Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Abteilung Experimentelle Embryologie
Lehrbereich Anatomie und Embryologie
Leiter: Professor Dr. U. Drews

BMP-2 abhängige Auswanderung von subventrikulären Stammzellen der adulten Maus nach Transplantation in die Neuralleiste von Hühnchen- und Wachtelembryonen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
CHRISTIAN BUSCH
aus Halle an der Saale

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Drews

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Luft

Für O+O+N+J+D+R+S+C

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1. Neuronale Stammzellen / Neurosphären 1

1.2. GFP 1

1.3. Neuralleiste 2
1.3.1. Neuralleiste-Definition 2
1.3.2. Regulierende Faktoren der Neuralleistenwanderung 3
1.3.3. Morphologie der Neuralleistenwanderung 5
1.3.4. Differenzierung der Neuralleistenzellen 7

1.4. Epitheliale-Mesenchymale-Transformation (EMT) 9
1.4.1. EMT - Definition 9
1.4.2. Regulierende Faktoren der EMT 9

1.5. BMP 11
1.5.1. BMP - Definition 11
1.5.2. BMP- Rezeptorsubtypen 11
1.5.3. BMP- Funktion 13
1.5.4. BMP - Einfluss auf Zellen 16

1.6. Vorversuche zur Injektion in das Neuralrohr des Hühnchens 17
1.6.1. SK-Mel 28 17
1.6.2. B16 18
1.6.3. Versuche anderer Forschungsgruppen 19

1.7. Zielsetzung 19

2 Material und Methodik 22

2.1. Gewebeaufbereitung und Neurosphären-Kultur 22

2.2. Inkubation und Vorbereitung der Embryonen 26

2.3. Transplantation der Neurosphären ins Neuralrohr 26

2.4. Markieren der Neurosphären mit Ferrocarbutran 28

2.5. New-Kultur 29

2.6. Histologie 31

2.7. Histochemie und Immunfärbungen 31

2.8. *In-situ*-Hybridisierung mit der L1-Sonde zum Nachweis von murinen DNA-Sequenzen 32

2.9. Auffinden apoptotischer Zellen 33

3 Ergebnisse 34

3.1. Neurosphären / Histologie 34

3.2. Hühnchen 12 Stunden Inkubationszeit 37

3.3. Hühnchen 24 Stunden Inkubationszeit 39

3.4. Hühnchen 48 Stunden Inkubationszeit 44

3.5. Hühnchen New Kultur 48
3.6. Wachtel 24 Stunden Inkubationszeit 50
3.7. Vergleich mit HNK-1 whole mounts 53
3.8. Differenzierung und Apoptose der transplantierten Neurosphären 59
3.9. Statistische Analyse der Experimente 62
4 Diskussion 65
4.1. Klinische Relevanz 65
4.2. *In vitro* Vorbehandlung der SVZ-Zellen 66
4.3. EMT 67
4.4. EMT – beteiligte Faktoren 68
4.5. Übertragung auf die eigenen Experimente 70
5 Zusammenfassung 72
6 Literaturverzeichnis 74
Danksagung
Lebenslauf

Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: Herstellung der verwendeten Lösungen und Wachstumsfaktoren 25

Tab. 2: Inhaltsstoffe der Tyrode-Lösung, modifiziert und im Original 27

Abb. 1: Neurosphären, nativ und immunhistochemisch gefärbt 35

Abb. 2: Hühnchenembryo 12 Stunden nach Transplantation 38

Abb. 3: Hühnchen mit BMP-2 behandeltem Transplantat. 24 Stunden *p.t.* 41

Abb. 4: Hühnchen mit unbehandeltem Transplantat. 24 Stunden *p.t.* 42

Abb. 5: BMP-2 behandelte und unbehandelte Neurosphären *in situ*, 24 Stunden *p.t.* 43

Abb. 6: Hühnchen mit BMP-2-behandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.* 45

Abb. 7: Hühnchen mit unbehandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.* 46

Abb. 8: Hühnchen mit BMP-2-behandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.*, Paraffinschnitte mit HE-Färbung 47

Abb. 9: Time-lapse Serie einer BMP-2 behandelten Neurosphäre in der New Kultur 49

Abb. 10: Wachtelembryo mit BMP-2 behandeltem Transplantat 24 Stunden *p.t* 51

Abb. 11: Vergleich mit autochthoner Neuralleistenauswanderung 55

Abb. 12: Autochthone Neuralleistenwanderung des Hühnchenembryos..... 56

Abb. 13: HNK-1 Reaktivität der autochthonen Neuralleiste des Hühnchens 58

Abb. 14: TuJ1-Färbung zur Markierung differenzierter Neurosphärenzellen 60

Abb. 15: TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose 61

Tab. 3: Statistische Auswertung 64

1 Einleitung

1.1. Neuronale Stammzellen / Neurosphären

Die Entdeckung von neuronalen Stammzellen im Zentralen Nervensystem (Subventrikularzone, Hippokampus) weckte die große Hoffnung, dass sie zukünftig als Stammzelltherapie für neurodegegenerative Erkrankungen (z.B. M. Parkinson) angewandt werden können (Reynolds und Weiss, 1992). Für die therapeutische Nutzung müssen die Stammzellen vorher in Bezug auf ihr Proliferationspotential, auf ihren Differenzierungszustand und auf ihre morphogenetischen Eigenschaften hin charakterisiert werden. Eine vielfach benutzte Methode für die Vermehrung von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen ist, die isolierten Zellen in selektiven Nährmedien unter Wachstumsfaktorstimulierung wachsen zu lassen, wodurch frei schwimmende Zellaggregate entstehen, welche den Namen „Neurosphären“ erhalten haben (Reynolds und Weiss, 1992; Reynolds et al., 1992; Uchinda et al., 2000). Frühere Studien haben zeigen können, dass Neurosphären dynamische Strukturen mit unterscheidbaren radialen Kompartimente von Zellproliferation, Apoptose und Phagozytose sind (Bez et al., 2003). *In vitro* haben Neurosphären aus menschlichen oder murinen Subventrikularzellen die Fähigkeit, sich in Richtung von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Johe et al., 1996; Reynolds und Weiss, 1996), bzw. nach Vorbehandlung mit bestimmten Wachstumsfaktoren zu Neuralleistenabkömmlingen (Sailer et al., 2005) zu entwickeln. Immunhistochemisch sind SVZ-Zellen Nestin-positiv. Nestin ist ein Intermediärfilament, das spezifisch von neuroepithelialen Stammzellen exprimiert wird (Lendahl et al., 1990).

1.2. GFP

Die in der vorliegenden Studie verwendeten SVZ-Zellen wurden aus transgenen Tieren gewonnen. Ein wichtiger Schritt nach der Transplantation von Zellen in einen Embryo ist das Widerauffinden der transplantierten Zellen mit großer Treffsicherheit im Empfängertier. Daher sind in ihrem Genom veränderte Tiere und deren Zellen, die mit *green fluorescent protein* (GFP) transfiziert sind, für

das spezifische Widerauffinden solcher markierten Zellen ein häufig angewandtes System. Die GFP-Fluoreszenz wird von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, das aus 238 Aminosäuren besteht. Das GFP-Gen ist aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert worden. Das GFP-*chromophore* stammt von der ursprünglichen Aminosäurensequenz von *A. victoria* ab und wurde durch die Modifizierung und Zyklierung der Aminosäuren Ser-Tyr-Gly an den Orten 65 bis 67 erzeugt. Es sind keine weiteren Substrate von *A. victoria* für die Herstellung der Fluoreszenz notwendig. Die transgenen Mäuse erscheinen einheitlich grün unter geeigneter blauer Lichtanregung, mit der Ausnahme von Haaren und Erythrozyten (Okabe et al., 1997).

Während in Quallen das GFP normalerweise in mikro-Einschlußkörperchen abgesondert wird, wird das stärker fluoreszierende *enhanced* GFP-Aktin Fusionsprotein (EGFP, maximale Anregung bei 509 nm) der im vorliegenden Experiment verwendeten Mäuse im gesamten Zytosol exprimiert, was den löslichen Eigenschaften des Proteins zugeschrieben wird. Das EGFP der transgenen Mäuse steht unter einem β-Aktin-Promoter und einem Cytomegalievirus *enhancer* des Hühnchens. Eine mögliche Toxizität aufgrund von hohen GFP-Konzentrationen, die im Zytosol erreicht werden, wurde durch histologische Untersuchungen von 12 Wochen alten Mäusen ausgeschlossen. Hierfür wurden Gewebe aus Muskulatur, Herz, Pankreas, Lunge und Niere auf mögliche zytologische Veränderungen überprüft, wobei keine Abnormalitäten in den untersuchten Geweben gefunden werden konnten. Dies wies darauf hin, dass die Exprimierung von EGFP nicht toxisch ist (Okabe et al. 1997).

1.3. Neuralleiste

1.3.1. Neuralleiste-Definition

In dieser Arbeit wurden die GFP-markierten Neurosphären in die Neuralleiste des Hühnchens transplantiert. Die Neuralleiste (*Crista neuralis*) ist eine einzigartige Struktur der Embryonen von Wirbeltieren. Sie geht aus Zellen des Neuroektoderms am Rand der Neuralwülste hervor. Vorübergehend bilden die Zellen der Neuralleiste eine Zwischenzone zwischen Neuralrohr und Oberfläche-

nektoderm. Das Neuralrohr entsteht aus der Neuralplatte, die durch den Chorda-Mesoderm-Komplex im Ektoderm induziert wird. Die Ektodermzellen bilden ein mehrreihiges Epithel (Neuralepithel), das sich zur Neuralrinne aufrichtet und sich durch Verschmelzung der Neuralwülste zum Neuralrohr schließt. Während des Neuralrohrschlusses wandern die Neuralleistenzellen aus und ordnen sich über und beidseits der Anlage des zentralen Nervensystems (ZNS) vom Mesencephalon bis in Höhe der kaudalen Somiten an. Dies geschieht beim Menschen am Anfang der 4. Embryonalwoche (post ovulationem); beim Huhn etwa ab Ende des 2. Embryonaltages. Es lässt sich bald ein Kopf- und Rumpfteil der Neuralleiste unterscheiden. Während ihrer aktiven Migration aus dem ektodermalen Zellverband in das darunter gelegene Mesoderm, wandeln sie sich dabei von epithelialen Zellen des Neuroektoderms in mesenchylame Zellen um. Während ihrer Wanderung dienen Moleküle der extrazellulären Matrix als Leitstruktur.

1.3.2. Regulierende Faktoren der Neuralleistenwanderung

Im Rumpfbereich von Vogelembryonen ist die Neuralleistenwanderung durch die einzelnen Somiten segmental, wobei die Neuralleistenzellen durch den rostralen Anteil des Sklerotoms wandern, während sie den kaudalen Anteil meiden (Krull et al., 1997). Dieses Migrationsmuster wird von Eph-Rezeptortyrosinkinasen und deren Liganden bewirkt. Die Eph-Familie ist die größte Unterfamilie von Rezeptortyrosinkinasen und besteht aus 16 bisher bekannten Rezeptoren, denen 9 bekannte Ephrin-Liganden zugeordnet werden. Der Ligand EphB3 ließ sich in der rostralen Hälfte des Sklerotoms nachweisen, welche die auswandernden Neuralleistenzellen mit einschließt. Im Gegensatz dazu besitzt der Ligand EphB1 ein komplementäres Exprimierungsmuster in der kaudalen Hälfte des Sklerotoms (Krull et al., 1997).

Neuralleistenzellen werden von Komponenten der extrazellulären Matrix, vor allem Fibronectin, gesteuert und werden durch das kaudale Sklerotom und die perichordale Region zurückgehalten (Perris und Perissinotto, 2000). Liem und Kollegen zeigten, wie dorsale Zellschicksale (Neuralleiste) von den Zellen der Neuralplatte angenommen werden, indem sie die Exprimierungsmuster von vier

hierfür ausschlaggebenden Genen (*MSX1, PAX3, DSL1 und SLUG*) nachwiesen. Diese vier Gene werden von Zellen in der dorsalen Hälfte des Neuralrohrs während der Auswanderung der Neuralleistenzellen exprimiert. Das epidermale Ektoderm erwies sich als Quelle eines kontaktabhängigen Signals, welches in der Lage war, die Differenzierung von Neuralleistenzellen *in vitro* zu induzieren. Darüber hinaus konnten verschiedene *bone morphogenetic proteins* (BMPs), die sowohl im epidermalen Ektoderm, als auch in den Zellen der Deckplatte exprimiert werden, als zweite Quelle von „dorsalisierenden" Signalen identifiziert werden, die wahrscheinlich in dem Augenblick zu wirken beginnen, sobald das epidermale Ektoderm keinen direkten Kontakt mehr mit dem Neuralepithel besitzt. Diese Ergebnisse legten die Schlussfolgerung nahe, dass die Differenzierung von Zellen des dorsalen Neuralrohrs in neuralleistenspezifische Zellschicksale von den entgegengesetzten Aktivitäten von BMPs aus dem epidermalen Ektoderm und der Deckplatte, und von einem Sonic hedgehog-vermittelten repressiven Signal aus der Chorda dorsalis abhängt (Liem et al., 1995).

Im peripheren Nervensystem werden die Zellschicksale Nervenzelle/Glia *in vivo* durch das Zusammenspiel von BMPs, Regulatorgenen und Zell-zu-Zell-Kontakten während der späteren Embryonalentwicklung gesteuert. Hierdurch werden zuerst Neurone und später Gliazellen gebildet. *In vitro* dominiert die neurogene Aktivität von BMP den gliogenen Effekt von Neuregulin auf Neuralleistenzellen. Postmigratorische Neuralleistenzellen wurden aus fetalem Rattendarm (E14.5) isoliert und zeigten eine mit der Zeit abnehmende neuronale Differenzierung in Abhängigkeit von BMP-2. Hierbei induzieren BMPs die Exprimierung von Mash1, welches in den Neuralleistenzellen die Fähigkeit aufrechterhält, wiederum auf BMP-2 zu reagieren. Auf diese Weise interagieren Wachstumsfaktoren und proneurale Gene in gegenseitiger Abhängigkeit, um die Neurogenese zu begünstigen, während sie gleichzeitig die Gliogenese inhibieren (Lo et al., 1997; Le Douarin und Dupin, 2003).

Ein weiterer Faktor, der die Morphogenese des Neuralrohres und das Auswanderungsverhalten von Neuralleistenzellen kontrolliert, wurde von Gurniak et al. untersucht. Sie stießen auf einen wesentlichen Zusammenhang der Neural-

leiste mit Cofilin/ADF-Proteinen. Diese gehören zur Familie der *F-Actin depolymerizing factors*, welche ubiquitär in eukaryontischen Zellen, inklusive der Pflanzenzellen, exprimiert werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Cofilin/ADF-Proteine Aktinfilamente abtrennen und die Aktindynamik unterstützen, in dem sie Aktinfilamente assoziieren und dissozoiieren. Dies geschieht in einem Prozess, in dem Teile vom spitzen Ende der Monomere entfernt und an das gegenüberliegende Ende angefügt werden. Allem Anschein nach ist das eine der Schlüsselaktivitäten, die für die aktinabhängige Motilität verantwortlich ist, da Cofilin/ADF sich in einem Listerienmotilitätsassay als essentieller Co-Faktor erwiesen hat (Gurniak et al., 2005). Es konnte mittels *whole-mount in-situ*-Hybridisierung von Mausembryonen gezeigt werden, dass eine starke n-Cofilin Exprimierung entlang der cephalen Neuralleiste, sowie entlang der Rumpfneuralleiste, stattfindet. Das legt nahe, dass n-Cofilin eine wichtige Rolle in der Regulation zytoskeletaler Vorgänge während der Neuralleistenauswanderung spielt. In homozygoten Mutanten, bei denen der n-Cofilin Locus ausgeschaltet wurde, konnte an E10.5 das Fehlen des Neuralrohrschlusses beobachtet werden. Daneben konnte in den Mutanten keine dem physiologischen medialen und lateralen Wanderweg entsprechende Neuralleistenzellauswanderung aus dem Neuralrohr beobachtet werden (Gurniak et al., 2005).

1.3.3. Morphologie der Neuralleistenwanderung

Auf Höhe des Rumpfes findet die Auswanderung der Neuralleistenzellen auf zwei verschiedenen Wegen statt, einem ventralen Weg, welcher die migrierenden Zellen zwischen dem Neuralrohr und der inneren Seite der Somiten (der Seite des Sklerotoms) bis zu den para-aortalen Ganglien entlang leitet und einem lateralen, der sich zwischen dem Ektoderm und den Somiten befindet (Le Douarin, 1999). Die ersten Rumpfneuralleistenzellen, welche die Somiten erreichen, bewegen sich entlang des ventralen Wanderungsweges, bis kurze Zeit später eine zweite Welle von Zellen in lateraler Richtung unterhalb des Ektoderms auswandert.

Bronner-Fraser beschrieb 1986, dass die ersten auswandernden Neuralleistenzellen im Hühnerembryo auf beiden Seiten der Mittellinie am dorsalen Rand des

Neuralrohrs ungefähr drei oder vier Somitensegmente rostral des jüngsten geformten Somiten beobachtet werden können. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Somiten disintegrieren, um Dermatom, Myotom und Sklerotom zu bilden, treten die ersten Neuralleistenzellen etwa fünf bis zehn Somitenlängen rostral des jüngsten geformten Somiten in das Sklerotom ein. In zunehmend reiferen Somiten können die Neuralleistenzellen an immer ventraleren Orten im Sklerotomgewebe, bis hin zur Aorta, gefunden werden. Jene Neuralleistenzellen, die den Melanozytenvorläuferzellen entsprechen, können lateral zwischen dem Ektoderm und dem Somiten ungefähr elf Somitenpaare rostral des jüngsten geformten Somiten, beobachtet werden.

Die melanozytäre Zelllinie wird auf dem lateralen Wanderungsweg der Neuralleistenzellen vom subektodermalen lateralen Mesoderm induziert. Dies ließ sich durch Färbung mit den spezifischen Antikörpern MelEM und ab732 nachweisen (Nataf et al., 1993).

Kasemeier-Kulesa et al. (2005) veröffentlichten eine Untersuchung der zellulären Dynamik, welche die Entstehung der dorsalen Wurzelganglien (DWG) und der para-aortalen sympathischen Ganglien (SG) vermittelt. Mittels fluoreszenzmarkierten Neuralleistenzellen des Rumpfbereiches und einer sagittalen Auspflanzungstechnik wurden Hühnchenembryonen per *time-lapse* Mikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass nachdem die Neuralleistenzellen das Neuralrohr verließen, sie Zellausläufer über den gesamten Bereich des kaudalen Somiten aussenden können und so mit den Zellen zweier DWGs in Kontakt bleiben. Nachdem sich die Zellen auf eines der sich ausbildenden DWGs festgelegt hatten, besaßen sie noch die Fähigkeit, sich umzuorientieren und zu migrieren, doch ließ sich dies in geringerem Ausmaße beobachten als bei den Zellen der SGs. Es wurden Zellen nachgewiesen, die sich zwischen zwei DWG-Anlagen hin- und herbewegten. Während die Zellen sich zum nächst kaudaleren DWG begaben, blieben sie ständig in Kontakt mit anderen DWG-Zellen.

Neuralleistenzellen, die das rostrale Sklerotom in ventraler Richtung bis zur Aorta durchwanderten, bilden regelrechte Zellstraßen, in denen die Zellen untereinander extensiv durch Zellausläufer verbunden waren. Es konnten einige Zellen beobachtet werden, die in die caudale Somitenhälfte eindrangen, wäh-

rend ein kleiner Anteil der Neuralleistenzellen, die zur Aorta migrierten, ebenfalls Zellausläufer in die caudale Somitenregion ausstreckten. Das Entwicklungsstadium, in dem sich das ventrale Auswanderungspotential der Zellen erschöpfte, entsprach etwa Stadium 20/21 (nach Hamburger und Hamilton, 1992) und konnte im Rumpfbereich zwischen den Flügel- und Extremitätenknospen beobachtet werden.

Nachdem die Neuralleistenzellen die Somiten erfolgreich durchwandert haben, zerstreuen sie sich rostral und caudal entlang eines dünnen Korridors, der von einer Seite durch die ventrale, äußere Ecke des Sklerotoms, und auf der anderen Seite durch die dorsale Aorta begrenzt war. Die räumliche Begrenzung der Neuralleistenzellen auf das rostrale Sklerotom wurde nur solange aufrecht erhalten, bis die Zellen sich dem ventralen Bereich des Sklerotoms näherten, um dann von diesem Wanderungsmuster abzuweichen und sich kontinuierlich in rostro-caudaler Richtung von ihrem zuvor axialem Ursprungslevel zu entfernen.

Daneben konnten zwei verschiedene Zellquellen ausgemacht werden, welche die SGs bilden. Eine dieser Zellpopulationen entsprang den Zellstraßen von Neuralleistenzellen, die sich von ihrem ursprünglichen Pfad durch den rostralen Somiten entfernen. Durch Zellausläufer verbanden sie sich mit Zellen, die sich der dorsalen Aorta angelagert haben und integrierten sich direkt in den interganglionären Raum zwischen den neu entstehenden SG-Anlagen. Die zweite Zellpopulation stammte von Neuralleistenzellstraßen ab, die vom Neuralrohr aus direkt die Anlagen der SGs ansteuerten, sich dann aber in das diese umgebende rostrale und caudale Gewebe bewegten. Im frühen Stadien gelang es sogar, wandernde Neuralleistenzellen zu beobachten, die sich auf dem Weg zur Aorta umorientierten und ihre ventrale Wanderrichtung in eine dorsale umänderten, um sich wieder in die DWGs einzugliedern. Nach einigen Stunden jedoch ging diese Plastizität der räumlichen Zellschicksale verloren, so dass die Zellen dann nur noch auf festgeschriebenen Wanderrouten auswanderten (Kasemeier-Kulesa et al., 2005).

1.3.4. Differenzierung der Neuralleistenzellen

Nach ihrer Auswanderung aus der Neuralleiste bilden die Rumpfneuralleistenzellen die sympathischen und parasympathischen Anteile des peripheren Nervensystems (PNS). Daneben entwickeln sie sich zu den Nervengeflechten, welche das Herz und die Derivate des Darmrohres innervieren, zu sensorischen Ganglien und zu Schwannzellen, die im PNS die Myelinscheiden bilden. Hinzu kommt noch, dass Abkömmlinge von Neuralleistenzellen sich in verschiedenen Hormondrüsen ansiedeln, wie beispielsweise im Nebennierenmark, und sich als Pigmentzellen (Melanozyten) im Stratum basale der Haut niederlassen. Ebenso besiedeln die Neuralleistenzellen die Wandschichten der großen Arterien, die von den Aortenbögen abstammen (Le Douarin, 1999).

Der parasympathischen (vagalen) Region der Neuralleiste, welche in ihrem kranialen Bereich den Somiten 1-7 zugeordnet ist, entspringt der größte Anteil der Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems. Daneben gibt es eine zweite Quelle von enterischen Vorläuferzellen, die sakrale Neuralleiste, welche sich im Hühnchenembryo caudal des 28. Somitenpaares befindet und Zellen für den postumbilikalen Darm bereitstellt. Die von der sakralen Neuralleiste stammenden Zellen dringen erst dann in den Darm ein, nachdem das Colorectum durch vagale Zellen kolonisiert wurde (Burns et al., 2002).

Das Rückdifferenzierungspotential von ausdifferenzierten Neuralleistenzellen wurde von Dupin und Kollegen untersucht. Hierfür wurden Schwannzellen des Nervus Ischiadicus aus E10.5 Wachtelembryonen immunselektiert und in klonalen Zellkulturen vermehrt. Diesen Zellkulturen wurde dann ET3 (Endothelin 3 Peptid) hinzugefügt, wodurch sie zu Gliazellen, Pigmentzellen und/oder Melanoblasten transdifferenzierten. Hierbei mussten die Zellen ein bipotentes glialmelanozytäres Neuralleistenvorläuferzellstadium durchlaufen. Somit ließ sich zeigen, dass Pigment- und Gliazellen, die von der Neuralleiste abstammen, *in vitro* phänotypisch instabil sind und durch eine Rückdifferenzierung als bipotente Stammzellen agieren können (Dupin et al., 2003).

