGFR}- bzw. anti-Thy1-Lebendfärbung fand für

III. Material und Methoden

45 min bei 37°C und 5 % CO₂ statt. Danach erfolgte bei RT die 20-minütige Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD). Hierzu wurde dem antikörperhaltigen Kulturmedium im gleichen Volumen 8%iges PFA (in PBS) zugesetzt. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper, CyTM-3 (Indocarbocyanin)-konjugiertes anti-Maus IgG (1:400, Jackson ImmunoResearch, USA), für 45 min bei RT und DH inkubiert.

Für eine Doppelmarkierung folgte zusätzlich die Färbung des intrazellulären Antigens S100. Zunächst wurde Blocking-Puffer (5 % BSA in PBS) auf die Zellen gegeben, um einer unspezifischen Antikörperbindung vorzubeugen (30 min, RT und DH). Danach wurden die Kulturen mit dem anti-S100-Antikörper (polyklonal, Kaninchen, DakoCytomation GmbH, Hamburg, BRD, 1:200 mit 0,3 % Triton X-100 [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD] in PBS verdünnt) für 60 min und anschließend mit dem Sekundärantikörper, CyTM-2 (Cyanin)-konjugiertes anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch, USA, 1:200 mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS verdünnt), für 45 min bei RT und DH inkubiert.

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die wells mit PBS gespült.

6.1.2 Markierung adulter humaner Schwann-Zellen

Die adulten humanen Schwann-Zellen wurden entweder mit dem anti-S100-Antikörper (gleiches Färbeprotokoll wie bei Ratten-Schwann-Zellen (s. III.6.1.1) und/oder mit dem anti-human-p75^{LNGFR}-Antikörper (monoklonal, Maus, Accurate Chemical & Scientific Corporation, USA, über WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach, BRD) markiert. Der anti-human-p75^{LNGFR}-Antikörper wurde 1:20 mit PBS verdünnt und für 45 min bei RT auf die mit PFA fixierten Zellen gegeben. Es folgte die Inkubation mit dem CyTM-2- (1:200, Jackson ImmunoResearch, USA) oder dem CyTM-3-konjugierten anti-Maus IgG-Sekundärantikörper für 45 min bei RT und DH.

III. Material und Methoden

6.2 Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

Die Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen wurden nach den verschiedenen Passagen, d.h. vor und nach selektiver Anreicherung, mit Hilfe des BrdU Labeling and Detection Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD) erhoben.

BrdU wird in die DNA sich teilender Zellen inkorporiert und kann im nächsten Schritt über spezifische monoklonale anti-BrdU-Antikörper gebunden und schließlich über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden.

Aliquots (durchschnittliche Aussaatzahl s. Ergebnisteil) wurden pro well PORN-Laminin beschichteter 24-well-Platten ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat wurde den Zellkulturen BrdU-Stammlösung zugegeben (1:1000 mit Kulturmedium verdünnt). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das, die BrdU-Stammlösung enthaltende Kulturmedium entfernt und die Zellen für 20-30 min bei -20°C mit Methanol fixiert. Danach erfolgte die Inkubation mit der anti-BrdU-Antikörper-Lösung (monoklonal, Maus, zuvor im Verhältnis 1:20 mit dem Inkubationspuffer verdünnt) für 60 min bei RT. Die anti-BrdU-Antikörper-Lösung enthielt Nukleasen zur Denaturierung der DNA. Als letztes erfolgte die Inkubation (45 min, RT) mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (entweder CyTM-2- oder CyTM-3-konjugiertes anti-Maus IgG).

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die wells dreimal mit in Aqua dest. verdünntem Waschpuffer (1:10) gewaschen.

Zur genauen Charakterisierung der BrdU-markierten Zellen wurde im Anschluss eine Färbung der spezifischen Markerproteine (p75^{LNGFR}, S100) vorgenommen (s. III.6.1.1/6.1.2). Der Unterschied zu dem unter III.6.1.1 aufgeführten immunzytochemischen Protokoll zur Markierung adulter Ratten-Schwann-Zellen bestand darin, dass die p75^{LNGFR}-Färbung nicht an lebenden, sondern an Methanol-fixierten Zellen vorgenommen wurde.

III. Material und Methoden

7. Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

Die selektiv angereicherten adulten Schwann-Zellen sollten genetisch so modifiziert werden, dass sie die 18 kDa-FGF-2-Isoform oder die höhermolekularen 21 und 23 kDa (HMW)-FGF-2-Isoformen überexprimieren. Zuvor musste eine geeignete Transfektionsmethode im Hinblick auf ihre Durchführbarkeit und ihre Effizienz ermittelt werden. Verschiedene, für andere Zelltypen etablierte, Transfektionsmethoden wurden hierfür ausprobiert und entsprechende Protokolle gegebenenfalls optimiert. Aufgrund der größeren Verfügbarkeit und leichteren Handhabung wurden erste Untersuchungen an hoch aufgereinigten neonatalen Schwann-Zellen erhoben. Zur Quantifizierung der Transfektionsraten wurden die Schwann-Zellen mit einem für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP, BD Biosciences Clontech, Heidelberg, BRD) codierenden Plasmid transfiziert und die Expression im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (s. III.8.).

7.1 Methode 1: Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Kalziumphosphat ein unlösliches Kopräzipitat mit der DNA bildet, welches an die Zelloberfläche bindet und über Endozytose aufgenommen wird (SAMBROOK u. RUSSELL, 2001).

24 h vor der Transfektion wurden die hoch aufgereinigten neonatalen Schwann-Zellen in 3 wells einer mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) beschichteten 6-well-Platte in einer Dichte ausgesät, dass die Kulturen am Tag der Transfektion 50-60 % konfluent waren.

Für die Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion wurde der Kit ProFection[®] Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate (Promega GmbH, Mannheim, BRD) verwendet.

3 h vor der Transfektion erhielten die Zellen frisches Kulturmedium (Zusammensetzung des Mediums für neonatale Schwann-Zellen: DMEM, 10 % FCS, 1 % L-Glutamin [PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD], 1 % Natrium-Pyruvat [PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD], 1 % Pen/Strep und 1 μ M FK).

III. Material und Methoden

150 µl HEPES-Puffer wurden in ein Eppendorf-Gefäß (Lösung A) gegeben, in ein anderes nacheinander 125,5 µl nukleasefreies Wasser, 18,5 µl Kalziumchlorid und 6 µl (= 3,156 µg) pEGFP-N2 Plasmid (Kit NucleoBond® PC 100, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, BRD) (Lösung B). Nachdem Lösung B trituriert wurde, wurde diese der Lösung A zugegeben. Die beiden Lösungen wurden dann mittels eines Vortexgerätes (Reax control, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, BRD) gut miteinander vermischt und anschließend für 30 min bei RT stehengelassen, damit sich die Kalziumphosphat-Koppräzipitate bilden konnten. Dann folgte ein weiterer Vortex-Schritt. Die so vorbereitete Transfektionslösung wurde einem well unter Schwenken der Kulturplatte tröpfchenweise zugefügt. Die Platte wurde anschließend wieder in den Inkubator (37°C, 5 % CO₂) verbracht.

Zur Steigerung der Effektivität der Transfektion wurde 4 h später ein Glycerol-Schock durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung bestehend aus 8,4 ml Aqua dest., 1,5 ml Glycerol (ICN Biomedicals, Ohio, USA) und 100 µl HEPES-Puffer (1 M, Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD) frisch angesetzt, steril filtriert und gekühlt (+ 4°C). Das Kulturmedium wurde von den 3 wells entfernt und durch 2 ml der Glycerol-Schock-Lösung ersetzt. Nach einer exakt 2-minütigen Inkubation wurde die Lösung wieder heruntergenommen und die wells zweimal mit PBS gespült. Zum Schluss erhielten die transfizierten neonatalen Schwann-Zellen frisches Kulturmedium und wurden weiter kultiviert (37°C, 5 % CO₂). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4%igem PFA fixiert und die Transfektionsrate ermittelt (s. III.8.).

7.2 Methode 2: Lipid-vermittelte Transfektion

Kationische Lipide werden verwendet, um künstliche Membranvesikel (Liposomen) herzustellen, welche die einzuschleusende DNA binden. Die resultierenden stabilen kationischen Komplexe binden und fusionieren mit der negativ geladenen Zellmembran, die DNA wird dann ins Zellinnere abgegeben (SAMBROOK u. RUSSELL, 2001).

24 h vor der Transfektion wurden die hoch aufgereinigten neonatalen Schwann-Zellen in 3 wells einer mit PLL beschichteten 6-well-Platte in einer Dichte ausgesät, dass die Kulturen am Tag der Transfektion 50-60 % konfluent waren.

III. Material und Methoden

Für die Lipid-vermittelte Transfektion wurde das Transfektionsreagenz MetafecteneTM (Biontex Laboratories GmbH, München, BRD) gewählt.

3 h vor der Transfektion erhielten die Zellen frisches Kulturmedium (s. III.7.1). In einem Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) wurde Lösung A aus 6 µl (= 3,156 µg) pEGFP-N2 (s. III.7.1) und 94 µl DMEM, in einem zweiten Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) Lösung B aus 10 µl MetafecteneTM und 90 µl DMEM hergestellt. Die Lösungen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und schließlich miteinander vereint. Nach vorsichtigem Triturieren wurde die Transfektionslösung für 20 min bei RT stengelassen, damit sich die DNA/Lipid-Komplexe bilden konnten. Danach wurde die Transfektionslösung unter Schwenken der Kulturplatte einem well tröpfchenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden für weitere 6 h inkubiert (37°C, 5 % CO₂) und erhielten anschließend frisches Kulturmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 4%igem PFA fixiert und die Transfektionsrate ermittelt (s. III.8.).

Auch adulte Schwann-Zellen der Ratte wurden, ähnlich wie oben beschrieben, mittels MetafecteneTM transfiziert. Hierzu wurden in 12 wells einer 24-well-Platte (s. III.4.1) jeweils 8×10^4 Zellen, im Anschluss an die Aufreinigung mit Cold jet, ausgesät und 24 h später mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses Plasmid-DNA/MetafecteneTM wurde eine Optimierungsreihe aufgestellt, in der jedes well ein unterschiedliches Verhältnis der Plasmid-Menge (0,2 µg, 0,5 µg, 0,8 µg) zur Menge des MetafecteneTM-Reagenzes (jeweils das 2, 4, 8 und 12fache der Plasmidmenge in µl) erhielt. Das weitere Vorgehen fand wie oben beschrieben statt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und der prozentuale Anteil der EGFP-exprimierenden Schwann-Zellen (Charakterisierung der Zellen anhand morphologischer Kriterien) in den Kulturen erhoben.

7.3 Methode 3: Elektroporation

Die Applikation von kurzen elektrischen Impulsen führt zur Formierung nanometergroßer Poren in der Plasmamembran. DNA gelangt entweder direkt durch diese Poren oder in Folge der Umverteilung der Membrankomponenten, welche das Verschließen der Poren begleitet, in das Zellzytoplasma (SAMBROOK u. RUSSELL, 2001).

III. Material und Methoden

Für die Elektroporation wurde das Gerät Easyjec T Optima (EQUIBIO, über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD) verwendet (Standort des Gerätes: Abteilung Neurologie der MHH).

Verschiedene Parameter fließen in den Erhalt einer optimalen Transfektionsrate ein, deshalb wurden die wesentlichen Stellglieder ermittelt und deren Einstellung optimiert.

- Spannung (Stellglied 1):
Durch die Einstellung der Spannung (in Volt) am Elektroporationsgerät wurde die Größe des elektrischen Feldes nach der Formel $E = V/d$ ($V = \text{Volt}$, $d = \text{Abstand}$ zwischen den Elektroden der Küvette in Zentimetern) bestimmt (Herstellerangaben: EquiBio limited Electroporation Optimisation Guide, 2000). Es gilt, je größer der Zellradius ist, desto kleiner ist das benötigte äußere elektrische Feld, um eine Permeabilisation der Zellmembran zu erreichen. Außerdem vergrößert sich der Membranbereich, durch den Diffusion stattfinden kann, mit der Erhöhung der Pulsamplitude. Der Grad der Permeabilisation kann durch die Pulsdauer kontrolliert werden, je länger die Pulsdauer ist, desto stärker ist die Permeabilisation der Membran in einem bestimmten Bereich (GEHL, 2003). Die optimale Stärke des elektrischen Feldes liegt für die meisten Säugetierzellen zwischen 250 V/cm und 750 V/cm (SAMBROOK u. RUSSELL, 2001).
- Ladung des Kondensators (Stellglied 2):
Am Elektroporationsgerät konnte zudem die Ladung des Kondensators in der Einheit Farad (F) eingestellt werden. Die Ladung des Kondensators beeinflusste die Pulsdauer. Der Widerstand (R) des Easyjec T Optima war konstant bei 335 Ohm.
- Temperatur (Stellglied 3):
Die richtige Temperatur (RT oder Kühlung der Zellen mit Eis) während der Elektroporation musste gefunden werden.
- Inkubationszeit (Stellglied 4):
Die Zellen konnten entweder vor und/oder nach der Elektroporation mit der DNA für eine bestimmte Zeit inkubiert werden, oder es fand nur eine kurzfristige Inkubation statt.

III. Material und Methoden

- Verhältnis Zellzahl/DNA-Menge (Stellglied 5):

Das richtige Verhältnis der verwendeten Zellzahl zur DNA-Menge musste ermittelt werden.

Vorversuche wurden ebenfalls mit hoch aufgereinigten neonatalen Schwann-Zellen durchgeführt. Die Einstellungen, die nach der Elektroporation zur höchsten Transfektionsrate geführt hatten, wurden auch für die Elektroporation von adulten Schwann-Zellen verwendet und weiter modifiziert.

Hoch aufgereinigte neonatale Schwann-Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von ihrer Kulturplatte abgelöst, in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt, zentrifugiert und in einem definierten Volumen an Kulturmedium resuspendiert. Es folgte die Ermittlung der Gesamtzellzahl (s. III.2.4) und die Portionierung der Zellen für die Elektroporation. Pro Elektroporationsansatz wurde eine unterschiedlich große Zellzahl in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen und parallel die entsprechend variable Menge an Plasmid-DNA (pEGFP, s. III.7.1) in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt. Die Kulturplatte, auf der die Zellen im Anschluss an die Elektroporation ausgesät werden sollten, wurde mit frischem Kulturmedium (s. III.7.1, zusätzlich mit 1 % BSA angereichert) aufgefüllt. Aufgrund des Umstandes, dass sich das Elektroporationsgerät in einer anderen Abteilung befand und dort keine Zentrifuge zur Verfügung stand, mussten die Zellen schon ca. 10-15 min vor der eigentlichen Elektroporation ein weiteres Mal zentrifugiert werden. Der Überstand über den Pellets wurde erst kurz vor der Elektroporation verworfen, um einer Austrocknung der Zellen während des Transportes vorzubeugen. Die Resuspension jeweils eines Zellpellets fand in 400 µl Elektroporationspuffer (50 mM K₂HPO₄ * 3H₂O [11,41 g], 20 mM K-Acetat [1,96 g], mit Essigsäure auf pH 7,35 eingestellt) statt. Der Suspension wurden noch 10 µl Magnesiumsulfat (1 M MgSO₄ * 7H₂O, pH 6,7 mit 0,01 N NaOH) zugefügt, bevor sie auf die Plasmid-DNA gegeben wurde. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde die DNA mit der Zellsuspension vermischt und das Zell-DNA-Gemisch vorsichtig unter Vermeidung von Bläschenbildung in eine Elektroporationsküvette mit einem Durchmesser von 4 mm (EQUIBIO, über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD) überführt. Die Küvette wurde in das Elektroporationsgerät verbracht und der elektrische Impuls mit den jeweils gewählten

III. Material und Methoden

Einstellungen (Volt, Farad) ausgelöst. Anschließend wurden 100.000 Zellen pro well einer mit PLL beschichteten 6-well-Platte ausgesät und für 24 h kultiviert (37°C, 5 % CO₂), bevor sie frisches Kulturmedium erhielten. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 4%igem PFA fixiert und die Transfektionsrate ermittelt (s. III.8.).

1. Passage- (noch nicht aufgereinigt) oder 2. Passage-Kulturen (einmal mit Cold jet aufgereinigt [s. III.5.2.]) adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen wurden von ihrer Kulturplatte selektiv abgelöst (Cold jet = Aufreinigungsschritt) und in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt, zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

Die Elektroporation erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Elektroporation wurden die adulten Schwann-Zellen auf PORN-Laminin beschichteten 24-well-Kulturplatten (s. III.4.1/4.2) ausgesät. Dem Kulturmedium wurde ebenfalls 1 % BSA zugesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden 24 h kultiviert (37°C, 5 % CO₂), bevor die Fixierung der Zellen mit 4%igem PFA oder ein Mediumwechsel zur Kultivierung für weitere 24 h erfolgte (Fixierung 48 h nach Transfektion). Der Fixierungszeitpunkt wurde danach gewählt, wie schnell und wie gut sich die transfizierten Zellen abgesetzt hatten.

Nach der Fixierung wurden die transfizierten Zellen immunzytochemisch markiert (s. III.6.1.1/6.1.2) und die Transfektionsrate erhoben (s. III.8.).

7.3.1 Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen

Die Elektroporation wurde herangezogen, um adulte Schwann-Zellen mit Plasmiden zu transfizieren, welche für die verschiedenen FGF-2-Isoformen (18 kDa-Isoform, HMW-FGF-2-Isoformen) und zusätzlich für eine Geneticin-Resistenz codierten. Die Plasmide wurden im hiesigen Labor hergestellt (MULLER-OSTERMEYER et al., 2001). Die transfizierten adulten Schwann-Zell-Kulturen wurden nach 48-stündiger Kultivierung einem Selektionsdruck durch Applikation des Antibiotikums G-418-Sulfat (Geneticin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) ausgesetzt. Die transfizierten Zellen sollten dabei aufgrund des eingeschleusten Neomycingens dazu befähigt sein, eine das Geneticin inaktivierende Neomycin-Phospho-Transferase zu bilden und so, trotz des Geneticin-haltigen Kulturmediums, überleben. Zellen, welche nicht erfolgreich transfiziert wurden

III. Material und Methoden

und demnach keine Geneticin-Resistenz aufwiesen, sollten dem Selektionsdruck zufolge absterben. Am Ende der Selektionsphase sollten nur die mit der Antibiotika-Resistenz ausgestatteten stabil transfizierten Zellen übrig bleiben und aus diesen eine die entsprechende FGF-2-Isoform überexprimierende Schwann-Zell-Population gezüchtet werden.

Zur sofortigen Überprüfung des Transfektionserfolges wurde in einem anderen Versuch ein 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstrukt verwendet (CLAUS et al., 2003), das nach der Einschleusung in die Zellen zur Translation von *Discosoma* Red Fluorescent Protein (DsRed, BD Biosciences Clontech, Heidelberg, BRD)-markiertem FGF-2 führte. Das FGF-2 ließ sich so als rot leuchtende Markierung in den erfolgreich transfizierten Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes (s.u.) darstellen.

8. Quantifizierung der Kulturreinheit, der Proliferations- und Transfektionsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

Die Fluoreszenz der immunzytochemisch markierten Zellen wurde mit dem Olympus IX-70 Fluoreszenzmikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, BRD) sichtbar gemacht. Als Filter kam für die CyTM-2-Sekundärantikörper-markierten Zellen und die EGFP-exprimierenden transfizierten Zellen der Olympus-Filter UMNb (Anregungsspektrum: 470-490 nm; Sperrfilter: > 515 nm) zum Einsatz, wodurch sich die Zellen grün darstellten. Der Olympus-Filter UMNG (Anregungsspektrum: 530-550 nm, Sperrfilter: > 590 nm) wurde herangezogen, um die CyTM-3-positiven Zellen und die 18 kDa-FGF-2-DsRed-exprimierenden Zellen (rote Fluoreszenz) sichtbar zu machen. Die Kernfärbung (Bisbenzimid oder DAPI) stellte sich unter Verwendung des Olympus-Filters UMNU (Anregungsspektrum: 360-370 nm, Sperrfilter: > 420) hellblau dar.

Für die Auszählung der Zellen wurde ein Okular mit integriertem Zählraster verwendet und die Wells einmal quer durchgemustert. Es wurden jeweils die Zellen berücksichtigt, die sich innerhalb des Zählrasters befanden. Für die Ermittlung u.a. der Reinheit, der Proliferations- und Transfektionsrate wurden pro Ansatz (Schwann-Zell-Kultur und Passagezahl) 1-3 Wells und in jedem Well mindestens 300 Zellen ausgezählt.

III. Material und Methoden

Die Zellen, die p75^{LNGFR}- oder S100-immunpositiv waren, wurden als Schwann-Zellen gezählt, alle nicht p75^{LNGFR}- oder S100-markierten (nur die Kernfärbung vorhanden) bzw. die Thyl-markierten Zellen wurden den Fibroblasten zugerechnet. Je höher der prozentuale Anteil der Schwann-Zellen an der Schwann-Zell/Fibroblasten-Mischkultur war, desto höher war die Reinheit der jeweiligen Kultur.

Alle BrdU-markierten Zellen, die zusätzlich p75^{LNGFR}- oder S100-gefärbt waren, wurden als proliferierende adulte Schwann-Zellen gezählt. Die ermittelten Proliferationsraten stellen den prozentualen Anteil BrdU/p75^{LNGFR}- oder S100-doppelt-immunpositiver Zellen an der Gesamtzellzahl p75^{LNGFR}- oder S100-markierter Zellen dar.

Die Transfektionsrate der hoch aufgereinigten neonatalen Ratten-Schwann-Zellen wurde anhand des Verhältnisses der grün-fluoreszierenden (EGFP-positiven, transfizierten) Schwann-Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt.

Für die Quantifizierung der Transfektionsrate adulter Schwann-Zellen (der Ratte und des Menschen) wurden alle grün-fluoreszierenden (EGFP-positiven) und zusätzlich p75^{LNGFR}- oder S100-markierten Zellen als transfizierte adulte Schwann-Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl aller p75^{LNGFR}- oder S100-markierten Zellen gesetzt.

9. Statistische Auswertung

Für alle Resultate wurden der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (SD) mit Hilfe des Statistikprogramms Excel 2002 unter dem Betriebssystem Windows XP Home Edition von Microsoft[®] bestimmt. Die Berechnung der Signifikanzen zwischen den Gruppen wurde mit dem Statistikprogramm StatView für Windows, Version 5.0 (SAS Institute Inc.) durchgeführt. Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test gewählt, weil hier eine Normalverteilung der Werte nicht vorausgesetzt wird. Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde zunächst der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test angewendet. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ berücksichtigt.

IV. Ergebnisse

IV. Ergebnisse

Ergebnisse A: adulte Schwann-Zellen der Ratte

1. Zellausbeute nach unterschiedlicher Vorbehandlung des Nervenmaterials adulter Ratten

Die explantierten distalen Nervenstümpfe aus *in vivo*-prädegenerierten Nervi (Nn.) ischiadici (s. III.2.1) hatten eine Länge von 1,1 bis 2,1 cm (1 cm Nervengewebe = 13,8 mg nach Entfernung des Epineuriums). Zur Kontrolle wurden 1,3 bis 2,2 cm lange Stücke nicht-prädegenerierter Nn. ischiadici der Gegenseite entnommen. Weitere unbehandelte (nicht *in vivo*-prädegenerierte) Nn. ischiadici wurden der *in vitro*-Prädegeneration (s. III.2.3) zugeführt (Länge der Explantate nicht gemessen).

Wie in Abb. 1 dargestellt konnte durch die *in vivo*-Prädegeneration der Nn. ischiadici die Ausbeute an vitalen Zellen/mg dissoziiertem Nervengewebe gegenüber der aus nicht-prädegenerierten Nerven signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden. Die Zellausbeute aus den nicht-prädegenerierten Nerven, welche sofort nach Entnahme dissoziiert wurden, lag im Mittel bei $0,8 \pm 0,2 \times 10^5$ vitalen Zellen/mg ($n = 11$) und die aus Nerven der *in vivo*-Prädegeneration durchschnittlich bei $1,1 \pm 0,3 \times 10^5$ vitalen Zellen/mg ($n = 30$). Demgegenüber führte die *in vitro*-Prädegeneration zu einer tendenziell höheren Ausbeute ($1,0 \pm 0,4 \times 10^5$ vitale Zellen/mg [$n = 9$]) im Vergleich zu nicht-prädegenerierten Nerven.

Die Verwendung zweier unterschiedlicher Prädegenerationsmedien (*Medium I*: auf Dulbecco's modified eagle medium [DMEM] und *Medium II*: auf Melanozyten-Wachstumsmedium basierend) für die *in vitro*-Prädegeneration (s. III.2.3) hatte zu vergleichbaren Zellausbeuten (*Medium I*: $1,3 \pm 0,2 \times 10^5$ Zellen/mg [$n = 3$]; *Medium II*: $1,1 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen/mg [$n = 3$]) geführt, so dass die Ergebnisse zu einer einheitlichen Gruppe der *in vitro*-prädegenerierten Nerven zusammengefasst werden konnten. Zusätzlich wurden von 3 weiteren Ansätzen *in vitro*-prädegenerierter Nerven (unter Verwendung des *Mediums II*) Zellausbeuten bestimmt.

IV. Ergebnisse

Eine zusammenfassende Darstellung der hier beschriebenen Ergebnisse ist der Tab. 1 im Anhang zu entnehmen.

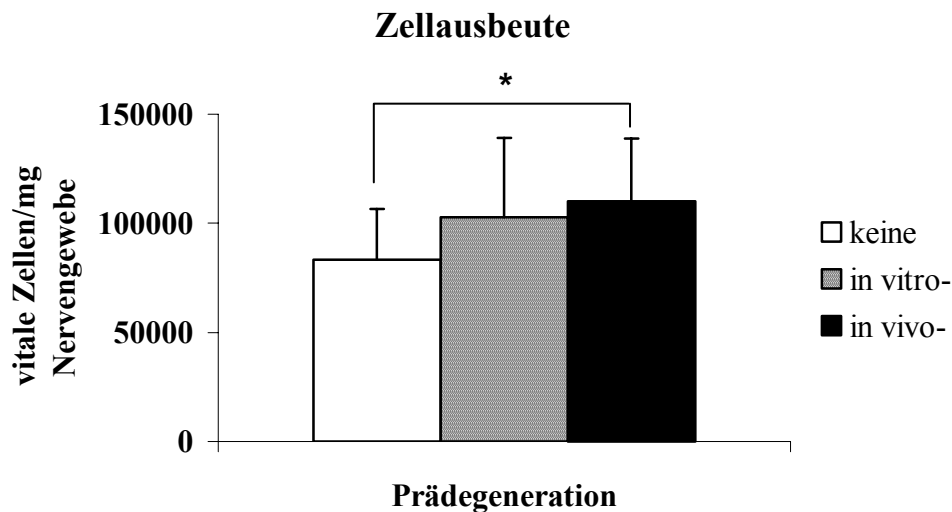


Abb. 1: Darstellung der Ausbeute ($\bar{x} + SD$) an vitalen (Trypan Blau-negativen) Zellen/mg dissoziiertem Gewebe des N. ischiadicus der adulten Ratte in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des Nervengewebes. Die Zellausbeute aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven war signifikant (* $p < 0,05$) höher als aus nicht-prädegenerierten Nerven.

