

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.2 Embryonale Stammzellen.....	2
1.3 Stammzellen im adulten Organismus.....	3
1.4 Stammzellen im Knochenmark.....	4
1.5 Plastizität adulter Stammzellen.....	8
1.6 Ursachen adulter Stammzellplastizität.....	10
1.7 Knochenmarkstromazellen und Stammzelltherapie	12
1.8 Genexpression und cDNS-Mikroarrays.....	13
1.9 Ziel der Arbeit.....	15
II. Material.....	16
2.1 Chemikalien, Mediumzusätze.....	16
2.2 Verwendeter Mausstamm.....	16
2.3 Zellkulturmaterialien.....	16
2.4 cDNS-Synthese und RT-PCR.....	17
2.5 Antikörper.....	17
2.6 Primer RT-PCRs.....	19
2.7 Primer sq-RT-PCRs.....	20
2.8 Puffer und Lösungen.....	21
2.9 Geräte und sonstige Materialien.....	21
2.10 Software.....	22
III. Methoden.....	23
3.1 Isolierung und Zellkultur von murinen Knochenmarkstromazellen.....	23
3.1.1 <i>Etablierung einer homogenen Kultur</i>	23
3.1.2 <i>FACS-Analyse</i>	24
3.1.3 <i>MACS-Sortierung</i>	26
3.2 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	28
3.2.1 <i>Entwicklung eines geeigneten Differenzierungsmediums</i>	29
3.2.2 <i>Immunfärbung/ -fluoreszenzmikroskopie</i>	32
3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen differenzierter Knochenmarkstromazellen.....	33
3.4 Expressionsanalysen muriner Knochenmarkstromazellen und ihrer neuronalen Differenzierung mit cDNS-Mikroarrays.....	33
3.4.1 <i>Expressionsprofil undifferenzierter muriner Knochenmarkstromazellen</i>	34
3.4.1.1 <i>RNS-Isolierung und -Markierung</i>	34
3.4.1.2 <i>Herstellung der cDNS-Mikroarrays</i>	35
3.4.1.3 <i>Mikroarray-Hybridisierung</i>	36
3.4.1.4 <i>Auswertung der Mikroarray-Hybridisierung</i>	36
3.4.1.5 <i>Normalisierung</i>	37
3.4.1.6 <i>Identifizierung exprimierter Gene</i>	38
3.4.1.7 <i>Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion</i>	39
3.4.2 <i>Expressionsprofil der Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen in Zellen mit neuronalen Eigenschaften</i>	40
3.4.2.1 <i>Clusteranalyse</i>	41
3.4.2.2 <i>Semiquantitative RT-PCR</i>	41

IV. Ergebnisse	43
4.1 Kultivierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	43
4.2 FACS Analyse.....	45
4.3 Expressionsprofil muriner Knochenmarkstromazellen.....	47
4.4 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	52
4.4.1 <i>Etablierung eines geeigneten Differenzierungsprotokolls</i>	52
4.4.2 <i>Immunzytochemische Untersuchung der Expression neuraler Markerproteine</i>	54
4.5 Elektrophysiologische Ableitungen an neuronal differenzierten Knochenmarkstromazellen.....	60
4.6 Genexpressionsanalysen zur neuronalen Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen mit cDNS-Mikroarrays	61
4.6.1 <i>Mikroarray-Hybridisierungen</i>	61
4.6.2 <i>Cluster-Analyse</i>	62
4.6.3 <i>Funktionelle Kategorien der differentiell exprimierten Gene</i>	63
4.6.4 <i>Semiquantitative-RT-PCRs</i>	79
4.7 Immunhistochemische Untersuchung des Knochenmarks der adulten Maus.....	83
V. Diskussion	86
5.1 Kultivierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	86
5.2 Expressionsprofil muriner Knochenmarkstromazellen.....	87
5.3 Lokalisierung von Knochenmarkstromazellen im Knochenmark adulter Mäuse	91
5.4 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	92
5.5 Neuronal differenzierte Knochenmarkstromazellen zeigen keine Aktivität von von Spannungs- oder Liganden-abhängigen Ionenkanälen.....	94
5.6 Expressionsanalysen der neuronalen Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen.....	95
5.7 Knochenmarkstromazellen exprimieren Neuralleisten-spezifische Gene.....	102
5.8 Ausblick.....	109
VI. Zusammenfassung	110
VII. Anhang	112
7.1 Literaturverzeichnis.....	112
7.2 Danksagung.....	137
7.3 Lebenslauf.....	138
7.4 Erklärung.....	140

Abkürzungen

α -MEM	Minimal essentielles Medium, α -Modifikation
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. „basic fibroblast growth factor“)
BHA	Butyliertes Hydroxyanisol
BLAST	engl. “Basic local alignment search tool”
cDNS	komplementäre DNS zur mRNA (engl. „complementary“)
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintriphosphat
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. “fluorescence activated cell sorting”)
FBS	Fötales Kälberserum (engl. „fetal bovine serum“)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81\text{m/s}^2$ bzw. g = Gramm bei Masseangaben
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HSZ	hämatopoetische Stammzelle(n)
KMSZ	Knochenmarkstromazellen
min	Minute
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. „magnetic bead activated cell sorting“)
mRNA	Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. „nerve growth factor“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. „Phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“)
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „sodium dodecyl sulfate“)
sqRT-PCR	semiquantitative RT-PCR
ZNS	Zentrales Nervensystem