Tomita et al. (2005) veröffentlichten Ergebnisse, die darauf hinwiesen, dass bei Nagetieren eine Subpopulation von Herzzellen existiert, die von der Neuralleiste abstammt und die sich unter bestimmten Bedingungen nach ihrer Rücktransplantation in Hühnchenembryonen der Stadien 12-13 (HH) sowohl in den cardi-

alen Ausflusstrakt, als auch in Spinalganglien, in Spinalnerven und in die glatte Muskulatur der Aorta integrieren.

1.4. Epitheliale-Mesenchymale-Transformation (EMT)

1.4.1. EMT - Definition

In der Embryonalentwicklung wird die Auswanderung von Neuralleistenzellen aus dem Neuralrohr als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichnet. Die EMT stellt eine komplexe Veränderung der Zellmorphologie und des Wanderungspotentials embryonaler Zellen dar und wird im Embryo durch „dorsalisierende“ BMPs, sowie durch „ventralisierende“ sonic hedgehog- und noggin-Signale induziert (Review von Hay, 2005). Die EMT umfasst zwei aufeinander folgende Schritte (nach Newgreen und Minichielle, 1995): Zuerst wird die Region der Neuralleiste im Epithel des Neuralrohrs induziert. Dieser erste Schritt ist morphologisch dadurch charakterisiert, dass die Basalmembran der Deckplatte des Neuralrohrs disintegriert. Als zweiter Schritt kann die Induktion der Auswanderung der Neuralleistenzellen von den dorsalen Ecken des Neuralrohrs entlang ihrer spezifischen Wanderwege (ventral und dorsal) betrachtet werden.

Die EMT kann daher als Prozess definiert werden, der durch einen kompletten Verlust epithelialer Eigenschaften von zuvor epithelialen Zellen gekennzeichnet ist. Während dieser Veränderung erwerben die Neuralleistenzellen mesenchymale Eigenschaften (z.B. die Exprimierung von Vimentin und N-Cadherin). Ihre neu erworbenen Eigenschaften erlauben es diesen Zellen, durch den Embryo zu wandern, um so zu spezifischen Zielregionen zu gelangen, wo sie sich dann differenzieren oder eine Differenzierung in umliegenden Zellen induzieren können. Während der EMT verlieren die beteiligten Zellen ihre apikale-basale Polarität zugunsten einer „vorderes Ende-hinteres Ende“-Polarität (Hay, 2005).

1.4.2. Regulierende Faktoren der EMT

Die Induktion der EMT im Embryo wird durch BMPs (die die Exprimierung der Transkriptionsfaktoren Slug/Snail hoch regulieren, Sakai et al., 2006), sowie

durch verschiedene andere embryonalen Faktoren (FGF, Wnt), (Aybar und Mayor, 2002) eingeleitet. Slug/Snail (Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die an den Promoter der E-Cadherin Exprimierung binden) sind die wichtigsten Repressoren von E-Cadherin (Huber et al., 2005). Daneben induzieren sie die Exprimierung von Vimentin in Neuralleistenzellen und in maligne entarteten Melanomzellen (Poser et al., 2001). Cadherine sind für feste Kontakte zwischen epithelialen Zellen verantwortlich. Sie zeichnen sich durch eine kalziumabhängige Bindung aus und aggregieren in den Desmosomen der Zellen. Die Herabregulierung des epithel-spezifischen E-Cadherin (einem wichtigen Molekül der Zelladhäsion) ist der wesentliche Schritt der EMT in vivo. Während ihrer Auswanderung aus dem Neuralrohr verlieren die Neuralleistenzellen ihre epithelspezifischen Adhäsionsmoleküle und entwickeln an deren Stelle eine neue Klasse von Haftmolekülen, die es ihnen ermöglicht, Determinanten im Kollagen und in den Glykoproteinen der Basalmembran zu erkennen. Während ihrer Auswanderung benutzen die Neuralleistenzellen die Basalmembran des Neuralrohrs und des Oberflächenektoderms als Leitstruktur. Es wurde postuliert, dass die EMT neben ihrer Rolle während der Embryonalentwicklung auch eine wichtige Rolle in der Zunahme der Malignität von Krebszellen spiele. Ein der embryonalen EMT ähnlicher Prozess sei Ursache der erhöhten Mobilität und invasiven Eigenschaften von Krebszellen, welche die Basalmembran durchbrechen und invasiv wachsen (Zhou et al., 2004).

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) unterstützen die EMT, indem sie die Basalmembran aufbrechen. Daneben scheinen sie auch eine wichtige Rolle bei der Durchwanderung der extrazellulären Matrix zu spielen.
Inhibitoren der MMPs sind sowohl in vitro, als auch in vivo in der Lage, die EMT von Neuralleistenzellen zu verhindern. Neuralleistenzellen aber, die sich bereits vom Neuralepithel gelöst haben und schon auf einem der Wanderwege migrieren (medial/lateral), wurden durch die inhibierten MMPs bei ihrer Auswanderung nicht beeinflusst (Duong und Erickson, 2004).
Ein weiterer wichtiger Faktor in der Entstehung der EMT ist c-Myb, welches ursprünglich als ein Schlüsselfaktor der Hämatopoese identifiziert wurde und bereits in frühen Embryonalstadien von Hühnchen synthetisiert wird. Durch

Elektroporation an Hühnchenembryonen im Stadium 10-12 (HH) konnte gezeigt werden, dass c-Myb als Mediator in der Bildung der Neuralleiste agiert. BMP-4 induzierte höhere Level von c-Myb in neuroepithelialen Zellen, wodurch die Gene MSX1 und Slug aktiviert werden. Mit dieser Aktivierung war der Verlust des epithelialen Zellcharakters und die Umwandlung in einen mesenchymalen Zustand verbunden (Karafiat et al., 2005).
In einer ähnlichen Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, dass die Co-Exprimierung der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Slug/Snail durch Elektroporation zu vermehrter HNK-1-Reaktivität und zu EMT in Neuralleistenzellen führte (Cheung et al., 2005).

1.5. BMP

1.5.1. BMP - Definition

Die in die Neuralleiste transplantierten Neurosphären wurden vor der Transplantation mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 behandelt. Das homodimere *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) ist ein Mitglied der *transforming growth factor β* (TGF-β) Substanzenfamilie, die aus BMPs, Activinen, Inhibinen und TFG-βs besteht. Dieser Komplex verschiedener Wachs tumsfaktoren übt pleiotrophe Effekte auf viele unterschiedliche Zelltypen aus und ist in dieser Weise für wichtige Schritte in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren und Nicht-Wirbeltieren (Scheufler et al., 1999) verantwortlich. Daneben spielen TGF-βs eine wichtige Rolle für die zelluläre Diferenzierung, für die Regulierung von Zellproliferation und Zelltod, für die Induzierung der Synthese extrazellulärer Matrix, sowie für die Modulierung der Immunantwort (Eickelberg et al., 2004).

1.5.2. BMP- Rezeptorsubtypen

BMPs besitzen Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, die als Rezeptor-Typ I (BMPR-IA und BMPR-IB) und Typ II (BMPR-II) bezeichnet werden (Miyazono et al., 1993). Untersuchungen an TGF-β-Rezeptoren legten nahe, dass der Ligand (z.B. BMP-2) sich zuerst mit dem Typ II-Rezeptor verbindet, um dann in einem zweiten Schritt einen heteromeren Komplex mit einem der beiden Typ I-

Rezeptoren bildet, wodurch eine intrazelluläre Signalkette induziert wird (Hogan, 1996). Diese Signalkaskade verläuft in folgenden Schritten: Endogenes/exogenes BMP-2 aktiviert den BMPR-IA Rezeptor (Rothhammer et al., 2005). Der aktivierte BMPR-IA Rezeptor phosphoryliert dann Rezeptor-regulierte Smad Proteine (Smad1, 5, 8), die sich zu heteromeren Komplexen mit Smad4 zusammenfügen (Varga und Wrana, 2005). Die heterodimeren Smad Komplexe translokieren schließlich in den Nukleus, wo sie die Transkription von Zielgenen induzieren.
BMP-2 bindet mit hoher Affinität an BMPR-IA, welcher darauf eine hohe Exprimierung von BMPR-II induziert (Allendorph et al., 2006). Die Bindung von BMPs an bereits bestehende heteromere Rezeptoren resultiert in der Aktivierung des Smad-*pathways*. Demgegenüber führt die durch BMPs induzierte Bildung von Rezeptor-Komplexen zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-*pathways* (Hsu et al., 2005).

Die meisten der bekannten Wirkungen von BMPs während der Entwicklung von neuralen Vorläuferzellen können den Wirkungsmechanismen von BMPR-1A und BMPR-1B zugeschrieben werden.
Die Aktivierung des BMPR-IA förderte die Proliferation von neuralen Vorläuferzellen (gemessen durch BrdU-Aufnahme) während der gesamten Embryonalzeit. Demgegenüber resultierte die Aktivierung von BMPR-IB in zellulärer Apoptose als frühe Antwort in Vorder- und Hinterhirn (E10.5 bei Mausembryonen, gemessen durch die Caspase3-Aktivität), und in Differenzierung als spätere Zellantwort (E13.5 bei Mausembryonen). Ob die beschriebenen BMPR Wirkungen über den MAPK- oder den Smad-pathway vermittelt werden, ist noch nicht untersucht worden (Panchision et al., 2001).
Stottman et al. (2004) konnten zeigen, dass die Signalketten, welche durch die BMP-Rezeptoren ausgelöst werden, wesentlich an der Auswanderung einer begrenzten Population von Neuralleistenzellen ins Epikard des Herzens beteiligt sind und dass BMPs auf diese Weise eine wichtige Rolle für die Entwicklung des kardialen Ausflusstraktes spielen. In ihrer Studie schalteten sie den BMPR-IA Rezeptor ab dem fünf-Somiten Stadium in Mäusen gezielt in der Neuralleiste

aus. Diese Knock-Out-Embryonen wiesen einen verkürzten Ausflusstrakt des Herzens und ein defektes Septum auf, und verstarben nach halber Tragezeit an akutem Herzversagen, begleitet von einer reduzierten Proliferation des ventrikulären Myokards. Stottmann und Kollegen schlussfolgerten hieraus, dass diesem myokardialen Defekt eine reduzierte BMP-Signalkette zu Grunde liegt in der von ihnen neu beschriebenen Untergruppe von Neuralleistenabkömmlingen im Epikard, welches eine bereits bekannte Quelle von ventrikulären myokardialen Proliferationssignalen sei. Diese Gruppe von neubeschriebenen Zellen seien aber morphologisch nur schwierig zu identifizieren, da Neuralleistenzellen das HNK-1-Epitop, welches von Neuralleistenzellen generell exprimiert wird, auf ihrer Wanderung zum Ausflusstrakt des Herzens verlieren können (Ito und Sieber-Blum, 1992).

Die Aktivierung von BMPR-IA (Protein) induziert die Expression von *BMPR-IB* (Gen). *BMPR-IB* arbeitet im Sinne eines Gens, das in der Folge seiner Aktivierung dorsale Charakteristika in dafür empfänglichen Zellen induziert.

BMP-2 verursachte in Ratten-E12 neuralen Stammzellen eine Proliferation in niedrigen Dosen (2 ng/ml), während höhere Dosen (50 ng/ml) einen gegenteiligen Effekt hatten. Um die Neuralleistenentwicklung zu testen, wurde die Entstehung von glatten Muskelzellen (als Neuralleistenabkömmling) nach einer BMP-2-Behandlung in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Niedrige BMP-2 Konzentrationen (2 ng/ml) generierten keinen glatten Muskelzellen; höhere Dosen (50 ng/ml) resultierten in *sma*-positiven glatten Muskelzellen. Dabei korrelierten die BMP-2 Dosen, die eine terminale Differenzierung als glatte Muskelzellen in den neuronalen Stammzellen hervorriefen mit den Dosen von BMP-2 für die Induktion des *BMPR-IB* Gens. Daraus wurde geschlussfolgert, dass BMP-2 mittels BMPR-IA (Rezeptorprotein) Proliferation verursacht, bis ein Schwellenwert von *BMPR-IB* (Gen) erreicht wird, nach dem die stimulierten Zellen sich terminal differenzieren (Panchision et al., 2001).

1.5.3. BMP- Funktion

BMP-Signalketten tragen zu der Spezifizierung und Expansion vieler Gewebe bei, wie beispielsweise zur Entwicklung der Gliedmaßen von Wirbeltieren und

der Flügelentwicklung bei *Drosophila* (Vogt und Duboule, 1999; Day und Lawrence, 2000), sowie des neuralen Ektoderms (Cornell und Ohlen, 2000).
BMPs besitzen die Fähigkeit, im Neuralrohr Neuralleistenzellen und deren „dorsale Differenzierungen“ zu induzieren (Deckplatte, Plexus Choroideus) (Liem et al., 1997; Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999; Panchision et al., 2001). Daneben sind sie an der Induktion der Neuralleiste beteiligt, indem sie das *basic-helix-loop-helix* Protein MASH1 in Neuralleistenstammzellen induzieren (Shah et al., 1996). BMP-2 und cyclic AMP (cAMP) üben in ähnlicher Weise einen kombinierten Effekt auf die Entwicklung von Melanozyten aus. Hierbei verstärkt die Behandlung von Neuralleistenzellen mit BMP-2 die Melanogenese, indem BMP-2 über eine selektive Aktivierung der Transkription des Tyrosinasegens die Synthese von Melanin verstärkt, ohne aber eine direkte Auswirkung auf die Differenzierung der Melanozyten zu haben (Bilodeau et al., 2001). Darüber hinaus können BMPs in frühen Vorläuferzellen des ZNS Apoptose induzieren (Graham et al., 1996; Furuta et al., 1997) und eine neuronale Differenzierung in ZNS-Vorläuferzellen von Mäusen während der frühen Embryonalentwicklung hervorbringen (Li et al., 1998; Mehler et al., 2000). Bei ZNS-Vorläuferzellen der späten Embryonalzeit, sowie bei adulten ZNS-Vorläuferzellen, induzieren BMPs eine Differenzierung in Richtung von Gliazellen (Gross et al., 1996), während sie die terminale Differenzierung im sich entwickelnden Neuralrohr begünstigen (Panchision et al., 2001).
BMPs spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des enterischen Nervensystems. In einer Versuchsreihe wurde die Aktivität von BMP durch noggin (BMP-2, -4, und -7 Antagonist; Sela-Donenfield und Kalchheim, 1999; Zhu et al., 2006) im Darm des Hühnchenembryos inhibiert. Es kam zur Unterbrechung der autochthonen Wanderung der enterischen Neuralleistenzellen. Daneben führte der Mangel an BMP zu einer Hypoganglionose und zur Unfähigkeit der Neuralleistenzellen, enterische Ganglien auszubilden (Goldstein et al., 2005).
Um die Funktion von BMP als Signalfaktor für die Neuralleisteninduktion zu untersuchen, wurden mit Noggin beschichtete Kügelchen in Pax7 exprimierende Regionen von Hühnchenembryonen im Stadium 3-4 (HH) implantiert. Pax7 stellt einen frühen embryonalen Marker dar, der für die Neuralleistenent-

wicklung in Vogelembryonen mitverantwortlich ist. Durch den Einfluss der Noggin-beschichteten Kügelchen wurde die Pax7-Exprimierung reduziert (Basch et al., 2006).

1.5.4. BMP - Einfluss auf Zellen

Durch die BMP-2 Behandlung von *in vitro* kultivierten kortikalen, striatalen und spinalen ZNS Stammzellen wurde die Zellentwicklung in Richtung von Neuralleistenzellen eingeleitet (tri-Potenz von Neuralleistenzellen: peripheres Neuron, Schwann'sche Zelle, glatte Muskelzelle; Mujtaba et al., 1998; Molne et al., 2000; Sailer et al., 2005).

Die Erzeugung des Neuralleistenabkömmlings „glatte Muskelzelle", welche laut einigen Autoren im kranialen Teil der Neuralleiste des Embryos und in den Aortenbögen auftritt (Le Douarin, 1999), lässt sich durch die Expression von *smooth muscle α-actin* messen (SMA; Shah et al., 1996; Tsai und McKay, 2000). Jedoch entwickeln sich *in vivo* glatte Muskelzellen nicht aus Rumpfneuralleistenzellen, was bedeutet, dass es wohl zusätzliche Mechanismen geben muss, die unerwünschte nicht-neurale Zellschicksale im peripheren Nervensystem supprimieren (Le Douarin und Dupin, 2003).

Hay (2005) wies darauf hin, dass die messbare Aktivität von SMA in Zellkulturen wohl eher als Ausdruck von „*stress fibers*" zu deuten ist und einen Artefakt der Zellkultur darstellt. So kann man nicht durch eine positive SMA-Reaktion auf das tatsächliche Vorhandensein von glatten Muskelzellen schließen.

Bei der Kultivierung von kortikalen, striatalen oder spinalen Stammzellen, die sowohl in hoher, als auch in niedriger lokaler Dichte wuchsen und nicht mit BMP behandelt wurden, ließen sich ausschließlich zentrale Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten erzeugen (ZNS tri-Potenz), was die Bedeutung von BMPs für die Entstehung von Neuralleistenzellen und deren Abkömmlingen hervorhob (Johe et al., 1996).

White et al. (2001) konnten zeigen, dass Neuralleistenstammzellen aus E14.5 Rattenembryonen sich unter niedrigen BMP-2 Konzentrationen in cholinerge parasympathische Neurone differenzieren, wohingegen für die Differenzierung in noradrenerge sympathische Neurone höhere BMP-2 Konzentrationen notwendig waren.

Hierbei setzt BMP-2 die spezifische neuronale Reifung von bereits ausgewanderten Neuralleistenvorläuferzellen in Kraft. Lokale BMP-2 Konzentrationen, sowie die Fähigkeit der Vorläuferzellen, auf diese zu reagieren, schienen für die

terminale Differenzierung in cholinerge und adrenerge Neurone verantwortlich zu sein (White et al., 2001).

1.6. Vorversuche zur Injektion in das Neuralrohr des Hühnchens

1.6.1. SK-Mel 28

In vorausgegangenen Experimenten injizierten wir menschliche SK-Mel 28 Melanomzellen ins Neuralrohr von Hühnchenembryonen, um das Auswanderungsverhalten der Melanomzellen in der Umgebung der embryonalen Hühnchenneuralleiste zu untersuchen. Die Hühnchenembryonen wurden in Paraffin eingebettet und mittels Serienschnitten untersucht. Hierfür wurden der melanomspezifische Antikörper HBM-45, sowie die für den Menschen spezifische Alu-Sequenz mittels *in-situ*-Hybridisierung benutzt. SK- Mel 28 Zellen integrierten sich in die Neuralleiste des Hühnerembryos und wurden in der Deckplatte des Neuralrohres, entlang des medialen Neuralleistenwanderweges, im Sklerotom, und schließlich auch in den sich entwickelnden Symphatikusganglien gefunden. Unsere Schlussfolgerung war, dass Melanozyten, als Neuralleistenabkömmlinge, nach ihrer Umwandlung in maligne Melanomzellen im Umfeld der embryonalen Neuralleiste wieder Neuralleistenwanderungseigenschaften annehmen können (Bartl et al., 1997; Schriek et al., 2005).

In einem zweiten Experiment injizierten wir mit eisenhaltigem Kontrastmittel (Resovist) beladene SK-Mel 28 Zellen ins Neuralrohr von Hühnchenembryonen im Stadium 12 (HH), um diese bis zu 16 weitere Tage zu bebrüten. Von Tag E4 bis E18 untersuchten wir die Embryonen mit einem klinischen Magnetresonanztomographen, um die eisenmarkierten Zellen im Embryo zu verfolgen. Das Signal der Eisenpartikel auf den Melanomzellen ließ sich gut darstellen und zeigte, dass die SK-Mel 28 Zellen entlang der Neuralleistenwanderwege auswandern, was sich histologisch bestätigen ließ (Oppitz et al., 2007).

1.6.2. B16

In ähnlicher Weise verfuhren wir mit Maus B16-F1 Melanomzellen, die mit einem VASP-GFP Konstrukt transfiziert waren und ebenfalls ins Neuralrohr von zwei Tage alten Hühnerembryonen transplantiert wurden. Das Auswanderungsverhalten der transplantierten Melanomzellen wurde mittels live-Fluoreszenz-Mikroskopie bis zu vier Tage nach der Injektion verfolgt; die Charakterisierung wurde in Paraffinserienschnitten durch Immunhistochemie mit den Antikörpern HMB-45, ab723 (Melanom-spezifisch) und HNK1 (neuralleistenspezifisch), sowie mittels *in-situ*-Hybridisierung mit der mausspezifischen repetitiven Genomsequenz *mL1* durchgeführt. Apoptotische Melanomzellen wurden durch Anti-Caspase3 und TUNEL-Färbungen nachgewiesen. Bereits 12 h nach der Injektion ins Neuralrohr des Rumpfbereiches waren die Melanomzellen in die Neuralleiste integriert und begannen, Zellklumpen auf Höhe der Intersegmentalspalten zwischen den einzelnen Somiten auszubilden. Zwei Tage nach der Injektion konnten die Melanomzellen auf dem medialen Neuralleistenwanderweg identifiziert werden, hier vor allem in den Symphatikusganglien, während die Melanomzellen sich Tage nach der Injektion auch auf dem lateralen Neuralleistenwanderweg anfärben ließen. Die Melanomzellen wurden sowohl nach der Integration in die Neuralleiste des Hühnerembryos, als auch während der Auswanderung entlang der Neuralleistenwanderwege apoptotisch, während sie nach Transplantation an ektope Stellen des Embryos (Augenbecher) invasive Melanome bildeten. (Oppitz et al. 2007).

In einer weiteren Versuchsanordnung ließen wir B16-F1 Melanomzellen in Rollerkultur zu Zellaggregaten wachsen. Während der Aggregatbildung wurden die Zellen mit BMP-2 oder dem BMP-Antagonisten noggin behandelt. Dann wurden die Melanomaggregate ins Neuralrohr von Hühnchenembryonen im Stadium 12 (HH) auf Höhe der oberen Extremitätenknospe (16.-19. Somitenpaar) transplantiert. Nach 24 h weiterer Bebrütung stellte sich heraus, dass noggin die Auswanderung der B16-F1 Melanomzellen unterdrückte. Die Vorbehandlung mit BMP-2 hatte einen additiven Effekt auf die Auswanderung der transplantierten Zellen. Wie schlussfolgerten hieraus, dass die Auswanderung von Melanomzellen nach Transplantation ins Neuralrohr von Hühnchenembryonen von der kon-

stitutiven Überexprimierung von BMPs in Melanomzellen (beschrieben von Rothhammer et al., 2005) abhängt und durch noggin unterdrückt werden konnte (Busch et al., Manuskript eingereicht zur Veröffentlichung).

1.6.3. Versuche anderer Forschungsgruppen

Brüstle et al. injizierten menschliche embryonale Stammzellen (ES-Zellen) in die Hirnventrikel von intrauterinen Rattenembryonen. Die injizierten Zellen wurden in alle größeren Kompartimente des Gehirns aufgenommen (Bulbus olfactorius, Kortex, Hippocampus, Striatum, Septum, Tektum, Thalamus, Hypothalamus und Hirnstamm). Nach ihrer Eingliederung ins embryonale Gewebe, differenzierten sich die injizierten Zellen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, welche die vorderen, die mittleren und die hinteren Gehirnabschnitte bevölkerten (Brüstle et al., 1995; 1997; 1998). In Brüstles Experimenten wurden die möglichen Zellschicksale der injizierten Zellen geprüft, nachdem sie sich willkürlich in verschiedene Gebiete des Gehirns eingegliedert hatten („homing in“).

1.7. Zielsetzung

Das Hauptziel dieser vorliegenden Arbeit war, die Wanderungs- und morphogenetischen Eigenschaften von transplantierten Neurosphären mit und ohne BMP-2-Vorbehandlung zu untersuchen. Hierfür versuchten wir, das Migrationsverhalten und die Morphogenese der transplantierten Neurosphären in einer genau definierten Mikroumgebung zu studieren (im Bereich der sich entwickelnden oberen Extremitätenknospe bei Hühnchen- und Wachtelembryonen, 16.-19. Somitenpaar im Stadium 12/13 HH).

Es wurden die Neurosphären, die sich aus neuralen Stammzellen der lateralen Subventrikularzone von transgenen adulten Mäusen entwickelt hatten, ins Lumen des Neuralrohres von transplantiert, nachdem sie unter dem Einfluss von rekombinantem humanen FGF2, oder FGF2 und BMP-2 kultiviert worden waren. Nach erfolgter Transplantation wurden die Embryonen weiterbebrütet und ausgewertet.