2. Zellvitalität nach Dissoziation

Der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl (GZZ) nach Dissoziation der Nn. ischiadici wurde mittels Trypan Blau-Färbung ermittelt.

96,4 ± 4,5 % (n = 5) der Zellen, die aus nicht-prädegenerierten Nerven gewonnen wurden, waren vital. Der Anteil an lebenden Zellen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven lag bei 96,9 ± 3,7 % (n = 6). Der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der GZZ nach der *in vitro*-Prädegeneration wurde nicht quantifiziert, allerdings fielen bei der Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen ähnlich wenig Trypan Blau-positive Zellen auf wie in den anderen Ansätzen.

IV. Ergebnisse

3. Zellaussaat

Die Anzahl auszusäender vitaler Zellen pro cm^2 Kulturoberfläche wurde vor allem durch Beobachtungen im mikroskopischen Phasenkontrast ermittelt. Herangezogen wurden hierbei die Dichte der adhäsiven Zellen und deren morphologisches Erscheinungsbild. Als positiv bewertet wurden Aussaatzahlen, die zu einer Dichte führten, bei der die Zellen untereinander Kontakt hatten, aber noch genügend Raum für Zellteilungen vorhanden war, Zellausläufer gebildet wurden und keine Anzeichen von erhöhtem Zellsterben (z.B. vermehrtes Ablösen von der Kulturplatte) auszumachen waren.

Die primäre Aussaat (1. Passage) fand generell auf 6-well-Platten (Kulturoberfläche eines wells = $9,6 \text{ cm}^2$) statt. Nach weiteren Passagen wurden die Zellen auf 6-well- oder auf anderen Platten mit entsprechend kleineren Kulturoberflächen (12-, 24-well) kultiviert. Für die immunzytochemischen Markierungen wurden bei jeder Passage Schwesterkulturen auf 24-well-Platten (Kulturoberfläche eines wells = $1,9 \text{ cm}^2$) ausgesät.

Bei der primären Aussaat wurde zusätzlich die seeding efficiency (SE) ermittelt, um eine Aussage über den Zellverlust 24 h nach der Primäraussaat in Abhängigkeit von der ausgesäten Zahl vitaler Zellen zu erhalten. Die SE 24 h nach der primären Aussaat von 1×10^6 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$, $0,75 \times 10^6$ Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$ und $0,5 \times 10^6$ Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$ war $18,3 \pm 1,6 \%$ ($n = 3$), $18,6 \pm 1,2 \%$ ($n = 3$) bzw. $22,7 \pm 3,4 \%$ ($n = 3$). Die Verwendung unterschiedlicher Aussaatzahlen führte also zu keinem deutlichen Unterschied im Verlust an nicht-adhäsiven Zellen. Es zeigte sich aber, dass sich durchschnittlich nur ca. 20 % der primär ausgesäten Zellen absetzten und der Rest für die weitere Kultivierung verloren ging.

Anhand der Beobachtungen im mikroskopischen Phasenkontrast wurde die Aussaat von etwa 1×10^6 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$ ($= 1,04 \times 10^5/\text{cm}^2$) als optimale Aussaatzahl für weitere Kultivierungen auf 6-well-Platten zugrunde gelegt. Die optimalen Aussaatzahlen/ cm^2 für die anderen verwendeten Kulturplatten variierten von der für die 6-well-Platte, da die Zellen auf den verschiedenen Platten mit geringerer Kulturoberfläche/well ein unterschiedliches Verhalten im Hinblick auf ihre Adhäsionseigenschaften und ihre Verteilung zeigten. Durchschnittliche Aussaatzahlen, die anhand der oben genannten

IV. Ergebnisse

Kriterien für die verschiedenen Kulturplatten ausgewählt wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt.

Platte	6-well (well = 9,6 cm ²)	12-well (well = 3,5 cm ²)	24-well (well = 1,9 cm ²)	24-well, nach Elektroporation
Anzahl ausgesäeter vitaler Zellen/cm ² Kulturoberfläche	1,2 ± 0,3 x 10 ⁵ /cm ²	4,3 ± 1,8 x 10 ⁴ /cm ²	4,8 ± 2,1 x 10 ⁴ /cm ²	1,4 ± 0,4 x 10 ⁵ /cm ²
n =	29	18	43	13

Tab. 1: Durchschnittliche Aussaatzahlen ($\bar{x} \pm SD$) vitaler adulter Ratten-Schwann-Zellen/cm² Kulturoberfläche der verschiedenen Kulturplatten.

4. Selektive Anreicherung adulter Ratten-Schwann-Zellen

Die primären Kulturen adulter Ratten-Schwann-Zellen waren mit Fibroblasten kontaminiert (s. IV.A.5.), so dass eine selektive Anreicherung der Schwann-Zellen primärer Kulturen und gegebenenfalls auch sekundärer Kulturen durchgeführt werden musste. Zwei Aufreinigungsmethoden, Dynabeads[®] Pan Mouse IgG und Cold jet (s. III.5.), wurden im Hinblick auf ihre Effizienz und ihre Durchführbarkeit miteinander verglichen. Beide Methoden führten zu einer vergleichbar hohen Aufreinigung der Kulturen. Zur Beurteilung wurde im mikroskopischen Phasenkontrast auf das Verhältnis von bipolaren, spindelförmigen Zellen (= Schwann-Zellen; SCARPINI et al., 1988; VROEMEN u. WEIDNER, 2003) zu mehr tri- bis multipolaren Zellen (= Fibroblasten; CASELLA et al., 1996; HANEMANN et al., 1998; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002) in den Kulturen geachtet. Cold jet war im Vergleich einfacher und schneller durchführbar. Außerdem konnte hier die Effizienz direkt während des Aufreinigungsschrittes kontrolliert werden: im mikroskopischen Phasenkontrast konnte das schrittweise Ablösen der Schwann-Zellen und der Verbleib der Fibroblasten auf der Kulturplatte beobachtet werden (s. Abb. 2 im Anhang). Cold jet wurde daher als Aufreinigungsmethode sowohl für adulte Schwann-Zellen der Ratte als auch für die des Menschen etabliert. Aufgrund der einfachen Anwendbarkeit und des zusätzlichen Aufreinigungseffektes wurde Cold jet überwiegend anstelle von Trypsin/EDTA (s. III.5.1) zum Passagieren der Zellen eingesetzt.

IV. Ergebnisse

5. Reinheit adulter Ratten-Schwann-Zell-Kulturen

Die Reinheit (prozentualer Anteil der p75^{LN_GFR}-positiven [p75⁺] Zellen [= Schwann-Zellen] in der Kultur, s. III.6./8.) adulter Schwann-Zell-Kulturen der Ratte wurde 2-3 Tage nach Primäraussaat immunzytochemisch ermittelt. Schwesterkulturen wurden parallel mittels Cold jet aufgereinigt (2. Passage) und von diesen wiederum Aliquots für die immunzytochemische Markierung (durchschnittlich 5 Tage nach der Aufreinigung) ausgesät. Die Kulturen wurden gegebenenfalls durchschnittlich 7 Tage nach dem ersten selektiven Anreicherungsschritt wiederholt aufgereinigt (3. Passage), und nach weiteren 7 Tagen wurden exemplarisch Schwesterkulturen zur Bestimmung der Reinheit immunzytochemisch markiert.

Die Reinheit von Kulturen aus *in vitro*- und *in vivo*-prädegenerierten Nerven nach den verschiedenen Passagen ist in Abb. 2 dargestellt.

Die *in vitro*-Prädegeneration der Nerven (s. III.2.3) führte unter Verwendung des *Prädegenerationsmediums I* (auf DMEM basierend) zu einer durchschnittlichen Reinheit der Primärkulturen von $70,8 \pm 6,5$ % (n = 3) und unter Verwendung des *Prädegenerationsmediums II* (auf Melanozyten-Wachstumsmedium basierend) zu einer Reinheit von $66,9 \pm 9,2$ % (n = 3). Wie bereits bei der Ermittlung der Zellausbeuten waren die Unterschiede auch hier unwesentlich, so dass die Quantifizierung der Reinheit der Kulturen aus beiden Gruppen zusammengefasst werden konnte. Es ergab sich eine durchschnittliche Reinheit der Primärkulturen aus *in vitro*-prädegenerierten Nerven von $68,9 \pm 7,2$ % (n = 6). Primärkulturen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven waren mit im Mittel $48,5 \pm 12,9$ % p75⁺-Zellen (n = 5) signifikant (p < 0,01) weniger rein als Primärkulturen aus der *in vitro*-Prädegeneration (s. Abb. 3 im Anhang).

Durch einen Cold jet-Aufreinigungsschritt konnte die Reinheit der Kulturen sowohl aus der *in vitro*- als auch aus der *in vivo*-Prädegeneration signifikant (p < 0,01) erhöht werden. Die 2. Passage-Kulturen aus der *in vitro*-Prädegeneration enthielten $93,8 \pm 4,1$ % p75⁺-Zellen (n = 6) und die aus der *in vivo*-Prädegeneration $90,5 \pm 5,3$ % p75⁺-Zellen (n = 5). Für weitere Untersuchungen, z.B. direkt vor der Transfektion (s. III.7.3), wurden Kulturen nach *in vivo*-Prädegeneration wiederholt aufgereinigt. Dadurch konnten die Schwann-

IV. Ergebnisse

Zellen auf $94,9 \pm 3,4$ % ($n = 3$) nach einer Gesamtkultivierungsdauer von ca. 3 Wochen angereichert werden (s. Abb. 4 im Anhang). Demgegenüber zeigte eine Kultur aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven, die nicht aufgereinigt und lediglich zweimal durch Trypsinierung (Vorgehen wie unter III. 5.1. beschrieben) passagiert wurde, nach ca. 3 Wochen *in vitro* eine Reinheit von nur 31,2 % ($n = 1$).

Eine zusammenfassende Darstellung der oben beschriebenen Ergebnisse ist der Tab. 1 im Anhang zu entnehmen.

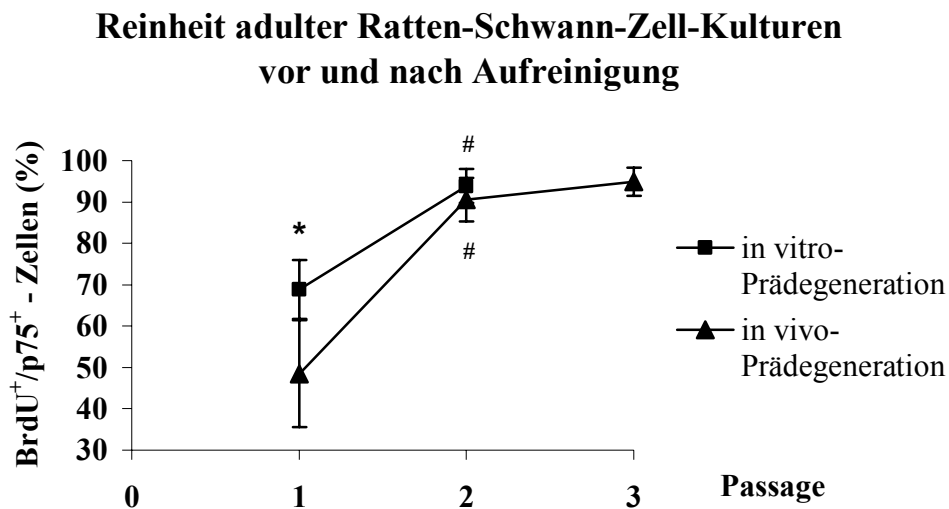


Abb. 2: Dargestellt ist die Reinheit ($\bar{x} + SD$; prozentualer Anteil der $p75^+$ -Zellen) adulter Ratten-Schwann-Zell-Kulturen nach der Primäraussaat (1. Passage) und nach dem ersten (2. Passage) und zweiten (3. Passage) Aufreinigungsschritt mit Cold jet. Die Reinheit von Kulturen aus der *in vitro*-Prädegeneration war nach der 1. Passage signifikant (* $p < 0,01$) höher im Vergleich zu der von Kulturen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven. Durch einen Aufreinigungsschritt konnten die adulten Schwann-Zellen aus beiden Prädegenerationsgruppen signifikant (# $p < 0,01$) angereichert werden.

Zur Überprüfung einer bestehenden Deckungsgleichheit der Charakterisierung bzw. Quantifizierung des jeweiligen Zelltyps anhand immunzytochemischer Markierungen verschiedener spezifischer Proteine wurden zum einen Schwesterkulturen mit dem anti-p75- und dem anti-Thy1-Antikörper inkubiert und zum anderen in weiteren Kulturen eine Doppelmarkierung der Markerproteine p75 und S100 vorgenommen (s. III.6.).

IV. Ergebnisse

In der untersuchten Primärkultur waren 46,5 % der Zellen Thy1-positiv (Thy1⁺), dieses Ergebnis korrelierte mit einem prozentualen Anteil p75-negativer (p75⁻) Zellen von 45,6 % in der Schwesterkultur. Andere Kulturen, die einmal aufgereinigt wurden, zeigten eine geringfügige Abweichung der Werte. So wurden 2,9 % Thy1⁺- und 6,6 % p75⁻-Zellen in der Schwesterkultur gezählt.

Die Doppelmarkierung einiger Kulturen aus der *in vivo*-Prädegeneration mit dem anti-p75- und dem anti-S100-Antikörper zeigte, dass nicht alle Zellen, die p75⁺ waren, auch eine S100-Markierung aufwiesen und umgekehrt. $0,9 \pm 0,5$ % der p75⁺-Zellen zeigten keine S100-Immunreaktivität (n = 3). Demgegenüber stellten sich $3,9 \pm 3,5$ % der Zellen, die p75⁻ waren, S100-positiv (S100⁺) dar (n = 3). Dies deutete auf eine nicht 100-prozentig übereinstimmende Identifizierung adulter Ratten-Schwann-Zellen durch die immunzytochemische Markierung von p75 und S100 hin.

6. Proliferationsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen

Zur Bestimmung der Proliferationsrate (prozentualer Anteil 5-Bromo-2'-deoxy-uridine [BrdU]/p75^{LNGFR}-doppelt-positiver [BrdU⁺/p75⁺] Zellen [= proliferierende Schwann-Zellen] in der Kultur) wurde auf die Primärkulturen adulter Ratten-Schwann-Zellen 1-2 Tage nach Primäraussaat BrdU-Stammlösung gegeben. 24 h später fand die Fixierung statt (s. III.6.2). Die jeweiligen Schwesterkulturen wurden parallel über einen Cold jet-Schritt aufgereinigt und Aliquots für die Ermittlung der Proliferationsrate ausgesät. Die BrdU-Markierung fand im Mittel 4 Tage nach der ersten Aufreinigung statt. Die 2. Passage-Kulturen wurden, wie unter IV.A.5. bereits erwähnt, für weitere Behandlungen gegebenenfalls ein zweites Mal aufgereinigt, und durchschnittlich 6 Tage später wurden Schwesterkulturen mit der BrdU-Stammlösung inkubiert.

Wie der Abb. 3 zu entnehmen ist, waren mit $40,9 \pm 11,3$ % (n = 6) signifikant (p < 0,01) mehr proliferierende Schwann-Zellen in Primärkulturen nach *in vitro*-Prädegeneration vorhanden als in Primärkulturen nach *in vivo*-Prädegeneration ($8,5 \pm 1,8$ %, n = 4). Nach dem ersten selektiven Anreicherungsschritt (Cold jet) konnte die Proliferationsrate der adulten Ratten-Schwann-Zellen, die aus der *in vivo*-Prädegeneration gewonnen wurden,

IV. Ergebnisse

signifikant ($p < 0,01$) auf $43,0 \pm 3,0$ % ($n = 3$) angehoben werden (s. Abb. 8 im Anhang). Demgegenüber nahm die Proliferationsrate der $p75^+$ -Zellen aus *in vitro*-prädegenerierten Nerven nach dem ersten Aufreinigungsschritt leicht auf $35,1 \pm 11,1$ % ($n = 6$) ab. Die BrdU-Inkorporationsrate der Schwann-Zellen in Kulturen aus der *in vivo*-Prädegeneration blieb über 3 Wochen *in vitro* und nach einem zweiten Aufreinigungsschritt relativ hoch ($35,9 \pm 17,1$ %, $n = 3$).

Die beschriebenen Resultate sind in der Tab. 1 im Anhang zusammengefasst dargestellt.

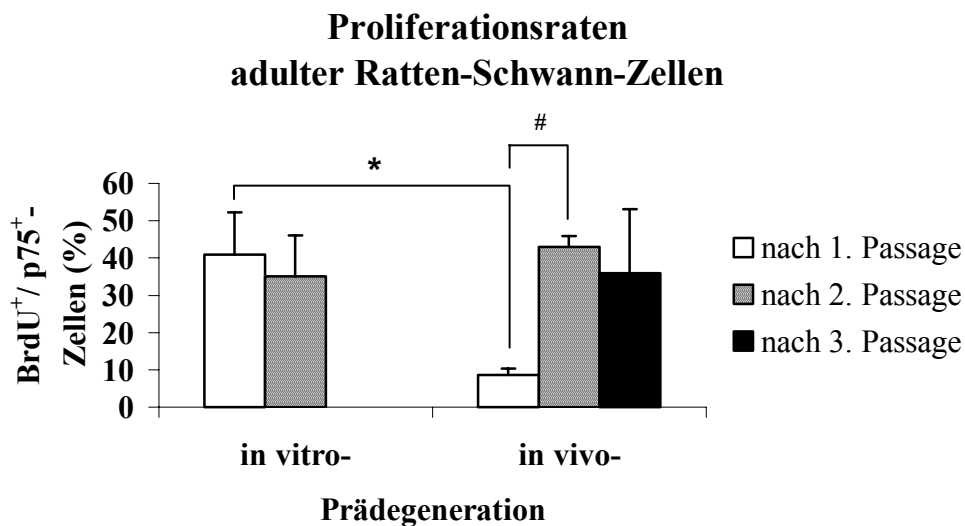


Abb. 3: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der $BrdU^+/p75^+$ -Zellen ($\bar{x} + SD$) nach den verschiedenen Passagen adulter Ratten-Schwann-Zell-Kulturen aus der *in vitro*- und *in vivo*-Prädegeneration. Die Proliferationsrate von Kulturen aus der *in vivo*-Prädegeneration war nach der 1. Passage (Primäraussaat) signifikant (* $p < 0,01$) niedriger als die von Kulturen aus der *in vitro*-Prädegeneration. Eine signifikante Erhöhung (# $p < 0,01$) der Proliferationsrate nach *in vivo*-Prädegeneration konnte nach einmaliger Aufreinigung (2. Passage) beobachtet werden.

7. Transfektionsraten neonataler und adulter Ratten-Schwann-Zellen

Die Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden (s. III.7.) wurde zunächst anhand hoch aufgereinigter neonataler Schwann-Zellen der Ratte ermittelt. 48 h nach der Transfektion wurden folgende Transfektionsraten (prozentualer Anteil von Schwann-Zellen an der GZZ, die das Enhanced Green Fluorescent Protein exprimierten [$EGFP^+$])

IV. Ergebnisse

evaluiert: $0,8 \pm 0,3$ % nach der Kalziumphosphat-vermittelten ($n = 3$) und $18,5 \pm 3,0$ % nach der Lipid-vermittelten Transfektion (Metafectene™) ($n = 3$). Der Zellverlust nach der Transfektion mit Metafectene™ war deutlich höher im Vergleich zu dem nach der Kalziumphosphat-vermittelten Transfektion. Jedoch zeigte die Auswertung der absoluten Zahl an EGFP⁺-neonatalen Schwann-Zellen, dass die Transfektion mit Metafectene™ im Vergleich zur Kalziumphosphat-Methode die 10fache Menge an transfizierten Zellen lieferte. Ein optimiertes Elektroporationsprotokoll ($10 \mu\text{g pEGFP-N2}/10^6$ Zellen, 300 V und $1500 \mu\text{F}$, Transfektion bei Raumtemperatur [RT] und keine längerfristige Inkubation der Zellen mit der Plasmid-DNA, s. auch III. 7.3.) resultierte in einer Transfektionsrate von $28,6 \pm 3,0$ % ($n = 3$; s. auch Anhang Tab. 2. u. 3.).

Für Transfektionen adulter Ratten-Schwann-Zellen wurden nur aufgereinigte Kulturen aus der *in vivo*-Prädegeneration verwendet. Die Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte mittels Metafectene™ führte zu einer vergleichsweise niedrigen Transfektionsrate von $1,7 \pm 1,1$ % EGFP⁺-Schwann-Zellen ($n = 5$; Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Optimierungsreihe). Die Charakterisierung der Schwann-Zellen fand hierbei anhand morphologischer Kriterien statt (s. IV.A.4.).

Die zunächst aus dem optimierten Elektroporationsprotokoll der neonatalen Ratten-Schwann-Zellen übernommenen Parameter führten bei der Elektroporation der adulten Schwann-Zellen nicht zum erwünschten Ergebnis. Zu viele Zellen starben ab, und es waren zu wenige EGFP⁺- (transfizierte) Zellen vorhanden. Daraufhin fand eine Optimierung der wichtigsten Elektroporationsparameter für die Transfektion adulter Ratten-Schwann-Zellen statt. Die Höhe der Spannung, die Ladung des Kondensators und das Verhältnis der Zellzahl zur Plasmid-DNA-Menge mussten angepasst werden. Die Verwendung von $15 \mu\text{g pEGFP-N2}/5 \times 10^5$ adulte Ratten-Schwann-Zellen bei der Einstellung von 260 V und $1050 \mu\text{F}$ lieferte das bis dahin beste Transfektionsergebnis (Volt- und Faradzahl wurden an das zur gleichzeitigen Anwendung bei einer Reihe von Zelllinien optimierte Elektroporationsprotokoll aus BAUM et al. (1994) angelehnt). Die Durchführung der Elektroporation bei RT und die nur kurzfristige Inkubation der Zellen mit der DNA innerhalb der Elektroporationsküvette vor und nach der Transfektion wurden beibehalten. Die adulten Ratten-Schwann-Zellen wurden entweder direkt im Anschluss an

IV. Ergebnisse

die erste oder an die zweite Aufreinigung mit Cold jet elektroporiert. Nach der ersten Aufreinigung konnten im Mittel $7,6 \pm 9,4$ % EGFP⁺/p75⁺-Zellen gezählt werden (n = 3). Der Prozentsatz transfizierter adulter Ratten-Schwann-Zellen nach dem zweiten Aufreinigungsschritt war mit $14,2 \pm 4,6$ % (n = 4) tendenziell höher (Ermittlung des Zelltyps EGFP⁺-Zellen anhand morphologischer Kriterien oder über eine immunzytochemische Markierung). Insgesamt (nach 1. und 2. Aufreinigung) konnten durch die Elektroporation durchschnittlich $11,4 \pm 7,3$ % der adulten Ratten-Schwann-Zellen transfiziert werden (n = 7). Eine einmalige Verdopplung der Plasmid-DNA-Menge ($30 \mu\text{g } pEGFP-N2/5 \times 10^5 \text{ Zellen}$) führte zu einer Transfektionsrate zweimal aufgereinigter adulter Ratten-Schwann-Zellen von 31,7 % (n = 1; s. Abb. 11 im Anhang). Die Tab. 4 im Anhang fasst die Transfektionsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen zusammen.

7.1 Transfektion adulter Ratten-Schwann-Zellen zur Überexpression von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)-Isoformen

Auf die Auswahl einer geeigneten Transfektionsmethode sollte die Produktion FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen folgen. Dazu wurden in einem ersten Versuch adulte Ratten-Schwann-Zellen nach der ersten Aufreinigung mit einem für die 21 und 23 kDa (HMW)-FGF-2-Isoformen und für eine Geneticin-Resistenz codierenden Plasmid transfiziert (s. III.7.3.1). Die Zellen wurden in drei 3 einer 24-well-Platte ausgesät und 24 h später die GZZ pro well bestimmt. Die Geneticin-vermittelte Selektion der transfizierten Zellen wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt. In dieser Zeit wurden 2 der wells mit einer Konzentration von 125 μg Geneticin/ml Kulturmedium und 1 well mit der Konzentration von 250 μg Geneticin/ml Kulturmedium inkubiert. Es zeigte sich, dass 2 Wochen nach der Transfektion in allen 3 wells der Zellverlust mit 90,1 %, 87,3 % und 94 % annähernd gleich groß war. 3 Wochen später waren kaum noch Zellen in den wells zu sehen und noch vorhandene Zellen saßen sehr vereinzelt. Nach insgesamt 4 Wochen waren von den ursprünglich im Durchschnitt $6,8 \pm 1,3 \times 10^4$ Zellen/well keine mehr vorhanden und somit auch keine stabil transfizierten Zellen selektiert worden.

IV. Ergebnisse

Ergebnisse B: adulte Schwann-Zellen des Menschen

1. Zellausbeute nach unterschiedlicher Vorbehandlung des humanen Nervengewebes

Pro Patient wurde im Mittel 288 mg (20-625 mg) humanes Nervengewebe (Faszikel) zur Verfügung gestellt. Die Höhe der Ausbeute an vitalen Zellen/mg dissoziiertem Nervengewebe war abhängig von der Art der Vorbehandlung (vgl. Abb. 4). Nervengewebe, das vor der Dissoziation einer *in vitro*-Prädegeneration unterzogen wurde (verzögerte Dissoziation), zeigte tendenziell eine höhere Zellausbeute als Nervengewebe, das direkt der Dissoziation zugeführt wurde. Dabei lag die Zellausbeute aus frischem Nervengewebe jeweils (direkte oder verzögerte Dissoziation) über der aus Nervengewebe, welches zuvor eingefroren wurde. Aus frischem, 7 Tage *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe wurden im Schnitt $2,1 \pm 1,5 \times 10^4$ vitale Zellen/mg gewonnen (n = 4). Die 14-tägige *in vitro*-Prädegeneration von zuvor eingefrorenem Gewebe führte zu einer Ausbeute an vitalen Zellen von $2,5 \pm 1,1 \times 10^4$ /mg (n = 5). Zwischen der niedrigsten Zellausbeute ($0,9 \pm 0,7 \times 10^4$ vitale Zellen/mg, n = 5) aus zunächst eingefrorenem und anschließend direkt der Dissoziation zugeführtem Nervengewebe und der höchsten Zellausbeute ($2,9 \pm 1,5 \times 10^4$ vitale Zellen/mg, n = 17), die aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe gewonnen wurde, bestand ein signifikanter (p < 0,01) Unterschied. Frisches Nervengewebe, das direkt dissoziiert wurde, wies eine durchschnittliche Zellausbeute von $1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ vitalen Zellen/mg (n = 5) auf.

