

## **III. Methoden**

### **3.1 Isolierung und Zellkultur von murinen Knochenmarkstromazellen**

#### **3.1.1 Etablierung einer homogenen Kultur muriner Knochenmarkstromazellen**

Da keinerlei Erfahrungen mit der Kultivierung von Knochenmarkstromazellen vorlagen, mußte diese zunächst etabliert werden.

Knochenmark wurde aus 6-8 Wochen alten weiblichen CD1-Mäusen (Charles River) gewonnen. Hierzu wurden die Oberschenkelknochen freipräpariert und aus den Gelenken gelöst. Da bei jeder Isolierung Oberschenkelknochen mehrerer Mäuse präpariert wurden, wurden die freipräparierten und von Muskel- und Bindegewebe gesäuberten Knochen zwischenzeitlich in eine Schale mit PBS (Raumtemperatur) gegeben. Danach wurden die Enden der Knochen mit einer feinen Schere abgeschnitten, an einem Ende die Spitze einer Kanüle angesetzt, das Knochenmark mit 0,6 ml des Kulturmediums (Raumtemperatur) ausgespült und in einem 15ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Das Kulturmedium bestand aus  $\alpha$ -MEM, 20% FBS, 100U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin und 2mM Glutamin. Da eine identische Proliferation der Knochenmarkstromazellen festgestellt wurde, wurden in späteren Primärkulturen 15% FBS verwendet. Für eine Primärkultur wurde Knochenmark aus 8-10 Oberschenkelknochen isoliert.

Da das Knochenmark meist noch relativ kompakt war, wurde es vorsichtig mit einer Pipette (10ml) zerstoßen und leicht auf- und absaugend zerkleinert. Nach einem kurzen Moment (ca.20s) zur Sedimentation von Resten der Knochenmatrix wurde die Zellsuspension abgenommen und - ohne Knochenreste - in ein neues Falcon-Röhrchen (15ml) überführt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 800 U/min (~260g) bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen, die Zellen als Waschschrift resuspendiert, gezählt und erneut zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit einem automatischen Zählsystem (Casy 1, Schärfe System) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$  in unbeschichteten Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

Nach drei Tagen wurden nicht-adhärenente Zellen zusammen mit dem Medium abgenommen, das Medium danach alle drei bis vier Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz der Kultur von ca. 90%, die in der Regel innerhalb von 10-14 Tagen erreicht wurde, wurden die adhärenente Zellen 2-fach mit PBS gewaschen und durch 5-minütige Inkubation in 0,25% Trypsin/1mM EDTA im Inkubatorschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vom Untergrund gelöst. Die Enzymaktivität wurde durch Mediumzugabe gestoppt und die gelösten Zellen in entsprechender Verdünnung weiter kultiviert (zunächst 1:2, spätere Passagen 1:3 bis 1:4). Zellen, die sich nicht lösten, wurden verworfen.

Bei Passage 6 wurden die Zellen von  $\alpha$ -MEM in DMEM (mit 15% FBS, 100U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin und 2mM Glutamax) überführt.