Nach der Transplantation wurden die Hühnchen- und Wachtelembryonen für weitere 12, 24, oder 48 h bebrütet. Dann wurden die Embryonen unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop dokumentiert, fixiert, in Paraffin eingebettet oder kryokonserviert, geschnitten, und histologisch ausgewertet (Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung). Es wurden von drei Embryonen in einer modifizierten New-Kultur (New, 1955) nach der Transplantation Serienaufnahmen gemacht, die es ermöglichten, die auswandernden subventrikularen Stammzellen zu beobachten und zu dokumentieren.

Mittels spezifischen anti-GFP und HNK-1 Färbungen, sowie der *in-situ*-Hybridisierung der Maus-spezifischen L1-Sequenz gelang es, die transplantierten Mauszellen im Hühnchenembryo wieder zu finden. Die mögliche Apoptose der transplantierten Neurosphären wurde mit der TUNEL-Methode nachgewiesen; eine terminale Differenzierung der Maus SVZ-Zellen im Hühnchenembryo wurde mit dem Neuronen-spezifischen Antikörper TuJ1 untersucht. Um die Morphologie der auswandernden Neurosphärenzellen mit der autochthonen Neuralleistenwanderung des Hühnchens zu vergleichen, wurden Totalpräparate von Hühnchenembryonen angefertigt und mit HNK-1 gefärbt. Darüber hinaus wurden Kontrollexperimente in Wachtelembryonen durchgeführt, um einerseits zu sehen, ob sich die BMP-2 abhängige Änderung der Morphogenese der SVZ-Zellen in der Wachtel reproduzieren ließ, und andererseits, um eine Zellfusion von transplantierten Zellen und Wirtszellen mittels Wachtel-spezifischer Immunfärbung (QCPN-Färbung) auszuschließen.

Durch diese Vorgehensweise konnte festgestellt werden, dass die Stammzellen aus transplantierten Neurosphären sich nur dann in die Deckplatte des Neuralrohrs und ins Neuralepithel integrierten und aus dem kompakten Zellverband der Neurosphäre auswanderten, wenn die Neurosphären *in vitro* für 24 h vor der Transplantation mit BMP-2 behandelt worden waren. Die unbehandelten Neurosphären zeigten nach ihrer Transplantation weder Integration noch Auswanderung. Die Neurosphären blieben im Lumen des Neuralrohrs und unterlagen nach einiger Zeit der Apoptose.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine 24-stündige BMP-2 Behandlung ein essentieller Schritt vor der Transplantation von Neurosphären ins Neuralrohr von

Hühnchen- oder Wachtelembryonen ist, um in den subventrikularen neuronalen Maus-Stammzellen ein den Neuralleistenzellen ähnliches Wanderungspotential und somit eine veränderte Morphogenese zu erzeugen.

2 Material und Methodik

2.1. Gewebeaufbereitung und Neurosphären-Kultur

Die GFP-actin transgenen Mäuse, die in den Experimenten benutzt wurden, sind von Okabe et al. (1997) erstmals beschrieben worden. Die Mäuse exprimieren das Transgen EGFP (S65T+F64L) im gesamten Körper, sowohl in embryonalen Präimplantationsstadien, als auch im adulten Tier.

Alle Arbeiten an adulten Tieren und Embryonen wurden in Übereinstimmung mit den örtlichen ethischen Bestimmungen und genehmigter Tierhaltung durchgeführt.

Adulte männliche Mäuse (Alter 2 Monate) wurden mittels Kohlendioxid getötet, mit einer 70% Ethanol-Lösung abgewaschen, und mit einer sterilisierten Schere dekapitiert. Das Gehirn wurde unter aseptischen Bedingungen in eisgekühltem HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY) aufgefangen. Mittels eines *Tissue choppers* (Mc Ilwain) wurden 400 µm dicke Koronarschnitte der Gehirne angefertigt und in HBSS überführt.
Mit Hilfe eines Dissektionsmikroskops (Zeiss, Oberkochem) wurde die laterale Subventrikularzone aufgesucht und mit einer Mikropinzette sowie einer Augenschere (Moria, FST, Heidelberg) entfernt.
Die Gewebestreifen wurden mittels einer 1000 µl Eppendorf - Pipette (Eppendorf, Hamburg) in ein steriles Grobsteinschälchen transferiert, welches HBSS enthielt, und mit einer gebogenen Mikroschere zerkleinert.
Die auf diese Art gewonnenen zerkleinerten Gewebestücke von vier Tieren wurden in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt und einmal mit 4℃ kaltem HBSS gewaschen. Das HBSS wurde dann entfernt und durch HBSS mit zugesetztem Trypsin (1,5 mg/ml; 10000 BAEE units/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) und DNAse (0,35 mg/ml; 3000 units/mg, Amersham Biosciences, Freiburg), ersetzt. Das Gewebe wurde bei Raumtemperatur für 30 min unter konstantem Drehen in einem Hybridisierungsofen (H. Saur, Reutlingen) inkubiert.

Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min wurden die angedauten Gewebestückchen mechanisch durch vorsichtiges Triturieren dissoziiert. Dies geschah durch das Aufziehen in aufeinander gesteckte sterile Spitzen zweier Eppendorf Pipetten mit abnehmendem Durchmesser. Dann wurden die nun in Suspension vorliegenden Zellen 5 min lang zentrifugiert bei 600 U/min. Der Mediumüberstand wurde vorsichtig entfernt, worauf das Zell-Pellet zweifach resuspendiert und gewaschen wurde mit *Dulbecco's minimum essential medium* (DMEM/F12-based Medium, GIBCO), welches mit Trypsin-Inhibitor (0,7 mg/ml, GIBCO) versehen war. Hierauf wurde erneut zweifach mit 4℃ kaltem HBSS gewaschen; der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 37℃ warmem DMEM/F12-based Medium resuspendiert, we lches folgende Zusätze (N2) enthielt: 100 µg/ml humanes Apo-Transferrin; 25 µg/ml Insulin; 20 nM Progesteron; 100 µM Putrescin; 30 nM Natrium Selen (alle Zusätze von Sigma), sowie 20 ng/ml von rekombinantem humanen *basic fibroblast growth factor* (FGF2, R&D Systems, UK).

Die Zellen ($0,5x10^5$ pro ml) wurden in 6-well-plates ausplattiert (Becton Dickinson, Heidelberg), welche zuvor mit 15 µg/ml poly-L-Ornithin und 2 µg/ml Fibronektin (Sigma) beschichtet worden waren, um neuroepitheliale Stammzellen zu kultivieren.

Vorgehen der Beschichtung:

Poly-L-Ornithin auf die Schale geben, min. 4 h, besser 12 h, max. mehrere Wochen. Etwa 3 ml / 6 cm Schale und 10 ml / 10 cm Schale.

2 Mal mit PBS waschen, 1-2 h warten, ein 3. Mal mit PBS waschen.

Mit Fibronectin beschichten, min 4 h, besser 1-5 Tage. (3 ml / 6 cm Schale; 10 m / 10 cm Schale). Die Schalen müssen die ganze Zeit bei 37℃, 5%CO_2 und 95% Luft im Inkubator feucht gehalten werden.

Es wurde der Zellkultur täglich FGF2 zugeführt, während alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Alle 3-5 Tage wurden die Zellen bei etwa 50% Konfluenz (optische Kontrolle unter dem Mikroskop) durch mechanische Dissoziation passagiert. Nach der dritten Passage wurden die Zellen, wie oben

beschrieben, in unbeschichtete *6-well-plates* ausplattiert, um das Entstehen von Neurosphären zu unterstützen.

Zellen und Neurosphären wurden bei 37℃ mit 95% Luf t und 5% CO_2 kultiviert.

Das Anheften der Neurosphären am Boden wurde durch sanftes Schütteln der *6-well-plates* (jeden zweiten Tag) verhindert.

Vitale Neurosphären, die für die Versuche dieser Studie benutzt worden sind, waren fünf bis acht Mal passagiert worden. Vor der Transplantation in die Hühner- bzw. Wachtelembryonen wurde ein Teil der Neurosphären zusätzlich zum FGF2 für 24 h mit 20 ng/ml *bone morphogenetic protein*-2 (BMP-2, R&D Systems) vorbehandelt, um ihr Zell-Schicksal zu „dorsalisieren“ (Panchision et al. 2001; siehe Einleitung). Als Kontrollgruppe dienten andere Neurosphären, welche die Behandlung mit BMP-2 nicht erhalten hatten und nur mit dem Zusatz von FGF2 kultiviert worden waren.

HBH:

HBSS, 500ml. Folgendes hinzufügen:

- 1,85 g Bicarbonat ($NaHCO_3$)
- 1,95 g Hepes-Puffer

pH von 7,2 einstellen mittels Salzsäure oder Natronlauge. Sterilfiltrieren.

Bei 4℃ aufbewahren.

N2:

DMEM/F12, 500 ml. Medium ist lichtempfindlich. Flasche in Alupapier einwickeln.

1. 5 ml entfernen und 50 mg Transferrin (Endkonzentration: 100 µg/ml) dazugeben. Ins Medium steril filtrieren.
2. 12,5 mg Insulin (Endkonzentration: µg/ml) in 5 ml 10 mM NaOH (5 ml steriles Wasser + 50 µl NaOH) auflösen; folgendes hinzufügen:
   - 30 µl Selen (Endkonzentration: 30 nM; Stammlösung: 1000X)
   - 50 µl Putrescine (Endkonzentration: 100 µM; 1 M Stammlösung)
   - 10 µl Progesteron (Endkonzentration: 20 nM; 1 mM Stammlösung)

   Ins Medium steril filtrieren.
3. 5 ml Penicillin/Streptomycin dazugeben und bei 4℃ aufbewahren.

Wachstumsfaktoren:

0,1% Bovine Serum Albumin (BSA):

100 mg BSA in 100 ml PBS auflösen; steril filtrieren.

FGF2:

10 µg FGF-2 / 1 ml 0,1% BSA; Endkonzentration: 20 ng/ml

BMP-2:

10 µg BMP-2 / 1 ml 0,1% BSA; Endkonzentration: 20 ng/ml

Tab. 1: Herstellung der verwendeten Lösungen und Wachstumsfaktoren

2.2. Inkubation und Vorbereitung der Embryonen

Befruchtete Eier der Hühnergattung Weißes Legehuhn (*Gallus Gallus domesticus*), sowie der Wachtelgattung Japanische Wachtel (*Coturnix Coturnix japonica*) wurden von Züchtern (Fa. Anton Weiß, Vermehrungszucht GmbH, Hauptstr.2, 88468 Kilchberg/Iller; Fa. Winter, Dechtow) erhalten und bei 37℃ und 70% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Bebrüter von Ehret, Esslingen).
Nach einer Bebrütungszeit von 48-50 h (was dem Hühnchenentwicklungsstadium 12-13 (HH) entspricht), wurden die Eier wie folgt gefenstert:
Nach gründlicher Säuberung mit 70% Ethanol wurde mit einem Eierstecher die Schale seitlich eröffnet und Eiklar entfernt (bei Hühnchen 2 ml; bei Wachteln 0,5 ml). Das entstandene Loch in der Eierschale wurde mittels Isolierband (Super33+, 3 M, St. Paul, MN) verschlossen. Mit einer Metallsäge (Stanley, Australien) wurde ein ca. 1,5 x 2 cm (Huhn) bzw. ein 0,7 x 0,7 cm (Wachtel) großes Fenster gesägt. Während des Fensterns lagen die Eier in Paraffinhaltern aus eigener Herstellung. Um die Sichtbarkeit der Embryonen zu verbessern, wurde die Keimscheibe vor der Transplantation mit Tusche unterspritzt. Eine Neurosphäre wurde pro Embryo auf der Höhe des 16. -18. Somitenpaares (Höhe der oberen Extremitätenknospe) der Embryonen ins Neuralrohr transplantiert.
Nach der Transplantation wurden die Eier dicht mit Isolierband verschlossen und für weitere 12 - 48 h inkubiert (Gesamtbebrütungszeit: 60 - 96 h).

2.3. Transplantation der Neurosphären ins Neuralrohr

Kurz vor der Transplantation wurden die Neurosphären aus den *6-well-plates* entfernt und in 4℃ Medium (DMEM/F12) mit den oben beschriebenen Zusätzen (N2) überführt. Es wurden die Neurosphären dann mit Nilblausulfatlösung (Sigma) angefärbt, um die Transplantation zu erleichtern. Eine Neurosphäre wurde nun in eine spitz ausgezogene Mikroglaspipette (1 mm Außendurchmesser, Borosilikatglas; World Precision Instruments, Sarasota, FL) aufgezogen. Die Vitellinmembran des Eies wurde mit Hilfe eines sterilen Wolframdrahtes (WPI) unter stereomikroskopischer Kontrolle (Zeiss) in fünf bis achtfacher Vergrößerung über der Schwanzknospe punktiert. Die aufgezogene Neurosphäre wurde mit einer Mundpipette (WPI) vorsichtig ins Lumen des Neural-

rohrs transplantiert (auf Höhe des 16.-18. Somitenpaares der Embryonen, was bei Hühnchen in etwa der Höhe der oberen Extremitätenknospe entspricht), ohne den Embryo zu verletzen. Nach der Injektion verblieb die Neurosphäre an der gewählten Stelle und wurde per Video dokumentiert. Um einer eventuellen Aus- oder Antrocknung des Embryos während des Transplantationsvorgangs vorzubeugen, wurde die Keimscheibe bzw. der Embryo sowohl vor, als auch nach erfolgter Transplantation mit steriler Tyrodelösung benetzt. Für den Fall, dass der Embryo durch das Abziehen des Eilklars zu weit ins Ei abgesunken war, wurde dieses mit steriler, 38℃ warmer Tyrode aufgefüllt, um den Embryo anzuheben und somit eine gute Positionierung für die Transplantation zu erreichen.

	Modifizierte Lösung	Modifizierte Lösung	Orginallösung
NaCl	102,7 mM	6,0 g/l	8,0 g/l
KCl	2,01 mM	0,15 g/l	0,2 g/l
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,75 mM	0,11 g/l	0,2 g/l
MgCl x 6 H_2O	0,79 mM	0,16 g/l	0,1 g/l
NaH_2PO_4 x 2 H_2O	0,31 mM	0,04 g/l	0,05 g/l
$NaHCO_3$	8,92 mM	0,75 g/l	1,0 g/l
Glucose	7,57 mM	1,36 g/l	1,0 g/l

Tab. 2: Inhaltsstoffe der Tyrode-Lösung, modifiziert (B. Braun, 1930) und im Original (M. V. Tyrode, 1914).

Es wurden insgesamt 85 Experimente (wobei jede Neurosphärentransplantation hierfür als Einzelexperiment betrachtet wurde) auf folgende Art und Weise durchgeführt:

Neurosphären, die vor ihrer Transplantation für 24 h mit BMP-2 behandelt wurden:

n	Spezies	Inkubationszeit nach Transplantation
5	Huhn	12 h
4	Wachtel	12 h
22	Huhn	24 h
18	Huhn	48 h

Insgesamt: 49

Neurosphären, die vor ihrer Transplantation nicht mit BMP-2 behandelt wurden (Kontrollgruppe):

n	Spezies	Inkubationszeit nach Transplantation
4	Huhn	12 h
1	Wachtel	12 h
20	Huhn	24 h
11	Huhn	48 h

Insgesamt: 36

Die Überlebensrate betrug 81/85 (Embryonen, welche die Transplantation einer Neurosphäre ins Neuralrohr zwischen 12 und 48 h weiterer Bebrütungszeit nach der Transplantation überlebten).

2.4. Markieren der Neurosphären mit Ferrocarbutran

In zehn der untersuchten Hühnchenembryonen wurden Neurosphären transplantiert, die zuvor mit Ferrocarbutran, einem MRT-Kontrastmittel (Resovist,

Schering, Basel, Schweiz) beladen worden waren, um somit eine bessere optische Auffindbarkeit in den histologischen Paraffinschnitten zu ermöglichen.
Sterile Ferrocarbutran-Lösung wurde einer verpackten Ampulle entnommen (540 mg/ml) und in N2-Medium zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml verdünnt. Ferrocarbutran besteht aus Dextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln. In diesem Medium wurden die Neurosphären 3 Tage lang kultiviert, bevor sie ins Neuralrohr von Hühnchenembryonen transplantiert wurden.
Die Zellen speicherten die Eisenpartikel sowohl intrazellulär, als auch auf ihrer Oberfläche. Jeweils 5 der in dieser Art markierten Neurosphären gehörten der BMP-2-Gruppe, bzw. der Kontrollgruppe an. Die mit Ferrocarbutran beladenen Neurosphären hatten aufgrund des Eisens eine hellbraune Farbe angenommen und waren sowohl gleich nach der Injektion, als auch 48 h später noch gut im Neuralrohr des Hühnchens sichtbar, wobei das Ferrocarbotran keine Auswirkung auf die Wanderungseigenschaften der transplantierten Neurosphärenzellen aufwies. Darüber hinaus blieb die hellbraune Farbe der eisenmarkierten Neurosphären bis in die histologischen Paraffinserienschnitte erhalten, was das Widerauffinden der transplantierten Neurosphäre in Hunderten von Schnitten pro Embryo deutlich erleichterte.

2.5. New-Kultur

Die Auswanderung von Zellen aus dem Zellverband der transplantierten Neurosphären wurde in einer modifizierten *New Culture* (New, 1955) beobachtet. Hierfür wurden die Hühnereier nach einer Bebrütungszeit von 48 h mit 70% Ethanol gereinigt. Dann wurde die Schale eröffnet und der Inhalt des Eies wurde in einer sterilen Abflammschale aufgefangen, deren Boden mit 37℃ warmer Tyrodelösung bedeckt war. Das zähe Eiweiß, welches den Dottersack bedeckt, wurde vorsichtig entfernt. Dann wurde der gesamte Embryo inklusive seiner Blutgefäße mit einer feinen Schere umschnitten und mit Hilfe eines Löffels und einer Pinzette vom Dottersack abgehoben. Der Embryo wurde nun auf eine runde Silikonmatrix (eigene Herstellung) gespannt, während ein zweiter, genau angepasster Silikonring auf die Basis der Matrix geschoben wurde, um den Dottersack zu befestigen. Um den Embryo in der Ebene zu halten, wurde eine

Schicht Eiweiß mit 0,75% Agar (BD, Heidelberg) (1:1) in den Raum zwischen dem fixierten Stück Dottersack (der den Embryo enthielt) und der Silikonbasis gefüllt. Darauf wurden die Neurosphären wie oben beschrieben in den Embryo transplantiert.
4 Stunden später wurden Serienaufnahmen mit einem invertierten Fluoreszenz-Mikroskop (IX-50, Olympus, Hamburg) begonnen, das mit einer temperaturregulierten Kammer versehen war. Mit einer „Shutter“ – gesteuerten s/w Digitalkamera (Fview, SIS, Leinfelden-Echterdingen) wurden unter Fluoreszenzanregung automatisch alle 15 min Aufnahmen gemacht. Die Beobachtung konnte bis zu drei Tage nach der Transplantation fortgeführt werden, während der sich der beobachtete Embryo weiterentwickelte (durch die nicht zu vermeidenden Temperaturschwankungen und die unphysiologische Aufbewahrung während der Prozedur allerdings mit einer Verzögerung, verglichen mit dem normalen Wachstum im geschlossenen Inkubator). Die Auswanderung von einzelnen Zellen aus den transplantierten Neurosphären wurde morphometrisch mit dem Programm „Analysis 3.0“ (SIS) beurteilt.

Insgesamt wurden drei solcher Experimente folgendermaßen durchgeführt:

Alle transplantierten Neurosphären erhielten eine 24 h BMP-2-Behandlung vor der Transplantation.

N	Spezies	Inkubationszeit nach Transplantation
2	Huhn	12 h
1	Huhn	72 h

Insgesamt: 3

Die Überlebensrate betrug 3/3.

2.6. Histologie

Die Hühnchen- und Wachtelembryonen wurden nach der Entnahme aus dem Ei je nach Größe für 2 bis 4 h in frisch angesetzter, gepufferter 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Embryonen durch die Alkoholreihen geführt, mit Xylol behandelt, und in Paraffin eingebettet. Dann wurden sie mit dem Mikrotom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Polylysin beschichtete Objektträger gezogen. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden in DePeX eingebettet (Serva, Heidelberg).

Ein kleiner Tel der Embryonen wurde direkt nach der Entnahme aus dem Ei in flüssigem Stickstoff tief gefroren.

2.7. Histochemie und Immunfärbungen

Nachdem die Gewebeschnitte entparaffiniert, rehydriert und HE gefärbt wurden (jeder 10. Objektträger), sind sie über Nacht bei 4℃ in einem *rabbit anti-GFP* polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:500; Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert worden. Diesem Schritt folgte die Einwirkung in *goat anti-mouse IgG* (Linaris, Wertheim) bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Antikörperbindung wurde durch die Bindung an den *biotin-streptavidin-HRP* Komplex während einer Stunde, sowie an das HRP-Substrat (Vector Laboratories) für eine weitere Stunde, visualisiert. Die Gewebsschnitte wurden mittels Lichtmikroskopie (Zeiss Axioplan Mikroskop) untersucht. Die Parallelschnitte zu den anti-GFP gefärbten Gewebsschnitten wurden mit dem monoklonalen Antikörper HNK-1 (Serotec) immungefärbt, der ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche von auswandernden Neuralleistenzellen spezifisch anfärbt (Bronner-Fraser, 1986). Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden in HNK-1 (1:1000) inkubiert, gefolgt von anti-Maus IgG für eine Stunde. Paraffinschnitte der Wachtelembryonen wurden mit dem Wachtel-spezifischen Antikörper QCPN (University of Iowa, USA) nach dem Protokoll von Kontges und Lumsden (1996) gefärbt.
Die neuronale Differenzierung der transplantierten Neurosphären wurde mit anti-TuJ1 (1:500, Convance, Richmond, CA, USA), einem neuronenspezifischen Antikörper getestet, gefolgt von anti-Maus IgG für eine Stunde.

Um apoptotische Zellen in den transplantierten Neurosphären nachzuweisen, färbten wir die Paraffinschnitte mit der TUNEL-Reaktion mit einem kommerziell erhältlichen Kit (TUNEL apoptosis detection kit, Chemicon, Temecula, CA, USA) nach Vorschrift des Herstellers.

2.8. *In-situ*-Hybridisierung mit der L1-Sonde zum Nachweis von murinen DNA-Sequenzen

Zum Nachweis von Neurosphären-Zellen und zum Ausschluß von nukleären Zellfusionen zwischen den Wirtszellen und den transplantierten Mauszellen wurden die Schnitte mit einer 416 Bp langen antisense-DNA-Sonde untersucht. Die DNA-Sonde entsprach in ihrer Sequenz der Maus-spezifischen, repetitiven Sequenz mL1 der Maus-cDNA. Die *in-situ*-Hybridisierung mit dieser Sonde wurde als Modifikation einer schon veröffentlichten Methode für die humane hAlu-Sequenz durchgeführt (Just et al., 2003). Die DIG-markierte Sonde wurde mit Hilfe des PCR-Digoxigenin Synthesis Kit (Roche) synthetisiert und in TE-Puffer bei -80℃ aufbewahrt. Die Schnitte wurden da bei nach der Entparaffinierung und Dehydrierung mit TE-Puffer (in einer Konzentration von 100 µmol in Trispuffer mit Zusatz von 50 µmol EDTA-Lösung, eingestellt auf einen pH-Wert von 8,0) vorbehandelt. Der Puffer enthielt Proteinase K in einer niedrigen Konzentration von 2 µg / ml in TE-Puffer. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde das Gewebe gewaschen; anschließend folgten zwei jeweils 5-minütige Acetylierungsschritte mit TEA-Puffer zur Reduktion unspezifischer Reaktionsausfälle. Der Puffer enthielt 0,1 molares Trietanolamin; sein pH-Wert wurde vor der Acetylierung gemessen und auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Nach der Prä-Hybridisierung mit dem Hybridisierungspuffer (Zusammensetzung: 50% Formamid (Sigma), 10% Dextransulfat, 5 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 10 mM DTT, 1x Denhardt's solution, 0.05% tRNA, 300 mM NaCl) für 3 h bei 85℃ folgte der eigentliche Hybridisierungsschritt. Dazu wurden 100 µl-Portionen der im Hybridisierungspuffer gelösten, mit DIG markierten RNA-Sonde in einer Konzentration von 100 ng / ml in eine gefräste Platte mit Aussparungen pipettiert, in die die Objektträger so gelegt wurden, dass das Gewebe ständig mit Sondenlösung benetzt wurde und nicht austrocknete. Die Hybridisierung im O-

fen erfolgte 2 h lang bei 85℃. Die Objektträger mit den mit der Sonde hybridisierten Geweben wurden auf Eis überführt und über Nacht bei 37℃ weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebe mit dem 1% verdünnten Blockierungsreagenz aus dem „Nucleic acid detection kit“ (Roche) 30 min lang bei Raumtemperatur behandelt, und dann eine Stunde lang mit einem Konjugat aus alkalischer Phosphatase und anti-DIG-Antikörper gebunden. Nach den in der Anleitung zum Kit vorgeschriebenen Waschschritten mit Maleinsäurepuffer und einer kurzen Äquilibrierungsphase mit Trispuffer (pH 9.5) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Farblösung (Nitro-blue Tetrazolium-Salz [NBT] und 5-bromo-4-choro-3-indolylphosphat) gestartet. Nach der Entwicklung der Farbreaktion (und vor dem Einsetzen von unspezifischen Reaktionen), wurde die Reaktion durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Gewebe wurden in ein wasserlösliches Eindeckmedium gebettet (Kaisers Gylceringelatine, Merck), und mikroskopisch ausgewertet.