Eine zusammenfassende Darstellung der oben beschriebenen Ergebnisse ist der Tab. 5 im Anhang zu entnehmen.

IV. Ergebnisse

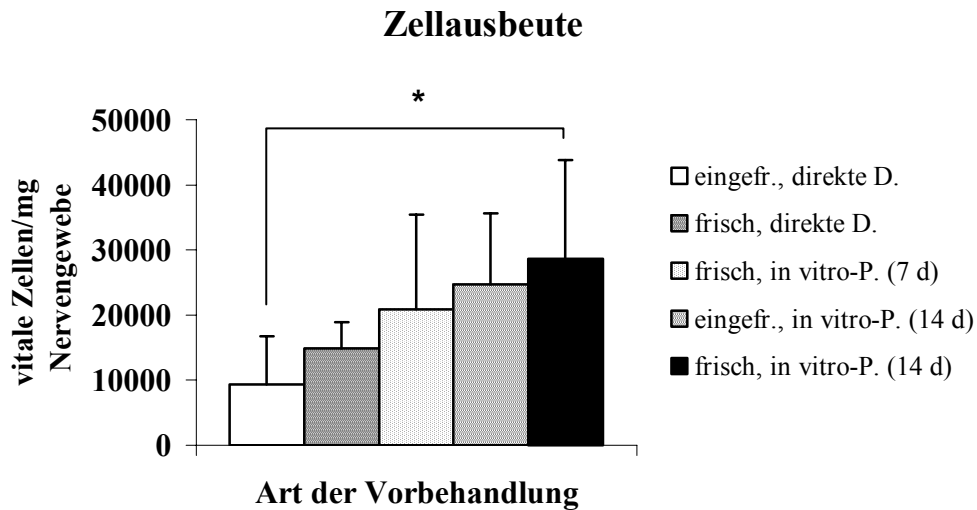


Abb. 4: Dargestellt ist die Ausbeute ($\bar{x} + SD$) an vitalen Zellen/mg dissoziiertem Nervengewebe in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des Nervengewebes. Die Ausbeute an vitalen Zellen aus frischem Nervenmaterial, welches vor der Dissoziation (D.) einer 14-tägigen *in vitro*-Prädegeneration (P.) unterzogen wurde, war signifikant (* $p < 0,01$) erhöht gegenüber der aus zunächst eingefrorenem (eingefr.) und nach dem Auftauen direkt dissoziierten Nervengewebe.

2. Qualität der Dissoziation in Abhängigkeit von der Vorbehandlung

Das humane Nervenmaterial war nach der enzymatischen und mechanischen Aufspaltung (Dissoziation, s. III.2.4/3.4) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung unterschiedlich gut dissoziiert. Es zeigte sich, dass zuvor eingefrorenes und anschließend *in vitro*-prädegeneriertes Nervengewebe durchschnittlich am besten dissoziiert war (mikroskopisch waren kaum noch Zellverbände sichtbar, die Zellen lagen überwiegend vereinzelt). Schlecht dissoziiert (viele Zellverbände, relativ wenige einzelne Zellen) war gleichermaßen eingefrorenes und frisches Gewebe, das der direkten Dissoziation unterzogen wurde. Frisches, *in vitro*-prädegeneriertes Nervenmaterial lag im Dissoziationsgrad dazwischen.

IV. Ergebnisse

3. Zellvitalität nach Dissoziation

Für die Primäraussaat adulter humaner Schwann-Zellen wurde nur die Zahl vitaler Zellen ermittelt, weil beim Auszählen in der Neubauer-Zählkammer vernachlässigbar wenig Trypan Blau-positive Zellen auszumachen waren (s. auch III.2.4). Das Gleiche galt für die weiteren Passagen.

4. Zellaussaat

Die optimale Aussaatzahl vitaler humaner Schwann-Zellen/cm² Kulturoberfläche der jeweiligen Platte richtete sich nach der, die mit adulten Ratten-Schwann-Zellen ermittelt worden war (s. IV.A.3.). Letztendlich lagen die jeweiligen Aussaatzahlen, wie der Tab. 2 zu entnehmen ist, über denen der Ratten-Schwann-Zellen. Die primäre Aussaat (1. Passage) fand generell, wie bei den adulten Ratten-Schwann-Zellen, auf 6-well-Platten statt. Nach weiteren Passagen wurden die humanen Schwann-Zellen ebenfalls auf 6-well oder auf anderen Platten (12-, 24-well) kultiviert. Nach jeder Passage wurden Schwesterkulturen auf 24-well-Platten zur anschließenden immunzytochemischen Markierung ausgesät.

Die SE humaner Schwann-Zellen wurde bei der Primäraussaat von Zellen, gewonnen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial, ermittelt. 24 h nach der primären Aussaat auf einer 6-well-Platte hatten sich im Durchschnitt $33,1 \pm 17,4 \%$ ($n = 5$) der ursprünglich ausgesäten Zellen abgesetzt. Der Rest, ca. 70 %, ging für die weitere Kultivierung verloren.

Allgemein konnte ein unterschiedlich gutes Absetzverhalten humaner Schwann-Zellen, trotz gleicher Zellaussaatzahlen, bei der Primäraussaat in Abhängigkeit ihrer Gewinnung festgestellt werden.

Humane Schwann-Zellen, die aus *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe gewonnen wurden, setzten sich tendenziell besonders gut ab. Dies äußerte sich in einer vergleichsweise hohen Zelldichte auf der Kulturoberfläche, beobachtet im mikroskopischen Phasenkontrast 24 h nach Primäraussaat. Demgegenüber zeigten Zellen,

IV. Ergebnisse

die aus Nervenfaszikeln stammten, welche sofort der Dissoziation zugeführt wurden, ein schlechteres Absetzverhalten (geringere Zelldichte 24 h nach Primäraussaat). Zudem setzten sich Zellen aus frischem Material besser ab als solche aus zuvor eingefrorenem Material.

Platte	6-well (well = 9,6 cm ²)	12-well (well = 3,5 cm ²)	24-well (well = 1,9 cm ²)	24-well, nach Elektroporation
Anzahl ausgesäter vitaler Zellen/cm ² Kulturoberfläche	1,3 ± 0,2 x 10 ⁵ /cm ²	6,1 ± 1,7 x 10 ⁴ /cm ²	6,1 ± 2,1 x 10 ⁴ /cm ²	1,6 ± 0,4 x 10 ⁵ /cm ²
n =	29	13	51	23

Tab. 2: Durchschnittliche Aussatzzahlen (\bar{x} + SD) vitaler adulter humaner Schwann-Zellen/cm² Kulturoberfläche der verschiedenen Kulturplatten.

5. Reinheit adulter humaner Schwann-Zell-Kulturen

Die Reinheit (prozentualer Anteil der p75⁺- oder S100⁺- Zellen [= Schwann-Zellen] in der Kultur, s. III.6./8.) der Primärkulturen adulter humaner Schwann-Zellen wurde im Mittel 5 Tage nach Primäraussaat ermittelt. Schwesterkulturen wurden parallel mittels Cold jet aufgereinigt (2. Passage) und von diesen wiederum Aliquots für die immunzytochemische Markierung (durchschnittlich 5 Tage nach der Aufreinigung) ausgesät. Die Kulturen wurden gegebenenfalls durchschnittlich 7 Tage nach dem ersten selektiven Anreicherungsschritt wiederholt aufgereinigt (3. Passage), und nach weiteren 5 Tagen wurden exemplarisch Schwesterkulturen zur Quantifizierung der Reinheit immunzytochemisch markiert.

Adulte humane Schwann-Zell-Kulturen, die aus jeweils unterschiedlich vorbehandeltem Nervengewebe gewonnen wurden, zeigten bezüglich ihrer Reinheit nur geringe Unterschiede (s. Tab. 5/6 im Anhang). Aus diesem Grund wurden die erhobenen Daten zu einer einheitlichen Gruppe (bis auf die 7-tägige *in vitro*-Prädegeneration, weil bei diesem Ansatz nur exemplarisch Daten von einmal aufgereinigten Kulturen ermittelt wurden) zusammengefasst. Die Primärkulturen adulter humaner Schwann-Zellen waren mit durchschnittlich 88,9 ± 9,6 % p75⁺- oder S100⁺-Zellen (n = 19) bereits relativ rein. Die

IV. Ergebnisse

Reinheit der Kulturen konnte jedoch aufgrund der selektiven Kulturbedingungen und durch einen Cold jet-Aufreinigungsschritt signifikant ($p < 0,01$) auf $96,5 \pm 2,6 \%$ ($n = 24$) erhöht werden. Adulte humane Schwann-Zell-Kulturen hatten nach zweimaliger Aufreinigung mit Cold jet einen durchschnittlichen Anteil an p75⁺- oder S100⁺-Zellen von $97,1 \pm 2,5 \%$ ($n=4$).

Die Primärkulturen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial waren dabei mit durchschnittlich $92,6 \pm 3,9 \%$ Schwann-Zellen ($n = 12$) besonders rein (s. Abb. 5/6 im Anhang), wobei der Anteil an adulten humanen Schwann-Zellen durch einen Aufreinigungsschritt signifikant ($p < 0,01$) auf $97,5 \pm 1,8 \%$ ($n = 15$) angehoben werden konnte (s. Tab. 5 u. Abb. 9/10/13 im Anhang). Humane Schwann-Zell-Kulturen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe zeigten während einer Langzeitkultivierung eine konstant hohe Reinheit. So war die 6. Passage-Kultur (zweimalige Cold jet-Aufreinigung [1. und 5. Passage], restliches Passagieren über Trypsin/EDTA [s. auch III. 5.1]) nach 44 Tagen *in vitro* noch zu 99 % ($n = 1$) rein (vgl. Tab. 6 im Anhang). Es gab keinen Unterschied in der Reinheit zwischen Kulturen, die mit und ohne rekombinanten humanen Neuregulin1- β 1/Heregulin- β 1 epidermal growth factor (EGF) Domäne [rHRG- β 1₁₇₆₋₂₄₆] als Mediumzusatz kultiviert wurden (s. III.4.1).

Zur Überprüfung einer bestehenden Deckungsgleichheit der Charakterisierung adulter humaner Schwann-Zellen anhand der immunzytochemischen Markierung der Proteine p75 und S100 wurden exemplarisch Doppelmarkierungen in Kulturen adulter humaner Schwann-Zellen vorgenommen. Wie in Abb. 5 u. 6 im Anhang zu sehen, markierten die beiden Antikörper anti-p75 und anti-S100 zu 100 % dieselben Zellen, wodurch die übereinstimmende Spezifität dieser Markierungen in Bezug auf adulte humane Schwann-Zellen gezeigt werden konnte.

6. Proliferationsraten adulter humaner Schwann-Zellen

Die Primärkulturen adulter humaner Schwann-Zellen wurden zur Bestimmung der Proliferationsrate (prozentualer BrdU⁺/p75⁺-oder S100⁺-Zellen [= proliferierende

IV. Ergebnisse

Schwann-Zellen] in der Kultur) im Mittel 4 Tage nach Primäraussaat mit BrdU-Stammlösung inkubiert. 24 h später fand die Fixierung statt (s. III.6.2). Die jeweiligen Schwesterkulturen wurden parallel über einen Cold jet-Schritt aufgereinigt und Aliquots für die Ermittlung der Proliferationsrate ausgesät. Die BrdU-Markierung erfolgte durchschnittlich 4 Tage nach der ersten Aufreinigung. Die 2. Passage-Kulturen wurden, wie unter IV.B.5. bereits erwähnt, gegebenenfalls ein weiteres Mal aufgereinigt, und durchschnittlich 4 Tage später wurden Schwesterkulturen mit der BrdU-Stammlösung inkubiert.

Fokussierend auf adulte Schwann-Zell-Kulturen, die aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial gewonnen wurden (vgl. Abb. 5), konnte eine nur geringe Rate an BrdU⁺-primären adulten Schwann-Zellen ermittelt werden ($2,6 \pm 3,5$ %, $n = 6$). Durch die Kultivierung von Schwesterkulturen in Medium, welches als Zusatz rHRG- $\beta_{176-246}$ enthielt, konnte demgegenüber eine signifikant ($p < 0,01$) höhere Rate an proliferierenden Schwann-Zellen erzielt werden ($32,7 \pm 12,5$ %, $n = 6$). Diese Kulturen standen im Mittel 5 Tage unter dem Einfluss von rHRG- $\beta_{176-246}$, von der primären Aussaat bis zur Fixierung. Die mitogene Eigenschaft des rHRG- $\beta_{176-246}$ machte sich auch in Kulturen nach der ersten selektiven Anreicherung bemerkbar. So war der Anteil proliferierender Schwann-Zellen mit $22,4 \pm 17,5$ % ($n = 7$) in Kulturen nach der 2. Passage, die seit der Primäraussaat durchschnittlich 10 Tage mit rHRG- $\beta_{176-246}$ inkubiert wurden (s. Abb. 9 im Anhang), signifikant ($p < 0,01$) größer im Vergleich zu Kulturen, die ohne rHRG- $\beta_{176-246}$ kultiviert wurden ($5,0 \pm 4,0$ %, $n = 8$; s. Abb. 10 im Anhang).

Humane Schwann-Zellen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe wiesen nach einer Langzeitkultivierung unter rHRG- $\beta_{176-246}$ -Einfluss eine um die Hälfte reduzierte Proliferationsrate auf. So waren in der 6. Passage-Kultur (zweimalige Cold jet-Aufreinigung [1. und 5. Passage], restliches Passagieren über Trypsin/EDTA [s. auch III. 5.1]) nach 44 Tagen *in vitro* nur noch 5,9 % proliferierende Schwann-Zellen ($n = 1$) von ursprünglich 13 % nach der 2. Passage ($n = 1$) vorhanden.

Eine Zusammenfassung der Resultate zeigen die Tab. 5 u. 7 im Anhang.

IV. Ergebnisse

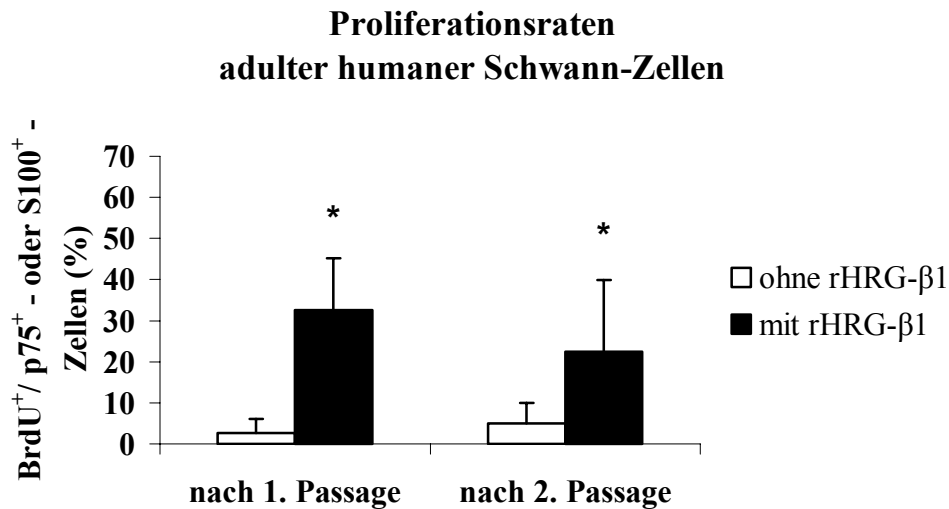


Abb. 5: Dargestellt ist der prozentuale Anteil BrdU⁺/p75⁺- oder S100⁺-Zellen (\bar{x} + SD) in adulten humanen Schwann-Zell-Kulturen nach der 1. Passage (Primäraussaat) und der 2. Passage (einmal aufgereinigt), die aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial gewonnen wurden. Signifikante Unterschiede zwischen Kulturen mit gleicher Passagezahl, die mit oder ohne rHRG-β1₁₇₆₋₂₄₆ kultiviert wurden, sind mit *, $p < 0,01$ gekennzeichnet.

7. Transfektionsraten adulter humaner Schwann-Zellen

Für die Transfektion adulter humaner Schwann-Zellen wurde ebenfalls die Elektroporation herangezogen, da sie sich als effektive Methode zur Transfizierung neonataler und adulter Ratten-Schwann-Zellen erwiesen hatte.

Zunächst wurde wieder die Transfektionsrate anhand EGFP-exprimierender Schwann-Zellen erhoben. Die für die adulten Ratten-Schwann-Zellen etablierten Elektroporationseinstellungen wurden dabei übernommen ($15 \mu\text{g } pEGFP-N2/5 \times 10^5$ Zellen, 260 V , $1050 \mu\text{F}$). Außerdem wurde die Elektroporation ebenfalls bei RT durchgeführt und die Plasmid-DNA vor und nach der Transfektion nur kurzfristig mit den Zellen innerhalb der Elektroporationsküvette inkubiert. Die Elektroporation wurde überwiegend mit Kulturen durchgeführt, welche aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial gewonnen wurden (s. hierzu Tab. 5 im Anhang). Bis auf zwei Ausnahmen

IV. Ergebnisse

wurde die Elektroporation im Anschluss an die erste Aufreinigung mit Cold jet durchgeführt.

Die Elektroporation von aufgereinigten adulten humanen Schwann-Zell-Kulturen aus frischem Nervenmaterial, das zuvor einer 14-tägigen *in vitro*-Prädegeneration unterzogen wurde, brachte folgende Ergebnisse: Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Transfektionsraten (prozentualer Anteil EGFP⁺/S100⁺-Zellen an der GZZ S100⁺-Zellen) von Kulturen, die mit rHRG-β1₁₇₆₋₂₄₆ kultiviert wurden ($14,9 \pm 5,0$ %, n = 3) und von Kulturen, die nicht unter rHRG-β1₁₇₆₋₂₄₆ -Einfluss standen ($24,7 \pm 10$ %, n = 4), vorhanden. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse zu einer einheitlichen Gruppe mit einer durchschnittlichen Transfektionsrate hoch aufgereinigter adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe, von $20,5 \pm 9,3$ % (n = 7) zusammengefasst werden (s. Abb. 12 im Anhang).

Mit dem Ziel die Kultivierungsdauer im Hinblick auf eine schnellstmögliche Retransplantation transfizierter autologer Schwann-Zellen zu verkürzen, wurde die Transfektionsrate von Kulturen evaluiert, die aus frischem, nur 7 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial gewonnen wurden. Die Elektroporation dieser nach einem Aufreinigungsschritt ebenfalls hoch angereicherten ($97,3 \pm 0,7$ % Schwann-Zellen, n = 3) Kulturen führte mit $37,5 \pm 12,3$ % (n = 3) zu einer tendenziell höheren Transfektionsrate im Vergleich zu Kulturen aus länger (14 Tage) *in vitro*-prädegeneriertem Nervenmaterial.

7.1 Transfektion adulter humaner Schwann-Zellen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen

3 verschiedene Kulturen aufgereinigter adulter humaner Schwann-Zellen wurden mit einem 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstrukt (s. III.7.3.1) nach dem oben beschriebenen Elektroporationsprotokoll transfiziert. Die Verwendung des Konstruktes anstelle des nicht mit *Discosoma* Red Fluorescent Protein (DsRed)-markierten 18 kDa-FGF-2 sollte den Erfolg der Transfektion anhand des rot fluoreszierenden Markerproteins DsRed sichtbar machen. Abb. 13 im Anhang zeigt transfizierte adulte humane Schwann-Zellen, welche

IV. Ergebnisse

die DsRed-markierte 18 kDa-FGF-2-Isoform mit dem charakteristischen Verteilungsmuster im Zellkernplasma und den Kernkörperchen exprimieren (CLAUS et al., 2003).

Neben dem Erfolg der Transfektion sollte auch ein möglicher Effekt des überexprimierten FGF-2 auf die zelluläre Teilungsrate ermittelt werden. Hierzu wurden die 3 mit 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstrukt transfizierten Kulturen und die jeweiligen nicht-transfizierten Schwesterkulturen 5 Tage nach Elektroporation mit BrdU-Stammlösung inkubiert und 24 h später fixiert und immunzytochemisch markiert (s. III.6.). Es zeigte sich, dass in allen 3 Kulturen die Proliferationsrate transfizierter Schwann-Zellen höher war im Vergleich zu der nicht-transfizierter Schwann-Zellen (s. hierzu Abb. 6).

Die Transfektion adulter humaner Schwann-Zellen mit HMW-FGF-2-Isoformen, die nicht über einen Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, wurde ebenfalls durchgeführt, aber keine weitere Quantifizierung vorgenommen.

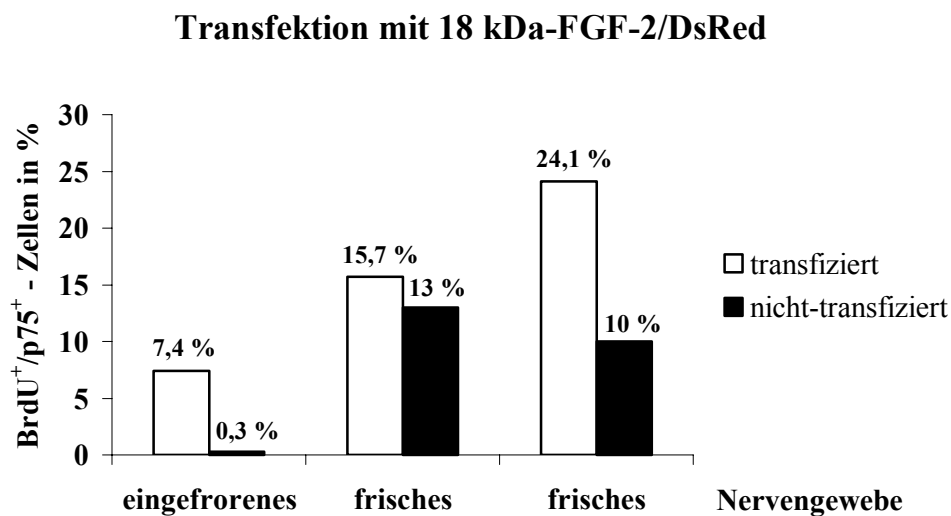


Abb. 6: Darstellung des prozentualen Anteils BrdU⁺/p75⁺-Zellen in Kulturen adulter humaner Schwann-Zellen, die aus 14 Tage *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe (zuvor eingefroren oder frisch) gewonnen, unter HRG-Einfluss kultiviert und nach der 1. Aufreinigung mit 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstrukt transfiziert wurden und der jeweiligen nicht-transfizierten Schwesterkultur, 6 Tage nach Transfektion, jeweils n = 1.

V. Diskussion

1. Optimierung der Methoden zur Isolierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen aus peripherem Nervenmaterial

1.1 Direkte Dissoziation und *in vitro*-Prädegeneration des adulten peripheren Nervenmaterials

In der Literatur werden bereits verschiedene Verfahren zur Isolierung adulter Schwann-Zellen aus peripheren Nerven beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Verfahren methodisch nachvollzogen, kombiniert und durch die Ergänzung neu etablierter Verfahren optimiert. Erstes Ziel war die Isolierung großer Mengen proliferierender adulter Schwann-Zellen in möglichst kurzer Zeit.

SCARPINI et al. (1988) beschrieben die direkte enzymatische und mechanische Dissoziation frisch explantierter, unbehandelter Nervi (Nn.) ischiadici der adulten Ratte und erhielten $0,06 \times 10^4$ Zellen/mg Nervengewebe bei einer Zellvitalität von 90 %. Zur Erhöhung der primären Zellausbeute etablierten MORRISSEY et al. (1991) die Vorkultivierung adulten peripheren Nervenmaterials der Ratte und des Menschen über mehrere Passagen für 5-6 (Ratten-Nerven) bzw. 6-7 (humanes Gewebe) Wochen (multiple Explantation). So wurde, nach Angaben der Autoren, entsprechend der Waller-Degeneration *in vivo* (s. II.3.), in Kultur die Dedifferenzierung der Schwann-Zellen mit anschließender Proliferation innerhalb der Explantate induziert (*in vitro*-Prädegeneration). Die daran anschließende Dissoziation des Nervengewebes führte zu einer deutlich verbesserten Zellausbeute von $4-14 \times 10^4$ Zellen/mg Nervengewebe der Ratte und 2×10^4 Zellen/mg humanem Nervengewebe, außerdem waren die Kulturen mit 97 % adulter Ratten-Schwann-Zellen und 98 % adulter humaner Schwann-Zellen sehr rein. Der Einsatz von Cholera-toxin (CT) wurde von RUTKOWSKI et al. (1992) zur Verkürzung der Kultivierungsphase adulten humanen Nervenmaterials auf 7 Tage genutzt. So konnte die Zellausbeute gegenüber direkt dissoziierten Nn. surales um das 25fache auf $2-6 \times 10^4$ vitale Zellen/mg Nervengewebe bei ähnlich reinen Kulturen angehoben werden.

V. Diskussion

CASELLA et al. (1996) konnten aus direkt dissoziiertem humanen Nervenmaterial zwar eine im Vergleich wesentlich höhere Zahl an vitalen Zellen gewinnen, doch auch sie beschrieben eine um 50 % gesteigerte Zellausbeute nach einer 14-tägigen *in vitro*-Prädegeneration der Explantate und eine zusätzliche Verbesserung des Absetzverhaltens der so gewonnenen Zellen. Durch die Applikation von Mitogenen (Forskolin [FK], Heregulin [HRG]) während der *in vitro*-Prädegeneration konnte die Zellausbeute signifikant gesteigert werden ($14 \pm 2 \times 10^4$ Zellen/mg Nervengewebe). Die Reinheit der Primärkulturen wurde mit 92 ± 1 % angegeben. Ein jüngeres Protokoll von HANEMANN et al. (1998) führte hingegen zu einer vergleichsweise niedrigen Zellausbeute von $0,2 \times 10^4$ Zellen/mg humanem Nervengewebe, wenn humane periphere Nerven für 14 Tage *in vitro* ohne jeglichen Zusatz von Mitogenen inkubiert wurden.

Verglichen mit den Ergebnissen von SCARPINI et al. (1988) und MORRISSEY et al. (1991) war die in dieser Arbeit erzielte Zellausbeute aus direkt dissoziiertem Nervengewebe der adulten Ratte mit $8 \pm 2 \times 10^4$ vitalen Zellen/mg bereits um das 100fache höher. Auch die Zellausbeute aus frischem, direkt dissoziierten Nervenmaterial des Menschen lag mit $1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ vitalen Zellen/mg bereits (ca. das 19fache) über der in der Literatur gemachten Angabe (RUTKOWSKI et al., 1992). Im eigenen Ansatz konnte durch die 14-tägige *in vitro*-Prädegeneration sowohl des Nervenmaterials der Ratte als auch des Menschen, modifiziert nach den Protokollen von CASELLA et al. (1996) und HANEMANN et al. (1998), die Ausbeute an vitalen Zellen/mg dissoziiertem Nervengewebe tendenziell weiter angehoben werden (s. IV.A.1./B.1.). Die Zellausbeute aus *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe der Ratte war mit $10 \pm 4 \times 10^4$ vitalen Zellen/mg vergleichbar mit der von MORRISSEY et al. (1991). Die aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegeneriertem humanen Nervengewebe gewonnene Zahl vitaler Zellen/mg ($2,9 \pm 1,5 \times 10^4$) entsprach der von MORRISSEY et al. (1991) und RUTKOWSKI et al. (1992) angegebenen und lag damit zwar deutlich unter der von CASELLA et al. (1996), aber auch deutlich über der von HANEMANN et al. (1998) aufgeführten Zahl. Das lässt sich durch die Zusammensetzung des in dieser Arbeit für die Prädegeneration verwendeten Mediums erklären. Es enthielt, neben den Zusätzen des Melanozyten-Wachstumsmediums (0,4 % bovines Hypophysenextrakt [BPE], 1 ng/ml Fibroblasten-

V. Diskussion

wachstumsfaktor-2 [FGF-2]), 5 µg/ml BPE und 10 ng/ml FGF-2 in Kombination mit 2 µM FK. Diese Substanzen hatten in vorangehenden Untersuchungen einen mitogenen Effekt auf Ratten-Schwann-Zellen gezeigt (RAFF et al., 1978; PEULVE et al., 1994; RAHMATULLAH et al., 1998). Möglicherweise wirken sie aber auf humane Schwann-Zellen weniger stimulierend (MORRISSEY et al., 1991). Dies könnte die im Vergleich mit CASELLA et al. (1996) niedrigere Zellausbeute erklären. CASELLA et al. (1996) inkubierten das Nervenmaterial schon während der *in vitro*-Prädegeneration mit 10 nM HRG und zusätzlich 2 µM FK, welche synergistisch die Proliferation von Schwann-Zellen des Menschen und auch der Ratte steigern (LEVI et al., 1995; RAHMATULLAH et al., 1998; SCHWORER et al., 2003). HRG wurde in den eigenen Versuchen nicht als Zusatz für die *in vitro*-Prädegeneration eingesetzt, weil befürchtet wurde, dass die frühe Inkubation mit dem sehr potenten Mitogen zu einer schnellen Alterung der humanen Schwann-Zellen und damit zu sinkenden Proliferationsraten während der nachfolgenden Kultivierung führen würde. Zudem hatte sich die verwendete Zusammensetzung des Prädegenerationsmediums als ausreichend für die Gewinnung einer hohen Zahl adulter Ratten-Schwann-Zellen erwiesen, und im Sinne späterer Anwendungen sollten die bei humanen Schwann-Zellen zum Einsatz kommenden Methoden mit denen bei adulten Ratten-Schwann-Zellen verwendeten direkt vergleichbar sein. So blieb selbst die höchste Zellausbeute aus der 14-tägigen *in vitro*-Prädegeneration frischen humanen Nervenmaterials deutlich hinter der aus *in vitro*-prädegeneriertem Nervengewebe der Ratte zurück. Dies könnte auf die geringere Aktivierung der humanen Schwann-Zellen durch die verwendete Kombination der Mitogene BPE und FGF-2 zusammen mit FK zurückzuführen sein. Letzteres hebt den Spiegel an intrazellulärem zyklischen Adenosinmonophosphat an (cAMP-steigernde Substanz) und bewirkt dadurch über die Aktivierung der Proteinkinase A die Phosphorylierung bestimmter Proteine (RAHMATULLAH et al., 1998).

1.2 *In vivo*-Prädegeneration des peripheren Nervenmaterials adulter Ratten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *in vitro*-Prädegeneration der *in vivo*-Prädegeneration gegenübergestellt. Zur Isolierung von adulten Ratten-Schwann-Zellen aus

V. Diskussion

peripherem Nervenmaterial wird in der Literatur nämlich noch eine weitere Methode beschrieben. ANSSELIN et al. (1995) berichteten von einer erhöhten Zellausbeute aus distalen Stümpfen von Nn. ischiadici der adulten Ratte 10-12 Tage nach vollständiger Durchtrennung der Nerven *in vivo* im Vergleich zur Zellausbeute aus den jeweils unverletzten kontralateralen Nerven. Die sich ergänzenden Arbeiten von FANSA et al. (1999b) und KEILHOFF et al. (1999) bezeichneten diese Methode als *in vivo*-Prädegeneration und verstanden darunter die Durchtrennung eines Spendernervens *in situ* zu einem bestimmten Zeitpunkt vor der Entnahme unter Abwartung der Waller-Degeneration (s. II.3.) mit nachfolgender Proliferation der Schwann-Zellen und Phagozytierung des Myelins. Die Autoren gaben eine optimale *in vivo*-Prädegenerationsdauer der Nn. ischiadici adulter Ratten von 7 Tagen an, nach der das distal der Läsion gelegene Nervensegment entnommen und dissoziiert wurde. Diese Prädegenerationsdauer hatte zu maximalen Zellausbeuten und optimalen Proliferationsraten der so gewonnenen Kulturen geführt. Genaue Angaben über die Höhe der Zellausbeute im Anschluss an die *in vivo*-Prädegeneration von Nn. ischiadici adulter Ratten konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Die *in vivo*-Prädegeneration der Nn. ischiadici adulter Ratten wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an das Protokoll von ANSSELIN et al. (1995) durchgeführt und die distalen Nervenstümpfe 10–12 Tage nach vollständiger Durchtrennung der Nerven entnommen. Dadurch ließen sich letztendlich mit $11 \pm 3 \times 10^4$ vitalen Zellen/mg die meisten Zellen aus Nn. ischiadici der adulten Ratte gewinnen (s. IV.A.1.).

1.3 Prädegeneration des peripheren Nervenmaterials als effiziente Isolierungsmethode

Seit der Veröffentlichung der Ergebnisse aus Versuchen mit adulten Ratten-Schwann-Zellen (MAURITZ et al., 2004) waren weitere Daten erhoben worden, die in den Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit mit eingeflossen sind. Dies führte zu geringen Änderungen der Zellausbeuten aus nicht-prädegenerierten und *in vitro*-prädegenerierten Nn. ischiadici der Ratte gegenüber den bereits veröffentlichten Ergebnissen. Doch die Überlegenheit der Methoden, die auf der Prädegeneration von Nervengewebe basieren,

V. Diskussion

blieb bestehen. Die Zellausbeute aus *in vitro*- bzw. *in vivo*-prädegenerierten Nerven war tendenziell bzw. signifikant höher als die aus nicht-prädegenerierten Nerven. Im Durchschnitt konnten durch die *in vivo*-Prädegeneration $2,6 \times 10^6$ vitale Zellen pro Nervus (N.) ischiadicus einer Ratte gewonnen werden. Trotz der geringeren Zellzahl/mg Gewebe war die absolute Zahl mit $8,4 \times 10^6$ vitalen Zellen, die im Mittel aus dem peripheren Nervenmaterial eines Patienten durch eine 14-tägige *in vitro*-Prädegeneration isoliert werden konnte, deutlich höher. Dies kann auf die jeweils größeren Mengen des zur Verfügung stehenden humanen Nervenmaterials im Vergleich zu dem adulter Ratten zurückgeführt werden.

1.4 Auswirkung der unterschiedlichen Vorbehandlung von adultem peripheren Nervengewebe

Die in dieser Arbeit aufgeführten Zellausbeuten beziehen sich nicht auf die Gesamtzellzahl (GZZ, lebende und tote Zellen), sondern nur auf den Anteil vitaler, Trypan Blau-negativer (Trypan-Blau-Färbung = etablierte Methode zur Unterscheidung lebender und toter Zellen [SCARPINI et al., 1988; GUENARD et al., 1992] s. III.2.4) Zellen pro mg dissoziiertem peripheren Nervengewebe. Diese Angabe wurde gewählt, weil nur vitale Zellen für die weitere Kultivierung herangezogen werden können, und nur der Anteil vitaler Zellen eine exakte Aussage über die Qualität der Präparation zulässt.

Die unterschiedliche Behandlung von peripherem Nervenmaterial der adulten Ratte hatte keinerlei Einfluss auf die Zellvitalität. Die Vitalität von Zellpräparationen aus direkt dissoziierten und aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven war mit $96,4 \pm 4,5$ % bzw. $96,9 \pm 3,7$ % lebender Zellen (s. IV.A.2.) annähernd gleich hoch und damit verglichen mit den Angaben in der Literatur mehr als ausreichend.

Die Arbeit mit unterschiedlich vorbehandeltem humanen Nervenmaterial zeigte, dass nicht primär die Qualität (frisch oder eingefroren), sondern vielmehr die Art der nachfolgenden Behandlung Einfluss auf die Höhe der Zellausbeute hatte. Dies kann anhand der höheren Ausbeute an vitalen Zellen ($2,5 \pm 1,1 \times 10^4$ Zellen/mg) aus zuvor eingefrorenem Nervengewebe, welches 14 Tage *in vitro*-prädegeneriert wurde, im Vergleich zur weitaus niedrigeren Zellausbeute ($1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ vitale Zellen/mg) zwar aus frischem Material,

V. Diskussion

welches aber sofort dissoziiert wurde, verdeutlicht werden. In jedem Fall lieferte frisches Material bei gleicher Behandlung tendenziell höhere Zellausbeuten als eingefrorenes Material und wird deshalb als Zellquelle empfohlen.

Auch der Grad der Dissoziation im Anschluss an die enzymatische und mechanische Aufspaltung war hauptsächlich abhängig von der Art der Behandlung des humanen Nervengewebes. Wie bei der Zellzählung im mikroskopischen Phasenkontrast (s. III.2.4) auszumachen, waren Präparationen von *in vitro*-prädegeneriertem Gewebe besser dissoziiert als solche von direkt aufgearbeitetem Gewebe (s. IV.B.2.). Die gut dissoziierten Präparationen aus *in vitro*-prädegenerierten Nerven (aus frischen tendenziell besser als aus eingefrorenen Nerven) führten außerdem zu einem besseren Absetzen der Zellen bei der Primäraussaat (s. IV.B.4.). Ähnliche Beobachtungen wurden auch an adulten Ratten-Schwann-Zellen gemacht. ANSSELIN et al. (1995) berichteten ebenfalls von einer verbesserten Dissoziation (*in vivo*-) prädegenerierten Gewebes und einer höheren seeding efficiency (SE, s. III.4.2) der so isolierten Zellen im Vergleich zu nicht-prädegeneriertem Nervengewebe. Um die Aggressivität der enzymatischen Verdauung zu reduzieren, verkürzten die Autoren zudem die Phase der Dissoziation von der sonst üblichen Inkubation „über Nacht“ (SCARPINI et al., 1988; MORRISSEY et al., 1991) auf 3–4 h, was keinen Effekt auf die Höhe der Zellausbeute hatte, jedoch die Zahl an adhäsiven Zellen nach der Aussaat ansteigen ließ. Eine vermutlich reduzierte Schädigung der Zellmembranen wurde als Grund hierfür angegeben.

In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit wurde die Beobachtung von ANSSELIN et al. (1995) aufgegriffen und eine Verkürzung der enzymatischen Dissoziation nicht-prädegenerierter Nn. ischiadici adulter Ratten auf 4 h vorgenommen. Die daraus gewonnenen Kulturen zeigten aber einen höheren Anteil an verunreinigenden Fibroblasten und geringere Proliferationsraten primärer Schwann-Zellen als Kulturen nach 20-stündiger Digestion („Schwann-Zellen-physiologische Zellkultur und Protein-Kaskade“, biochemischer Großversuch von Kerstin Radtke, 2002, im Zellkulturlabor der Abteilung Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover [MHH]). Es wurde daher für die Dissoziation adulten Nervengewebes die nach KEILHOFF et al. (1999) modifizierte Methode angewendet, welche in der Zusammensetzung der Enzyme (Dispase,

V. Diskussion

Kollagenase; s. III.2.4) und der Dissoziationsdauer (20 h) weitestgehend mit denen in der übrigen Literatur beschriebenen Methoden (SCARPINI et al., 1988; MORRISSEY et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 1992; CASELLA et al., 1996; HANEMANN et al., 1998) übereinstimmte.

2. Kultivierung adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

2.1 Beschichtung der Kulturplatten

Die Wahl der richtigen Beschichtung von Kulturplatten ist Voraussetzung für eine ausreichende Adhäsion und Proliferation adulter Schwann-Zellen *in vitro*. In Pilotstudien zu dieser Arbeit hatte sich die Doppelbeschichtung der Kulturplatten mit Laminin, als natürlicher Komponente, und der synthetisch hergestellten Polyaminosäure Poly-L-Ornithin (s. III.4.1) als geeignetes Substrat zur Kultivierung adulter Ratten-Schwann-Zellen erwiesen („Schwann-Zellen-physiologische Zellkultur und Protein-Kaskade“, biochemischer Großversuch von Kerstin Radtke, 2002, im Zellkulturlabor der Abteilung Neuroanatomie, MHH). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass dies auch uneingeschränkt für adulte humane Schwann-Zellen zutraf. Laminin ist als Bestandteil der extrazellulären Matrix am Aufbau der Basallamina beteiligt und kommt im regenerationsfähigen Teil des Nervensystems vor. Letzteres lässt auf die wichtige Rolle des Laminins in der Unterstützung axonaler Regeneration des peripheren Nervensystems schließen (FU u. GORDON, 1997; MIRSKY u. JESSEN, 1999). Laminin ist außerdem für die Aufrechterhaltung der normalen Schwann-Zell-Funktion im peripheren Nerven zuständig (MIRSKY u. JESSEN, 1999). Die Verwendung von Laminin-beschichteten Kulturplatten unterstützt die Adhäsion und Proliferation adulter Schwann-Zellen (VLEGGERT-LANKAMP et al., 2004). CASELLA et al. (1996) sowie HANEMANN et al. (1998) berichteten zudem von schnellerem Wachstum bzw. am stärksten proliferierenden adulten humanen Schwann-Zellen, wenn diese auf Laminin ausgesät wurden.

V. Diskussion

2.2 Optimale Aussaatdichte

Die Diskussion über die optimale Aussaatdichte in der Literatur ist kontrovers, so dass die in den wissenschaftlichen Veröffentlichungen aufgeführten Aussaatzahlen/cm² Kulturoberfläche stark variieren. Während die Zahl von FANSA et al. (1999b) mit 20×10^4 ausgesäten Zellen/cm² noch über der in dieser Arbeit verwendeten höchsten Aussaatdichte lag, wurde diese von anderen Autoren deutlich unterschritten. So säten SCARPINI et al. (1988) $1,6 \times 10^4$ Zellen/cm², PEULVE et al. (1994) $1,0 \times 10^4$ Zellen/cm² und HANEMANN et al. (1998) $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² aus und damit im Durchschnitt 7mal weniger Zellen/cm² als in der vorliegenden Arbeit (s. IV.A.3./B.4.). CALDERON-MARTINEZ et al. (2002) säten mit $0,26 \times 10^4$ /cm² sogar noch weniger Zellen aus.

Die Aussaatzahlen wurden unterschiedlich begründet. Auf der einen Seite hatten CASELLA et al. (2000) herausgefunden, dass mit sinkender Zahl ausgesäter adulter humaner Schwann-Zellen/cm² Kulturoberfläche die HRG/FK-induzierte Proliferation steigt. Auf der anderen Seite bewiesen FANSA et al. (1999b) das Gegenteil, nachdem die Proliferationsraten adulter humaner Schwann-Zellen einhergehend mit der Vermehrung der Zellen und folglich mit der Erhöhung der Zelldichte während der Kultivierung immer weiter angestiegen waren. Die durch FANSA et al. (1999b) zitierten Beobachtungen von DONG et al. (1995), dass Schwann-Zellen *in vitro* eine dichteabhängige Überlebensrate zeigten und bei ungenügender Dichte abstarben, bekräftigt die Notwendigkeit der Aussaat einer relativ hohen Zellzahl/cm². Dies rechtfertigte durchaus die im Vergleich hohe Aussaatdichte der Zellen in den eigenen Versuchen.

Eine wirkliche Aussagekraft erhält die ausgesäte Zelldichte erst mit der Angabe der SE. Unterschiede in der SE können trotz abweichender Aussaatzahlen zu einer ähnlich hohen absoluten Zahl adhäsiver Zellen/cm² führen. Die von SCARPINI et al. (1988) erhobene SE adulter Ratten-Schwann-Zellen von 30-35 % war mit der eigenen von ca. 20 % vergleichbar (s. IV.A.3.), während die von LI et al. (1998) mit 40-60 % schon deutlich höher lag. Die SE, welche RUTKOWSKI et al. (1992) anhand von adulten humanen Schwann-Zellen nach der Primäraussaat erhoben hatten, lag mit 85 % um ein Vielfaches über den Literaturangaben und der SE adulter humaner Schwann-Zellen in den eigenen Versuchen (ca. 33 %, s. IV.B.4.). Die Zeitspanne von der Aussaat der Zellen bis zur

V. Diskussion

Ermittlung der SE war bei RUTKOWSKI et al. (1992) aber mit 48 h doppelt so lang. Trotzdem kann die SE als vergleichsweise hoch eingeschätzt werden. Um die Adhäsion möglichst vieler Zellen zu bewirken, säten RUTKOWSKI et al. (1992) die Zellen in einem anfänglich sehr geringen Volumen an Medium aus, damit der Kontakt zur Kulturoberfläche gewährleistet werden konnte. Erst nach dem Absetzen der Zellen wurde die Menge an Medium wieder erhöht. Die Verwendung eines geringen Volumens an Medium zur primären Aussaat könnte eine geeignete Modifikation eigener Techniken bedeuten.

2.3 Selektive Kulturbedingungen unter Verwendung eines definierten serumfreien Kulturmediums

Die Auswahl eines geeigneten Kulturmediums hatte in Pilotstudien zu dieser Arbeit mit adulten Ratten-Schwann-Zellen stattgefunden. In vergleichenden Untersuchungen waren hierbei verschiedene serumfreie Medien getestet worden. Es hatte sich herausgestellt, dass Melanozyten-Wachstumsmedium versetzt mit 2 μ M FK, 10 ng/ml FGF-2 und 5 μ g/ml BPE als definiertes serumfreies Kulturmedium am besten geeignet war, das Fibroblastenwachstum zu unterdrücken und gleichzeitig die Kulturen mit einem hohen Anteil an Schwann-Zellen rein zu halten. Die Verwendung eines serumhaltigen Mediums hatte sich als unzuverlässig herausgestellt (MAURITZ et al., 2004; biochemischer Großversuch von Kerstin Radtke, 2002, im Zellkulturlabor der Abteilung Neuroanatomie, MHH).

Der Gebrauch serumfreier Medien bietet zahlreiche Vorteile. Seren sind undefinierbare Naturprodukte wechselnder Zusammensetzung und schwankenden Gehalts an Inhaltsstoffen. Daraus ergeben sich zahlreiche Nachteile. Neben der Schwankung in Qualität und Quantität können Inhibitoren (z.B. Bakterientoxine) oder auch Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, Viren) enthalten sein. Ein weiterer negativer Aspekt ist, dass in heterogenen Zellpopulationen von Primärkulturen bestimmte Zelltypen in ihrem Wachstum unkontrollierbar bevorzugt werden. So wird besonders das Wachstum von Fibroblasten begünstigt (LINDL u. BAUER, 2000). Demgegenüber teilen sich Schwann-Zellen in serumhaltigen Medien ohne Zusatz von Mitogenen normalerweise nur

V. Diskussion

sehr langsam (RAFF et al., 1978; SCARPINI et al., 1988; LEVI et al., 1995). Bevorzugt werden sollten demnach definierte serumfreie Medien, denen zur selektiven Anregung der Schwann-Zell-Proliferation Mitogene zugesetzt werden.

Die Auswahl geeigneter Mitogene erfolgte nach eingehendem Literaturstudium. BPE und FGF-2 stimulierten in Kombination mit cAMP-steigernden Substanzen (FK, CT) selektiv die Proliferation von Ratten-Schwann-Zellen (RAFF et al., 1978; PEULVE et al., 1994). Sehr potente Mitogene für humane Schwann-Zellen gehören der Familie der Neureguline an. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören u.a. die Polypeptide HRG und glial growth factor (GGF) (LEVI et al., 1995; RUTKOWSKI et al., 1995; SCHWORER et al., 2003). Die Neureguline kommen in peripheren Nerven vor und spielen bei der Differenzierung, der Proliferation und dem Überleben von Schwann-Zellen eine wichtige Rolle. Sie besitzen alle eine epidermal growth factor (EGF)-ähnliche Domäne, durch welche die direkte Bindung zu den von Schwann-Zellen exprimierten Tyrosinkinase-Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 hergestellt wird. Als Voraussetzung für die Teilung vieler Zelltypen aktiviert diese Bindung den mitogenaktivierten Proteinkinase-Signalweg (LEVI et al., 1995; RAHMATULLAH et al., 1998; SCHWORER et al., 2003). Rekombinantes GGF (RUTKOWSKI et al., 1995) und rekombinantes HRG- β ₁₇₇₋₂₄₄, eine die (EGF)-ähnliche Domäne enthaltende verkürzte Form des HRG- β ₁ (LEVI et al., 1995), stimulierten die Teilungsaktivität humaner Schwann-Zellen *in vitro*, ein Effekt, der sich durch Zusatz von cAMP-steigernden Substanzen potenzieren ließ. Dabei bildete die zusätzliche Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels nach Autorenangaben die Voraussetzung für eine Langzeitkultivierung der Schwann-Zellen bei gleichzeitiger Verhinderung des Überwucherns der Schwann-Zellen durch stark proliferierende Fibroblasten. Anders als in Schwann-Zellen führt nämlich die erhöhte cAMP-Konzentration in humanen Fibroblasten zu einer Inhibierung der Zellteilung (LEVI et al., 1995; RUTKOWSKI et al., 1995). Dem oben genannten Rechnung tragend wurde dem hier verwendeten Melanozyten-Wachstumsmedium 10 nM rekombinantes humanes Neuregulin1- β ₁/Heregulin- β ₁ EGF domain zugesetzt.

3. Reinheit adulter Schwann-Zell-Kulturen der Ratte und des Menschen

3.1 Charakterisierung adulter Schwann-Zellen anhand spezifischer Markerproteine

Aufgrund der Heterogenität der Kulturen musste eine genaue Identifizierung der Zelltypen vorgenommen werden. Die Morphologie der Zellen gab erste Anhaltspunkte. Adulte Ratten-Schwann-Zellen stellen sich *in vitro* bipolar und spindelförmig dar (SCARPINI et al., 1988; VROEMEN u. WEIDNER, 2003). Demgegenüber wird die Morphologie adulter humaner Schwann-Zellen als bi-, tri- oder multipolar (CASELLA et al., 1996; HANEMANN et al., 1998; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002) beschrieben. Die Fibroblasten sowohl der Ratte als auch des Menschen zeigen hingegen eine flachere, mehr polymorphe Gestalt (SCARPINI et al., 1988; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002; VROEMEN u. WEIDNER, 2003). Es ist aber auch bekannt, und eigene Beobachtungen bestätigen dies, dass Zellen mit der morphologischen Erscheinung einer Schwann-Zelle oder der eines Fibroblasten spezifische Proteine für Fibroblasten (Thy1) bzw. für Schwann-Zellen (p75^{LNGFR} oder S100) exprimieren können (ECCLESTON et al., 1991; LI et al., 1998). Aus diesem Grund ist eine Charakterisierung der Zellen anhand spezifischer Markerproteine nötig, um eine genaue Aussage über die Reinheit der Kulturen treffen zu können.

Die am häufigsten herangezogenen Markerproteine für Schwann-Zellen sind das intrazelluläre Kalzium-bindende Protein S100 (MORRISSEY et al., 1991; LEVI et al., 1995; RUTKOWSKI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; LI et al., 1998; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002) und der auf der Zelloberfläche befindliche niedrig-affine Nervenwachstumsfaktorrezeptor p75 (p75^{LNGFR}) (YASUDA et al., 1987; DONG et al., 1997; LI et al., 1998; VROEMEN u. WEIDNER, 2003). S100 wird von myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen peripherer Nerven exprimiert (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2003), wohingegen p75^{LNGFR} *in vivo* nur von Schwann-Zellen während der Entwicklung oder von der nicht-myelinisierenden Form reifer Schwann-Zellen exprimiert wird. Außerdem findet eine Hochregulierung des p75^{LNGFR} in dedifferenzierten, ursprünglich Myelin-bildenden Schwann-Zellen infolge einer Verletzung peripherer

V. Diskussion

Nerven statt (YASUDA et al., 1987; STOLL u. MULLER, 1999; COSGAYA et al., 2002; MIRSKY et al., 2002).

Obwohl von einer übereinstimmenden Charakterisierung von Schwann-Zellen *in vitro* durch die immunzytochemische Markierung beider Proteine ausgegangen werden konnte, wiesen in Kulturen adulter Ratten-Schwann-Zellen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven, die exemplarisch mit dem anti-p75^{LNGFR}- und dem anti-S100-Antikörper doppelmarkiert wurden (s. IV.A.5.), etwa 4 % der S100-positiven [S100⁺] Zellen keine p75^{LNGFR}-Markierung [p75⁺] auf. Dies lässt sich nach YASUDA et al. (1987) dadurch erklären, dass p75^{LNGFR} erst mit der Zeit in Kultur von adulten Schwann-Zellen als Antwort auf stattfindende Redifferenzierungsprozesse analog zu den Prozessen, die nach Nervenverletzungen *in vivo* ablaufen, exprimiert wird. Somit erscheint es plausibel, dass nicht zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung alle adulten Schwann-Zellen eine p75^{LNGFR}-Immunreaktivität zeigen. Auch HANEMANN et al. (1998) berichteten von Kulturen adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen nach *in vitro*-Prädegeneration, in denen S100⁺-Zellen nur zu 80-90 % auch mit anti-p75^{LNGFR}-Antikörpern markiert werden konnten. Demgegenüber stellten LI et al. (1998) keine Unterschiede in der Doppelmarkierung von S100 und p75^{LNGFR} adulter Ratten-Schwann-Zellen fest, die ebenfalls aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven (7 Tage) mit nachfolgender *in vitro*-Prädegeneration (4 Tage) gewonnen wurden. Hier waren alle Zellen gleichzeitig S100⁺ und p75⁺. Auch der alleinige Nachweis des Proteins S100 zur Identifizierung von Schwann-Zellen ist nicht unumstritten (GARAVITO et al., 2000).