2.9. Auffinden apoptotischer Zellen

Apoptosevorgänge in den transplantierten Embryonen wurden mit Hilfe des auf der TUNEL-Reaktion (*TdT-mediated dUTP nick translation end labelling*) basierenden *cell detection kit* (Roche) ausgewertet. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden hierfür entparaffinisiert, in einer 0,1 M physiologischen Kochsalzlösung (PBS) rehydriert, und den Vorschriften des Herstellers gemäß weiterverarbeitet. Die durch die TUNEL-Reaktion positiv markierten Zellkerne wurden durch die Inkubation in anti-FITC-IgG, DAB-Peroxidase Reaktion sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

3.1. Neurosphären / Histologie

Die aus adulten GFP-Mäusen gewonnenen Neurosphären exprimierten das enhanced GFP-Aktin Fusionsprotein (EGFP) unter dem Hühnchen β-Aktin Promoter und einem Zytomegalie-Virus Enhancer (Okabe et al., 1997) zu 90%. Die Neurosphären stellten sich *in vitro* als lockere Aggregate aus scheinbar undifferenzierten Zellen dar. Die Exprimierung von Nestin betrug mindestens 70% sowohl in den BMP-2 vorbehandelten Zellen, als auch in den nicht mit BMP-2 vorbehandelten Zellen (75%, mit einer Standartabweichung von 5%, ermittelt durch Auszählung von jeweils 10 histologischen Schnitten). Die Exprimierung der L1-Sequenz betrug in beiden Zellgruppen 100%. Das Anfärben der Neurosphären mit dem für Neuralleistenzellen spezifischen Antikörper HNK-1 konnte zeigen, dass die SVZ-Neurosphären hierfür eine deutliche Reaktivität besaßen. Diese positive Färbereaktion für HNK-1 ist bisher noch nicht publiziert worden. Überraschenderweise gab es in diesem Zusammenhang keinen Unterschied zwischen BMP-2 behandelten und BMP-2 unbehandelten Zellen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen der Neurosphären bereits unabhängig von einer BMP-2-Behandlung ein Neuralleistenzellschicksal angenommen hatten. Eine zweite Erklärung wäre, dass die Neurosphärenzellen sich in einem noch sehr undifferenzierten Zustand befanden, in dem Zellen häufig HNK-1 exprimieren. Beispiele hierfür wären nicht-seminomatöse Keimzelltumoren des Hodens (Navarro et al., 1997) oder primordiale Keimzellen von Vögeln (Anstrom und Tucker, 1996). Die Neurosphären wurden in das Neuralrohr von Hühnchen- und Wachtelembryonen transplantiert. Die Positionierung der Neurosphäre wurde mit Hilfe der GFP-Eigenfluoreszenz im gefensterten Ei unter dem Steromikroskop überprüft. Die genaue Lokalisation der Neurosphäre lag am Übergang des segmentierten zum nicht-segmentierten Mesoderm des Somiten. Dies entsprach dem 16.-19. Somitenpaar im 2 Tage alten Hühnchen- bzw. Wachtelembryo (Stadium 12-13, HH; Graham und Meier, 1975).

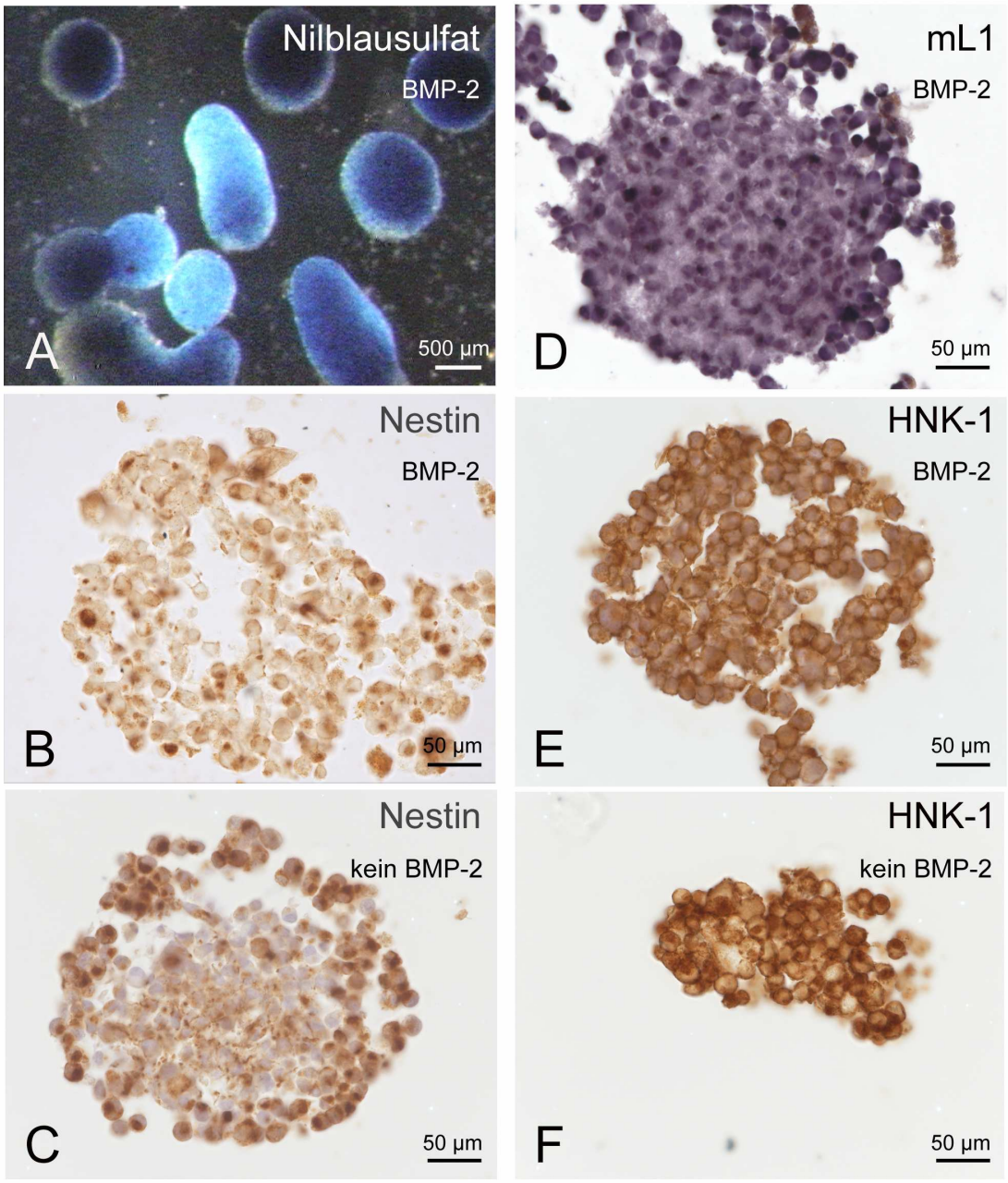

Abb. 1: Neurosphären, nativ und immunhistochemisch gefärbt

Abbildung 1:

A. SVZ Neurosphären vor der Transplantation, mit Nilblausulfat gefärbt. Aufgrund der Beleuchtung erscheinen Teile der Neurosphären heller.

B. Paraffinschnitt einer BMP-2 vorbehandelten Neurosphäre aus derselben Charge wie in Bild A. Nestin wird von mind. 70% der Zellen exprimiert (intrazellulär, als positiv gefärbtes Intermediärfilament).

C. Paraffinschnitt einer nicht mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphäre mit Hämalaun-Gegenfärbung. Nestin wird ebenfalls von etwa 70% der Zellen exprimiert.

D. Parallelschnitt von B. Die Zellen zeigen eine homogene Färbung mit der mL1-Sonde.

E. Parallelschnitt von B. Alle Zellen zeigen eine starke Reaktivität für HNK-1.

F. Paraffinschnitt einer nicht mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphäre. Auch hier weisen alle Zellen eine starke Reaktivität für HNK-1 auf.

3.2. Hühnchen 12 Stunden Inkubationszeit

Die erste Gruppe von Embryonen wurde nach erfolgreicher Transplantation für weitere 12 Stunden bebrütet, bevor sie aus dem Ei entnommen wurden. Die Embryos waren bis zum Stadium 13/14 (HH) weiter gewachsen. In dieser Versuchsreihe wurden 5 Embryonen mit einem BMP-2 vorbehandelten Transplantat mit 4 Embryonen verglichen, die nicht mit BMP-2 vorbehandelte Neurosphären erhalten hatten. Die hierfür verwendeten Neurosphären stammten aus derselben Charge und wurden am selben Tag transplantiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließ sich im Fluoreszenzmuster der Embryonen kein Unterschied zwischen den BMP-2 behandelten und nicht behandelten Neurosphären *in situ* erkennen. Das Transplantat konnte ohne Schwierigkeiten zwischen den vollständig ausgebildeten 17.-19. Somitenpaaren lokalisiert werden (Abb. 2A). In Serienparaffinschnitten zeigte sich, dass die BMP-2 vorbehandelten Neurosphären in die Deckplatte eingebaut worden waren. Jedoch hatten sich die transplantierten SVZ-Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht mit den Wirtszellen vermischt (Abb. 2C). Die Neurosphärenzellen wiesen eine positive Reaktivität für HNK-1 auf, während sich in diesem frühen Entwicklungsstadium die autochthonen Neuralleistenzellen des Hühnchens noch nicht mit HNK-1 anfärben ließen (Abb. 2B). Unbehandelte Neurosphären bildeten freie Aggregate im Lumen des Neuralrohrs.

Neben der positiven Reaktion für HNK-1 wiesen die Neurosphären im Embryo ebenfalls eine positive Reaktion für anti-GFP auf (Abb. 2D).

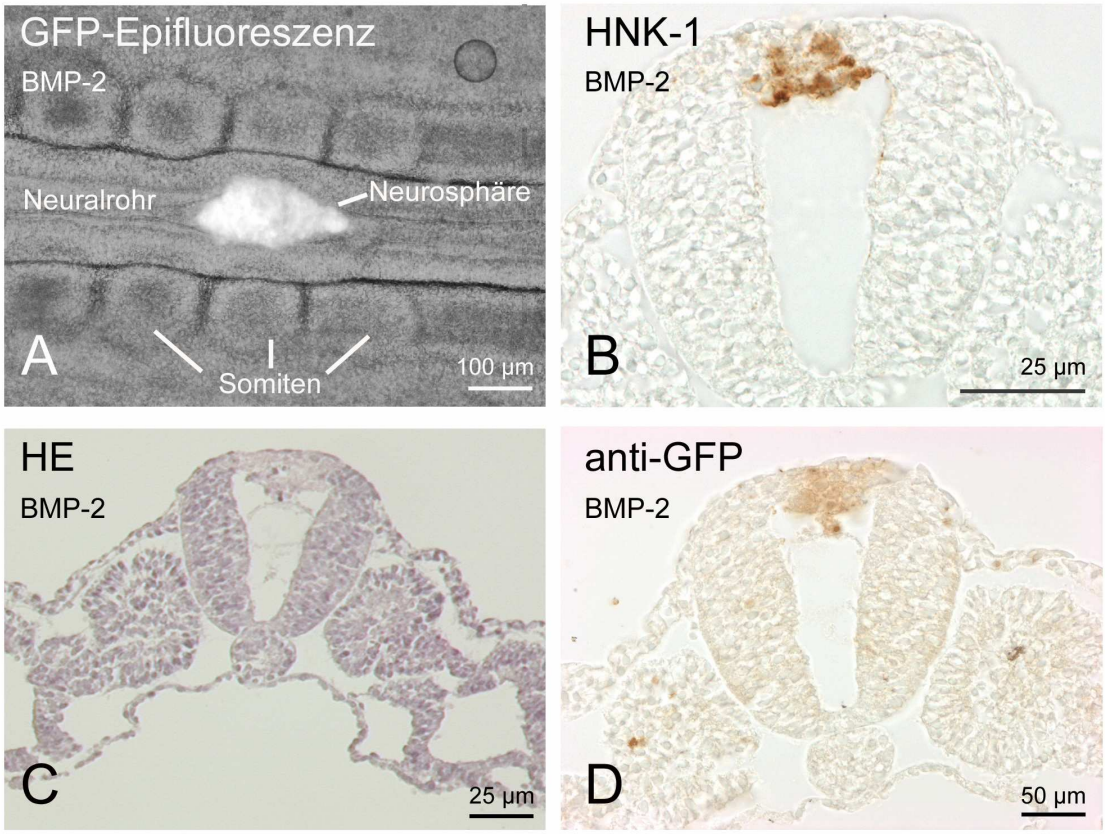

Abb. 2: Hühnchenembryo 12 Stunden nach Transplantation

Abbildung 2:

A. BMP-2-vorbehandeltes Neurosphärentransplantat im Neuralrohr des Hühnchenembryos 12 Stunden nach erfolgter Transplantation (Stadium 13, HH). Die Neurosphäre zeigt die GFP-Eigenfluoreszenz und befindet sich zwischen dem 18. Somitenpaar.

B. Paraffinschnitt desselben Embryos, mit HNK-1 gefärbt (braune Reaktion). Die SVZ Neurosphärenzellen erscheinen HNK-1 positiv, während die autochthonen Hühnchenneuralleistenzellen zu diesem Entwicklungszeitpunkt und in dieser kaudalen Rumpfregion noch HNK-1-negativ sind.

C. Parallelschnitt von B. In der HE-Färbung zeigt sich die Integration der SVZ Zellen in die Deckplatte des Neuralrohres.

D. Parallelschnitt von C, anti-GFP Färbung. Die Neurosphäre in der Deckplatte färbt sich positiv (braunes Reaktionsprodukt).

3.3. Hühnchen 24 Stunden Inkubationszeit

Es wurden an 7 Experimentaltagen Experimente durchgeführt, bei denen die Embryonen 24 weitere Stunden nach der Transplantation bebrütet wurden. Dabei handelte es sich um 22 Embryonen, die eine mit BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre erhalten hatten, und um 20 Embryonen mit Neurosphären ohne zusätzliche BMP-2-Vorbehandlung. Die Embryonen waren bis zu den Stadien 17-19 (HH) weiter gewachsen. Ab diesem Zeitpunkt wurde ein deutlicher Unterschied zwischen BMP-2 behandelten und nicht behandelten Neurosphären in den Embryonen sichtbar. Im invertierten Mikroskop konnte man bereits unter niedriger Vergrößerung eine Zellauswanderung in der mit BMP-2 vorbehandelten Gruppe von Neurosphären erkennen (Abb. 3A). Demgegenüber stellten sich die nicht mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphären auch in hoher Vergrößerung dar wie bereits nach 12 Stunden (Abb. 4A). Durch Zuschaltung von Phasen-Kontrastbeleuchtung konnten die seitlichen Ränder des Neuralrohres deutlich vom umliegenden Gewebe unterschieden werden. Unspezifische Fluoreszenz wurde unter hoher Vergrößerung von zellulärer Fluoreszenz unterschieden.

Einzelne auswandernde Zellen, die sich durch zytoplasmatische Fluoreszenz und einen Fluoreszenz-negativen Zellkernbereich auszeichneten, wurden in hoher Vergrößerung und unter langer Belichtungszeit dargestellt. Es zeigten sich viele Zellen, die sich aus den Neurosphären ins umliegende Neuralepithel eingliederten. Dabei konnten einzelne Zellen durch ihre charakteristische Form und Größe im Epithel des Neuralrohres unterschieden werden (Abb. 5I-P). Die GFP-Eigenfluoreszenz ließ einzelne auswandernde Zellen erkennen, die sich seitlich über die Ränder des Neuralrohres projizierten (Abb. 3A).

Abbildung 3B zeigt einen tangential geschnittenen Gefrierschnitt 24 h nach Transplantation (Gesamtinkubationszeit von insgesamt 72 h). In der anti-GFP Färbung kann man die Vermischung von Maus SVZ-Zellen und Hühnchenzellen sehen; einige GFP-positive Mauszellen befinden sich in der Region der Deckplatte (Abb. 3B+Insert).

Die ebenfalls durchgeführte *in-situ*-Hybridisierung mit der Maus-speziefischen mL1-Sonde an Paraffinschnitten zeigte mL1-positive ausgewanderte Zellen (mit BMP-2 Vorbehandlung) im dorsalen Neuralrohr, in der Deckplatte, im angren-

zenden Mesenchym, sowie in der Gegend der motorischen Vorderwurzel am ventro-lateralen Rand des Neuralrohres. Histologische Detailaufnahmen dieser Schnitte finden sich in Abb. 3C und Abb. 10C, D.

Abbildung 4 zeigt ein Beispiel eines Embryos, der eine nicht mit BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre erhalten hatte. Es ist keine zelluläre Auswanderung sichtbar. Unspezifisch fluoreszierende Zelltrümmer können auf Grund ihrer Größe und Form deutlich von spezifisch zellulärer Fluoreszenz unterschieden werden (Abb. 4A). Es wurden ebenfalls histologische Schnitte der Transplantatregion, und die entsprechende Immunhistochemie durchgeführt. Die nicht mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphären blieben im Lumen des embryonalen Neuralrohres mit sehr spärlichem oder überhaupt keinem direkten Kontakt zum neuralen Gewebe der Deckplatte (Abb. 4B). In einigen Embryonen fiel die transplantierte Neurosphäre während des anschließenden histologischen Aufarbeitungsprozesses aus dem Lumen des Neuralrohres (Abb. 4B, Insert). Jene Neurosphärenzellen, die im Lumen des Neuralrohres verblieben, zeigten nur eine sehr schwache Reaktivität für anti-GFP und färbten sich positiv in der TUNEL Reaktion (was auf den Übergang in die Apoptose der im Neuralrohr verbliebenen, nicht ausgewanderten Zellen hinwies). Weitere nicht mit BMP-2 behandelte Neurosphären nach der Transplantation zeigt Abbildung 5A-H.

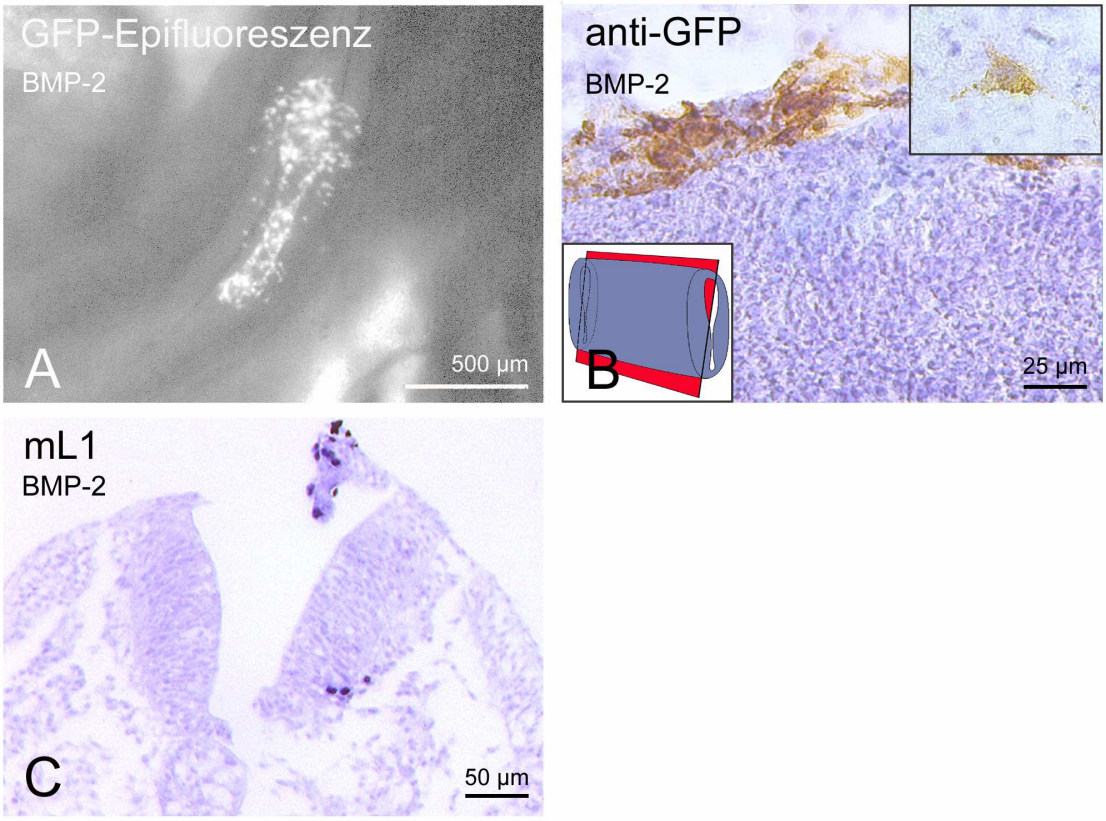

Abb. 3: Hühnchen mit BMP-2 behandeltem Transplantat. 24 Stunden *p.t.*

Abbildung 3:

A. BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre 24 Stunden nach erfolgter Transplantation in das Neuralrohr des Hühnchenembryos (Stadium 19, HH; bei einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden). GFP-Eigenfluoreszenz zeigt die Neurosphäre. Das Transplantat befindet sich im Bereich der oberen Extremitätenknospe. Die GFP-Eigenfluoreszenz macht bereits bei geringer Vergrößerung eine beidseitige Auswanderung einzelner Zellen aus dem Transplantat seitlich über der sich projizierenden Neuralrohrgrenze sichtbar.

B. Ein tangential geschnittener Gefrierschnitt (Insert, untere linke Ecke) desselben Embryos. Die anti-GFP Färbung zeigt sich vermischende Maus- und Hühnchenzellen im Bereich der Deckplatte des Neuralrohres (Insert, obere rechte Ecke).

C. Auswandernde SVZ-Zellen, markiert durch *in-situ*-Hybridisierung mit der Maus-spezifischen mL1-Sonde. Die auswandernden Zellen stellen sich in der Deckplatte, sowie im Bereich des motorischen Vorderhorns auf dem ventralen Wanderweg der Neuralleistenzellen dar.