Tatsächlich zeigten die eigenen Untersuchungen nur eine geringe Diskrepanz in der Identifizierung adulter Ratten-Schwann-Zellen über die Markierung der Antigene p75^{LNGFR} und S100. Um falsch positive Markierungen durch S100-Antikörper auszuschließen, wurden zur einfachen Markierung nur anti-p75^{LNGFR}-Antikörper verwendet. Zur zusätzlichen Absicherung der Spezifität der p75^{LNGFR}-Markierung wurden außerdem, unter Vermeidung der gleichzeitigen Markierung der Primärantikörper durch zwei Sekundärantikörper mit gleicher Bindungsspezifität, Schwesterkulturen mit Primärantikörpern gegen Thy1, etablierter Oberflächenmarker für Fibroblasten (BROCKES et al., 1979; ASSOULINE et al., 1983; VROEMEN u. WEIDNER, 2003),

V. Diskussion

inkubiert. Diese immunzytochemische Markierung lieferte keine 100-prozentige Übereinstimmung der prozentualen Anteile Thy1-positiver (2,9 %) und p75^{LNGFR}-negativer (6,6 %) Zellen in den analysierten Schwesterkulturen. Die Abweichung war aber sehr gering und kann sicherlich auch auf Schwankungen in der Reinheit der Schwesterkulturen basieren. Adulte humane Schwann-Zellen hingegen haben in den eigenen Studien keinen Unterschied in der Markierung gezeigt (s. IV.B.5.).

3.2 Strategien zur selektiven Anreicherung adulter Schwann-Zellen

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Anstrengungen unternommen, Schwann-Zellen aus adultem peripheren Nervenmaterial in ausreichender Menge zu gewinnen und diese in Kultur zu expandieren. Besonders für Zellimplantationen müssen möglichst reine Kulturen (hoher Anteil an Schwann-Zellen) verwendet werden, da Fibroblasten den regenerationsfördernden Effekt der Schwann-Zellen u.a. durch Narbenbildungen zunichte machen könnten (RUTKOWSKI et al., 1992; RUTKOWSKI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; CALDERON-MARTINEZ et al., 2002). Die Schwierigkeiten liegen dabei in der Notwendigkeit Methoden zu entwickeln, welche die differenzierten, postmitotischen adulten Schwann-Zellen zur Proliferation anregen und gleichzeitig das Fibroblastenwachstum unterdrücken. Die hierzu etablierten Strategien basieren auf der Aufreinigung der Kulturen erstens durch die Eliminierung der Fibroblasten und zweitens durch die Schaffung selektiver Kulturbedingungen unter Verwendung von Mitogenen oder Antimitotika. Zudem hat sich gezeigt, dass schon die Art der Gewinnung adulter Schwann-Zellen, besonders der Ratte, Einfluss auf die Reinheit der Primärkulturen hat.

In vergleichenden Studien konnten MORRISSEY et al. (1991) zeigen, dass die multiple Explantation, d.h. die *in vitro*-Prädegeneration mit einem gleichzeitigen Aufreinigungseffekt durch das Auswachsen von Fibroblasten aus den Explantaten und deren Eliminierung über einen Wechsel der Kulturplatten, von *Nn. ischiadici* adulter Ratten zu Primärkulturen mit deutlich höherer Reinheit (97 %) führte im Vergleich zu denen aus direkt dissoziierten Nerven (10-40 % Reinheit). Primärkulturen adulter Ratten-Schwann-Zellen aus der *in vitro*-Prädegeneration waren in den eigenen Versuchen (s. IV.A.5.) mit etwa 69 % weniger rein. Dies kann auf die längere Kultivierung der

V. Diskussion

Explantate *in vitro* (5-6 Wochen) durch MORRISSEY et al. (1991), welche mit einem vermehrten Auswachsen der Fibroblasten einhergeht, zurückgeführt werden. Das Augenmerk auf ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit gerichtet, in möglichst kurzer Zeit ausreichende Mengen an adulten Schwann-Zellen zu gewinnen, wurden kürzere Prädegenerationszeiten beibehalten. Aufgrund der vorliegenden und der in der Literatur beschriebenen schlechten Ergebnisse wurde die Kultivierung adulter Schwann-Zellen der Ratte, welche aus direkt dissoziierten Nerven gewonnen wurden, nach Erhebung der Zellausbeute und -vitalität nicht weiter verfolgt. Die *in vivo*-Prädegeneration lieferte tendenziell höhere Zellausbeuten als die *in vitro*-Prädegeneration, führte jedoch zu einer durchschnittlich geringeren Reinheit der Primärkulturen (ca. 49 %).

Während der weiteren Kultivierung adulter Schwann-Zellen müssen diese weiter angereichert oder bereits reine Kulturen vor dem Überwuchern durch stark proliferierende Fibroblasten bewahrt werden. Wie bereits unter V. 2.3 erwähnt, spielt dabei die Schaffung selektiver Kulturbedingungen eine wichtige Komponente, unter denen besonders das Wachstum der Schwann-Zellen gefördert und das der Fibroblasten inhibiert wird. Die Kultivierung adulter Schwann-Zellen ist in serumhaltigem Medium ohne weitere Zusätze über einen längeren Zeitraum nicht möglich (SCARPINI et al., 1988). Eine Überwucherung der Schwann-Zellen durch Fibroblasten kann verhindert werden, indem Substanzen eingesetzt werden, welche selektiv proliferationsfördernd auf Schwann-Zellen wirken und möglichst gleichzeitig inhibierend auf das Fibroblastenwachstum. So führte die Kombination aus HRG mit den cAMP-steigernden Substanzen CT und FK zu selektiven Bedingungen, unter denen adulte humane Schwann-Zellen nicht durch Fibroblasten überwuchert wurden (LEVI et al., 1995). Auch RUTKOWSKI et al. (1995) machten ähnliche Erfahrungen und konnten durch den Einsatz von rekombinantem GGF2 in Kombination mit zwei cAMP-steigernden Substanzen adulte humane Schwann-Zell-Kulturen über 9 Passagen rein halten. Adulte Ratten-Schwann-Zellen konnten unter dem Einfluss von GGF und FK 12-18 Wochen in Kultur gehalten werden (MORRISSEY et al., 1991). Das in dieser Arbeit verwendete definierte serumfreie Kulturmedium wurde zur Schaffung solcher für adulte Schwann-Zellen selektiven Kulturbedingungen ebenfalls mit den entsprechenden Mitogenen (FGF-2, BPE, HRG, FK) versetzt.

V. Diskussion

Zur Anreicherung adulter Schwann-Zellen können auch Antimitotika wie cytosine arabinoside (Ara-C) eingesetzt werden, die das Fibroblastenwachstum hemmen. Ara-C hat aber bei zu häufiger Verabreichung auch einen cytotoxischen Effekt auf adulte humane Schwann-Zellen gezeigt (CALDERON-MARTINEZ et al., 2002).

Eine andere Möglichkeit, um Fibroblasten zu eliminieren, stellt die aktive Aufreinigung adulter Schwann-Zell-Kulturen dar. Hierzu gehört das Antikörper-vermittelte Immunopanning, welches aber eine aufwendige Präparation von Antikörper-beschichteten Platten voraussetzt und bei DONG et al. (1997) zusätzlich die Verabreichung des Antimitotikums Ara-C notwendig machte. Als weitere Beispiele seien die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (MORRISSEY et al., 1995) und die Magnet-aktivierte Separation (VROEMEN u. WEIDNER, 2003) genannt, die neben dem zeitlichen Aufwand auch das Vorhandensein der entsprechenden Apparaturen voraussetzen. Für die eigenen Versuche wurde eine einfache, wenig zeitaufwendige und kostengünstige Aufreinigungsmethode für adulte Schwann-Zellen etabliert (s. III.5.2). Ein vergleichbares Verfahren wurde zuvor zur Aufreinigung von Schwann-Zell-Kulturen aus fetalen Dorsalwurzelganglien etabliert (JIRSOVA et al., 1997) und konnte hier zum ersten Mal erfolgreich zur Anreicherung adulter Schwann-Zellen angewendet werden. Die Methode basiert auf unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften, so lösten sich adulte Schwann-Zellen unter dem Strahl eiskalten Mediums (= Cold jet) selektiv von der Oberfläche der Kulturplatte ab, während die verunreinigenden Fibroblasten überwiegend sitzen blieben. Auf diese Weise konnten Primärkulturen adulter Ratten-Schwann-Zellen innerhalb der ersten 2-3 Kulturtage signifikant aufgereinigt werden (s. IV.A.5.). Das galt gleichermaßen für Präparationen aus der *in vitro*- (ca. 94 % Schwann-Zellen nach 2. Passage) als auch für solche aus der *in vivo*-Prädegeneration (ca. 91 % Schwann-Zellen nach 2. Passage). So wurde der in weniger reinen Primärkulturen liegende scheinbare Nachteil der *in vivo*-Prädegeneration ausgeglichen. Zudem konnten die Schwann-Zellen der einmal aufgereinigten Kulturen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven über einen zweiten Cold jet-Aufreinigungsschritt nochmal weiter angereichert werden und zeigten nach ca. 3 Wochen in Kultur eine Reinheit von etwa 95 %. Die Kombination aus aktiver Aufreinigung und selektiven Kulturbedingungen ermöglichte außerdem, die Kulturen der adulten Ratten-Schwann-

V. Diskussion

Zellen über Wochen vor dem Überwuchern durch Fibroblasten zu bewahren. Fand jedoch keine selektive Anreicherung über Cold jet statt und wurden die Zellen lediglich durch Trypsinierung passagiert, war die Reinheit mit 31,2 % gering und zeigte die Wichtigkeit mindestens eines Cold jet-Aufreinigungsschrittes auf. Aufgrund der bewiesenen Effektivität und der einfachen und schnellen Anwendbarkeit von Cold jet wurde diese Methode auch stellvertretend für die Verwendung von Trypsin/EDTA zum Passagieren eingesetzt.

Auch bei der Arbeit mit adulten humanen Schwann-Zellen lag der Fokus eher auf Kulturen, die aus prädegenerierten Nerven gezüchtet wurden. Die Primärkulturen adulter humaner Schwann-Zellen (s. IV.B.5.) waren unabhängig von der Vorbehandlung des Nervengewebes im Vergleich zu denen der Ratte bereits relativ rein. So lag die Reinheit der primären Kulturen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial mit ca. 93 % im Bereich der in der Literatur gemachten Angaben (CASELLA et al., 1996; HANEMANN et al., 1998). Trotz ihrer vergleichsweise hohen Reinheit konnten aber auch die Primärkulturen adulter humaner Schwann-Zellen durch einen Cold jet-Schritt signifikant aufgereinigt werden (ca. 97 % Schwann-Zellen nach 2. Passage). Kulturen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe, waren auch nach einer Langzeitkultivierung von 44 Tagen und nach zweimaliger Aufreinigung über Cold jet mit 99 % Schwann-Zellen weiterhin hoch angereichert, wodurch die Effektivität der Kulturbedingungen auch für adulte humane Schwann-Zellen gezeigt werden konnte. Gleichzeitig bot das in den eigenen Versuchen verwendete serumfreie Medium die Grundlage, neben der möglichen Langzeitkultivierung, definierbare und reproduzierbare und dadurch für adulte Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen direkt vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Unter dem in dieser Arbeit verwendeten Begriff „Schwann-Zell-Kultur“ wird aufgrund der Tatsache, dass die Kulturen nie zu 100 % rein waren, immer die Mischkultur aus Schwann-Zellen und Fibroblasten verstanden.

4. Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

4.1 Verfahren zur Bestimmung der Proliferationsrate adulter Schwann-Zellen

Zwei verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Proliferationsrate werden in der Literatur beschrieben. Die eine Methode basiert auf dem Nachweis des in die DNA sich teilender Zellen inkorporierten radioaktiven [³H]-Thymidin-Isotops (LEVI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; CASELLA et al., 2000) und die andere Methode auf dem Nachweis des analogen Einbaus von 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) (SCARPINI et al., 1988; MORRISSEY et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 1992; RUTKOWSKI et al., 1995; DONG et al., 1997; FANSA et al., 1999b). Letztere Methode bietet den Vorteil, nicht mit einer radioaktiven Substanz umgehen zu müssen und wurde zur Erhebung der Proliferationsraten in den eigenen Versuchen eingesetzt.

Die in der Literatur angegebenen Inkubationszeiten der Kulturen mit [³H]-Thymidin oder BrdU vor der Fixierung und der anschließenden immunzytochemischen Färbung spezifischer Markerproteine (S100, p75 = Schwann-Zellen; Thy1 = Fibroblasten) variieren. Es werden Inkubationszeiten von 18 h (RUTKOWSKI et al., 1992; RUTKOWSKI et al., 1995), 20 h (DONG et al., 1997), 24 h (MORRISSEY et al., 1991; LEVI et al., 1995; CASELLA et al., 1996; FANSA et al., 1999b; CASELLA et al., 2000) und 3 Tagen (SCARPINI et al., 1988) aufgeführt. Für die eigenen Untersuchungen wurde eine Inkubationszeit der Kulturen mit BrdU von 24 h gewählt. Während eine 18-, 20- und 24-stündige Inkubation dem Zellzyklus der meisten Säugetierzellen entspricht (LEVI et al., 1995), ist die Wahrscheinlichkeit bei einer 3 Tage langen Inkubation sehr hoch, dass sich Tochterzellen weiter teilen und dadurch eine erhöhte Proliferationsrate ermittelt wird. So sind die aus einer 18-, 20- und 24-stündigen Inkubation erfassten Daten untereinander eher vergleichbar als mit Daten, die nach einer 3 Tage langen Inkubation erhoben wurden.

V. Diskussion

4.2 Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des adulten peripheren Nervenmaterials und von den verwendeten Medienzusätzen

MORRISSEY et al. (1991) kombinierten die *in vitro*-Prädegeneration der Nervenexplantate mit mitogen- und serumhaltigem Medium während der anschließenden Kultivierungsphase und zählten etwa 27 % proliferierende adulte Ratten-Schwann-Zellen. FANSA et al. (1999b) berichteten von signifikant höheren Proliferationsraten (> 60 %) adulter Ratten-Schwann-Zellen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven im Gegensatz zu denen aus den kontralateralen Kontrollnerven (direkt dissoziiert), auch ohne Einsatz von Mitogenen, aber unter Verwendung serumhaltigen Mediums. In den eigenen Untersuchungen war die Proliferationsrate der adulter Ratten-Schwann-Zellen (s. IV.A.6.) in Kulturen aus *in vitro*-prädegenerierten Nerven zunächst signifikant höher (ca. 41 %) als die der Schwann-Zellen in Kulturen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven (ca. 9 %). Das Verhältnis veränderte sich aber nach dem ersten notwendigen Cold jet-Aufreinigungsschritt zugunsten der *in vivo*-Prädegeneration. Während die Proliferationsrate der Schwann-Zellen aus der *in vitro*-Prädegeneration mit etwa 35 % leicht abnahm, steigerte sich die der Schwann-Zellen aus der *in vivo*-Prädegeneration signifikant auf 43 %. Als eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Entwicklung der Proliferationsraten in Abhängigkeit der Prädegenerationsart konnten DONG et al. (1997) zeigen, dass adulte Ratten-Schwann-Zellen, welche aus direkt dissoziierten Nerven gewonnen wurden, erst nach einer 5-tägigen Refraktärzeit in Kultur auf die proliferationsfördernden Eigenschaften von Wachstumsfaktoren (z.B. FGF-2) mit oder ohne Zusatz von FK ansprachen, d.h., die Reaktion auf die Mitogene entwickelte sich erst mit der Zeit in Kultur. Übertragen auf die eigenen Versuche könnte die relativ hohe Proliferationsrate der Schwann-Zellen in Primärkulturen aus *in vitro*-prädegenerierten Nerven darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen innerhalb der Explantate bereits für 2 Wochen den Mitogenen des Prädegenerationsmediums (s. III.2.3) ausgesetzt waren, und sie deshalb in den ersten Kulturtagen die oben genannte Refraktärzeit bereits überwunden hatten. Dementsprechend könnten adulte Ratten-Schwann-Zellen aus der *in vivo*-Prädegeneration eine bestimmte Zeit *in vitro* benötigt haben, um auf die im Medium

V. Diskussion

enthaltenden Mitogene anzusprechen und zeigten deshalb erst nach der ersten Aufreinigung und nach durchschnittlich ca. 7 Tagen in Kultur einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate. Der Anstieg der Proliferationsrate kann dabei allein auf die längere Exposition der Mitogene zurückgeführt werden. Es kann aber auch eine zusätzliche Aktivierung der Zellen durch den Aufreinigungsschritt an sich postuliert werden. Die Abnahme der Proliferationsrate sowohl der Zellen aus den 2. Passage-Kulturen der *in vitro*-Prädegeneration als auch die zwar noch hohe, aber dennoch abnehmende Proliferationsrate der Zellen aus der *in vivo*-Prädegeneration nach der 3. Passage (ca. 36 %), könnten auf ein mit der Zeit nachlassendes Ansprechen auf die Mitogene hindeuten. Dies rechtfertigt die Wahl der *in vivo*-Prädegeneration als beste Methode, adulte Schwann-Zellen der Ratte zu gewinnen, da hierbei die Proliferationsrate in der für die Aufreinigung benötigten Zeit signifikant gesteigert werden kann, während nach der *in vitro*-Prädegeneration die Teilungsrate in dieser Zeit bereits wieder zurückgeht. So steht durch *in vivo*-Prädegeneration eine höhere Anzahl proliferierender Schwann-Zellen nach der ersten Aufreinigung für die Transfektion zur Verfügung, eine wichtige Voraussetzung für die anschließende Expansion dieser Zellen.

Insgesamt können die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Proliferationsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen als vergleichsweise hoch eingestuft werden. Das Niveau der Proliferationsraten von FANSA et al. (1999b) mit > 60 % konnte zwar nicht erreicht werden, aber diesem lag die Verwendung serumhaltigen Mediums mit den Nachteilen der starken Proliferation der Fibroblasten und der undefinierbaren und nicht reproduzierbaren Kulturbedingungen zugrunde. Andere ebenfalls unter serumfreien Kulturbedingungen (Verwendung von FGF-2 und FK) ermittelte Proliferationsraten (DONG et al., 1997) erreichten mit Werten von ca. 20-34 % nicht das Niveau der in den eigenen Versuchen erhobenen Teilungsraten.

Insgesamt waren die Proliferationsraten adulter humaner Schwann-Zellen in den eigenen Versuchen, unabhängig von der Vorbehandlung, relativ gering, wenn die Zellen nicht unter HRG-Einfluss kultiviert wurden (s. dazu Tab. 7 im Anhang). Dies kann auf die im Vergleich zu adulten Ratten-Schwann-Zellen möglicherweise geringere Wirksamkeit der im Kulturmedium verwendeten Mitogene (BPE/FK) auf humane Schwann-Zellen (RAFF

V. Diskussion

et al., 1978; PEULVE et al., 1994; MORRISSEY et al., 1995; RAHMATULLAH et al., 1998) zurückgeführt werden. Erst durch die Applikation von HRG, dessen mitogener Effekt auf adulte humane Schwann-Zellen in der Literatur beschrieben ist (LEVI et al., 1995; CASELLA et al., 1996), konnte die Proliferationsrate der adulten humanen Schwann-Zellen auch in den eigenen Untersuchungen angehoben werden (s. IV.B.6.). Der Anteil proliferierender humaner Schwann-Zellen, welche aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial gewonnen und mit HRG inkubiert wurden, war sowohl nach der 1. Passage (Primäraussaat; $32,7 \pm 12,5$ %) als auch nach der 2. Passage ($22,4 \pm 17,5$ %) gegenüber dem in Schwesterkulturen ($2,6 \pm 3,5$ % bzw. $5,0 \pm 4,0$ %), welche nicht unter HRG-Einfluss standen, signifikant erhöht. Ähnliches beobachteten LEVI et al. (1995), die sehr geringe Proliferationsraten von $1,2 \pm 0,8$ % unter dem Einfluss von HRG zusammen mit der cAMP-steigernden Substanz CT auf $51,1 \pm 9,9$ % steigern konnten. In Vorversuchen zu dieser Arbeit hatte sich der Zusatz von CT zum Kulturmedium adulter Ratten-Schwann-Zellen als nicht geeignet herausgestellt, um gut proliferierende Kulturen mit einem hohen Schwann-Zell-Anteil zu erhalten („Schwann-Zellen-physiologische Zellkultur und Protein-Kaskade“, biochemischer Großversuch von Kerstin Radtke, 2002, im Zellkulturlabor der Abteilung Neuroanatomie, MHH). Dieser Ansatz wurde deshalb nicht weiter verfolgt. Auch Hanemann et al. (1998) erreichten durch die Applikation von HRG zusammen mit zwei cAMP-steigernden Substanzen (FK, 3-Isobutyl-Methylxanthine) eine Proliferationsrate adulter humaner Schwann-Zellen von > 50 %. Mögliche Steigerungen der Teilungsraten adulter humaner Schwann-Zellen durch die Kombination dieser cAMP-steigernden Substanzen in den eigenen Versuchen sollte zumindest überprüft werden. Hanemann et al. (1998) konnten die Teilungsrate zusätzlich durch die Zugabe von 2,5 ng/ml Insulin zum Medium bei jedem Mediumwechsel auf > 80 % steigern. Dieser mitogene Effekt des Insulins auf adulte humane Schwann-Zellen konnte in den eigenen Versuchen nicht beobachtet werden. An keiner anderen Stelle in der Literatur wird von einer vergleichbar hohen Proliferationsrate adulter humaner Schwann-Zellen berichtet, so dass ein gewisser Vorbehalt dieser Angabe gegenüber als angemessen erscheint.

V. Diskussion

Neben HRG stellt auch GGF ein potentes Mitogen für adulte humane Schwann-Zellen dar. Während nur 5 % der humanen Schwann-Zellen proliferierten, wenn sie mit serumhaltigen Medium ohne Mitogene kultiviert wurden, konnten RUTKOWSKI et al. (1995) eine bis zu 8fache Steigerung der Proliferationsrate durch Applikation von rekombinantem GGF2 bewirken. GGF2 war zumindest zum Beginn der vorliegenden Arbeit nicht kommerziell erhältlich und konnte deshalb nicht verwendet werden. Eine spätere klinische Anwendung eines solchen Ansatzes setzt zudem die kommerzielle Verfügbarkeit verwendeter Medienzusätze voraus.

CASELLA et al. (2000) brachten den Aspekt der dichteabhängigen Proliferationsrate adulter humaner Schwann-Zellen auf, da sie herausgefunden hatten, dass mit sinkender Zahl ausgesäeter Schwann-Zellen/cm² Kulturoberfläche, die HRG/FK-induzierte Proliferation steigt. Einer solchen Steigerung der Proliferationsrate durch die Senkung der Aussaatzahl sind aber Grenzen gesetzt. Zu geringe Zelldichten haben in den eigenen Versuchen zum Absterben oder zumindest zum Ruhen der Zellen geführt. Solche Beobachtungen wurden auch von DONG et al. (1997) beschrieben.

Das Ansprechen der adulten humanen Schwann-Zellen auf die Mitogene schien, wie bereits bei den adulten Ratten-Schwann-Zellen diskutiert, mit der Zeit in Kultur nachzulassen. So nahm die Proliferationsrate der adulten humanen Schwann-Zellen, welche unter HRG-Einfluss standen, von den primären (ca. 33 %) zu den einmal aufgereinigten Kulturen (ca. 22 %) ab und auch die Kultur aus der Langzeitstudie zeigte nach der 6. Passage eine mit 5,9 % um die Hälfte reduzierte Anzahl proliferierender Schwann-Zellen im Vergleich zu der nach der 2. Passage (13 % BrdU⁺-Schwann-Zellen). Diese Abnahme der Proliferationsrate hat für das eigene Projekt keinen großen Nachteil, da trotzdem ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, nämlich viele adulte Schwann-Zellen in hoch aufgereinigten Kulturen für eine genetische Modifikation zur Verfügung zu stellen und so nach kurzer Zeit eine ausreichende Zellzahl in Transplantationsversuchen einsetzen zu können, erreicht wurde. Außerdem sollten die Schwann-Zellen in jedem Fall dem Einfluss der Mitogene für eine bestimmte Zeit vor der Transplantation entzogen werden, um dadurch die Proliferationsrate herunterzufahren und die Übertragung von Mitogenen in

V. Diskussion

den Patienten zu verhindern. Dieses sind Vorsichtsmaßnahmen, um eventuellen Transformationen der Zellen vorzubeugen.

Die erhobenen Teilungsraten adulter humaner Schwann-Zellen in den Arbeiten von LEVI et al. (1995), RUTKOWSKI et al. (1995) und Hanemann et. al. (1998) lagen zwar über denen aus den eigenen Versuchen, aber sie wurden auf der nachteiligen Grundlage serumhaltigen Mediums erzielt. Demgegenüber stellten die Kulturbedingungen aus den eigenen Versuchen eine geeignete Grundlage dar, die Proliferationsrate adulter humaner Schwann-Zellen so anzuheben, dass sie für die Expansion der Zellen ausreichend war, verbunden mit den Vorteilen eines definierten serumfreien Mediums.

5. Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen

5.1 Etablierung der Elektroporation als effiziente Transfektionsmethode für adulte Schwann-Zellen

Das Endziel der vorliegenden Arbeit war, eine nicht-virale Transfektionsmethode für die spätere Produktion FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen zu etablieren. Zur Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen werden in der Literatur bisher nur Virus-vermittelte Methoden (Transduktion) aufgeführt (MENEI et al., 1998; TUSZYNSKI et al., 1998; MOSAHEBI et al., 2001). Die Verwendung replikationsdefizienter Retro- oder Adenoviren bietet den Vorteil, unterschiedliche Zelltypen mit hoher Effizienz genetisch verändern zu können. Neben dem Nachteil möglicher zytotoxischer Effekte (SHY et al., 1995) und dem möglichen Interferieren mit metabolischen Prozessen in den Zellen (DITYATEVA et al., 2003) durch die virale Infektion, besteht ein gewisses Risiko, dass die inaktivierten Viren *in vivo* durch die Rekombination mit endogenen Viren ihre Pathogenität zurückerlangen (BROEKE u. BURNY, 2003). Solange ein solches Restrisiko besteht, ist die Transplantation transduzierter Zellen in Patienten nicht zu vertreten. Deshalb mussten in dieser Arbeit alternative Transfektionsmethoden gefunden werden, durch deren Anwendung keine Gefahr für den späteren Empfänger der genetisch veränderten Zellen besteht.

V. Diskussion

Sowohl die Kalziumphosphat-vermittelte (Kit ProFection[®]Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate) als auch die Lipid-vermittelte Transfektion (Metafectene[™]) waren im hiesigen Labor für neonatale Ratten-Schwann-Zellen etabliert (CLAUS et al., 2003; TIMMER et al., 2004). Als neue Methode wurde die Elektroporation adulter Schwann-Zellen im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die verschiedenen Transfektionsmethoden wurden in den eigenen Untersuchungen zunächst an neonatalen Ratten-Schwann-Zellen erprobt und die Methoden mit der höchsten Effizienz auch zur Transfektion adulter Schwann-Zellen herangezogen (s. III.7.). Die Elektroporation erwies sich sowohl bei den neonatalen als auch bei den adulten Schwann-Zellen als effektivste Methode (s. IV.A.7.). Im Durchschnitt konnten etwa 11 % der adulten Ratten-Schwann-Zellen aus *in vivo*-prädegenerierten Nerven auf diese Weise transfiziert werden (MAURITZ et al., 2004). Bei fast der Hälfte der durchgeführten Elektroporationen lag die Transfektionsrate sogar über 17 %. Wurde die verwendete DNA-Menge verdoppelt, erhöhte sich die Transfektionsrate auf ca. 32 %. Letzteres scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein, zumal auch in der Literatur von einer Anhebung der Transfektionsrate durch die Erhöhung der für die Elektroporation verwendeten DNA-Menge berichtet wird (BAUM et al., 1994). Die Elektroporation adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen aus frischem, 14 Tage *in vitro*-prädegenerierten Nervenmaterial, führte zu einer mit ca. 21 % durchschnittlich höheren Transfektionsrate im Vergleich zu der adulter Ratten-Schwann-Zellen (s. IV.B.7.). Es zeigte sich außerdem, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Transfektionsraten adulter humaner Schwann-Zellen bestand, die mit HRG (etwa 15 %) oder ohne dieses Mitogen (etwa 25 %) kultiviert wurden und eine hohe bzw. niedrige Proliferationsrate aufwiesen. Dies scheint auf eine von der Proliferationsrate unabhängige Elektroporationsrate (zumindest bezogen auf eine transiente Transfektion) hinzudeuten, mit dem Vorteil, dass auf diese Weise auch postmitotische Zellen transfiziert werden können. Im Hinblick auf die schnellstmögliche Autotransplantation adulter Schwann-Zellen wurde die Phase der *in vitro*-Prädegeneration adulten humanen Nervengewebes um die Hälfte auf 7 Tage verkürzt. Die Transfektionsrate der so gewonnenen Zellen konnte mit ca. 38 % tendenziell gegenüber der aus 14 Tage *in vitro*-

V. Diskussion

prädegeneriertem Nervengewebe angehoben werden. Dieser Ansatz sollte weiter verfolgt werden und ebenfalls eine Erhöhung der verwendeten DNA-Menge getestet werden.

Mit der Elektroporation, als physikalische Transfektionsmethode, konnte zum ersten Mal eine gute Alternative zur Transduktion adulter Schwann-Zellen etabliert werden. MOSAHEBI et al. (2001) erzielten zwar eine hohe Transduktionsrate neonataler Ratten-Schwann-Zellen von 80 % und adulter humaner Schwann-Zellen von 70 %, indem sie einen retroviralen Vektor einsetzten, aber die im Rahmen dieser Arbeit evaluierten Transfektionsraten sind für das eigene Vorhaben ausreichend. Zudem stellt die Elektroporation eine sichere, einfache, schnelle und gut reproduzierbare Methode dar, adulte Schwann-Zellen genetisch zu verändern.

5.2 Produktion FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen

Im Anschluss an die Etablierung der Transfektionsmethode folgten Pilotstudien zur Produktion FGF-2-überexprimierender Schwann-Zellen. Adulte Ratten-Schwann-Zellen, welche mit einem für die 21 und 23 kDa (HMW)-FGF-2-Isoformen und für eine Geneticin-Resistenz codierendem Plasmid transfiziert wurden, gingen während der im Anschluss folgenden 4-wöchigen Geneticin-vermittelten Selektion verloren (s. IV.A.7.1). Eine adulte Ratten-Schwann-Zell-Population, welche die HMW-Isoformen stabil überexprimiert, hatte also auf diesem Weg nicht erzeugt werden können.

Anhand adulter humaner Schwann-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Transfektion adulter Schwann-Zellen zur Produktion eingeschleuster FGF-2-Isoformen möglich ist (s. IV.B.7.1). Durch die Verwendung des 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstruktes wurde die Expression der *Discosoma* Red Fluorescent Protein (DsRed)-markierten 18 kDa-FGF-2-Isoform in den transfizierten Schwann-Zellen sichtbar gemacht. So zeigte sich in transfizierten Schwann-Zellen, unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes, die rot leuchtende Expression der DsRed-markierten 18 kDa-FGF-2-Isoform in ihrer charakteristischen intrazellulären Verteilung (CLAUS et al., 2003).

Neben der Überprüfung des Transfektionserfolges wurde außerdem der Frage nachgegangen, ob die zusätzliche (neben der physiologischen) endogene Produktion der 18 kDa-FGF-2-Isoform, die Proliferationsrate von Kulturen transfizierter adulter humaner

V. Diskussion

Schwann-Zellen gegenüber der nicht-transfizierter Schwesterkulturen verändert. In den transfizierten Kulturen wurde jeweils eine höhere Proliferationsrate erhoben im Vergleich zu der in den Schwesterkulturen. Dies lässt auf einen möglichen mitogenen Effekt der zusätzlich produzierten 18 kDa-FGF-2-Isoform auf die adulten humanen Schwann-Zellen schließen.

In jedem Fall sollte bei weiteren Ansätzen zur Produktion FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen auch eine Kontrollgruppe an Schwann-Zellen mitgeführt werden, die mit einem leeren Kontrollvektor transfiziert wurden. So können etwaige Effekte, die allein auf das Einschleusen eines Plasmids in die Zellen entstehen, kontrolliert werden.

Eine an die Transfektion mit den FGF-2-Isoformen anschließende Geneticin-vermittelte Selektion mit nachfolgender Expansion der Geneticin-resistenten transfizierten Zellen steht noch aus. Möglicherweise ist eine Selektion aber nicht notwendig (s.u.).

6. Schlussbetrachtung

Auf dem Weg zur Gewinnung ausreichender Mengen FGF-2-überexprimierender autologer adulter Schwann-Zellen, die für eine Transplantation ins periphere Nervensystem zur Verfügung stehen, konnten mit der vorliegenden Arbeit bereits beschriebene Isolierungsmethoden modifiziert und serumfreie definierte Kulturbedingungen etabliert werden, welche die Gewinnung einer großen Zahl adulter Schwann-Zellen ermöglichten. Zur Isolierung adulter Ratten-Schwann-Zellen wurde die 10-12-tägige *in vivo*-Prädegeneration des Nervenmaterials bevorzugt, welche neben einer hohen Zellausbeute zu maximal proliferierenden Schwann-Zellen nach der ersten Aufreinigung führte, einer wichtigen Voraussetzung für die erfolgreiche Expansion transfizierter Schwann-Zellen. Aufgrund der (noch) nicht durchführbaren *in vivo*-Prädegeneration peripherer Spendernerven beim Menschen, konnte zur Gewinnung adulter humaner Schwann-Zellen die 14- bzw. 7-tägige *in vitro*-Prädegeneration des Nervengewebes als analoge Methode angewendet werden. Idealerweise sollte das humane Nervenmaterial dazu frisch sein, wenn aber in der Klinik das Einfrieren des Gewebes aus organisatorischen Gründen notwendig werden sollte, kann zumindest die Zellausbeute

V. Diskussion

durch eine 14-tägige *in vitro*-Prädegeneration ausreichend gesteigert werden. Die so gewonnenen Kulturen waren ähnlich rein wie die Kulturen aus frischem Material. Ob die Kulturen ähnliche Proliferationsraten unter HRG-Einfluss zeigen, müssten weitere Untersuchungen klären.

Die zum ersten Mal zur Anwendung bei adulten Schwann-Zellen etablierte Aufreinigungsmethode Cold jet führte auf schnelle und einfache Weise zu einer signifikanten Anhebung der Reinheit sowohl der Schwann-Zell-Kulturen der Ratte als auch des Menschen. Die Verwendung des mit BPE, FGF-2 und FK angereicherten Melanozyten-Wachstumsmediums führte zu hohen Proliferationsraten der adulten Ratten-Schwann-Zellen. Die zusätzliche Applikation des Mitogens HRG erbrachte die erwünscht hohen Teilungsraten auch in humanen Schwann-Zell-Kulturen.

Mit der Elektroporation konnte eine einfach durchführbare und effiziente Alternative zur risikobehafteten Transduktion adulter Schwann-Zellen etabliert werden. Weitergehende Modifikationen, wie die Erhöhung der Plasmid-DNA-Menge und die Verkürzung der *in vitro*-Prädegeneration auf 7 Tage zur zusätzlichen Steigerung der Transfektionsraten, sollten weiter verfolgt werden.

Adulte Schwann-Zellen konnten im nächsten Schritt erfolgreich mit FGF-2-Isoformen transfiziert werden, die Selektion und Expansion stabil FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen steht noch aus. In weiteren Versuchen müsste die Höhe der Geneticinkonzentration in der Selektionsphase weiter angepasst werden. Zudem müsste eine Lösung gefunden werden, wie ein zu vereinzelt Sitzen der Schwann-Zellen auf der Kulturoberfläche während der Selektionsphase verhindert werden kann, denn ein mangelnder Zellkontakt kann zum Zellsterben führen. Dies könnte durch die Kultivierung der Zellen auf einem „feeder cell layer“ erreicht werden. Es stellt sich die Frage, ob eine zeitaufwendige Selektion mit anschließender Expansion im Hinblick auf möglichst kurze Kultivierungszeiten zur frühestmöglichen Transplantation der Zellen umgangen werden kann. Auch die Transplantation von Zellsuspensionen zur Unterstützung der peripheren Nervenregeneration, die aus transfizierten und nicht-transfizierten autologen adulten Schwann-Zellen bestehen, ist denkbar. Zuvor müsste eine Quantifizierung des von diesen Zellsuspensionen produzierten FGF-2 durchgeführt werden, z.B. durch Western Blot oder

V. Diskussion

mittels Zell-ELISA. Sollte die Höhe der Produktion deutlich über der von Zellsuspensionen liegen, die ausschließlich aus nicht-transfizierten Schwann-Zellen bestehen, wäre eine Transplantation durchaus sinnvoll. Das allmähliche „Ausdünnen“ der FGF-2-Expression durch die möglicherweise überwiegend transient transfizierten Zellen könnte dabei von Vorteil sein.

Hinsichtlich der Verwendung *in vitro* expandierter autologer adulter Schwann-Zellen als zelluläre Prothese in verletzten peripheren Nerven muss deren Fähigkeit zur Redifferenzierung erhalten bleiben. Untersuchungen anderer Autoren weisen auf den Erhalt dieser Fähigkeit hin. MORRISSEY et al. (1995) kultivierten Mitogen-expandierte adulte Schwann-Zellen sowohl der Ratte als auch des Menschen zusammen mit sensorischen Neuronen aus Ratten-Embryonen. In beiden Ko-Kulturen konnte eine Myelinisierung von Axonen nachgewiesen werden. LEVI u. BUNGE (1994) konnten zeigen, dass *in vitro* expandierte adulte humane Schwann-Zellen *in vivo* redifferenzieren und wieder den myelinisierenden Phänotyp ausbilden können. Dazu transplantierten sie Mitogen-expandierte oder nicht-expandierte adulte humane Schwann-Zellen zwischen die Stümpfe des durchtrennten N. ischiadicus immundefizienter Mäuse. Sowohl die nicht-expandierten als auch die über mehrere Passagen *in vitro* expandierten humanen Schwann-Zellen myelinisierten nach Transplantation regenerierende Axone.

Mitogen-expandierte adulte Schwann-Zellen, welche für Autotransplantationen eingesetzt werden sollen, dürfen außerdem keinerlei Anzeichen maligner Entartung zeigen. MORRISSEY et al. (1991) berichteten von einer solchen, als Transformation bezeichneten, Änderung im Wachstumsverhalten adulter Ratten-Schwann-Zellen, nachdem diese für 12-18 Wochen kontinuierlich unter Einfluss von Mitogenen kultiviert worden waren. Demgegenüber wiesen die über 10 Wochen Mitogen-expandierten adulten humanen Schwann-Zellen von CASELLA et al. (1996) keine Anzeichen in Richtung wachstumsfaktorunabhängiger Kolonien auf. Von ähnlichen Beobachtungen berichteten auch RUTKOWSKI et al. (1995) und erklärten die Resistenz adulter humaner Schwann-Zellen gegenüber spontaner Immortalisierung mit der relativ niedrigen mitotischen Rate dieser Zellen *in vitro*. Auch *in vivo* führten Mitogen-expandierte adulte humane Schwann-

V. Diskussion

Zellen, nach Transplantation in immundefiziente Mäuse, zu keiner Tumorbildung (EMERY et al., 1999).

In den eigenen Versuchen konnten keine spontanen Transformationen adulter Schwann-Zellen beobachtet werden, vermutlich wegen der vergleichsweise kurzen Gesamtkultivierungsdauer.

Weitergehende Untersuchungen zur Überprüfung der Fähigkeit zur Myelinisierung der mit den hier vorgestellten Methoden gewonnenen, kultivierten und auch transfizierten adulten Schwann-Zellen müssten sich anschließen. Diese Untersuchungen sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden, letzteres durch den Einsatz dieser Zellen im etablierten Regenerationsmodell des N. ischiadicus adulter Ratten der Abteilung Neuroanatomie, MHH. Auch die regenerationsfördernden Eigenschaften sowohl FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen der Ratte als auch des Menschen müssten zunächst im oben genannten Tiermodell untersucht werden. Des Weiteren müsste das Potential der Zellen zur malignen Entartung *in vivo* ausgeschlossen werden, bevor ein klinischer Einsatz denkbar wird. Die Transplantation rein autologer Schwann-Zellen der Ratte ist hierbei für die genannten Untersuchungen nicht möglich, da zum einen die Gewinnung der Schwann-Zellen aus einem N. ischiadicus und die für die Reimplantation notwendige Durchtrennung des kontralateralen Nervens aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht durchgeführt werden sollte und zum anderen die Zahl der aus einem Nerven gewonnenen transfizierten Schwann-Zellen für die Autotransplantation möglicherweise nicht ausreicht. Folglich müsste eine allogene Transplantation mit Zellsuspensionen durchgeführt werden, die aus Schwann-Zellen von mehreren adulten Ratten bestehen. Genauso wie die allogene würde auch die mit den humanen Schwann-Zellen durchgeführte xenogene Transplantation (Transplantation zwischen Individuen verschiedener Spezies) den Einsatz von Immunsuppressiva nach sich ziehen. Es sollte berücksichtigt werden, dass diese nicht-autologen Transplantationen den tatsächlichen regenerationsfördernden Effekt schmälern könnten.

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnten etliche Schwierigkeiten in der Kultivierung adulter Schwann-Zellen überwunden und mit der möglichen Isolierung großer Zellzahlen und dem Erhalt hochreiner adulter Schwann-Zell-Kulturen mit erhöhten

V. Diskussion

Proliferationsraten optimale Voraussetzungen für die oben angeregten weitergehenden Untersuchungen geschaffen werden.

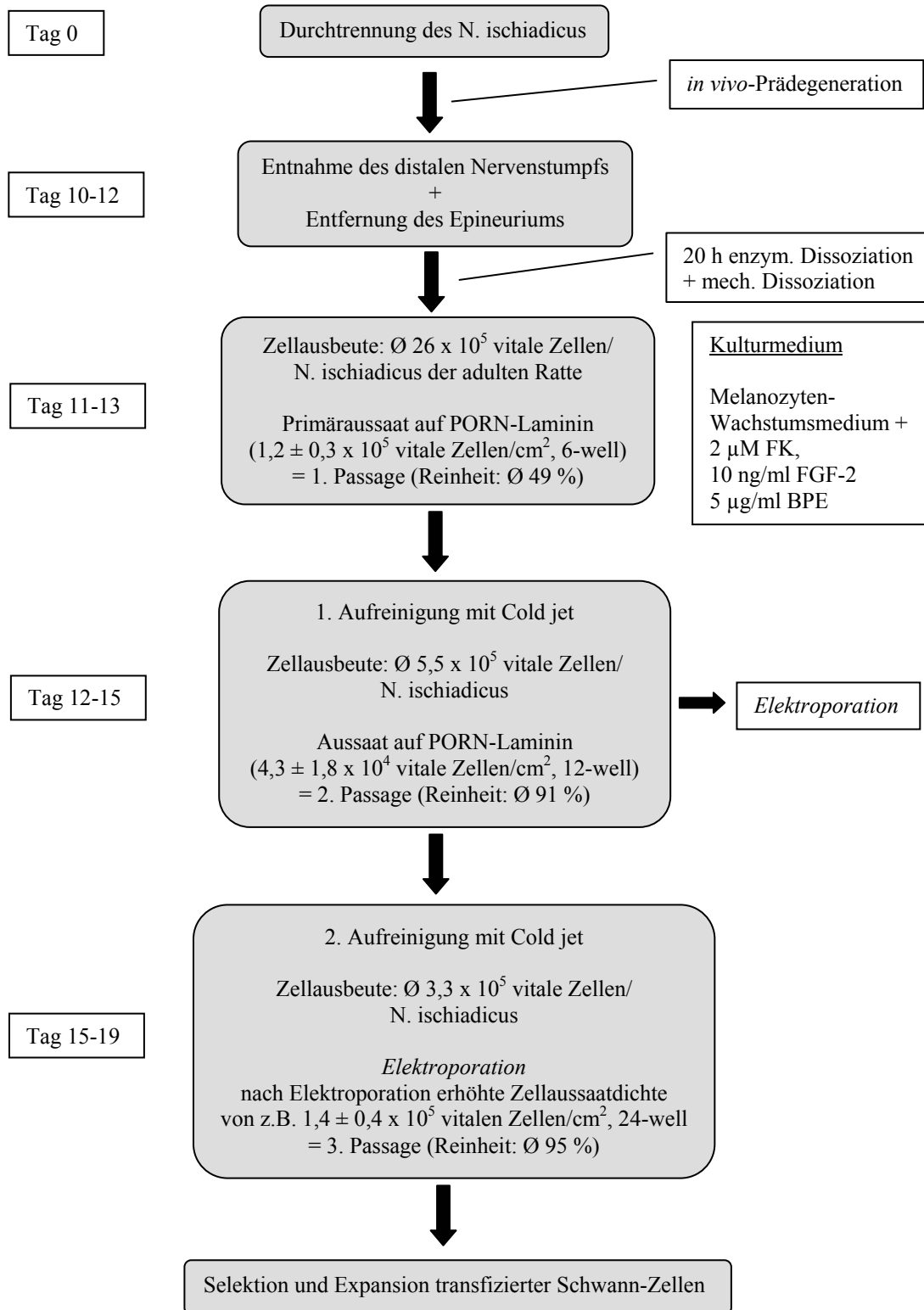
Die folgenden Schemata zeigen die optimierten Schritte zur Gewinnung FGF-2-überexprimierender adulter Schwann-Zellen.

Schema I führt die Schritte auf, welche sich als optimal für die Produktion transfizierter adulter Schwann-Zellen der Ratte erwiesen haben. Der ideale Zeitpunkt für die Elektroporation der adulten Ratten-Schwann-Zellen konnte noch nicht genau festgelegt werden. In weiterführenden Untersuchungen müsste dieser ermittelt werden. Die Vorteile der Elektroporation im Anschluss an die erste Aufreinigung liegen in der höheren zur Verfügung stehenden Zellzahl und der zu diesem Zeitpunkt höheren Proliferationsrate der adulten Ratten-Schwann-Zellen. Jedoch ist die Reinheit der Kulturen geringgradig niedriger als nach der zweiten Aufreinigung, so dass die höhere zur Verfügung stehende Zellzahl auch auf einen größeren Anteil an Fibroblasten zurückgeführt werden könnte. Zudem war die erhobene Transfektionsrate tendenziell niedriger im Vergleich zu der zweimal aufgereinigter adulter Ratten-Schwann-Zellen. Dementsprechend bietet die Elektroporation nach der zweiten Aufreinigung die Vorteile einer höheren Reinheit der Kulturen und einer tendenziell höheren Transfektionsrate, aber die Nachteile geringerer für die Elektroporation zur Verfügung stehender Zellen und geringerer Proliferationsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen.

Schema II stellt entsprechend die Schritte zur Gewinnung transfizierter adulter humaner Schwann-Zellen dar.

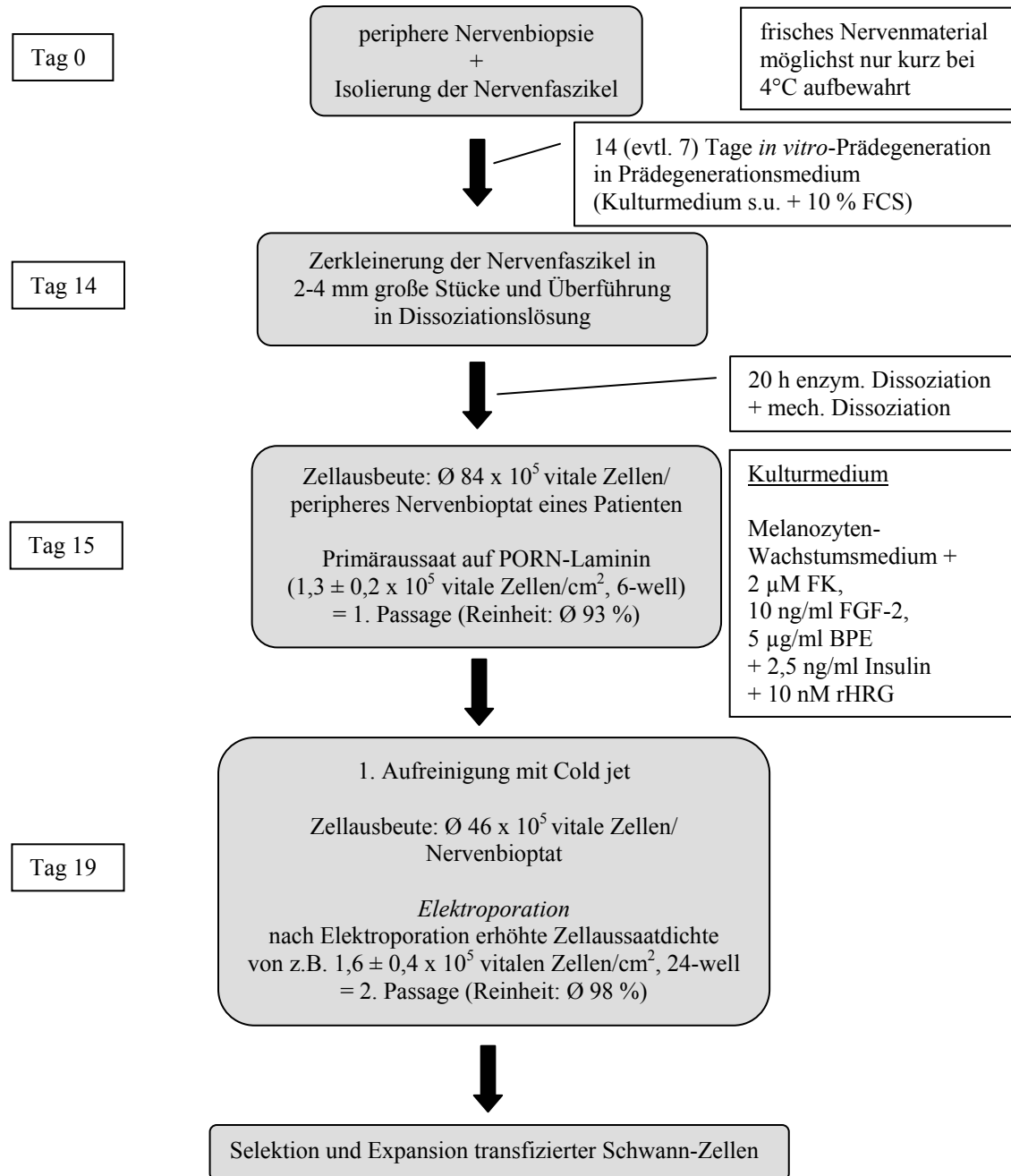
V. Diskussion

Schema I: Gewinnung transfizierter adulter Schwann-Zellen der Ratte



V. Diskussion

Schema II: Gewinnung transfizierter adulter humaner Schwann-Zellen



VI. Zusammenfassung

Christina Mauritz

Etablierung der Isolierung, selektiven Anreicherung und Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zur Überexpression von FGF-2-Isoformen.

Im Rahmen der Entwicklung alternativer Therapien zur Wiederherstellung peripherer Nerven stellen genetisch veränderte (transfizierte) Schwann-Zellen, welche Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)-Isoformen überexprimieren, einen vielversprechenden Ansatz dar. Sowohl Schwann-Zellen als auch FGF-2 spielen in der Unterstützung körpereigener Regenerationsprozesse nach peripherer Nervenverletzung eine wichtige Rolle. Schwann-Zellen bilden dabei unter anderem eine natürliche Quelle für FGF-2. Durch die Transfektion der Schwann-Zellen mit entsprechenden Plasmiden kann die endogene Produktion der FGF-2-Isoformen gesteigert und so die regenerationsfördernden Eigenschaften von Schwann-Zellen mit denen eines neurotrophen Faktors (FGF-2) kombiniert werden. Schwann-Zellen neonataler Ratten, welche die höhermolekularen 21 und 23 kDa-FGF-2-Isoformen überexprimierten und innerhalb artifiziell hergestellter Nerveninterponate zwischen die Stümpfe des axotomierten Nervus ischiadicus adulter Ratten transplantiert wurden, unterstützten die Regeneration großer Defektstrecken peripherer Nerven. Aufgrund der Tatsache, dass gerade bei Läsionen des Armnervengeflechtes (Plexus brachialis) sehr häufig junge Erwachsene nach Motorradunfällen betroffen sind, ist die Notwendigkeit gegeben, auch Schwann-Zellen von Erwachsenen (adulte Schwann-Zellen) in ausreichender Menge kultivieren und transfizieren zu können. Denn die Schwann-Zellen sollten bei einem späteren klinischen Einsatz autolog sein, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Das heißt, sie sollten aus dem Gewebe des betroffenen Patienten gewonnen (periphere Nervenbiopsie) und nach Anreicherung, Transfektion und Vermehrung in Kultur reimplantiert werden. Um dies zu

VI. Zusammenfassung

erreichen wurden erste Versuche an Schwann-Zellen der adulten Ratte durchgeführt und die so gewonnenen Erfahrungen auf adulte humane Schwann-Zellen übertragen.

In der Literatur beschriebene Verfahren zur Isolierung adulter Schwann-Zellen aus peripherem Nervengewebe wurden in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen, modifiziert und die Methode, welche zur höchsten Zellausbeute führte, wurde für die Gewinnung adulter Schwann-Zellen in der eigenen Arbeit etabliert. Die Prädegeneration adulter peripherer Nerven, das heißt die Induktion der *in vivo* oder der entsprechend *in vitro* ablaufenden Waller-Degeneration, in deren Verlauf adulte differenzierte Schwann-Zellen dedifferenzieren und mitotisch angeregt werden, erzielte die besten Ergebnisse. So konnten durch eine 10-12-tägige *in vivo*-Prädegeneration der Nervi ischiadici adulter Ratten ca. $1,1 \times 10^5$ vitale Zellen/mg Nervengewebe und durch die analoge Methode der 14-tägigen *in vitro*-Prädegeneration humanen peripheren Nervengewebes bis zu $0,3 \times 10^5$ vitale Zellen/mg Nervengewebe gewonnen werden.