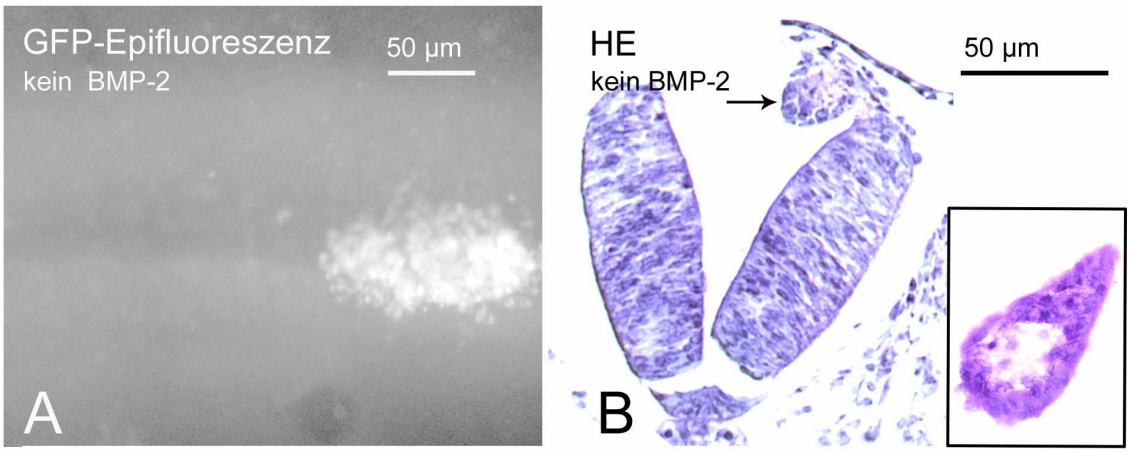

Abb. 4: Hühnchen mit unbehandeltem Transplantat. 24 Stunden *p.t.*

Abbildung 4:

A. Unbehandelte Neurosphäre im Neuralrohr des Hühnchenembryos 24 Stunden nach erfolgter Transplantation (Stadium 19 HH). Die GFP-Eigenfluoreszenz lässt keine zelluläre Auswanderung erkennen. Siehe auch die beigefügte CD mit GFP-Epifluoreszenzbildern von verschiedenen Embryonen.

B. Paraffintransversalschnitt desselben Embryos. Die Neurosphärenzellen haben das Lumen des Neuralrohres nicht verlassen (Pfeil) und zeigen keine Auswanderung. Bei mehreren Embryonen fiel die Neurosphäre während der histologischen Aufarbeitung des Embryos aus dem Neuralrohr heraus (Insert).

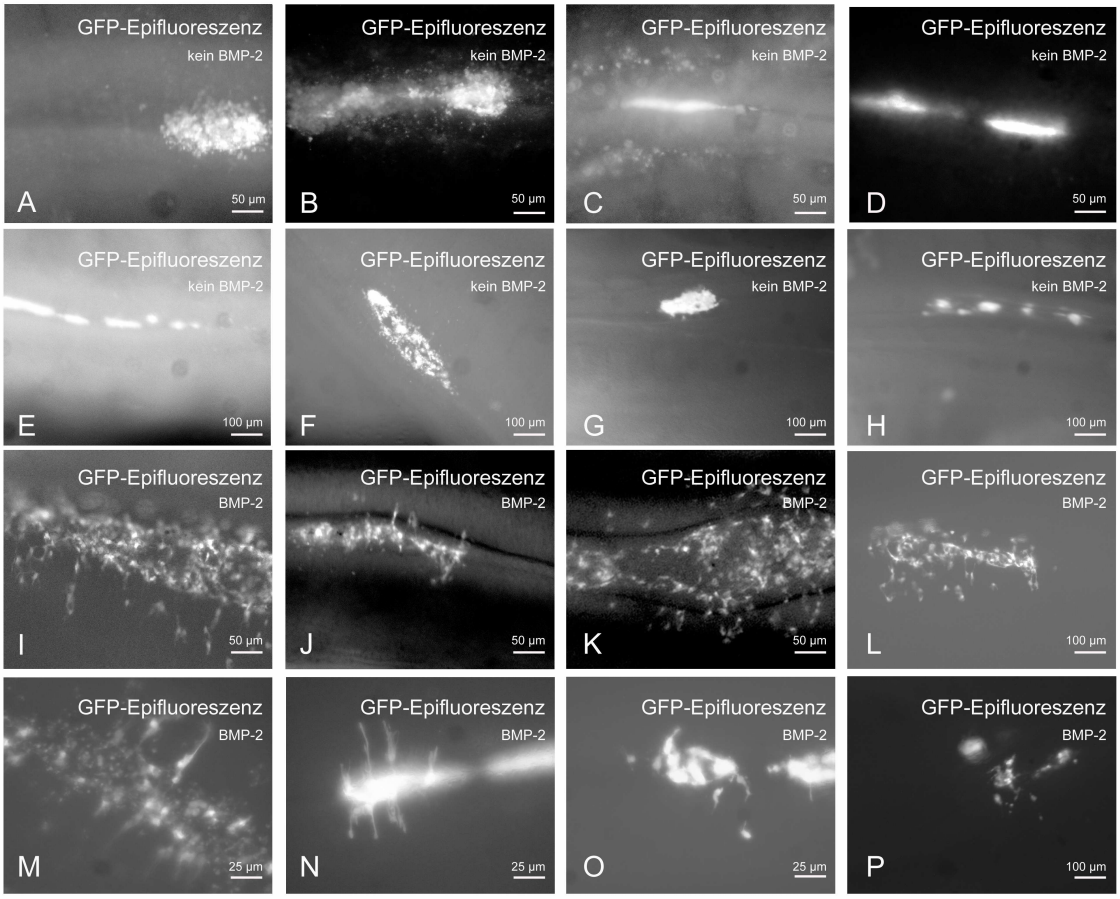

Abb. 5: BMP-2 behandelte und unbehandelte Neurosphären *in situ*, 24 Stunden *p.t.*

Abbildung 5:

A-H Beispielembryonen, die eine unbehandelte vorbehandelte Neurosphäre erhalten haben. 24 Stunden nach erfolgter Transplantation zeigt die GFP-Eigenfluoreszenz die Morphologie der Neurosphäre ohne zelluläre Auswanderung. Um den Unterschied zwischen BMP-2 vorbehandelten und unbehandelten Neurosphären auf zellulärer Ebene in hoher Vergrößerung zu beurteilen, siehe beigefügte CD.

I-P Beispielembryonen, die eine BMP-2-vorbehandelte Neurosphäre erhalten haben. 24 Stunden nach erfolgter Transplantation zeigt die GFP-Eigenfluoreszenz beidseitige zelluläre Auswanderung aus dem Zellverband der Neurosphäre (für zelluläre Details siehe CD).

3.4. Hühnchen 48 Stunden Inkubationszeit

Es wurden an 4 Experimentaltagen Experimente durchgeführt, bei denen die Embryonen nach der Neurosphärentransplantation für weitere 48 Stunden bebrütet wurden. Dabei handelt es sich um 18 Embryonen, die eine BMP-2-vorbehandelte Neurosphäre erhalten hatten und um 11 Embryonen mit einer Neurosphäre ohne Vorbehandlung. Die Embryonen waren bis zu den Stadien 21/22 (HH) weiter gewachsen.
Einzelne auswandernde Zellen, die sich durch zytoplasmatische Fluoreszenz und einen Fluoreszenz-negativen Zellkernbereich auszeichneten, konnten in hoher Vergrößerung und langer Belichtungszeit nur noch schwierig dargestellt werden. Dies lag an der Größe des sich rasch entwickelnden Embryos, aufgrund derer die GFP-Eigenfluoreszenz der transplantierten Zellen vom dichten embryonalen Gewebe überlagert und somit auch zerstreut wurde. Abbildung 6 zeigt vier Hühnchen mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphären 48 Stunden nach der Transplantation. Die Embryonen liegen entwicklungsbedingt auf der Seite und lassen eine Neurosphären-Zellauswanderung in ventraler Richtung deutlich erkennen. Reste der Neurosphäre sind im Lumen des Neuralrohres verblieben und weisen teilweise eine unspezifische, unzelluläre Fluoreszenz auf (Abb. 6C).

Abbildung 7 zeigt vier Hühnchen, die eine unbehandelte Neurosphäre erhalten hatten. Die GFP-Eigenfluoreszenz lässt Reste der Neurosphäre im Lumen des Neuralrohrs gut erkennen. Die sich darstellenden Neurosphären zeigen keine zelluläre Auswanderung (Abb. 7A-D).

Es stellte sich während der histologischen Untersuchung der Embryonen als schwierig heraus, die transplantierten Neurosphären nach 48 Stunden in den Paraffinschnitten wieder zu finden (Abb. 8C, D). In einigen der Embryonen, die BMP-2 vorbehandelte Neurosphären erhalten hatten, waren in den HE-gefärbten Paraffinschnitten rosettenartige Zellstrukturen lateral des Neuralrohres auffindbar (Abb 8A, B), die sich in nicht-transplantierten Embryonen, sowie in Embryonen, die eine unbehandelte Neurosphäre erhalten hatten, nicht nachweisen ließen. Diese Rosettenstrukturen entsprachen dem Fluoreszenzmuster

und der Lokalisation der transplantierten Neurosphären im Embryo, zeigten aber bei der *in-situ*-Hybridisierung mit der L1-Sonde nur eine schwache Reaktion.

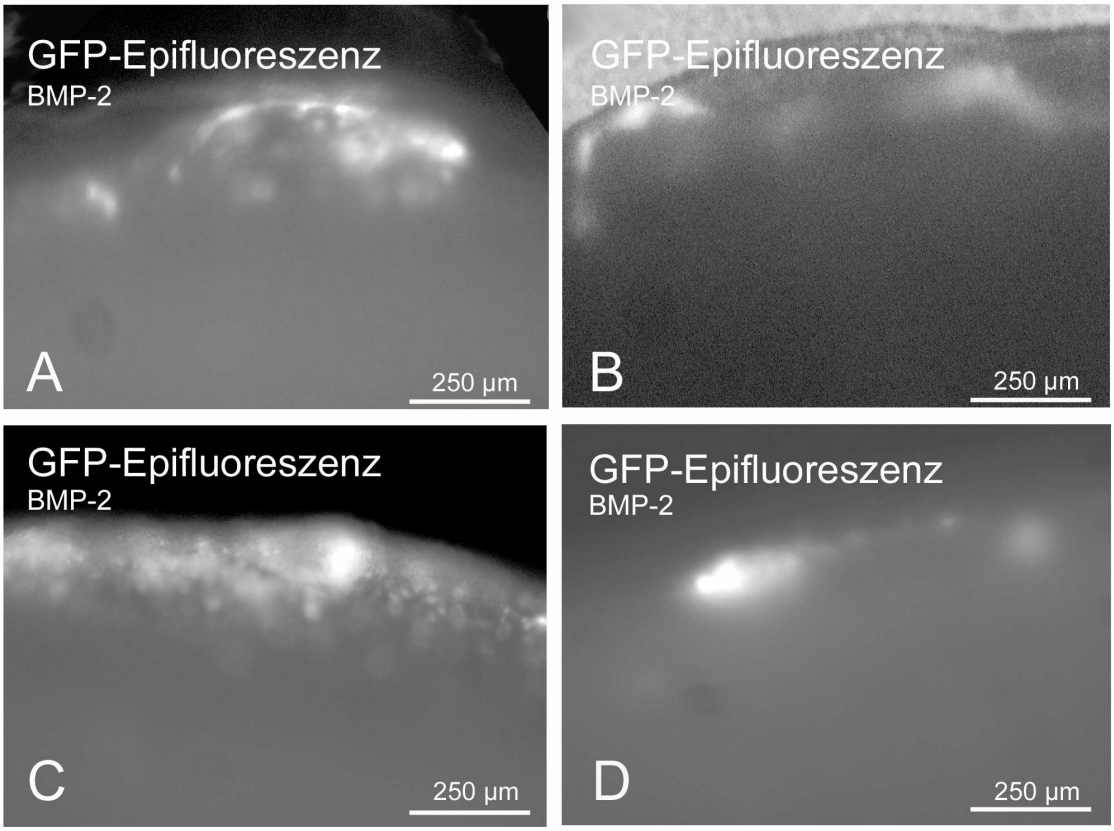

Abb. 6: Hühnchen mit BMP-2-behandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.*

Abbildung 6:

A-D Beispielembryonen, die eine mit BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre erhalten haben. Die Embryonen liegen auf der Seite (oben im Bild ist dorsal, unten ventral). 48 Stunden nach erfolgter Transplantation zeigt die GFP-Eigenfluoreszenz ventrale Auswanderung mit zu diesem Zeitpunkt bereits überstrahltem zellulärem Auswanderungsmuster.

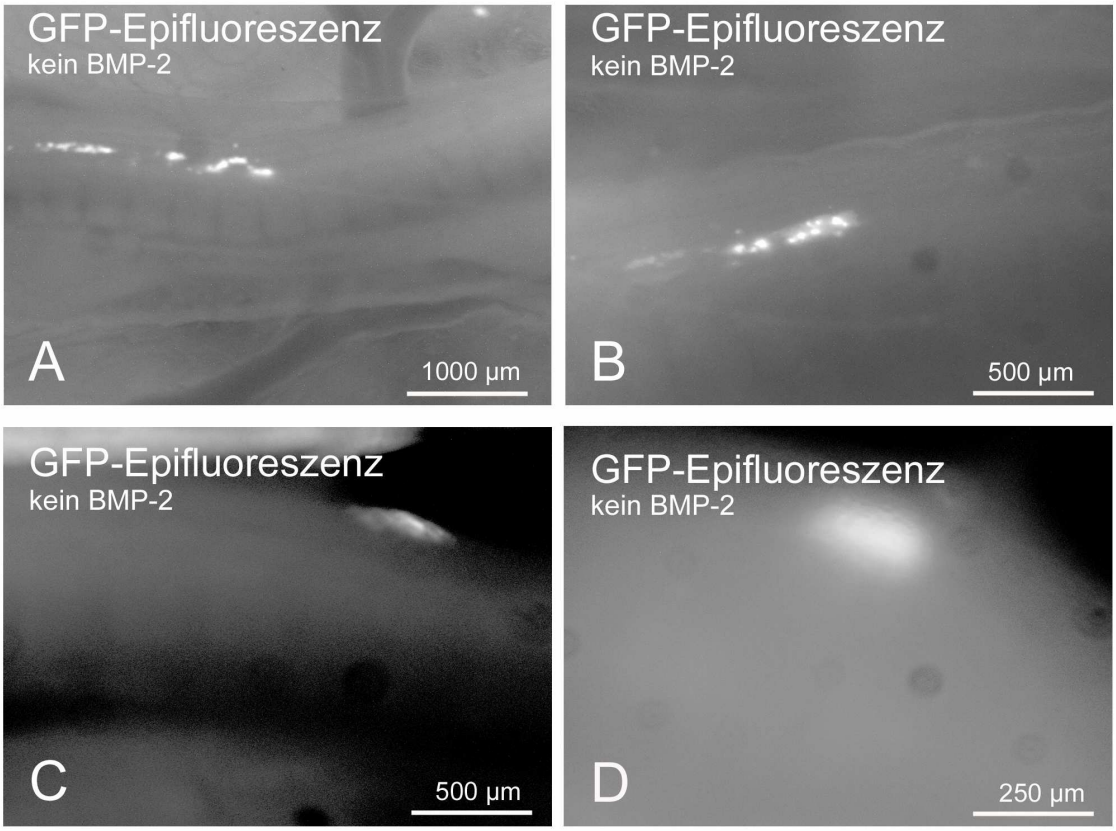

Abb. 7: Hühnchen mit unbehandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.*

Abbildung 7:

A-D Beispielembryonen, die eine unbehandelte Neurosphäre erhalten haben. 48 Stunden nach erfolgter Transplantation zeigt die GFP-Eigenfluoreszenz keine zelluläre Auswanderung der transplantierten Neurosphäre (vgl. ventrale Auswanderung auf Abb. 6).

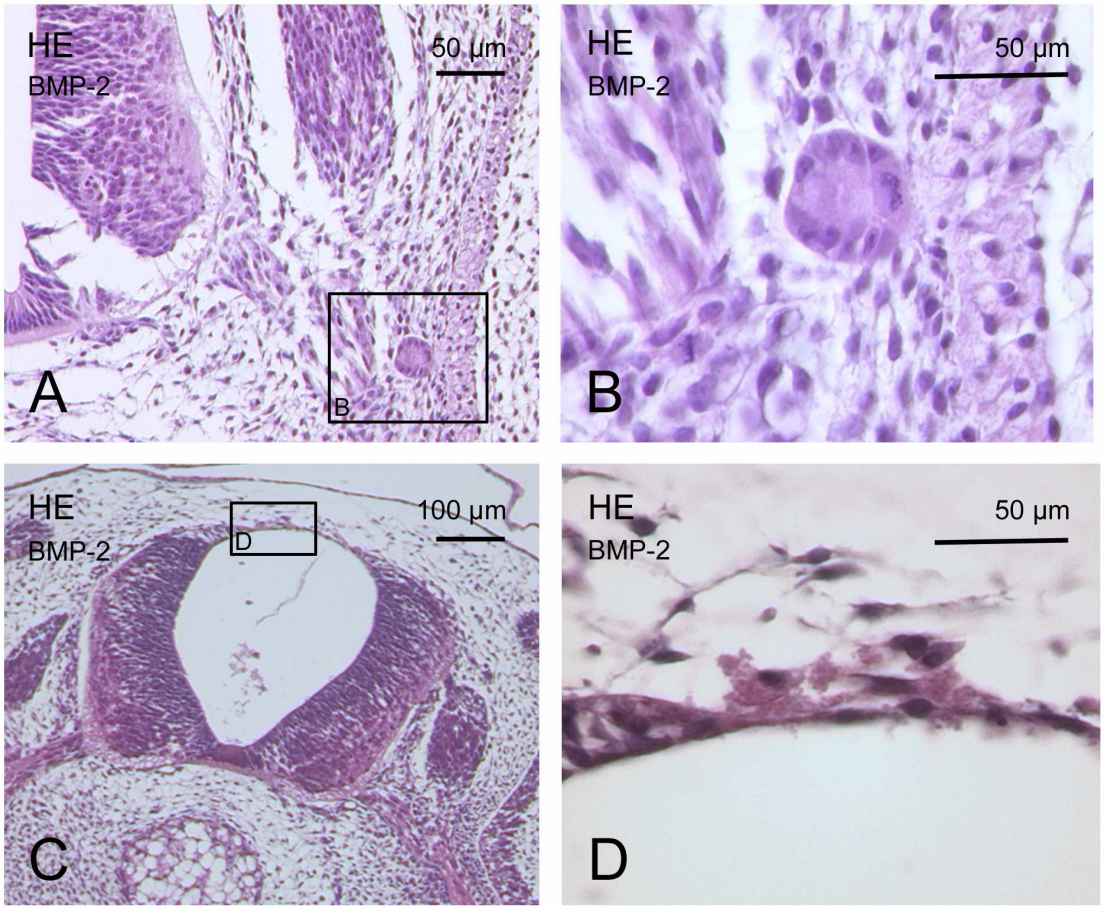

Abb. 8: Hühnchen mit BMP-2-behandeltem Transplantat. 48 Stunden *p.t.*, Paraffinschnitte mit HE-Färbung

Abbildung 8:

A. Paraffintransversalschnitt eines Hühnchenembryos 48 h nach Transplantation. Die HE Färbung zeigt ausgewanderte SVZ-Zellen, die sich in runder Formation medial des Myotoms an der Vereinigungsstelle von Vorder- und Hinterwurzel angesiedelt haben. Kasten entspricht Bild B.

B. Vergrößerung aus A. Kreisförmige Anordnung der Neurosphärenzellen.

C. Paraffintransversalschnitt eines anderen Embryos 48 h nach Transplantation. Die HE Färbung zeigt verbliebene Reste der Neurosphäre im Lumen des Neuralrohrs. Das Neuralrohr hat aufgrund der Transplantation ein deutlich erweitertes Lumen. Kasten entspricht Bild D.

D. Vergrößerung aus C. Neurosphärenzellen in der Deckplatte des Neuralrohrs und im angrenzenden Mesenchym.

3.5. Hühnchen New Kultur

Drei Embryonen wurden als New Kulturen angelegt (s. Material und Methoden) und nach erfolgter Transplantation mit BMP-2 vorbehandelten Neurosphären bis zu 3 Tage lang nachuntersucht. Die time-lapse Aufnahmen im invertierten Mikroskop erwiesen sich als schwer durchführbar, da sich der Fokus des Fluoreszenzsignals bei fortschreitendem Wachstum der Embryonen veränderte und scharfe Aufnahmen von einzelzellulärer Fluoreszenz erschwerte. Einzelne BMP-2 vorbehandelte Neurosphärenzellen ließen sich dennoch während ihrer Auswanderung aus dem Neuralrohr ins umliegende Neuralepithel dokumentieren (Abbildung 9). Nach 8 Stunden waren die ersten Zellen sichtbar, die sich nach lateral ausstreckten (Abb. 9C); mit zunehmender Beobachtungsdauer entfernten sich die Zellen immer weiter in lateraler Richtung vom Neuralrohr (Abb. 9D-F), bis sie schließlich in der ventralen Tiefe des Embryos verschwanden und sich nicht mehr fokussieren ließen.

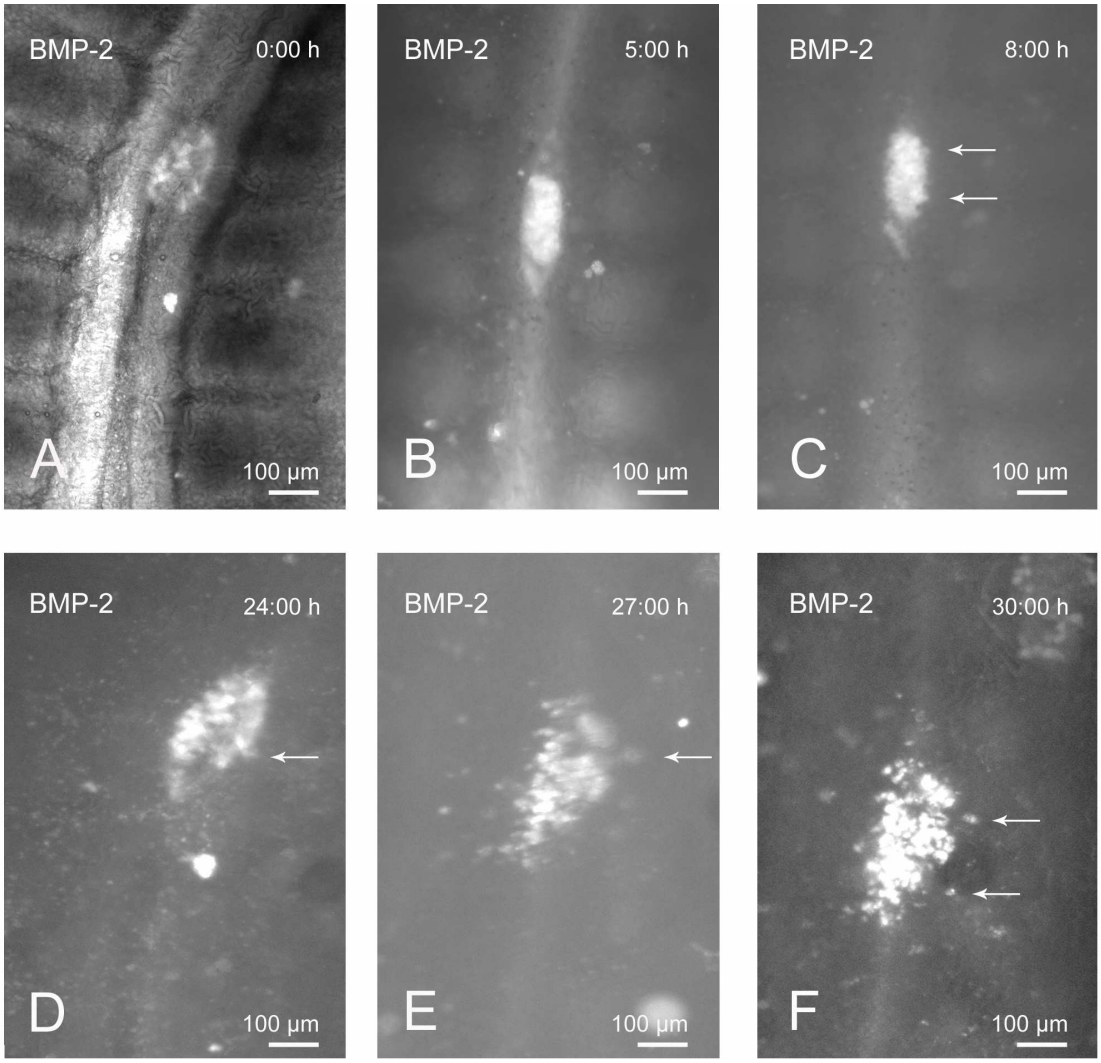

Abb. 9: Time-lapse Serie einer BMP-2 behandelten Neurosphäre in New Kultur

Abbildung 9:

A-F Hühnchenembryo in New Kultur mit BMP-2 vorbehandelter Neurosphäre. Time-lapse Aufnahmen der Neurosphäre mit auswandernden Zellen (Pfeile).