Kontaminierende Fibroblasten konnten durch selektive Kulturbedingungen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Außerdem wurde mit Cold jet erstmalig eine einfache und schnelle Methode zur aktiven Anreicherung adulter Schwann-Zellen etabliert. Der Anteil adulter Schwann-Zellen in den Kulturen konnte so auf über 90 % angehoben werden.

Es ist zudem durch die Applikation spezifischer Mitogene gelungen, erwünscht hohe Proliferationsraten adulter Schwann-Zellen (Ratten-Schwann-Zellen: > 40 %, humane Schwann-Zellen: > 30 %) während der Kultivierung zu erzielen.

Mit der Elektroporation, einer physikalischen Methode zur genetischen Veränderung von Zellen, konnte eine effiziente, schnelle und gut reproduzierbare Alternative zur bisher publizierten risikobehafteten Virus-vermittelten Transduktion adulter Schwann-Zellen etabliert werden. Es wurden Transfektionsraten von bis zu 19 % bei adulten Ratten-Schwann-Zellen und bis zu 34 % bei adulten humanen Schwann-Zellen erreicht.

Das Augenmerk lag außerdem auf einer möglichen Verkürzung der Kultivierungsphase zur schnellstmöglichen Reimplantation transfizierter (autologer) adulter Schwann-Zellen. Hierzu wurde die zunächst auf 14 Tage ausgerichtete *in vitro*-Prädegeneration des humanen Nervenmaterials auf 7 Tage verkürzt. Die so gewonnenen Kulturen wiesen nach der Elektroporation mit bis zu 48,4 % grün-fluoreszierenden (Expression des

VI. Zusammenfassung

Markerproteins Enhanced Green Fluorescent Protein) adulten humanen Schwann-Zellen außerdem eine gesteigerte Transfektionsrate auf. Dieser Ansatz sollte deshalb weiter verfolgt werden. Die erfolgreiche Transfektion adulter humaner Schwann-Zellen mit FGF-2 konnte durch die Expression einer mit *Discosoma* Red Fluorescent Protein-markierten 18 kDa-FGF-2-Isoform bewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, unter Verwendung eines serumfreien Mediums, definierbare und reproduzierbare Bedingungen zu schaffen, welche eine gute Grundlage für alle weiterführenden Untersuchungen mit adulten Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen darstellen.

VII. Summary

VII. Summary

Christina Mauritz

Establishment of methods to isolate, enrich and transfect adult rat and human Schwann cells to overexpress FGF-2 isoforms.

Concerning the development of alternative therapies to restore peripheral nerves the use of transplanted Schwann cells genetically modified (transfected) to overexpress fibroblast growth factor-2 (FGF-2) isoforms is a very promising approach. Schwann cells as well as FGF-2 play a crucial role in the endogenous regeneration process following peripheral nerve injury. Among other things Schwann cells are a cellular source of FGF-2. Transfection of Schwann cells using the appropriate plasmids can enforce the endogenous production of FGF-2 isoforms. The regeneration promoting qualities of Schwann cells and neurotrophic factors, like FGF-2, are thereby combined. Schwann cells obtained from newborn rats, which were transfected to overexpress the high molecular weight 21 and 23 kDa-FGF-2 isoforms, enhanced peripheral nerve regeneration across long gaps after transplantation into the axotomized sciatic nerve of adult rats. Due to the fact that mostly young adults are affected by brachial plexus lesions after motorcycle accidents, it is necessary to obtain Schwann cells from adults (adult Schwann cells), and to cultivate and transfect them in sufficient amounts. Because for a clinical application transplanted Schwann cells should be autologous to avoid immune rejection. Therefore, Schwann cells should be isolated from the patient's own peripheral nerve biopsy. These autologous cells could be reimplanted at the site of injury after enrichment, transfection and expansion.

For that particular purpose first experiments were conducted with Schwann cells of adult rats. The gained experience was applied to culture adult human Schwann cells.

In the literature several methods are described to isolate adult Schwann cells from peripheral nerve tissue. These methods were compared, modified and that, which resulted in highest cell yields, was chosen for further experiments. *In vivo* as well as *in vitro*

VII. Summary

predegeneration of adult peripheral nerves inducing Wallerian degeneration is an effective method to obtain high numbers of activated Schwann cells. 10-12 days of *in vivo* predegeneration of adult rat sciatic nerves resulted in 1.1×10^5 living cells/mg tissue and analogous 14 days of *in vitro* predegeneration of adult human peripheral nerve material resulted in 0.3×10^5 living cells/mg tissue.

Growth of contaminating fibroblasts was inhibited by using selective culture conditions. Furthermore, Cold jet was established as an easy and fast method to enrich adult Schwann cells. Using this enrichment procedure the percentage of Schwann cells in cultures could be elevated to > 90 %.

In addition high proliferation rates (adult rat Schwann cells: > 40 %, adult human Schwann cells: > 30 %) were achieved by the application of specific mitogens during cultivation.

Electroporation, as a physical method to modify cells genetically, was established to transfect adult Schwann cells in an effective, fast and well reproducible way. Electroporation is therefore a suitable alternative to the already published virus-mediated transduction of adult Schwann cells, which is associated with safety risks. In this study up to 19 % of adult rat and up to 34 % of adult human Schwann cells were successfully transfected using electroporation.

Another attempt was to shorten the cultivation time in view of an early reimplantation of transfected (autologous) adult Schwann cells, and therefore, the *in vitro* predegeneration period was reduced to 7 days. Hereby obtained cultures exhibited up to 48.4 % green-fluorescent (expression of enhanced green fluorescent protein) adult human Schwann cells after electroporation indicating an enhanced transfection rate. This approach should be pursued. The successful transfection of adult human Schwann cells with FGF-2 was shown by the expression of a *Discosoma* red fluorescent protein marked 18 kDa-FGF-2 isoform.

The present work provides reproducible conditions, which are a proper base for further investigations with Schwann cells of adult rats and humans.

VIII. Literaturverzeichnis

VIII. Literaturverzeichnis

AEBISCHER, P., A. N. SALESIOTIS u. S. R. WINN (1989):

Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps.

J Neurosci Res 23, 282-289

ANSSELIN, A. D., S. D. CORBEIL u. D. F. DAVEY (1995):

Culture of Schwann cells from adult animals.

In Vitro Cell Dev Biol Anim 31, 253-254

ANSSELIN, A. D., T. FINK u. D. F. DAVEY (1997):

Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells.

Neuropathol Appl Neurobiol 23, 387-398

ASSOULINE, J. G., E. P. BOSCH u. R. LIM (1983):

Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies.

Brain Res 277, 389-392

BAUM, C., P. FORSTER, S. HEGEWISCH-BECKER u. K. HARBERS (1994):

An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines.

Biotechniques 17, 1058-1062

BERGER, A. C., R. HIERNER u. M. H. BECKER (1997):

Early microsurgical revision of the brachial plexus in traumatic birth injuries. Patient selection and outcome.

Orthopade 26, 710-718

BROCKES, J. P., K. L. FIELDS u. M. C. RAFF (1979):

Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve.

Brain Res 165, 105-118

BROEKE, A. V. u. A. BURNY (2003):

Retroviral Vector Biosafety: Lessons from Sheep.

J Biomed Biotechnol 2003:1, 9-12

BUNGE, R. P. (1993):

Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration.

Curr Opin Neurobiol 3, 805-809

VIII. Literaturverzeichnis

BUTI, M., E. VERDU, R. O. LABRADOR, J. J. VILCHES, J. FORES u. X. NAVARRO (1996):

Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation.

Exp Neurol 137, 26-33

CALDERON-MARTINEZ, D., Z. GARAVITO, C. SPINEL u. H. HURTADO (2002):

Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C).

J Neurosci Methods 114, 1-8

CARVALHO, G. A., G. NIKKHAH u. M. SAMII (1997):

Diagnosis and surgical indications of traumatic brachial plexus lesions from the neurosurgery viewpoint.

Orthopade 26, 599-605

CASELLA, G. T., R. P. BUNGE u. P. M. WOOD (1996):

Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro.

Glia 17, 327-338

CASELLA, G. T., R. WIESER, R. P. BUNGE, I. S. MARGITICH, J. KATZ, L. OLSON u. P. M. WOOD (2000):

Density dependent regulation of human Schwann cell proliferation.

Glia 30, 165-177

CHEN, Y. S., C. L. HSIEH, C. C. TSAI, T. H. CHEN, W. C. CHENG, C. L. HU u.

C. H. YAO (2000):

Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin.

Biomaterials 21, 1541-1547

CLAUS, P., F. DORING, S. GRINGEL, F. MULLER-OSTERMEYER, J. FUHLROTT, T. KRAFT u. C. GROTHE (2003):

Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein.

J Biol Chem 278, 479-485

COSGAYA, J. M., J. R. CHAN u. E. M. SHOOTER (2002):

The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination.

Science 298, 1245-1248

VIII. Literaturverzeichnis

DANIELSEN, N., B. PETTMANN, H. L. VAHLSING, M. MANTHORPE u. S. VARON (1988):

Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model.

J Neurosci Res 20, 320-330

DITYATEVA, G., M. HAMMOND, C. THIEL, M. O. RUONALA, M. DELLING, G. SIEBENKOTTEN, M. NIX u. A. DITYATEV (2003):

Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons.

J Neurosci Methods 130, 65-73

DONG, Z., A. BRENNAN, N. LIU, Y. YARDEN, G. LEFKOWITZ, R. MIRSKY u. K. R. JESSEN (1995):

Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors.

Neuron 15, 585-596

zit. nach FANSA et al. (1999b)

DONG, Z., C. DEAN, J. E. WALTERS, R. MIRSKY u. K. R. JESSEN (1997):

Response of Schwann cells to mitogens in vitro is determined by pre-exposure to serum, time in vitro, and developmental age.

Glia 20, 219-230

ECCLESTON, P. A., R. MIRSKY u. K. R. JESSEN (1991):

Spontaneous immortalisation of Schwann cells in culture: short-term cultured Schwann cells secrete growth inhibitory activity.

Development 112, 33-42

EMERY, E., X. LI, J. P. BRUNSCHWIG, L. OLSON u. A. D. LEVI (1999):

Assessment of the malignant potential of mitogen stimulated human Schwann cells.

J Peripher Nerv Syst 4, 107-116

EVANS, G. R. (2001):

Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs.

Anat Rec 263, 396-404

FANSA, H., G. KEILHOFF, G. FORSTER, B. SEIDEL, G. WOLF u. W. SCHNEIDER (1999a):

Acellular muscle with Schwann-cell implantation: an alternative biologic nerve conduit.

J Reconstr Microsurg 15, 531-537

VIII. Literaturverzeichnis

- FANSA, H., G. KEILHOFF, O. FRERICHS, G. WOLF u. W. SCHNEIDER (1999b):
Effect of pre-degeneration of peripheral nerves on plasticity of cultivated Schwann cells and their cell number in vitro.
Handchir Mikrochir Plast Chir 31, 367-372
- FANSA, H., G. KEILHOFF, G. WOLF u. W. SCHNEIDER (2001):
Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells.
Plast Reconstr Surg 107, 485-494
- FINE, E. G., I. DECOSTERD, M. PAPALOIZOS, A. D. ZURN u. P. AEBISCHER (2002):
GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap.
Eur J Neurosci 15, 589-601
- FLORES, A. J., C. J. LAVERNIA u. P. W. OWENS (2000):
Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair.
Am J Orthop 29, 167-173
- FU, S. Y. u. T. GORDON (1995):
Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy.
J Neurosci 15, 3876-3885
- FU, S. Y. u. T. GORDON (1997):
The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration.
Mol Neurobiol 14, 67-116
- GARAVITO, Z. V., J. J. SUTACHAN, V. C. MUNETON u. H. HURTADO (2000):
Is S-100 protein a suitable marker for adult Schwann cells?
In Vitro Cell Dev Biol Anim 36, 281-283
- GEHL, J. (2003):
Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research.
Acta Physiol Scand 177, 437-447
- GONZALEZ-MARTINEZ, T., P. PEREZ-PINERA, B. DIAZ-ESNAL u. J. A. VEGA (2003):
S-100 proteins in the human peripheral nervous system.
Microsc Res Tech 60, 633-638

VIII. Literaturverzeichnis

GROTHER, C., K. HEESE, C. MEISINGER, K. WEWETZER, D. KUNZ, P. CATTINI u. U. OTTEN (2000):

Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2.

Brain Res 885, 172-181

GROTHER, C., C. MEISINGER u. P. CLAUS (2001):

In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia.

J Comp Neurol 434, 342-357

GROTHER, C. u. G. NIKKHAH (2001):

The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration.

Anat Embryol (Berl) 204, 171-177

GUENARD, V., N. KLEITMAN, T. K. MORRISSEY, R. P. BUNGE u. P. AEBISCHER (1992):

Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration.

J Neurosci 12, 3310-3320

HAASTERT, K., J. GROSSKREUTZ, M. JAECKEL, C. LADERER, J. BUFLER, C. GROTHE u. P. CLAUS (2005):

Rat embryonic motoneurons in long-term co-cultures with Schwann cells - a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro.

J Neurosci Methods 142, 274-285

HANEMANN, C. O., C. ROSENBAUM, S. KUPFER, S. WOSCH, F. STOEGBAUER u. H. W. MULLER (1998):

Improved culture methods to expand Schwann cells with altered growth behaviour from CMT1A patients.

Glia 23, 89-98

IJKEMA-PAASSEN, J., M. F. MEEK u. A. GRAMSBERGEN (2002):

Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats.

Muscle and nerve 25, 891-897

JANEWAY, C. A. u. P. TRAVERS (1995):

Immunologie.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 518

VIII. Literaturverzeichnis

JIRSOVA, K., P. SODAAR, V. MANDYS u. P. R. BAR (1997):

Cold jet: a method to obtain pure Schwann cell cultures without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment.

J Neurosci Methods 78, 133-137

KEILHOFF, G., H. FANSA, W. SCHNEIDER u. G. WOLF (1999):

In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits.

J Neurosci Methods 89, 17-24

LEONHARDT, H. (1990):

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

8. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Bd. 3, S. 235-292

LEVI, A. D. u. R. P. BUNGE (1994):

Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse.

Exp Neurol 130, 41-52

LEVI, A. D., R. P. BUNGE, J. A. LOFGREN, L. MEIMA, F. HEFTI, K. NIKOLICS u. M. X. SLIWKOWSKI (1995):

The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation.

J Neurosci 15, 1329-1340

LEVI, A. D., V. GUENARD, P. AEBISCHER u. R. P. BUNGE (1994):

The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve.

J Neurosci 14, 1309-1319

LI, H., C. WIGLEY u. S. M. HALL (1998):

Chronically denervated rat Schwann cells respond to GGF in vitro.

Glia 24, 290-303

LINDL, T. u. J. BAUER (2000):

Zell- und Gewebekultur.

4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 77-79

LIPOKATIC, E., C. GROTHE u. K. HAASTERT (2004):

Schwann cells over-expressing high molecular weight fibroblast growth factor-2 (FGF-2) promote axonal regeneration in long term peripheral nerve repair across long gaps.

in: 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2004,

Supplement zum 187. Band des Anatomischen Anzeigers, S. 277

VIII. Literaturverzeichnis

LÜLLMANN-RAUCH, R. (2003):

Histologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 141-180

LUNDBORG, G., L. B. DAHLIN, N. DANIELSEN, R. H. GELBERMAN,
F. M. LONGO, H. C. POWELL u. S. VARON (1982):

Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components.

Exp Neurol 76, 361-375

MACKINNON, S. E. u. A. L. DELLON (1990):

A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate.

J Reconstr Microsurg 6, 117-121

MALECKI, J., J. WESCHE, C. S. SKJERPEN, A. WIEDLOCHA u. S. OLSNES (2004):
Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism.

Mol Biol Cell 15, 801-814

MAURITZ, C., C. GROTHE u. K. HAASTERT (2004):

Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells.

J Neurosci Res 77, 453-461

MEEK, M. F., W. F. DEN DUNNEN, P. H. ROBINSON, A. J. PENNINGNS u.

J. M. SCHAKENRAAD (1997):

Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a new biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide.

Int J Artif Organs 20, 463-468

MEISINGER, C. u. C. GROTHE (1997):

Differential regulation of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 mRNAs and FGF-2 isoforms in spinal ganglia and sciatic nerve after peripheral nerve lesion.

J Neurochem 68, 1150-1158

MENEI, P., C. MONTERO-MENEI, S. R. WHITTEMORE, R. P. BUNGE u.

M. B. BUNGE (1998):

Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord.

Eur J Neurosci 10, 607-621

VIII. Literaturverzeichnis

MILLES, H. (1997):

Brachial plexus injuries in adults.

Orthopade 26, 590-598

MIRSKY, R. u. K. R. JESSEN (1999):

The neurobiology of Schwann cells.

Brain Pathol 9, 293-311

MIRSKY, R., K. R. JESSEN, A. BRENNAN, D. PARKINSON, Z. DONG, C. MEIER,
E. PARMANTIER u. D. LAWSON (2002):

Schwann cells as regulators of nerve development.

J Physiol Paris 96, 17-24

MORRISSEY, T. K., N. KLEITMAN u. R. P. BUNGE (1991):

Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve.

J Neurosci 11, 2433-2442

MORRISSEY, T. K., N. KLEITMAN u. R. P. BUNGE (1995):

Human Schwann cells in vitro. II. Myelination of sensory axons following extensive purification and heregulin-induced expansion.

J Neurobiol 28, 190-201

MOSAHEBI, A., B. WOODWARD, M. WIBERG, R. MARTIN u. G. TERENGI (2001):

Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration.

Glia 34, 8-17

MULLER-OSTERMEYER, F., P. CLAUS u. C. GROTHE (2001):

Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells.

Growth Factors 19, 175-191

MUMENTHALER, M., H. SCHLIACK u. M. STÖHR (Hrsg.) (1998):

Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome.

7. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 15-28

NAVARRO, X., F. J. RODRIGUEZ, D. CEBALLOS u. E. VERDU (2003):

Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries.

Med Biol Eng Comput 41, 220-226

VIII. Literaturverzeichnis

NIKKHAH, G., G. A. CARVALHO u. M. SAMII (1997a):
Nerventransfer (Neurotisation) zur funktionellen Wiederherstellung von Armfunktionen bei zervikalen Wurzelaustrissen.
Orthopäde 26, 606-611

NIKKHAH, G., G. A. CARVALHO u. M. SAMII (1997b):
Nerventransplantation und Neurolyse des Plexus brachialis nach posttraumatischen Läsionen.
Orthopäde 26, 612-620

ORNITZ, D. M. u. N. ITOH (2001):
Fibroblast growth factors.
Genome Biol 2, 3005.1-3005.12

OTTO, D., K. UNSICKER u. C. GROTHE (1987):
Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia.
Neurosci Lett 83, 156-160

PEULVE, P., A. LAQUERRIERE, M. PARESY, J. HEMET u. M. TADIE (1994):
Establishment of adult rat Schwann cell cultures: effect of b-FGF, alpha-MSH, NGF, PDGF, and TGF-beta on cell cycle.
Exp Cell Res 214, 543-550

RAFF, M. C., E. ABNEY, J. P. BROCKES u. A. HORNBY-SMITH (1978):
Schwann cell growth factors.
Cell 15, 813-822

RAHMATULLAH, M., A. SCHROERING, K. ROTHBLUM, R. C. STAHL, B. URBAN u. D. J. CAREY (1998):
Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin.
Mol Cell Biol 18, 6245-6252

RUTKOWSKI, G. E. u. C. A. HEATH (2002):
Development of a bioartificial nerve graft. I. Design based on a reaction-diffusion model.
Biotechnol Prog 18, 362-372

RUTKOWSKI, J. L., C. J. KIRK, M. A. LERNER u. G. I. TENNEKOON (1995):
Purification and expansion of human Schwann cells in vitro.
Nat Med 1, 80-83

RUTKOWSKI, J. L., G. I. TENNEKOON u. J. E. MCGILLICUDDY (1992):
Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves.
Ann Neurol 31, 580-586

VIII. Literaturverzeichnis

SAMBROOK, J. u. D. W. RUSSELL (2001):

Molecular Cloning.

3. Aufl. Verlag Cold Spring Harbor, New York, Bd. 3, S. 1-62 (Kapitel 16)

SAMII, M., G. A. CARVALHO, G. NIKKHAH u. G. PENKERT (1997):

Surgical reconstruction of the musculocutaneous nerve in traumatic brachial plexus injuries.

J Neurosurg 87, 881-886

SCARPINI, E., B. Q. KREIDER, R. P. LISAK u. D. E. PLEASURE (1988):

Establishment of Schwann cell cultures from adult rat peripheral nerves.

Exp Neurol 102, 167-176

SCHACHNER, M. (2000):

Neurobiology. Nervous engineering.

Nature 405, 747-748

SCHLOSSHAUER, B., E. MULLER, B. SCHRODER, H. PLANCK u. H. W. MULLER (2003):

Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration.

Brain Res 963, 321-326

SCHMALBRUCH, H. (1986):

Fiber composition of the rat sciatic nerve.

Anat Rec 215, 71-81

SCHMIDT, C. E. u. J. B. LEACH (2003):

Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration.

Annu Rev Biomed Eng 5, 293-347

SCHWORER, C. M., K. K. MASKER, G. C. WOOD u. D. J. CAREY (2003):

Microarray analysis of gene expression in proliferating Schwann cells: synergistic response of a specific subset of genes to the mitogenic action of heregulin plus forskolin.

J Neurosci Res 73, 456-464

SEDDON, H. (1943):

Three types of injury.

Brain 66, 237-288

zit. nach NIKKHAH et al. (1997b) u. MUMENTHALER et al. (1998)

VIII. Literaturverzeichnis

SHY, M. E., M. TANI, Y. J. SHI, S. A. WHYATT, T. CHBIHI, S. S. SCHERER u. J. KAMHOLZ (1995):

An adenoviral vector can transfer lacZ expression into Schwann cells in culture and in sciatic nerve.

Ann Neurol 38, 429-436

STÖHR, M. u. R. KRAUS (2002):

Einführung in die klinische Neurophysiologie.

Steinkopff Verlag, Darmstadt, S. 18

STOLL, G. u. H. W. MULLER (1999):

Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights.

Brain Pathol 9, 313-325

SUNDERLAND, S. (1951):

A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function.

Brain 74, 491-516

zit. nach NIKKHAH et al. (1997b) u. MUMENTHALER et al. (1998)

TIMMER, M., F. MULLER-OSTERMEYER, V. KLOTH, C. WINKLER, C. GROTHE u. G. NIKKHAH (2004):

Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms.

Exp Neurol 187, 118-136

TIMMER, M., S. ROBBEN, F. MULLER-OSTERMEYER, G. NIKKHAH u. C. GROTHE (2003):

Axonal regeneration across long gaps in silicone chambers filled with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2.

Cell Transplant 12, 265-277

TUSZYNSKI, M. H., N. WEIDNER, M. MCCORMACK, I. MILLER, H. POWELL u. J. CONNER (1998):

Grafts of genetically modified Schwann cells to the spinal cord: survival, axon growth, and myelination.

Cell Transplant 7, 187-196

UDINA, E., E. VERDU u. X. NAVARRO (2004):

Effects of the immunophilin ligand FK506 on nerve regeneration in collagen guides seeded with Schwann cells in rats.

Neurosci Lett 357, 99-102

VIII. Literaturverzeichnis

VAN DER WERKEN, C. u. L. S. DE VRIES (1993):

Brachial plexus injury in multitraumatized patients.

Clin Neurol Neurosurg 95, 30-32

VLEGGERT-LANKAMP, C. L., A. P. PEGO, E. A. LAKKE, M. DEENEN,
E. MARANI u. R. T. THOMEER (2004):

Adhesion and proliferation of human Schwann cells on adhesive coatings.

Biomaterials 25, 2741-2751

VROEMEN, M. u. N. WEIDNER (2003):

Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve.

J Neurosci Methods 124, 135-143

WELCH, J. A. (1996):

Peripheral nerve injury.

Semin Vet Med Surg (Small Anim) 11, 273-284

YASUDA, T., G. SOBUE, K. MOKUNO, B. KREIDER u. D. PLEASURE (1987):

Cultured rat Schwann cells express low affinity receptors for nerve growth factor.

Brain Res 436, 113-119

ZILLES, K. u. G. REHKÄMPER (1994):

Funktionelle Neuroanatomie.

2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 359

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

MAURITZ, C., C. GROTHE u. K. HAASTERT (2003):
Enriched cultures of adult rat and human Schwann cells suitable for genetic modification and for cell transplantation in peripheral nerve repair.
in: 20. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2003,
Supplement zum 186. Band des Anatomischen Anzeigers, S. 257

MAURITZ, C., C. GROTHE u. K. HAASTERT (2004):
Adult rat and human Schwann cells suitable for cell transplantation in peripheral nerve repair – comparative studies on pre-treatment of nerve tissue, culture conditions and cell enrichment as well as establishment of transfection protocols.
in: 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2004,
Supplement zum 187. Band des Anatomischen Anzeigers, S. 281

MAURITZ, C., C. GROTHE u. K. HAASTERT (2004):
Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells.
J Neurosci Res 77, 453-461

Anhang

Der Anhang ist in zwei Abschnitte gegliedert.

Abschnitt 1 zeigt Fotos adulter Schwann-Zell-Kulturen der Ratte und des Menschen *in vitro*. Abgebildet sind mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen und Fotos immunzytochemisch markierter und transfizierter Zellen.

Abschnitt 2 fasst die Daten aus den Versuchen mit adulten Schwann-Zellen sowohl der Ratte als auch des Menschen zusammen. Einzelne Daten stellen dabei Mittelwerte dar. Gesamtergebnisse werden als Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Außerdem wird die Anzahl der Versuche (n) aufgeführt.

Abschnitt 1

Abb. 1

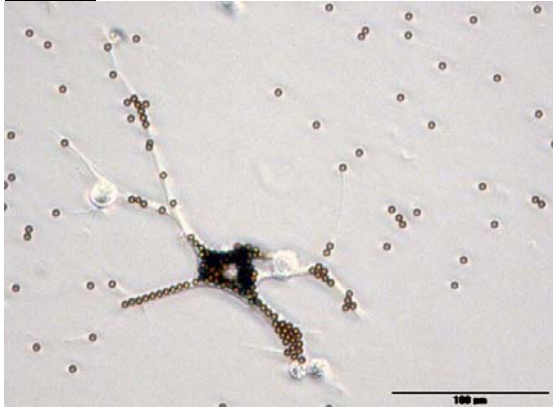


Abb. 1: Dynabeads[®] Pan Mouse IgG über anti-Thy1-Antikörper gebunden an Fibroblasten der adulten Ratte. Messbalken $\hat{=}$ 100 μm .

Abb. 2

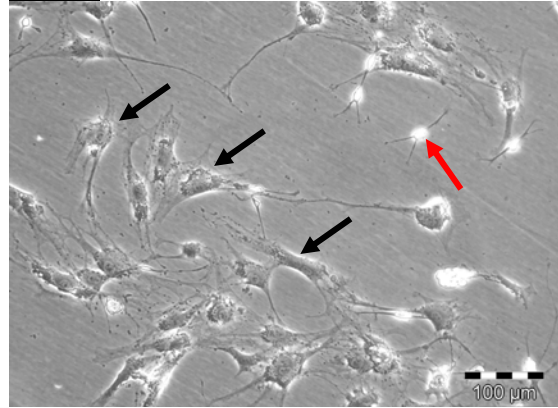


Abb. 2: Kulturplatte nach Aufreinigung einer Schwann-Zell-Kultur adulter Ratten mit Cold jet. Schwarze Pfeile markieren auf der Kulturoberfläche verbliebene Fibroblasten. Roter Pfeil markiert eine nicht-abgelöste Schwann-Zelle. Messbalken $\hat{=}$ 100 μm .

Abb. 3

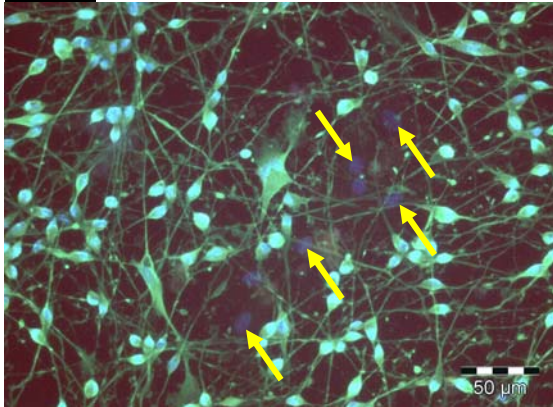


Abb. 3: Immunzytochemische Markierung einer nicht aufgereinigten Schwann-Zell-Kultur adulter Ratten (Primärkultur), gewonnen aus *in vivo*-prädegenerierten Nn. ischiadici. S100-positive (grün-fluoreszierende) Zellen sind Schwann-Zellen. S100-negative, nur die blaue Hoechst-Kernfärbung aufweisende Zellen, sind Fibroblasten und durch Pfeile markiert. Messbalken $\hat{=}$ 50 μm .

Abb. 4

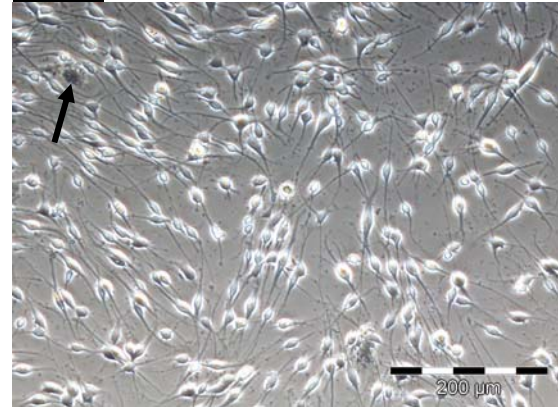


Abb. 4: Schwann-Zell-Kultur adulter Ratten, gewonnen aus *in vivo*-prädegenerierten Nn. ischiadici, nach insgesamt zweimaliger Aufreinigung mit Cold jet. Pfeil markiert einen Fibroblasten. Messbalken $\hat{=}$ 200 μm .

Abb. 5

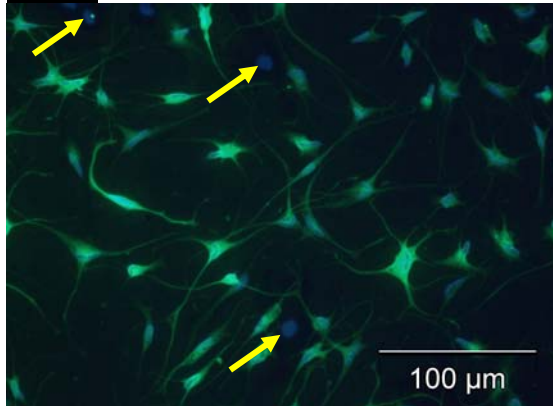


Abb. 6

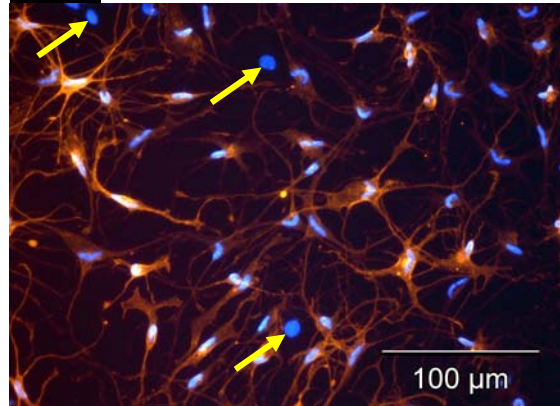


Abb. 5 + 6: Primärkultur adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe, mit anti-S100-Antikörpern (grüne Fluoreszenz, Abb. 5) und anti-p75^{LNGFR}-Antikörpern (rote Fluoreszenz, Abb. 6) doppelmarkiert. Beide Antikörper markieren zu 100 % dieselben Zellen. Nicht markierte Zellen, die nur eine DAPI-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz) aufweisen, sind Fibroblasten (Pfeile). Messbalken $\hat{=}$ 100 µm.

Abb. 7

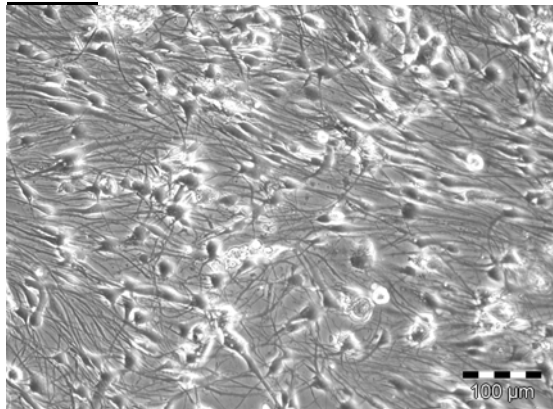


Abb. 7: Primärkultur adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe, nach 5 Tagen unter Heregulin-Einfluss. Messbalken: $\hat{=}$ 100 µm.

Abb. 8

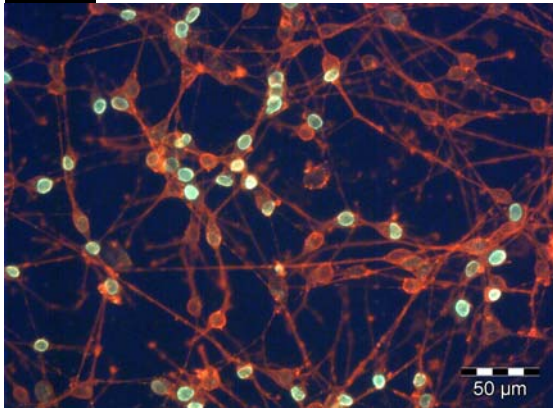


Abb. 8: 2. Passage-Kultur (einmal mit Cold jet aufgereinigt) adulter Ratten-Schwann-Zellen, gewonnen aus *in vivo*-prädegenerierten Nn. ischiadici. Abgebildet ist der BrdU-Einbau (grüne Fluoreszenz) in die DNA sich teilender Schwann-Zellen (Markierung über anti-p75^{LNGFR}-Antikörper, rote Fluoreszenz). Messbalken $\hat{=}$ 50 μ m.

Abb. 9

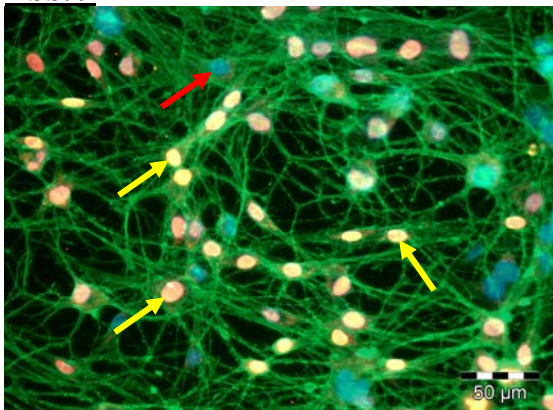


Abb. 10

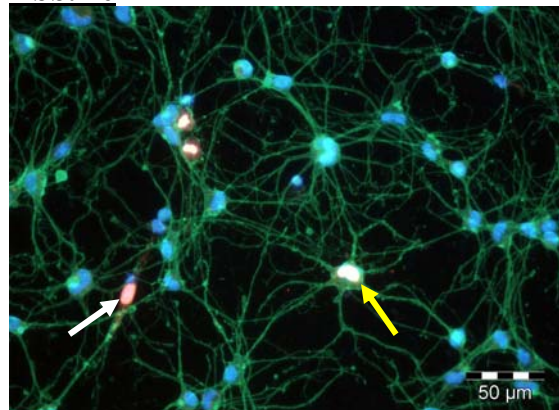


Abb. 9 + 10: Einmal mit Cold jet aufgereinigte Schwesterkulturen adulter humaner Schwann-Zellen, gewonnen aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe.

Abb. 9 zeigt Kultur unter Heregulin-Einfluss mit deutlich höherer Proliferationsrate der Schwann-Zellen (mehr BrdU-Einbau) im Vergleich zur Schwesterkultur ohne Zusatz von Heregulin, dargestellt in Abb. 10. Gelbe Pfeile markieren exemplarisch p75^{LNGFR}-positive Zellen (= Schwann-Zellen, grüne Fluoreszenz) mit BrdU-Inkorporation (Zellkerne mit rot-gelber Fluoreszenz). Roter Pfeil zeigt Schwann-Zelle, welche BrdU-negativ ist und nur die blaue DAPI-Kernfärbung aufweist. Weißer Pfeil kennzeichnet p75^{LNGFR}-negative Zelle (= Fibroblast), welche BrdU inkorporiert hat (rote Fluoreszenz). Messbalken $\hat{=}$ 50 μ m.

Abb. 11

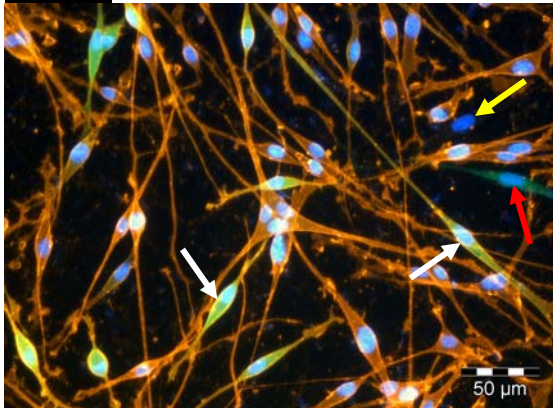


Abb. 12

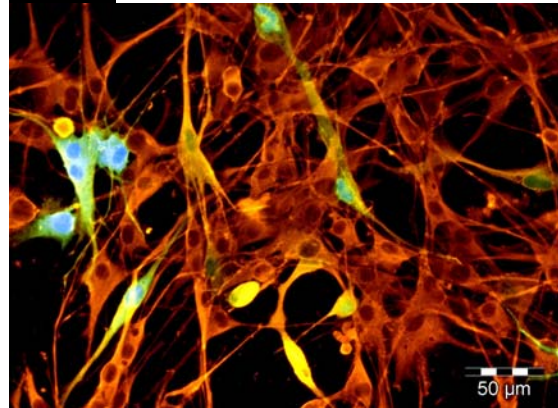


Abb. 11: Zweimal mit Cold jet aufgereinigte Schwann-Zell-Kultur adulter Ratten, gewonnen aus *in vivo*-prädegenerierten Nn. ischiadici, nach Elektroporation. Weiße Pfeile zeigen transfizierte p75^{LNGFR}-positive Zellen (= Schwann-Zellen, rote Fluoreszenz), welche das Markerprotein EGFP exprimieren (grüne Fluoreszenz). Transfizierte Schwann-Zellen stellen sich gelb-grün dar. Roter Pfeil markiert EGFP-positive (transfizierte) p75^{LNGFR}-negative Zelle (= Fibroblast). Gelber Pfeil kennzeichnet eine nicht-transfizierte p75^{LNGFR}-negative Zelle. Messbalken $\hat{=}$ 50 μm .

Abb. 12: Adulte humane Schwann-Zell-Kultur, gewonnen aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe und einmal mit Cold jet aufgereinigt, nach Elektroporation. EGFP-exprimierende S100-positive Zellen (transfizierte Schwann-Zellen) stellen sich gelb-grün dar. Messbalken $\hat{=}$ 50 μm .

Abb. 13

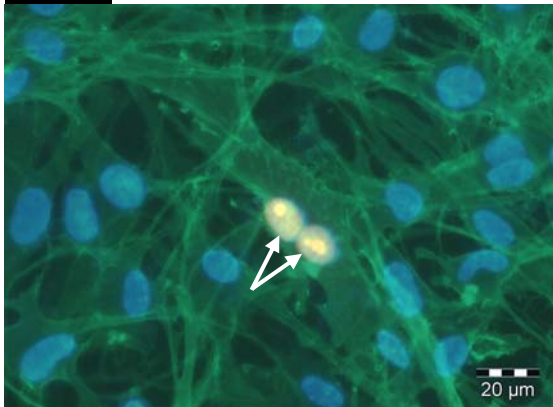


Abb. 13: Adulte humane Schwann-Zell-Kultur, gewonnen aus frischem, *in vitro*-prädegenerierten Nervengewebe und einmal mit Cold jet aufgereinigt, nach Elektroporation mit 18 kDa-FGF-2/DsRed-Konstrukt. Pfeile zeigen transfizierte p75^{LNGFR}-positive Zellen (= Schwann-Zellen, grüne Fluoreszenz), welche die DsRed-markierte 18 kDa-FGF-2-Isoform mit dem charakteristischen Verteilungsmuster im Zellkernplasma und den Kernkörperchen exprimieren (rote Fluoreszenz). Messbalken $\hat{=}$ 20 μm .

Abschnitt 2

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus Versuchen mit adulten Ratten-Schwann-Zellen (SZad), gewonnen aus unterschiedlich vorbehandelten Nervi ischiadici. [BrdU = 5-Bromo-2'-deoxy-uridine; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein]

Parameter	unbehandelte Nerven, direkt dissoziiert	<i>in vitro</i>-prädegenerierte Nerven	<i>in vivo</i>-prädegenerierte Nerven
Zellausbeute (vitale Zellen/mg Nervengewebe)	$0,8 \pm 0,2 \times 10^5$ (n = 11)	$1,0 \pm 0,4 \times 10^5$ (n = 9)	$1,1 \pm 0,3 \times 10^5$ (n = 30)
Anteil vitaler Zellen nach Dissoziation (in %)	$96,4 \pm 4,5$ (n = 5)	nicht ermittelt	$96,9 \pm 3,7$ (n = 6)
Reinheit (SZad in %)			
nach 1. Passage	nicht ermittelt	$68,9 \pm 7,2$ (n = 6)	$48,5 \pm 12,9$ (n = 5)
nach 2. Passage	nicht ermittelt	$93,8 \pm 4,1$ (n = 6)	$90,5 \pm 5,3$ (n = 5)
nach 3. Passage	nicht ermittelt	nicht ermittelt	$94,9 \pm 3,4$ (n = 3)
Proliferationsrate (BrdU ⁺ -SZad in %)			
nach 1. Passage	nicht ermittelt	$40,9 \pm 11,3$ (n = 6)	$8,5 \pm 1,8$ (n = 4)
nach 2. Passage	nicht ermittelt	$35,1 \pm 11,1$ (n = 6)	$43,0 \pm 3,0$ (n = 3)
nach 3. Passage	nicht ermittelt	nicht ermittelt	$35,9 \pm 17,1$ (n = 3)

Tab. 2: Elektroporation neonataler Ratten-Schwann-Zellen (SZneo): 1. Optimierungsreihe (gleiche Zellzahl und Plasmidmenge; Volt und Farad variabel) [EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein]

Anzahl SZneo	Menge an Plasmid (pEGFP-N2)	Spannung (Volt)	Ladung des Kondensators (μ Farad)	Ergebnis (transfizierte SZneo in %)
1×10^6	5 μ g	200	1500	1,6 (n = 1)
1×10^6	5 μ g	250	750	1,9 (n = 1)
1×10^6	5 μ g	300	750	4,5 (n = 1)
1×10^6	5 μg	300	1500	7,1 (n = 1)

Tab. 3: 2. Optimierungsreihe (Volt- und Farad-Einstellung der besten Transfektionsrate aus 1. Optimierungsreihe übernommen; Zellzahl und Plasmidmenge variabel) [EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein]

Anzahl SZneo	Menge an Plasmid (pEGFP-N2)	Spannung (Volt)	Ladung des Kondensators (μ Farad)	Ergebnis (transfizierte SZneo in %)
1×10^6	10 μg	300	1500	$28,6 \pm 3,0$ (n = 3)
1×10^6	15 μ g	300	1500	16,4 (n = 1)
$0,5 \times 10^6$	5 μ g	300	1500	9,9 (n = 1)
$0,5 \times 10^6$	10 μ g	300	1500	25,0 (n = 1)
$0,5 \times 10^6$	15 μ g	300	1500	25,8 (n = 1)

Tab. 4: Zusammenfassende Darstellung der Transfektionsraten adulter Ratten-Schwann-Zellen (SZad), durch *in vivo*-Prädegeneration gewonnen, in Abhängigkeit der Transfektionsmethode. [EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein]

	Metafectene™ (Ergebnisse aus Optimierungsreihe)	Elektroporation	
		15 µg pEGFP-N2/ 5 x 10 ⁵ Zellen	30 µg pEGFP-N2/ 5 x 10 ⁵ Zellen
		<i>nach</i> 1. Aufreinigung:	
EGFP ⁺ -SZad aus der <i>in vivo</i> - Prädegeneration (in %)	0,8	2,4	
	1,5	1,9	
	1,7	18,5	
	3,5	7,6 ± 9,4 (n = 3)	
	1	<i>nach</i> 2. Aufreinigung:	
	1,7 ± 1,1 (n = 5)	10,3	31,7
		10,2	
		18,9	
		17,5	
		14,2 ± 4,6 (n = 4)	31,7 (n = 1)
	<i>Gesamt:</i> 1,7 ± 1,1 (n = 5)	<i>Gesamt:</i> 11,4 ± 7,3 (n = 7)	<i>Gesamt:</i> 31,7 (n = 1)

Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus Versuchen mit adulten humanen Schwann-Zellen (SZhum), gewonnen aus unterschiedlich vorbehandeltem Nervengewebe. [BrdU = 5-Bromo-2'-deoxy-uridine; eingefr. = eingefroren; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein; rHRG = rekombinantes humanes Heregulin]

	Art der Vorbehandlung					
	direkte Dissoziation		<i>in vitro</i> -Prädegeneration			
	eingefr.	frisch	eingefr.	14 d		7 d
				frisch		frisch
Zellausbeute vitale Zellen/mg	$0,9 \pm 0,7 \times 10^4$ (n = 5)	$1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ (n = 5)	$2,5 \pm 1,1 \times 10^4$ (n = 5)	$2,9 \pm 1,5 \times 10^4$ (n = 17)		$2,1 \pm 1,5 \times 10^4$ (n = 4)
Mediumzusätze					rHRG	rHRG
Reinheit (SZhum in %) nach 1. Passage	92,2 83,5 (n = 2)	$74,3 \pm 17,8$ (n = 3)	86,5 93,7 (n = 2)	$92,6 \pm 3,6$ (n = 6)	$92,5 \pm 4,5$ (n = 6)	
nach 2. Passage	$92 \pm 2,2$ (n = 3)	$96,4 \pm 3,2$ (n = 4)	96,1 95,8 (n = 2)	$97,6 \pm 1,7$ (n = 8)	$97,5 \pm 2,0$ (n = 7)	$97,3 \pm 0,7$ (n = 3)
Proliferation (BrdU ⁺ -SZhum in %) nach 1. Passage	2,1 0,01 (n = 2)	0,0 0,4 (n = 2)	0,0 9,2 (n = 2)	$2,6 \pm 3,5$ (n = 6)	$32,7 \pm 12,5$ (n = 6)	
nach 2. Passage	$0,8 \pm 0,8$ (n = 5)	$1,8 \pm 0,6$ (n = 3)	2,0 0,01 (n = 2)	$5,0 \pm 4,0$ (n = 8)	$22,4 \pm 17,5$ (n = 7)	
Elektroporation (EGFP ⁺ -SZhum in %)		2,6 (n = 1)	5,2 (n = 1)	$24,7 \pm 10,0$ (n = 4)	$14,9 \pm 5,0$ (n = 3)	$37,5 \pm 12,3$ (n = 3)
				$20,5 \pm 9,3$ (n = 7)		

Tab. 6: Auflistung der Daten, die den prozentualen Anteil p75^{LN_GFR}- oder S100-positiver Zellen (humane Schwann-Zellen, SZhum) in Kulturen adulter humaner Schwann-Zellen wiedergeben. [Cold jet = Cold jet-Aufreinigungsschritt; rHRG = rekombinantes humanes Heregulin]

	Art der Vorbehandlung				
	direkte Dissoziation		in vitro-Prädegeneration (14 d)		
	eingefroren	frisch	eingefroren	frisch	
					rHRG
nach 1. Passage (Primäraussaat) <i>SZhum in %</i>	92,2	83,9	86,5	89,0	86,4
	83,5	53,8	93,7	98,8	89,9
		85,2		89,9	89,7
				90,5	95,0
				93,1	96,1
				94,3	98,0
		74,3 ± 17,8		92,6 ± 3,6	92,5 ± 4,5
	(n = 2)	(n = 3)	(n = 2)	(n = 6)	(n = 6)
nach 2. Passage (1 x mit Cold jet aufgereinigt) <i>SZhum in %</i>	89,5	91,8	96,1	100,0	95,1
	93,0	98,7	95,8	95,4	98,5
	93,5	97,0		97,8	94,2
		98,2		99,4	98,1
				99,0	98,4
				96,8	99,3
				96,4	98,7
				95,9	
	92,0 ± 2,2	96,4 ± 3,2	(n = 2)	97,6 ± 1,7	97,5 ± 2,0
	(n = 3)	(n = 4)		(n = 8)	(n = 7)
nach 3. Passage (2 x Cold jet) <i>SZhum in %</i>		93,7	98,1	99,7	
				96,7	
		(n = 1)	(n = 1)	(n = 2)	
Langzeitkultivierung					92,6
nach 4. Passage (1 x Cold jet)					(n = 1)
nach 5. Passage (1 x Cold jet)					97,7
					(n = 1)
nach 5. Passage (2 x Cold jet)					97,8
					(n = 1)
nach 6. Passage (2 x Cold jet) <i>SZhum in %</i>					99,0
					(n = 1)

Tab 7.: Auflistung der Proliferationsraten (Anteil der BrdU/p75^{LNGFR}- oder S100-doppelt-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl p75^{LNGFR}- oder S100-positiver Zellen = BrdU⁺-SZhum) adulter humaner Schwann-Zell-Kulturen, gewonnen aus unterschiedlich vorbehandeltem Nervengewebe, die z.T. rekombinantes humanes Heregulin (rHRG) als Mediumzusatz erhielten. [Cold jet = Cold jet-Aufreinigungsschritt]

	Art der Vorbehandlung				
	direkte Dissoziation		in vitro-Prädegeneration (14 d)		
	eingefroren	frisch	eingefroren	frisch	
					rHRG
nach 1. Passage (Primäraussaat) <i>BrdU⁺-SZhum in %</i>	2,1	0,0	0,0	0,5	13,5
	0,01	0,4	9,2	9,4	25,0
				1,0	47,6
				0,0	40,0
				3,1	41,0
				1,7	28,8
				2,6 ± 3,5	32,7 ± 12,5
	(n = 2)	(n = 2)	(n = 2)	(n = 6)	(n = 6)
nach 2. Passage (1 x Cold jet) <i>BrdU⁺-SZhum in %</i>	1,2	2,0	2,0	8,0	27,3
	1,9	2,3	0,01	12,8	10,5
	0,7	1,2		6,4	21,1
	0			3,3	59,6
	0			1,9	10,0
				0,0	13,0
				3,1	15,3
				4,2	
	0,8 ± 0,8	1,8 ± 0,6		5,0 ± 4,0	22,4 ± 17,5
	(n = 5)	(n = 3)	(n = 2)	(n = 8)	(n = 7)
nach 3. Passage (2 x Cold jet) <i>BrdU⁺-SZhum in %</i>	4,2	16,9	0	1,3	
				0	
	(n = 1)	(n = 1)	(n = 1)	(n = 2)	
Langzeitkultivierung nach 4. Passage (1 x Cold jet)					7,0
					(n = 1)
nach 5. Passage (1 x Cold jet)					11,6
					(n = 1)
nach 5. Passage (2 x Cold jet)					6,1
					(n = 1)
nach 6. Passage (2 x Cold jet) <i>BrdU⁺-SZhum in %</i>					5,9
					(n = 1)

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Claudia Grothe möchte ich mich sehr für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken und dafür, dass sie mir stets beratend zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Bicker für die Übernahme meiner Arbeit und die freundliche Unterstützung.

Für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit danke ich Frau Dr. Kirsten Haastert, die mit wertvollen Vorschlägen im Verlauf der Versuche und bei der Anfertigung des Manuskriptes zum Gelingen der Arbeit entscheidend beigetragen hat.

Weiter möchte ich Frau Prof. Dr. Cordula Matthies für die Zurverfügungstellung humanen peripheren Nervenmaterials danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Maike Wesemann für die hilfreichen Ratschläge in Zellkultur-Fragen und Herrn Dr. Peter Claus für solche in molekularbiologischen Fragen.

Ferner danke ich Frau Hella Brinkmann und Frau Kerstin Kuhleemann für die zeitaufwendige Herstellung der Plasmide und Proteine.

Der Abteilung Neurologie der Medizinischen Hochschule Hannover bin ich für die ermöglichte Nutzung des Elektroporationsgerätes zu besonderem Dank verpflichtet.

Danken möchte ich ganz herzlich Natascha, Esther, Katrin, Alex, Jeroen und Jürgen für die stets heitere Atmosphäre und die angeregten Gespräche. Ein ganz besonderer Dank gebührt Esther, die mir in allen computertechnischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und mich so des Öfteren vor Nervenzusammenbrüchen bewahrt hat.

Allen Kollegen der Abteilung Neuroanatomie möchte ich abschließend für die schöne und unvergessliche Zeit danken, die sie mir bereitet haben.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich moralisch und finanziell unterstützt hat und meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.