3.6. Wachtel 24 Stunden Inkubationszeit

Es wurde ein Experiment durchgeführt, in dem Neurosphären in Wachtelembryonen transplantiert wurden in Entwicklungsstadien, die denen der Hühnchenembryonen entsprachen. Insgesamt wurden in fünf Wachteln vier BMP-2 vorbehandelte und eine nicht mit BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre transplantiert. Dieses Experiment wurde angesetzt um zu sehen, ob sich der Auswanderungseffekt von BMP-2 auf Neurosphärenzellen auch im Wachtelembryo reproduzieren ließ. Außerdem wurde mit dieser Versuchsanordnung überprüft, ob es zwischen den transplantierten Zellen und den Wirtszellen zu Zell- oder Kernfusion kommt.

BMP-2 erwies sich als ebenso wirkungsvoll auf SVZ-Zellen in der Wachtel wie im Hühnchen (Epifluoreszenz-Aufnahmen, Abb. 10A, B). Es konnten die Neurosphärenzellen, die integriert worden waren oder die auswanderten, in der *in-situ*-Hybridisierung mit der mL1-Sonde angefärbt werden (Abb. 10C, D). Die auswandernden Zellen wurden an vergleichbaren Orten wie im Hühnchenembryo gefunden: im Lumen des Neuralrohres, in der Deckplatte, im angrenzenden Mesenchym, sowie in der Region der motorischen Vorderwurzel.

Um die Möglichkeit einer Zell- bzw. Kernfusion zwischen transplantierten Zellen und Wirtszellen auszuschließen, wurden die Wachtelzellkerne mit dem QCPN-Antikörper angefärbt, der ein Spezies-spezifisches nukleäres Antigen markiert, das in allen Wachtelzellen vorkommt, aber nicht in Mauszellen. Wie stellten fest, dass die Mauszellen in der Deckplatte, die sich spezifisch mit dem anti-GFP-Antikörper anfärben ließen (Abb. 10F) und mit der mL1-Sone hybridisiert wurden (Abb. 10C, D), nicht mit dem QCPN-Antikörper reagierten (Abb. 10E, Pfeil). Gleichermaßen reagierten QCPN-positive Wachtelzellen weder mit dem anti-GFP-Antikörper, noch konnten sie mit der mL1-Sone hybridisiert werden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die transplantierten Mauszellen nicht mit den Wirtszellen fusioniert hatten.

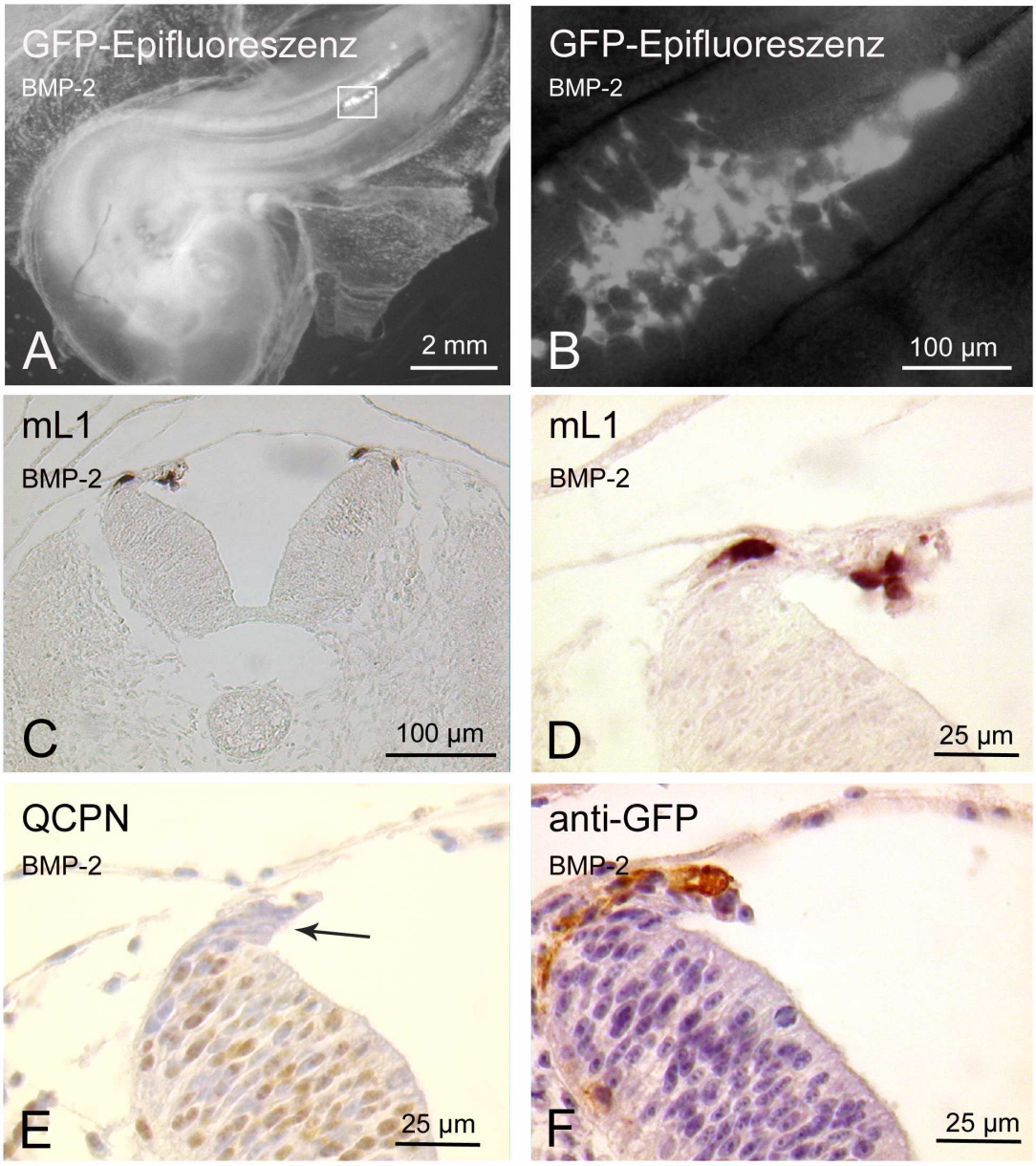

Abb. 10: Wachtelembryo mit BMP-2 behandeltem Transplantat 24 Stunden *p.t*

Abbildung 10:

A. BMP-2-vorbehandelte Neurosphäre 24 Stunden nach erfolgter Transplantation ins Neuralrohr eines Wachtelembryos (bei einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden). GFP-Eigenfluoreszenz zeigt die Neurosphäre *in situ*. Der Rahmen entspricht B.

B. Vergrößerung aus A. Auswandernde Neurosphärenzellen lassen sich durch ihre ausgezogene Morphologie gut erkennen. Beidseitig auswandernde Zellen befinden sich dorsal des Neuralepithels.

C. Paraffinschnitt desselben Embryos. Mit Hilfe der mL1-Sonde können die transplantierten Zellen mittels *in-situ*-Hybridisierung sichtbar gemacht werden. Auswandernde Zellen befinden sich in der Deckplatte des Neuralrohres und im lateral angrenzenden Mesenchym.

D. Vergrößerter Ausschnitt aus C.

E. Parallelschnitt von C. Die Wachtelzellkerne wurden mit dem QCPN-Antikörper markiert (braue Farbreaktion), der ein Spezies-spezifisches Antigen erkennt und selektiv Wachtelzellen anfärbt. Hervorzuheben ist die Deckplatte des Neuralrohres, der sich ungefärbt darstellt (Pfeil).

F. Parallelschnitt von E. Die anti-GFP Immunhistochemie zeigt, dass sich Zellen zwischen der Deckplatte und dem dorsalen Ektoderm, sowie lateral im Mesenchym GFP-positiv darstellen und somit Mauszellen sind. Wenn man die Parallelschnitte von C, D und E miteinander vergleicht, wird deutlich, dass anti-GFP und mL1-positive Zellen nicht mit QCPN positiven Zellen co-reagieren, wodurch sich eine Zell- bzw. Kernfusion zwischen Spender- und Empfängerzellen weitgehend ausschließen lässt.

3.7. Vergleich mit HNK-1 whole mounts

Zusätzlich zu den Transplantationsexperimenten in Hühnchen- und Wachtelembryonen im Stadium 12/13 (HH) erstellten wir Totalpräparate von Hühnchenembryonen, die diesen Stadien entsprachen, um sie mit dem Neuralleistenspezifischen Antikörper HNK-1 anzufärben (nach dem Protokoll von Lumsden, 1989). Dadurch wurde es möglich, das Auswanderungsmuster, das durch die auswandernden Neurosphärenzellen im Embryo gebildet wurde, mit dem autochthonen Auswanderungsmuster der Hühnchenneuralleistenzellen zu vergleichen. Dabei stimmten unsere Ergebnisse mit ähnlichen, bereits publizierten Beschreibungen auswandernder Neuralleistenzellen (Bronner-Fraser et al., 1986) überein. In Hühnchenembryonen im Stadium 12 erschienen die ersten HNK-1 positiven Neuralleistenzellen im dorsalen Neuralrohr circa 6 Somitenpaare kranial des jüngsten, neu geformten Somitenpaares (was im Stadium 12 dem 16. Somitenpaar entspricht).

Zu diesem Zeitpunkt war die Auswanderung der Neuralleistenzellen im lateralen Mesenchym noch nicht auf die kaudale Somitenhälfte beschränkt. Dieses restriktive Verhalten der Neuralleistenzellen zeigte sich in reiferen Stadien der Embryonalentwicklung. Ephrin-Rezeptor assoziierte Tyrosinkinasen und deren Liganden sind für dieses Auswanderungsmuster verantwortlich. EphB3 lässt sich sowohl in der rostralen Hälfte des Sklerotoms einschließlich der Neuralleiste nachweisen, während der Ligand EphB1 ein komplementäres Exprimierungsmuster in der kaudalen Somitenhälfte aufweist (Krull et al., 1997).

Bereits 24 Stunden nach der Transplantation (Stadium 16-18 HH), konnte dieses streng segmentale Auswanderungsmuster der Neuralleistenzellen bis ungefähr 8 Somitenpaare rostral des jüngsten gebildeten Somitenpaares im Embryo dokumentiert werden. Am Transplantationsort der SVZ Neurosphäre (16. Somitenpaar) hatten die autochthonen Hühnchenneuralleistenzellen bereits die paraaortalen Ganglien (Sympathikusganglien) erreicht, während andere Neuralleistenzellen auf der selben Rumpfhöhe noch von den Rändern des Neuralrohres auswandern.

Abb. 11 zeigt ein Totalpräparat eines Hühnerembryos im Stadium 18, das mit HNK-1 gefärbt wurde. Die auswandernden Neuralleistenzellen weisen ein typi-

sches Wanderungsmuster auf. Ein vergrößerter Ausschnitt der Region der oberen Extremitätenknospe zeigt eine Population von auswandernden Neuralleistenzellen in unmittelbarem Kontakt zum Neuroepithel (Abb. 11B). Diese Zellen ordnen sich keinem spezifischen Auswanderungsmuster unter, sondern scheinen wahllos von medial nach lateral zu wandern, während sie in engem Kontakt zum dorsalen Neuroepithel und der Deckplatte stehen. Diesem Muster entsprechende auswandernde Neurosphärenzellen, die mit BMP-2 vorbehandelt worden waren, werden in derselben Region des Rumpfes anhand von drei transplantierten Embryonen gezeigt (Abb. 11C-E).

Abbildung 12 stellt 2 Totalpräparate vom Embryonen in den Stadien 12 und 18 (HH) dar, um die autochthone Hühnchenneuralleistenwanderung zu verdeutlichen. Zum Zeitpunkt der Transplantation besteht das laterale segmentale Auswanderungsmuster nur in den vagalen, kranialen Anteilen der Neuralleiste, während es an der Stelle der Transplantation noch nicht aufgetreten ist (Abb. 12A, B). Bereits 24 h später, im Stadium 18, erscheint das segmentale Muster über der gesamten Länge des Embryos (Abb. 12C, D).

Da sich in den Totalpräparaten während der HNK-1 Färbung auch das Neuralrohr leicht, aber unspezifisch (keine zelluläre Reaktion, Abb. 12) mitfärbte, fertigten wir histologische Schnitte der entsprechenden Regionen an und färbten diese mit HNK-1, um das Muster der auswandernden autochthonen Neuralleistenzellen histologisch zu bestätigen.

Abb. 13A zeigt die HNK-1 Färbung eines Hühnchenembryos im Stadium 13, 12 h nach erfolgter Transplantation einer BMP-2 behandelten Neurosphäre. Man konnte feststellen, dass nur die Neurosphärenzellen eine HNK-1 Reaktivität aufweisen. Die HNK-1 Färbung derselben Region (Höhe des 16. Somitenpaares) eines Embryos im Stadium 13 ohne Transplantat ließ zu diesem Zeitpunkt noch keine Neuralleistenzellen erkennen (Abb. 13B). Bereits 24 h später, im Stadium 18, erschienen HNK-1 positive Zellen in der Neuralleiste und in den Spinalganglien auf der Höhe des 16. Somitenpaares (Abb. 13C, D).

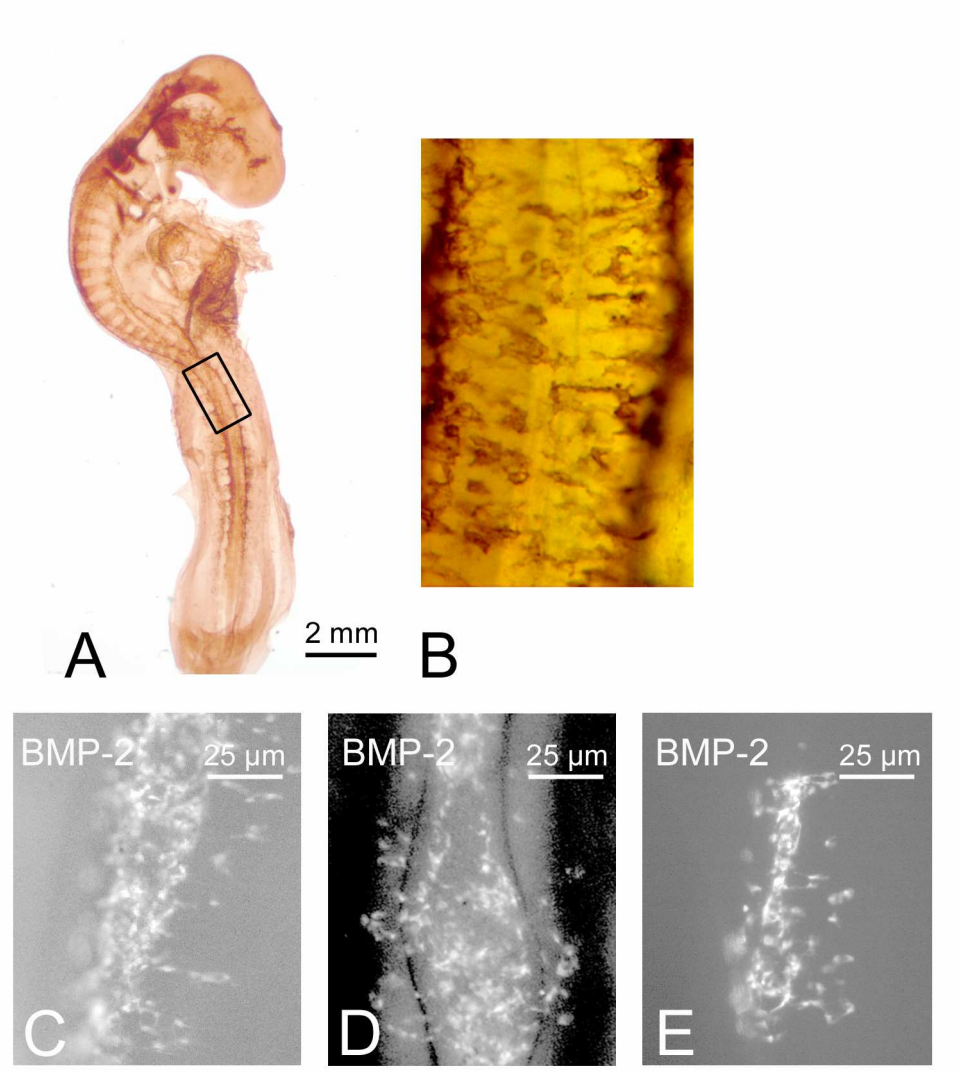

Abb. 11: Vergleich mit autochthoner Neuralleistenauswanderung

Abbildung 11:

A. HNK-1-Färbung eines Totalpräparats eines Hühnchenembryos im Stadium 18 nach 72 Stunden Inkubationszeit. Der Rahmen entspricht B.

B. Vergrößerter Ausschnitt aus A. Ansicht von dorsal auf das Neuralrohr der Region der oberen Extremitätenknospe, die dem Transplantationsort der Neurosphären entspricht. Die auswandernden autochthonen Neuralleistenzellen dorsal des Neuralrohres sind gut sichtbar (braunes Reaktionsprodukt). Dabei bilden die sie kein spezifisches Muster, so lange sie sich noch in unmittelbarem Kontakt zum dorsalen Neuralepithel befinden.

C-E. Drei Embryonen, die eine beidseitige Auswanderung aus der BMP-2-vorbehandelten Neurosphäre aufweisen, die dem Muster von B entspricht.

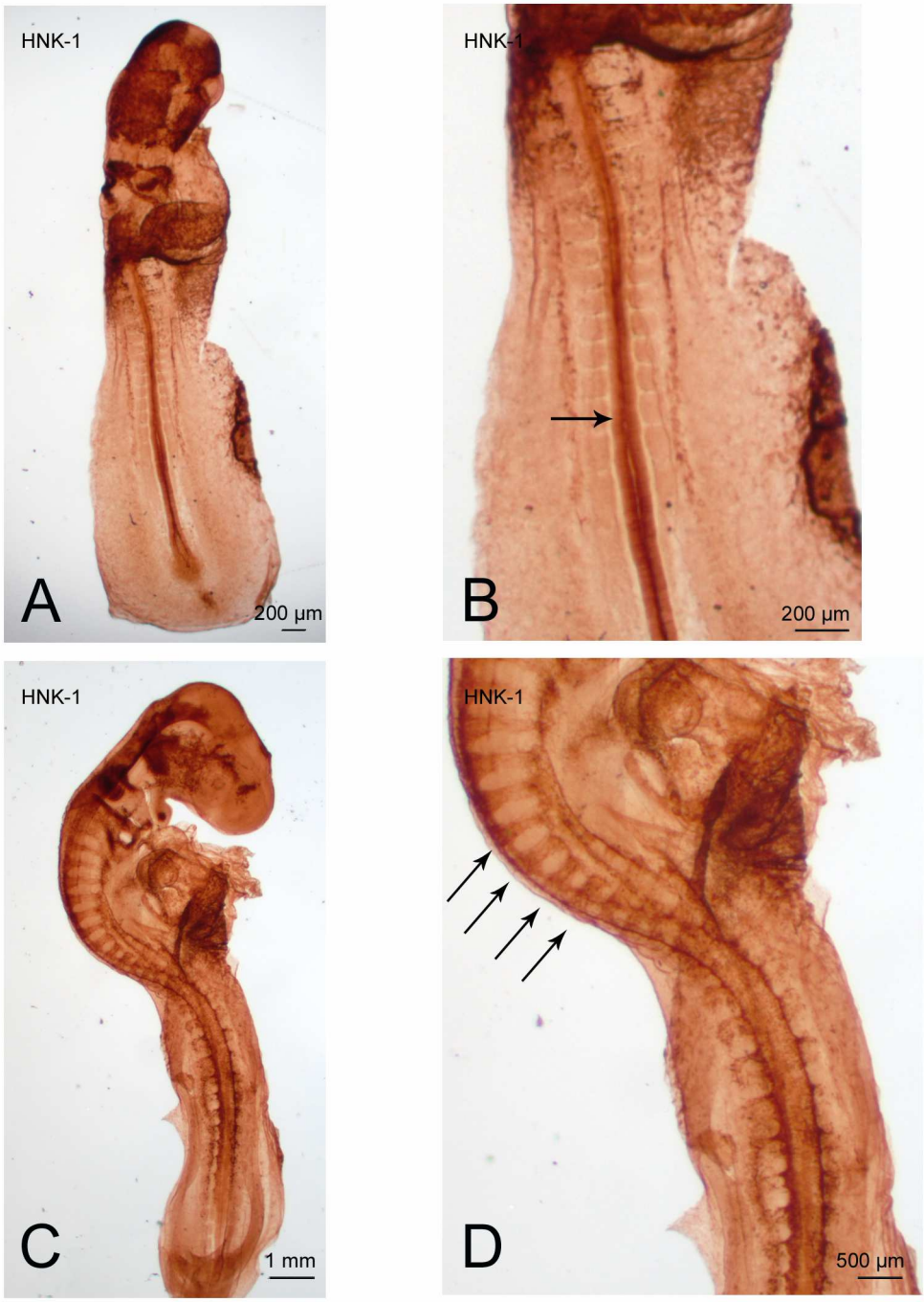

Abb. 12: Autochthone Neuralleistenwanderung des Hühnchenembryos

Abbildung 12:

A. HNK-1-Färbung eines Totalpräparats im Stadium 12.

B. Vergrößerter Ausschnitt aus A. Am Ort der Neurosphärentransplantation, der etwa dem jüngsten kaudal neu gebildeten Somitenpaar entspricht, kann man über dem Neuralrohr noch keine HNK-1-positiven Zellen erkennen (Pfeil).

C. HNK-1-Färbung eines Totalpräparats im Stadium 18.

D. Vergrößerter Ausschnitt aus C. Das spezifische Auswanderungsmuster der Neuralleistenzellen besteht lateral des Neuralrohrs im gesamten Embryo (Pfeile).

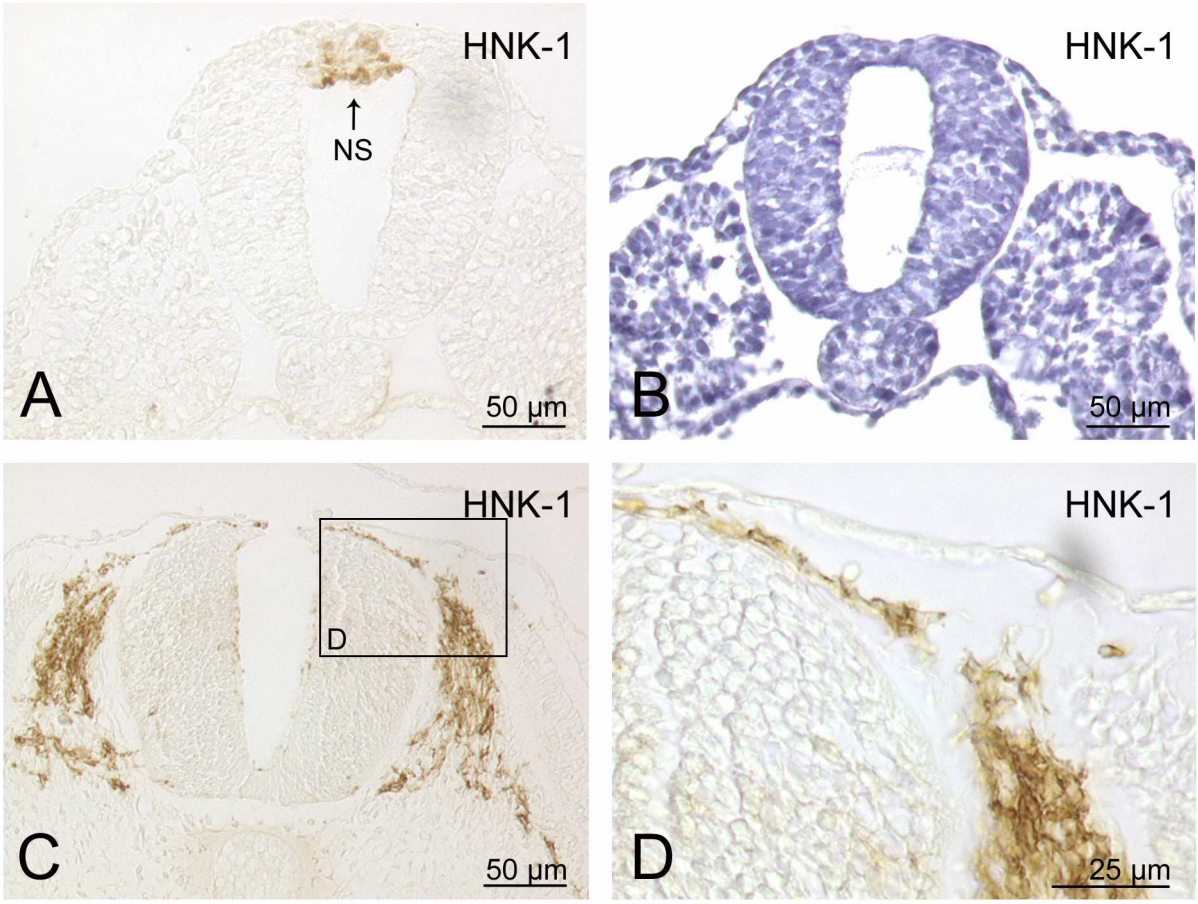

Abb. 13: HNK-1 Reaktivität der autochthonen Neuralleiste des Hühnchens

A. HNK-1 Färbung eines Hühnchenembryos im Stadium 13, 12 h nach erfolgter Transplantation einer BMP-2 behandelten Neurosphäre. Nur die Neurosphärenzellen (NS) zeigen eine HNK-1 Reaktivität (Pfeil).

B. HNK-1 Färbung mit Hämalaun-Gegenfärbung derselben Region wie in A eines Embryos im Stadium 13 ohne Transplantat. Zu diesem Zeitpunkt sind in dieser Rumpfregion noch keine HNK-1 positiven Zellen vorhanden.

C. HNK-1 Färbung eines Embryos Stadium 18 (ohne Neurosphäre) auf der Höhe des 16. Somitenpaares. Autochthone HNK-1 positive Zellen erscheinen in der Neuralleiste und in den Spinalganglien.

D. Vergrößerung aus C. HNK-1 positive Neuralleistenzellen können entlang des dorsalen Randes des Neuralrohrs und im Spinalganglion unterschieden werden.

3.8. Differenzierung und Apoptose der transplantierten Neurosphären

Um der Frage nach einer möglichen terminalen Differenzierung der transplantierten Neursphärenzellen nachzugehen, färbten wir die Hühnchen mit TuJ1, einem Neuronen-spezifischen Antikörper. Hierbei zeigte sich, dass einige unbehandelte Neurosphärenzellen, die sich 24 h nach ihrer Transplantation im Lumen des Hühnchenneuralrohrs befanden, TuJ1-Positivität besaßen (Abb. 14A, B). Nach BMP-2-Vorbehandlung zeigten die sich in die Deckplatte integrierten Neurosphärenzellen zu einem kleinen Prozentsatz ebenfalls eine TuJ1-Positivität (Abb. 14C, D). Daraus schlossen wir, dass die bereits in der Neurosphäre einsetzende Differenzierung in Richtung von neuronalen Zellen unabhängig vom direkten Kontakt mit dem umgebenden Wirtsgewebe war. Im Hühnchen färbten sich die frühen, differenzierenden motorischen Vorderhornzellen und ihre Axone positiv für TuJ1.

Um auszuschließen, dass die Neurosphärenzellen die Vorbehandlung mit BMP-2 einen Überlebensvorteil erhielten (Vitalität sichtbar durch Auswanderung), färbten wir Embryonen mit unbehandelten Neurosphärentransplantaten mit der TUNEL-Reaktion, die apoptotische Zellen markiert. Es zeigte sich, dass auch unbehandelte Neurosphären nach der Transplantation vital blieben (Abb 15A, B). Nur wenige Zellen der nicht in die Deckplatte eingebauten Neurosphären waren apoptotisch.

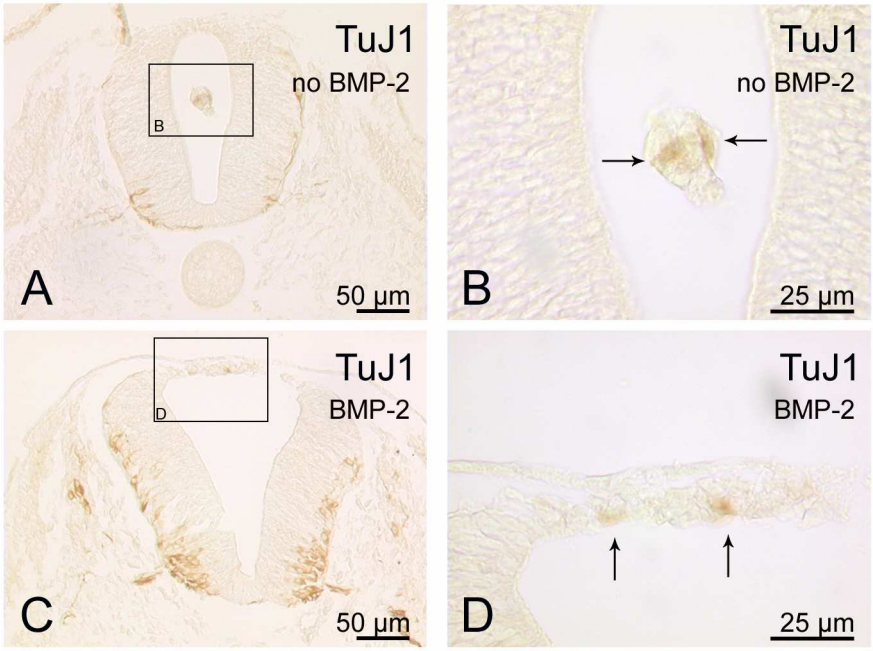

Abb. 14: TuJ1-Färbung zur Markierung differenzierter Neurosphärenzellen

Abbildung 14:

A. TuJ1 Färbung (Neuronen-spezifisch) eines Hühnchenembryos im Stadium 18, 24 h nach erfolgter Transplantation einer unbehandelten Neurosphäre. Frühe, sich differenzierende motorische Neurone und deren Axone sind im Vorderhorn des Neuralrohrs gefärbt.

B. Vergrößerung aus A. Zwei Zellen sind TuJ1-positiv in einer nicht ausgewanderten Neurosphäre im Lumen des Neuralrohrs (Pfeile).

C. TuJ1 Färbung eines Hühnchenembryos mit einer BMP-2 behandelten Neurosphäre im Stadium 21. Es zeigt sich ein ähnliches Färbemuster wie in A.

D. Vergrößerung aus C. Die Reste der BMP-2 behandelten Neurosphäre wurden in die Deckplatte integriert. Zwei TuJ1-positive Zellen der Neurosphäre sind markiert (Pfeile).

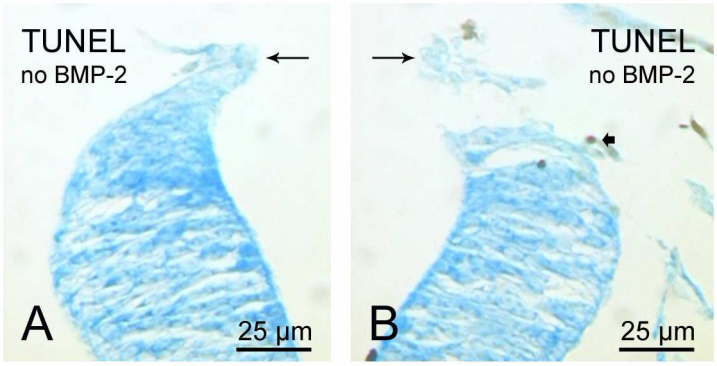

Abb. 15: TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose

Abbildung 15:

A-B TUNEL-Reaktion eines Embryos 24 h nach Transplantation einer unbehandelten Neurosphäre. Die Neurosphärenzellen sind kaum angefärbt (lange Pfeile). Einzelne positive apoptotische Zellen des Hühnchens sind sichtbar (kurzer Pfeil).

3.9. Statistische Analyse der Experimente

Die Beobachtungen der GFP-Eigenfluoreszenz im invertierten Mikroskop wurden anhand der Kriterien für „Auswanderung“ quantifiziert und statistisch ausgewertet (*Fisher's Exact Test*). Die durch GFP-Epifluoreszenz nachgewiesene Auswanderung der Neurosphärenzellen ins umliegende embryonale Gewebe wurde in „Auswanderung“ und in „keine Auswanderung“ eingeteilt. Die Zuteilung zu einer dieser beiden Gruppen erfolgte aufgrund von fluoreszierendem Zytoplasma der Neurosphärenzellen, das sich über das Lumen des Neuralrohres in lateraler Richtung hinausstreckte. Nur jene transplantierten Zellen, die dieses Kriterium deutlich erfüllten, wurden in die Gruppe „Auswanderung“ aufgenommen, während alle anderen Embryonen als „keine Auswanderung“ gewertet wurden. Für die statistische Auswertung wurde ein Experiment definiert als Zusammenfassung aller Neurosphären-Transplantationen, die am selben Tag mit derselben Charge von Neurosphären (mit und ohne BMP-2) stattgefunden haben (Tab. 3). Es stellte sich heraus, dass in den Experimenten 1 und 2, in denen 24 Stunden nach erfolgter Transplantation nachuntersucht wurde, eine statistisch signifikante Auswanderung bei der Gruppe von Embryonen, die eine BMP-2 vorbehandelte Neurosphäre erhalten hatten, beobachtet wurde ($P<0.01$). Die Experimente 3 und 4, bei denen ebenfalls 24 Stunden nach erfolgter Transplantation nachuntersucht wurde, ließen sich aufgrund der geringen Stückzahl von Embryonen nicht statistisch auswerten. Ihre Ergebnisse bestätigen jedoch die Ergebnisse aus den Experimenten 1 und 2.

Beispiele von Embryonen mit auswandernden Zellen sowie von Embryonen, die als „Keine Auswanderung“ klassifiziert wurden, werden in Abbildung 5 gezeigt.

Während der Auswertung hat sich gezeigt, dass es mit ansteigender Bebrütungszeit der Embryonen zunehmend schwieriger wurde, anhand der GFP-Eigenfluoreszenz eine eindeutige Aussage über die Zellauswanderung der transplantierten SVZ-Zellen zu machen. Bereits 48 Stunden nach der Transplantation, also nach insgesamt 4 Tagen Inkubationszeit, ließen sich die ausgewanderten Zellen nur noch als diffuse Fluoreszenz tief im Gewebe des sich rasch entwickelnden Embryos nachweisen. Ursächlich hierfür war die Größenzunahme und Rotation des Embryos während der normalen Entwicklung im Ei,

sowie das den Embryo bedeckende Amnion. Aus diesen Gründen sind die Experimente mit 48 Stunden Inkubationszeit nach der Transplantation nicht in die statistische Auswertung aufgenommen worden, obwohl deren histologische Aufarbeitung die Ergebnisse der für 24 h weiter bebrüteten Embryonen bestätigten. Ebenfalls nicht in die Statistik aufgenommen wurden die Embryonen, die nach erfolgter Transplantation 12 h weiter bebrütet worden waren, da sich in dieser Experimentalgruppe noch kein Unterschied zwischen BMP-2 behandelten und unbehandelten Neurosphären mit der GFP-Eigenfluoreszenz nachweisen ließ.

Die Ergebnisse aller Experimente, in denen nach Transplantation 24 h weiter bebrütet wurde, werden in Tabelle 3 gezeigt. Diese unterscheidet zwei unterschiedliche Gruppen von Experimenten:

1. Daten, bei denen BMP-2 behandelte und unbehandelte Neurosphären im selben Experiment untersucht wurden (Exp. 2, 3 und 4).
2. Daten, bei denen BMP-2 behandelte und unbehandelte Neurosphären in unterschiedlichen Experimenten an aufeinander folgenden Tagen untersucht wurden, die aber aus derselben Charge von Neurosphären stammten (Exp. 1).

Die Überlebensrate der statistisch ausgewerteten Experimente, in denen Hühnchen- und Wachtelembryonen untersucht wurden, die eine Neurosphärentransplantation erhalten hatten, betrug 45/47.

Tab. 3: Statistische Auswertung

GFP-Epifluoreszenz: Korrelation zwischen BMP-2 Behandlung und Auswanderung der SVZ-Zellen nach Transplantation ins Neuralrohr von Hühnchen- und Wachtelembryonen und einer Nachbeobachtung von 24 Stunden *p.t*.

		Behandlung	n	Auswanderung / keine Auswanderung	p [a]
Exp. 1	(Hühnchen)	BMP-2	10	7 / 3	0,003
		Kein BMP-2	9	0 / 9	
Exp. 2	(Hühnchen)	BMP-2	8	6 / 2	0,007
		Kein BMP-2	7	0 / 7	
Exp. 3	(Hühnchen)	BMP-2	4	2 / 2	n.d.
		Kein BMP-2	4	0 / 4	
Exp. 4	(Wachtel)	BMP-2	4	4 / 0	n.d.
		Kein BMP-2	1	0 / 1	
		Total n	47		

[a] Fisher's Exact Test, two-tailed

n Anzahl der Embryonen

Tabelle 3:

24 Stunden nach erfolgter Transplantation der Neurosphären ins Neuralrohr wurden die Embryonen unter dem invertierten Fluoreszenzmikroskop untersucht. Neurosphären, bei denen keine zelluläre Auswanderung sichtbar war, wurden als „keine Auswanderung" klassifiziert. Neurosphären, bei denen zelluläre Auswanderung über die laterale Neuralrohrgrenze hinaus beobachtet werden konnte, wurden als „Auswanderung" klassifiziert. Die Gesamtüberlebensrate von Hühnchen- und Wachtelembryonen, die eine Neurosphäre transplantiert bekommen haben und für 24 Stunden weiterbebrütet wurden, betrug 45/47. Es hat sich gezeigt, dass in den Experimenten 1 und 2 eine statistisch signifikante Auswanderung stattgefunden hat ($P < 0.01$). Experimente 3 und 4 ließen sich aufgrund der geringen Anzahl von Embryonen nicht statistisch auswerten; dennoch wiesen die Ergebnisse in dieselbe Richtung wie Experimente 1 und 2.

4 Diskussion

4.1. Klinische Relevanz

Eine mögliche klinische Anwendung von neuralen Stammzellen zu therapeutischen Zwecken bedarf folgender Voraussetzungen:
Erstens muss die Induktion des erwünschten Zelltyps der Stammzelle *in vitro* oder *in vivo* erfolgen. Es ist also notwendig, dass die gezielte Manipulation der Stammzelle mittels verschiedenster Wachstumsfaktoren (FGF2; EGF; BMP-2, usw.) oder Selektivmedien (z.B. N2) erfolgt und die so erzeugte differenzierte Zelle alle physiologischen Eigenschaften (z.B. Hormonsekretion) des erwünschten Zelltyps erfüllt.
Zweitens muss die künstlich veränderte Zelle die Fähigkeit besitzen, sich morphogenetisch in das Wirtsgewebe einzufügen, um sich therapeutisch in den geschädigten Zellverband einzugliedern oder einen nicht mehr vorhandenen Zelltyp zu ersetzen, um physiologisch „mitzuarbeiten".
Dabei ist es sehr schwierig, das morphogenetische Potential einer Stammzelle *in vitro* zu bestimmen. Unser Ansatz bestand darin, die morphogenetischen Eigenschaften von SVZ Neurosphären *in vivo* nach vorausgegangener Transplantation ins embryonale Neuralrohr von Hühnchen- und Wachtelembryonen zu testen.
Unsere Experimente konnten zeigen, dass die Vorbehandlung der Neurosphären mit BMP-2 *in vitro* eine Änderung des morphogenetischen Verhaltens der SVZ Zellen erreicht, wenn man diese in die embryonale Neuralleistenumgebung transplantiert. Nach der Vorbehandlung und Transplantation traten die Neurosphären in engen Kontakt mit dem dorsalen Neuralepithel. Einzelne Neurosphärenzellen wanderten aus dem Transplantat aus und vermischten sich mit dem dorsalen Neuralepithel, integrierten sich in die Deckplatte des Empfängerembryos, und wurden an der motorischen Vorderwurzel nachgewiesen, was einer medialen Neuralleistenwanderung entspricht. Im Gegensatz dazu waren die Neurosphären, welche nicht mit BMP-2 vorbehandelt worden waren, nicht in der

Lage, sich in das Hühnchen- oder Wachtelgewebe zu integrieren. Sie bildeten kompakte Aggregate im Lumen des Neuralrohrs.

4.2. *In vitro* Vorbehandlung der SVZ-Zellen

In vitro - Experimente konnten zeigen, dass die Behandlung mit BMP-2 und FGF2 den Determinierungszustand von Neurosphärenzellen verändert. Die SVZ-Zellen differenzieren sich, wenn beide Wachstumsfaktoren entzogen werden. Die Vorbehandlung mit FGF2 und BMP-2 resultiert in der Exprimierung von *smooth muscle actin*, wenn man die Neurosphären in der Zellkulturschale kultiviert. Nach der Behandlung mit FGF2 und BMP-2 zeigen die SVZ Zellen darüber hinaus Eigenschaften der Neuralleiste, welche sich durch die Ausdifferenzierung in periphere Neurone, Gliazellen, sowie in glatte Muskelzellen hervorheben. Ohne eine BMP-2-Vorbehandlung differenzieren sich die SVZ-Zellen nach Entzug von FGF2 in zentrale Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten (Sailer et al., 2005).

Adulte SVZ Zellen exprimieren die beiden BMP-Rezeptoren BMPR1A und BMPR1B (Lim et al., 2000).

Die Vorbehandlung mit BMP-2 ging in der Neuralrohrumgebung mit einer Integration in die Neuralleiste einher. Nach ihrer Integration in die Deckplatte nahmen die Maus-SVZ-Zellen an der autochthonen, Neuralleisten-spezifischen EMT teil. Auf diese Weise ermöglichten unsere *in vivo* Experimente die Sichtbarwerdung einer morphologischen Zellveränderung, die mit *in vitro* Experimenten nicht sichtbar sein kann.

Ein kleiner Teil der Neurosphärenzellen war unabhängig von der Vorbehandlung mit BMP-2 positiv für TuJ1, einem neuronalen Marker. Diese Differenzierung schien eine Subpopulation von bereits vordifferenzierten Zellen im Verband der Neurosphären zu sein. Die terminale Determination von Rumpfneuralleistenzellen des Hühnchenembryos zu pseudounipolaren Neuronen der Spinalganglien, zu Sympathikoblasten, Schwann Zellen, sowie zu Melanozyten, geschieht zu einem späteren Zeitpunkt, der nicht Gegenstand dieser Untersuchung war. Um die Frage nach der terminalen Differenzierung der Maus-Neurosphären nach ihrer Integration in die Hühnchenneuralleiste und ihrer

Auswanderung in die Zielgewebe zu klären, bedarf es einer längeren Nachuntersuchung.

4.3. EMT

Das Durchlaufen der EMT ist ein wichtiger Schritt für Neuralleistenzellen und für BMP-2 vorbehandelte Neurosphärenzellen, die es ihnen ermöglicht, sich in das umgebende embryonale Gewebe einzugliedern bzw. darin auszuwandern.
Die EMT wird von einer Reihe unterschiedlicher Gene reguliert, welche die Mechanismen erzeugen, die von Zellen gebraucht werden, um sich durch eine 3-D-Matrix (extrazelluläres embryonales Gewebe) zu bewegen.
Laut Hay (2005) entspricht das Auswanderungsverhalten von Fibroblasten in der Zellkulturschale nicht einer EMT, sondern stellt einen Artefakt dar, hervorgerufen durch die Kultivierung in einem 2-dimensiolalen Substrat. Hierbei flachen die Zellen ab und verlieren ihre gestreckte Morphologie. Die meisten, wenn nicht sogar alle der Aktin- und Myosinmoleküle, die eigentlich für die Zellbewegung benötigt werden, polymerisieren in so genannten *stress fibers*. Daher ist es laut Hay wichtig, die mesenchymale (oder die auswandernde) Neuralleistenzelle nicht anhand von *stress fibers* zu definieren, da diese trotz ihrer *smooth muscle actin* – Positivität abnormale Zellen darstellen.
Es konnte gezeigt werden, dass BMPs und Mitglieder der Wnt-Familie von Glykoproteinen im Embryo eine EMT induzieren können (Aybar und Mayor, 2002). *In vivo* wird die EMT durch die Exprimierung von HNK-1, sowie durch die Herabregulierung von E-Cadherin und das gleichzeitige Auftreten der Expression von Vimentin und N-Cadherin charakterisiert (Cheung et al., 2005).
In unseren Experimenten zeigten alle Neurosphärenzellen unabhängig von einer BMP-2-Vorbehandlung vor und nach ihrer Transplantation in den Hühnerembryo eine starke HNK-1-Positivität. Daraus konnten wir schließen, dass die Neurosphärenzellen entweder bereits ohne BMP-2-Vorbehandlung ein Neuralleistenzellschicksal angenommen hatten, oder dass die Neurosphärenzellen sich in einem undifferenzierten Stammzellzustand befanden, der oft zu einer Exprimierung von HNK-1 führt. In Bezug auf den epithelialen Charakter der Neurosphären, konnten wir keinen Unterschied zwischen BMP-2 behandelten

und unbehandelten Neurosphären vor der Transplantation erkennen. Nach der Transplantation bildeten die unbehandelten Neurosphären im Lumen des Neuralrohres kompakte Aggregate, was auf eine hohe E-Cadherin-Exprimierung schließen ließ.

4.4. EMT – beteiligte Faktoren

Verschiedenen Transkriptionsfaktoren (*PAX3, PAX7, Sox9, FoxD3, SLUG, Snail, Snail2, MSX, DSL1*), sowie einer Reihe von anderen Faktoren (MMP-2, c-Myb, E-Cadherin) wird eine wichtige Rolle in der Determination und Differenzierung von Neuralleistenzellen zugeschrieben (Basch et al., 2006; Sakai et al., 2006; Karafiat et al., 2005; Cheung et al., 2005; Hay, 2005; Duong and Erickson, 2004; Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999; Liem et al., 1995;). Die Exprimierung dieser genannten Faktoren in SVZ Neurosphären vor und nach ihrer Integration in die Hühnchenneuralleiste ist noch nicht untersucht worden.

Die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) wird sowohl in Neuralleistenzellen exprimiert, die im Begriff sind, sich während ihrer EMT vom Neuralepithel zu lösen, als auch im Sklerotom im Augenblick der Initiierung der EMT. Sobald die Neuralleistenwanderung stagniert, wird MMP-2 herabreguliert. Daraus lässt sich schließen, dass MMP-2 eine Rolle bei der Zellmobilität im extrazellulären 3-D-Raum während der EMT spielt. Dies wird von der Tatsache unterstützt, dass spezifische Inhibitoren der MMP-2 die EMT bei Hühnchenembryonen *in vivo* und *in vitro* inhibieren (Duong und Erickson, 2004).

Mittels in-ovo-Elektroporation der Transkriptionsfaktoren *Sox9, SLUG, Snail* und *FoxD3* konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren den Erwerb von Neuralleisteneigenschaften in neuralen Zellen reguliert. Dabei hat sich die forcierte Überexprimierung von *SLUG* / *Snail* nicht als effektiv erwiesen, um eine EMT in explantierten Rumpfneuralleistenzellen zu induzieren. Wurden jedoch *Sox9* und *SLUG* ko-elektroporiert, konnte eine EMT mittels ektoper HNK-1-Exprimierung beobachtet werden (Cheung et al., 2005).

In unseren Experimenten wurden ähnliche Effekte durch die Vorbehandlung von Neurosphären mit BMP-2 hervorgerufen.

Der Schlüsselfaktor aus der Hämatopoese, c-Myb, der in frühen Embryonalstadien von Hühnchen synthetisiert wird, trägt zu der Regulierung der Rumpfneuralleistenzellen bei. C-Myb scheint ein wichtiger Vermittler in der BMP-4–induzierten Formierung der Neuralleiste zu sein. BMP-4 war in der Lage, hohe Level von c-Myb in neuroepithelialen Zellen zu induzieren, was zu einer Aktivierung von *MSX1* und *SLUG* führte, deren Aktivitäten den Verlust des epithelialen Charakters der Zellen zugunsten der Umwandlung in einen mesenchymalen Zustand hierfür geeigneter Zellen, herbeiführten (Karafiat et al., 2005).

Basch und Kollegen implantierten mit Wnt beziehungsweise dem BMP-2, -4, und -7 Inhibitor Noggin beschichtete Plastikkügelchen in die zuvor durch *in-situ*-Hybridisierung ermittelte *Pax7*–exprimierende Region in Hühnchenembryonen der Stadien 3-4 (HH). *Pax7* repräsentiert einen frühen Marker für die Neuralleistenbildung in Vogelembryonen. Durch die Inhibierung konnte die *Pax7* – Exprimierung deutlich verringert werden, was ein Hinweis dafür ist, dass WnT und BMPs für Induktion der Neuralleiste während der Gastrulation notwendig waren (Basch et al., 2006).

Sakai et al. veröffentlichten, dass *Sox9* essentiell für die BMP-Signal vermittelte Induktion von *Snail2* ist, die wiederum zu EMT in der Vogelneuralleiste führt (Sakai et al., 2006). Man könnte daraus schlussfolgern, dass BMP-2 vorbehandelte Neurosphären eine zusätzliche Quelle für die Induktion von *Snail* und anschließender EMT sind. Wenn die BMP-2, -4, und -7 Aktivität durch Noggin inhibiert wurde, führte dies zu einem inhibierten Wanderungsverhalten von enterischen Neuralleistenzellen im sich entwickelnden Hühnchendarm (Goldstein et al., 2005). Ähnlich verhielten sich die BMP-2-unbehandelten Neurosphären, deren Zellen auch keine Auswanderung vollzogen.

4.5. Übertragung auf die eigenen Experimente

Eine mögliche Wirkungsweise von BMP-2 könnte zusammenfassend daher folgendermaßen aussehen:

Die BMP-2-Vorbehandlung der Neurosphären stimuliert die SVZ-Zellen, Zell-zu-Zell-Kontakte mit dem umliegenden Neuralleistenepithel einzugehen. BMP-2 führt außerdem zur Exprimierung von *SLUG*, welches de Exprimierung von E-Cadherin herabreguliert und öffnet auf diese Weise die *gap junctions* zwischen den neuroepithelialen Zellen des dorsalen Neuralrohrs. Somit erwerben die Neurosphärenzellen möglicherweise ein den Neuralleistenzellen ähnliches Verhalten. Die Unterdrückung von E-Cadherin durch *SLUG*, sowie durch die in der Neuralleiste exprimierten MMPs, könnte zu einer Verstärkung der EMT des Neuroepithels führen und den SVZ-Zellen additiv ermöglichen, durch die Basalmembran ins umliegende embryonale Gewebe auszuwandern.

Einen derartigen Effekt konnten wir *in vivo* durch den Vergleich des Verhaltens von BMP-2 behandelten und unbehandelten Neurosphären nach ihrer Transplantation ins embryonale Neuralrohr demonstrieren. Die BMP-2-Behandlung hatte offensichtlich einen schwächenden Effekt auf das kompakte Neuroepithel der Hühnchen- und Wachtelembryonen und ermöglichte den Neurosphärenzellen die Eingliederung und Auswanderung. Neurosphärenzellen, die keinen direkten Kontakt mit dem Neuroepithel aufwiesen, verblieben selbst nach einer BMP-2-Vorbehandlung im Lumen des Neuralrohrs.

Wenn man die auswandernden SVZ-Zellen aus BMP-2 vorbehandelten Neurosphären mit der autochthonen Neuralleistenwanderung in Hühnchenembryonen entsprechender Stadien verglich, zeigte sich ein überraschend ähnliches Auswanderungsmuster beider Zellgruppen. Im Stadium der Transplantation (Stadium 12/13 HH) ließ sich eine Zellpopulation von Hühnchenneuralleistenzellen dokumentieren, die von den lateralen Rändern des Neuralrohres entlang der gesamten Länge des Neuralrohres auswanderte. Diese Zellen ließen sich mit dem HNK-1-Antiörper anfärben und als Gesamtpräparat gut darstellen. Sie befanden sich am Anfang ihrer Auswanderung im dorsalen Neuroepithel und wiesen noch nicht das spezifische segmentale Auswanderungsmuster auf, das bei weiterer Bebrütung sichtbar wurde. Das übereinstimmende Auswanderungs-

muster der autochthonen Neuralleistenzellen mit BMP-2 vorbehandelten SVZ-Zellen legte nahe, dass die transplantierten Zellen sich in die autochthone Neuralleistenauswanderung des Hühnchens eingliederten.

Brüstle et al. hatten eine Versuchanordnung, in der sie menschliche embryonale Stammzellen in die Hirnventrikel von embryonalen Ratten injizierten. Nach weiterer Austragung und Geburt der Ratten wurden diese nachuntersucht. Es zeigte sich, dass sich die injizierten menschlichen Zellen willkürlich in alle Hauptkompartimente des Rattenhirns integrierten (Riechhirn, Kortex, Hippocampus, Striatum, Septum, Tektum, Thalamus, Hirnstamm). Nach ihrer Integration differenzierten sich die injizierten Zellen in Neurone, Astrozyten und in Oligodendrozyten (Brüstle et al., 1995, 1997, 1998).

Brüstle untersuchte in seinen Experimenten die möglichen Zellschicksale nach einem unkontrollierten *homing in* der injizierten Zellen in verschiedene Gehirnregionen. Im Gegensatz dazu war der Ansatz unserer Experimente, das Verhalten von *in vitro* präparierten Zellen in einer definierten Mikroumgebung (Neuralleiste auf Höhe der Flügelknospe) *in vivo* zu beobachten. Wir konnten zeigen, dass BMP-2 die behandelten SVZ-Zellen hinsichtlich ihrer morphogenetischen Fähigkeiten, eine EMT durchzuführen, beeinflusst. Diese *in vitro* vorbereitete und *in vivo* verifizierte Modifikation der morphogenetischen Eigenschaften von SVZ-Stammzellen ist in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal publiziert worden (Busch et al., 2006).

5 Zusammenfassung

Fragestellung

Die Entdeckung neuronaler Stammzellen eröffnete die Option auf eine Stammzelltherapie neurodegenerativer Erkrankungen. Adulte neuronale Stammzellen werden aus der Subventrikularzone isoliert und *in vitro* in Form von Neurosphären kultiviert. *In vitro* wurde gezeigt, dass SVZ Zellen durch BMP-2-Behandlung in Richtung Neuralleiste determiniert werden. Um das Entwicklungspotential und die Morphogenese von Neurosphären *in vivo* zu testen, wurden Neurosphären aus GFP-Mauszellen in das Neuralrohr von Hühnchen- und Wachtelembryonen transplantiert.

Methode

Die Neurosphären wurden vor der Transplantation *in vitro* mit FGF2 allein oder mit FGF2 und BMP-2 behandelt. Die Auswanderung der transplantierten Zellen aus dem Neuralrohr wurde 24 Stunden nach der Transplantation in den Hühnchen- und Wachtelembryonen mit der GFP-Epifluoreszenz dokumentiert. Die Embryonen wurden in Paraffin eingebettet. Die transplantierten Mauszellen wurden im Embryo durch Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen.

Ergebnisse

Neurosphären, die nur in FGF2 kultiviert worden waren, zeigten nach der Transplantation weder eine Integration, noch eine Auswanderung in den Embryo. Die mit FGF2 und BMP-2 vorbehandelten subventrikularen Stammzellen verließen das Neuralrohr, um sich in die Deckplatte, ins Neuralepithel, ins Sklerotom, sowie in den Bereich der ventralen Wurzel zu integrieren. 48 Stunden nach erfolgter Transplantation fanden sich einige SVZ-Zellen im Bereich der Vereinigung von Vorder- und Hinterwurzel wieder.

Konklusion

Die BMP-2-Behandlung der Neurosphären führte zu einer Veränderung des Wanderungsverhaltens im Embryo. Die subventrikulären Stammzellen der Maus wurden fähig, an der epithelial-mesenchymalen Transformation der Neuralleiste im Embryo teilzunehmen.

6 Literaturverzeichnis

1. Allendorph, G.P., Vale, W.W., Choe, S. 2006. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-*β* superfamily member. *Proc Natl Acad Sci*. **103**: 7643-7648.
2. Anstrom, K.K., Tucker, R.P. 1996. Tenascin-C lines the migratory pathways of avian primordial germ cells and hematopoietic progenitor cells. *Dev Dyn*. **206**: 437-446.
3. Aybar, M., Mayor, R. 2002. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12:** 452-458.
4. Bartl, K., Oppitz, M., Fröhlich, E., and Drews, U. 1998. [Matrix-directed cell migration: Studies on the invasiveness of human melanoma cells in the chick embryo using antibody HMB-45.] (Ger) *Ann. Anatom.* **180**: 79
5. Basch, M.L., Bronner-Fraser, M., Garcia-Castro, M.I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7*. Nature* **441**: 218-22.
6. Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R.F., Pagano, S.F., and Parati, E.A. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *J. Brainres.* **993:** 18-29.
7. Bilodeau, M.L., Greulich, J.D., Hullinger, R.L., Bertolotto, C., Ballotti, R., and Andrisani, O.M. 2001. BMP-2 stimulates tyrosinase gene expression and melanogenesis in differentiated melanocytes. *Pigment Cell Res*. **14:** 328-36.
8. Bronner-Fraser, M. 1986. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev Biol* **115:** 44-55
9. Brustle, O., Choudhary, K., Karram, K., Huttner, A., Murray, K., Dubois-Dalcq, M., McKay, R.D. 1998. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat Biotechnol.* **16:**1040-4.
10. Brustle, O., Spiro, A.C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., McKay, R.D. 1997. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94:**14809-14814.
11. Brustle, O., Maskos, U., and McKay, R.D.G. 1995. Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron.* **15:** 1275-1285.
12. Busch, C., Oppitz, M., Sailer, M.H., Just, L., Metzger, M., and Drews, U. 2006. BMP-2 dependent integration of mouse adult subventricular stem cells into the neural crest of chick and quail embryos*. J Cell Sci* **119**: 4467-4474.
13. Busch, C., Oppitz, M., Garbe, C., Eisele, S.R., Drews, U. 2007. Noggin inhibits migration of B16 mouse melanoma cells along the neural crest pathways of the chick embryo. *Submitted for publication*.

14. Burns, A.J., Delalande, J-M.M., Le Douarin, N.M. 2002. In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonization. *Development* **129:** 2785-2796.
15. Cheung, M., Chaboissier, M.-C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., Briscoe, J. 2005. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev. Cell* **8:** 179-192.
16. Cornell, R.A., and Ohlen, T.V. 2000. Vnd/nkx, ind/gsh, and msh/msx: Conserved regulators of dorsoventral neural patterning? *Curr Opin Neurobiol.* **10:** 63-71.
17. Day, S.J., and Lawrence, P.A. 2000. Measuring dimensions: The regulation of size and shape*. Development* **127:** 2977-2987.
18. Drews, U. *Taschenatlas der Embryologie*. 1993. 1. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, New York.
19. Duong, T.D., Erickson, C.A. 2004. MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev. Dyn*. **229:** 42-53.
20. Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., Le Douarin, N.M. 2003. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Swann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad. Sci U S A.* 100: 5229-5233.
21. Eickelberg, O., and Hecker, M. 2004. TGF-β signaling: the known and the unknown. *Zellbiologie aktuell* **30**: 20-23.
22. Furuta, Y., Piston, D.W., and Hogan, B.L. 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* **124:** 2203-2212.
23. Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., Roberts, D.J. 2005. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech. Dev.* **122:** 821-833.
24. Graham, A., Koentges, G., and Lumsden, A. 1996. Neural crest apoptosis and the establishment of craniofacial pattern: An honourable death. *Mol Cell Neurosci.* **8:** 76-83.
25. Graham, D. L., and Meier, G.W. 1975. Standards of morphological development of the quail, *Coturnix Coturnix Japonica*, embryo. *Growth* **39**: 389-400.
26. Gross, R.E., Mehler, M.F., Marbie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., and Kessler, J.A. 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17:** 595- 606.
27. Gurniak, C.B., Perlas, E., Witke, W. 2005. The actin depolymerising factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol*. **278:** 231-241.
28. Hamburger, V., Hamilton, H.L. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo (1951). *Dev. Dyn.* **195:** 231-272.
29. Hay, E.D. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* **233:** 706-720.

30. Hogan, B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 432-438.
31. Hsu, M.-Y., Rovinsky, S., Penmatcha, S., Herlyn, M., Muirhead, D. 2005. Bone morphogenic proteins in melanoma: Angel or devil? *Cancer Met Rev*. **24**: 251-263.
32. Huber, M.A., Kraut, N., Beug, H. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumour progression. *Curr Opin Cell Biol.* **17**: 548-558.
33. Ito, K., and Sieber-Blum, M. 1992. Pluripotent and developmentally restricted neural-crest-derived cells in posterior visceral arches. *Dev Biol.* **156:** 191-200.
34. Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. 1996. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes & Dev.* **10:** 3129-3140.
35. Just, L., Timmer, M., Tinius, J., Stahl, F., Deiwick, A., Nikkhah, G., Bader, A. 2003. Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe. *J Neurosci Methods* Jun **126:** 69-77.
36. Karafiat, V., Dvorakova, M., Krejci, E., Kralova, J., Pajer, P., Snajdr, P., Mandikova, S., Bartunek, P., Grim, M., and Dvorak, M. 2005. Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cell. Mol. Life Sci.* **62:** 2516-2525.
37. Kasemeier-Kulesa, J.C., Kulesa, P.M., Lefcort, F. 2005. Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Development* **132:** 235-245.
38. Kontges, G., Lumsden, A. 1996. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**: 3229-3242.
39. Krull, C.E., Lansford, R., Gale, N.W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G.D., Fraser, S.E., and Bronner.Fraser, M. 1997. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol.* **7:**571-80.
40. Le Douarin, N.M., and Dupin, E. 2003. Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Gen & Dev* **13:** 529-536.
41. Le Douarin, N.M. 1999. *The Neural Crest.* 2. Auflage. Cambridge University Press, Cambridge
42. Li, W., Cogswell, C.A., and LoTurco, J.J. 1998. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered my BMP. *J. Neurosci.* **18:** 8853-8862.
43. Lendahl, U., Zimmermann, L.B., McKay, R.D. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**: 585-595.
44. Liem, K.F.J., Tremml, G., and Jessell, T.M. 1997. A role for the roof plate and its resident TGFβ-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91:** 127-138.

45. Liem, K.F., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T.M. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82:** 969-79.
46. Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., Avarez-Buylla, A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**: 713-726.
47. Lo, L., Sommer, L., Anderson, D.J. 1997. MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr. Biol.* **7**: 440-450.
48. Lumsden, A., Keynes, R. 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**: 424-428.
49. Mehler, M.F., Marbie, P.C., Zhu, G., Gokhan, S., and Kessler, J.A. 2000. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev. Neurosci.* **22:** 74-85.
50. Miyazono, K., Ichijo, H., Heldin, C.H. 1993. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* **8**: 11-22.
51. Molne, M., Studer, L., Tabar, V., Ting, Y.T., Eiden, M.V., and McKay, R.D. 2000. Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J. Neurosci. Res.* **59:** 301-311.
52. Mujtaba, T., Mayer-Proschel, M., and Rao, M.S. 1998. A common neural progenitor for the CNS and the PNS. *Dev. Biol.* **200:** 1-15
53. Nataf, V., Mercier, P., Ziller, C., Le Douarin, N.M. 1993. Novel markers of melanocyte differentiation in the avian embryo. *Exp Cell Res*. **207** : 171-182.
54. Navarro, S., Noguera, R., Peydro-Olaya, A., Llombart-Bosch, A. 1997. Bipolar (neural and myoblastic) phenotype in cell lines derived from human germ cell tumours of the testis. *Virchows Arch*. **430**: 291-300.
55. Newgreen, D.F., Minichiello, J. 1995. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors. *Dev Biol*.**170**: 91-101.
56. New, D.A.T. 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J. Embryol. Exp. Morph.* **3:** 326-331
57. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y. 1997. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters*. **407:** 313-319.
58. Oppitz, M., Busch, C., Schriek, G., Just, L., Drews, U. 2007. Non-malignant migration of B16 mouse melanoma cells in the neural crest and invasive growth in the eye cup of the chick embryo. *Melanoma Res*. In press.
59. Oppitz, M., Pintaske, J., Kehlbach, R., Schick, F., Schriek, G., Busch, C. 2007. Magnetic resonance imaging of iron-oxide labelled SK-Mel

28 human melanoma cells in the chick embryo using a clinical whole body MRI scanner. *MAGMA*. In press.
60. Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G., and McKay, R.D. 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* **15:** 2094-2110.
61. Perris, R., Perissinotto, D. 2000. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* **95:** 3-21
62. Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A.G., Varnai, A., Buettner, R., Bosserhoff, A.K. 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail*. J Biol Chem*. **276**: 24661-24666.
63. Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* **12:** 4565-4574.
64. Reynolds, B.A., Weiss, S. 1992. Generation of neurons and astrocytesfrom isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255:** 1707-1710.
65. Reynolds, B.A., Weiss, S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* **175:** 1-13.
66. Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M., Bosserhoff, A.K. 2005. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* **65**: 448-456.
67. Sailer, M.H., Hazel, T.G., Panchision, D.M., Hoeppner, D.J., Schwab, M.E., McKay, R.D. 2005. BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells. *J Cell Sci*. **118**: 5849-5860.
68. Sakai, D., Suzuki, T., Osumi, N., Wakamatsu, Y. 2006. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signalling in early neural crest development. *Development* **133:** 1323-1333.
69. Scheufler, C., Sebald, W., Hülsmeyer, M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 A resolution. *J. Mol. Biol.* **287:** 103-115.
70. Schriek, G., Oppitz, M., Busch, C., Just, L., Drews, U. 2005. Human SK-Mel 28 melanoma cells resume neural crest migration after transplantation into the chick embryo. *Melanoma Res* **15:** 225-234.
71. Sela-Donnenfeld, D., and Kalcheim, C. 1999. Regulation of the onset of neural crest mirgation by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* **126:** 4749-4762.
72. Shah, N.M., Groves, A.K., and Anderson, D.J. 1996. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFβ superfamily members. *Cell* **85:** 331-343.
73. Stottmann, R.W., Choi, M., Mishina, Y., Meyers, E.N., Klingensmith, J. 2004. BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development* **131:** 2205 – 2218

74. Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., Okano, H., Fukuda, K. 2005. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol*. **170**: 1135-1146.
75. Tsai, R.Y., and McKay, R.D. 2000. Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J. Neurosci.* **20:** 3725-3735.
76. Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., Weissman, I.L. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad. Sci U S A.* **97:**14720-14725.
77. Varga, A.C., Wrana, I.L. 2005. The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* **24**: 5713-5721.
78. Vogt, T.F., and Duboule, D. 1999. Antagonists go out on a limb. *Cell* **99:** 563-566.
79. White, P.M., Morrison, S.J., Orimoto, K., Kubu, C.J., Verdi, J.M., and Anderson, D.J. 2001. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron.* **29:** 57-71.
80. Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., Hung, M.C. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. **6**, 931-940.
81. Zhu, W., Kim, J., Cheng, C., Rawlins, B.A., Boachie-Adjei, O., Crystal, R.G., Hidaka, C. 2006. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone*. **39**: 61-71.

Danksagung

Am guten Gelingen dieser Arbeit waren zahlreiche Menschen beteiligt, die ich nun einzeln erwähnen werde, und deren besondere Künste ich ebenfalls ausführen werde:

- Mein umfassendstes Dankeschön verdient Prof. Dr. U. Drews, dem ich die Ehre, als erster genannt zu werden, nicht nur zuteil werden lasse, weil er mein Betreuer war, sondern weil er meine Visionen von Anfang an mit mir geteilt hat und alles nur Erdenkliche dafür getan hat, dass diese Ideen Wirklichkeit wurden. Gemeinsam haben wir ein Gedankengerüst errichten können, das uns noch in den kommenden Jahren mit reichlich Arbeit versorgen wird. Ihm verdanke ich meinen kritischen Blick, das praktische Experimentieren, die Fähigkeit, aus einer fixen Idee ein Projekt zu entwickeln, sowie die Erkenntnis, das eine Kaffeepause mit Kuchen Wunder bewirken kann.
- Herrn Dr. M. Oppitz danke ich für die nicht enden wollende Unterstützung bei allen Experimenten, für die vielen guten Gespräche, für diverse Mittagessen und Knabbereien, für die rasche Hilfe bei Computerproblemen, und für den tollen Wilhelm Busch Gedichtband.
- Den Herren Dr. rer. nat. L. Just und Dr. sc. hum. M. Metzger, und Frau S. Conrad danke ich für ihre rege Unterstützung bei der *in-situ*-Hybridisierung, der mühseligen Neurosphärenkultur, sowie für den konstruktiven Dialog während des Manuskriptschreibens.
- S. Eisele danke ich fürs aufmerksame Korrekturlesen dieses Werkes und G. Schriek ich für Gummibärchen, viel gemeinsames Lachen, für das Beibringen der Injektionstechnik und für die tiefstgreifenden philosophischen Exkurse während unserer Experimente.
- L. Macher und I. Epple danke ich für ihre unersättliche Geduld mit den kleinen Embryonen und den gelungenen Schnitten und Färbungen.
- Frau U. Drews danke ich für den leckeren Kuchen und viele Plätzchen, und im Voraus schon mal für die weitere Zusammenarbeit bei den nächsten Projekten.

- P. Künstle danke ich für die Bewältigung bei technischen Problemen aller Art, sowie für seine stets lustigen sarkastischen Kommentare über den Laborbetrieb, und Frau G. Fischer für Literaturbesorgungen aller Arten.
- Den Herren Dr. M. Sailer und R.D. McKay, PhD, danke ich für die mir gebotene Möglichkeit, im NIH praktische Erfahrungen gesammelt zu haben.
- Und wäre diese ganze Sache auch nur halb so gut geworden ohne die jahrelange Unterstützung meiner Eltern und Ehefrau?? - - - Sicherlich nicht. Daher gilt mein innigster Dank meiner Familie, die ganz schön herhalten musste, immer wenn ich von unverständlichen Dingen in Fachchinesisch berichtet habe, und weil sie das höchstwahrscheinlich nicht immer interessiert hat. Außerdem habe ich unzählige Stunden in der Anatomie verbracht, die ich auf diese Art meiner Familie entzogen habe. Vielen Dank für euer Verständnis!!!
- Als letztes möchte ich auch noch die vielen unscheinbaren Mitarbeiter nennen, die mir zugehört haben, die mit mir diskutiert haben, die immer da waren, und die alle ihren kleinen Beitrag für diese Arbeit beigetragen haben, ohne davon zu wissen (Janina, Tobias, Annette, Jörg, Basti, Markus, Ellen, Konrad, Ravi, Dan, Petra, Elke, …, …).

Lebenslauf

Name:	Christian Busch
Geboren:	29.01.1977 in Halle / Saale
Familienstand:	verheiratet mit Olivia Busch Töchter: Ophelia und Novalie Busch

Schulausbildung und Zivildienst

1983 – 1985	Grundschule in Halle / S.
1985 – 1987	Grundschule in Böblingen
1987 – 1997	Albert-Einstein-Gymnasium, Böblingen (Abitur mit Auszeichnung für besondere Leistungen)
1994-1995	Beavercreek High School, Dayton, Ohio, USA (Graduation, Diploma with Honors)
1998 – 1999	Zivildienst, Sonderschulkindergarten für Sprachbehinderte, Sindelfingen

Studium

1999 – 2006	Medizinstudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2001	Physikum, Famulatur Kinderchirurgie
2002	1. Staatsexamen, Famulatur Dermatologie, Gynäkologie
2005	2. Staatsexamen
2005/06	Praktisches Jahr, Uniklinik Tübingen: 1. Tertial: Gynäkologie (Frauenklinik Tübingen) 2. Tertial: Innere Medizin (Medizinische Klinik Tübingen) 3. Tertial: Chirurgie (BG; Crona, Tübingen)
12.05. 2006	3. Staatsexamen und Approbation zum Arzt

Forschung

02 - 03 / 2003	National Institutes of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Bethesda, Washington DC, USA
2001 – 2007	Doktorand im Anatomischen Institut der Uni Tübingen, Abt. Experimentelle Embryologie

Berufserfahrung

07-12 / 2006	Universitätsfrauenklinik Tübingen
01-03 / 2007	Anatomisches Institut, Abt. Experimentelle Embryologie
seit 04/2007	Universitätshautklinik Tübingen, Abt. Dermatologische Onkologie