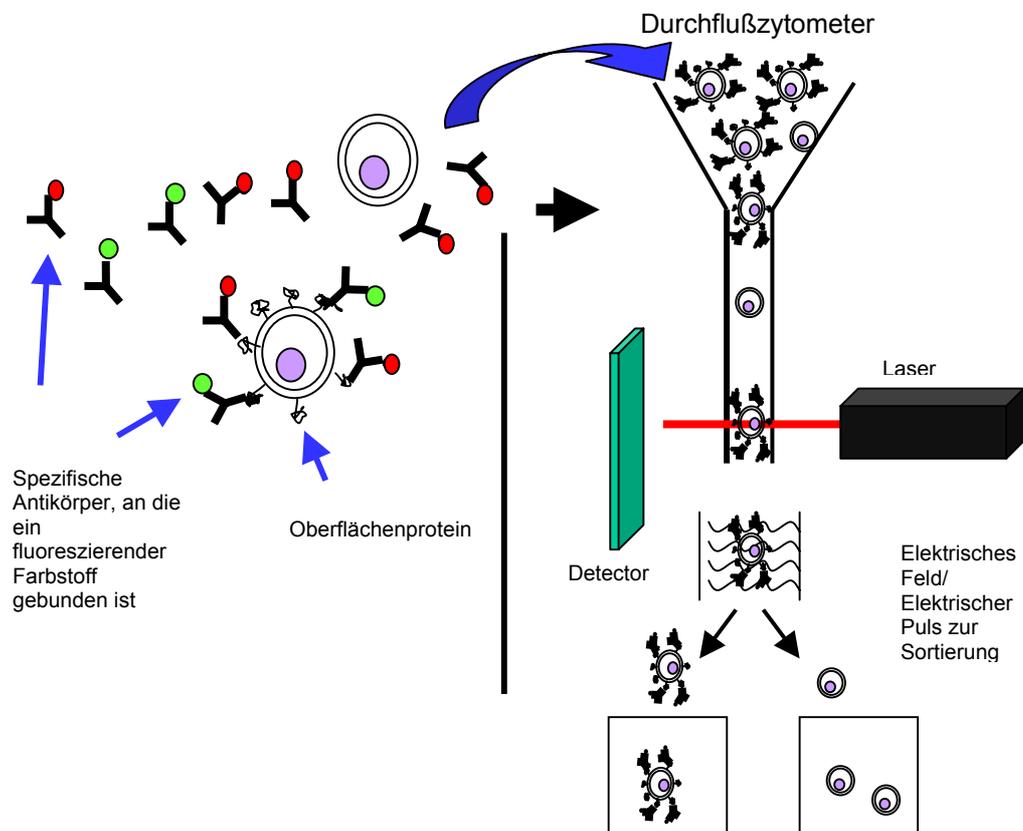
### 3.1.2 FACS-Analyse mittels Durchflußzytometrie

Eine der entscheidenden Schwächen vieler Stammzellstudien ist die mangelnde Charakterisierung der Ausgangszellpopulation. Sowohl bei Studien mit embryonalen Stammzellen als auch mit adulten Stammzellen ist häufig nicht eindeutig definiert, wie homogen die Ausgangszellpopulation ist. Für viele Zelltypen fehlen auch eindeutige Marker, die einen bestimmten Entwicklungszustand beschreiben. Das hämatopoetische System ist durch eine Vielzahl von Markern (meist Oberflächenproteine) sehr gut charakterisiert, welche die verschiedenen Zelltypen (z.B. B-Lymphozyt, Makrophage) und deren verschiedene Entwicklungsstadien sehr exakt charakterisieren, von der allen hämatopoetischen Zellen gemeinsamen Stammzelle über myeloische und lymphatische Vorläuferzellen bis hin zu den differenzierten Zelltypen. Diese Marker wurden auch genutzt, um Knochenmarkstromazellen besser zu charakterisieren, welche sowohl als Nährzellen bei der *in vitro* Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer genutzt werden, als auch hinsichtlich ihrer eigenen Fähigkeit, in einen anderen Zelltyp zu differenzieren. Die meisten Linien-spezifischen Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen werden jedoch nicht von Knochenmarkstromazellen exprimiert, z.B. CD11b für Monozyten und Makrophagen oder CD45 für alle hämatopoetischen Zellen. Die vorliegenden Daten (Woodbury et al., 2000; Colter et al., 2000, 2001) zur Expression verschiedener Oberflächenproteine in Knochenmarkstromazellen dienten als Orientierung zur Charakterisierung der in dieser Arbeit isolierten und kultivierten murinen KMSZ.

Eine homogene Population von Knochenmarkstromazellen war für die in dieser Arbeit beschriebenen Genexpressionsanalysen von entscheidender Bedeutung; zunächst um den

richtigen Zelltyp zu bestimmen, weiterhin um die Expressionsanalysen nicht durch Expressions-„Hintergrund“ anderer Zellpopulationen zu verwässern oder zu verfälschen. Zur Charakterisierung von Zellpopulationen eignet sich besonders die FACS-Analyse (FACS engl. „fluorescence activated cell sorting“). Hierbei werden Oberflächenantigene mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und in einem Durchflußzytometer mittels Laser detektiert (s. Abb. 3.1). Durch gleichzeitige Markierung mit unterschiedlichen und an verschiedene fluoreszierende Gruppen gekoppelte Antikörper können verschiedene Zellpopulationen sehr präzise unterschieden werden.

**Abb. 3.1:** Prinzip der FACS-Analyse



Die Durchflußzytometrie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marina Scheller am Institut für experimentelle Medizin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

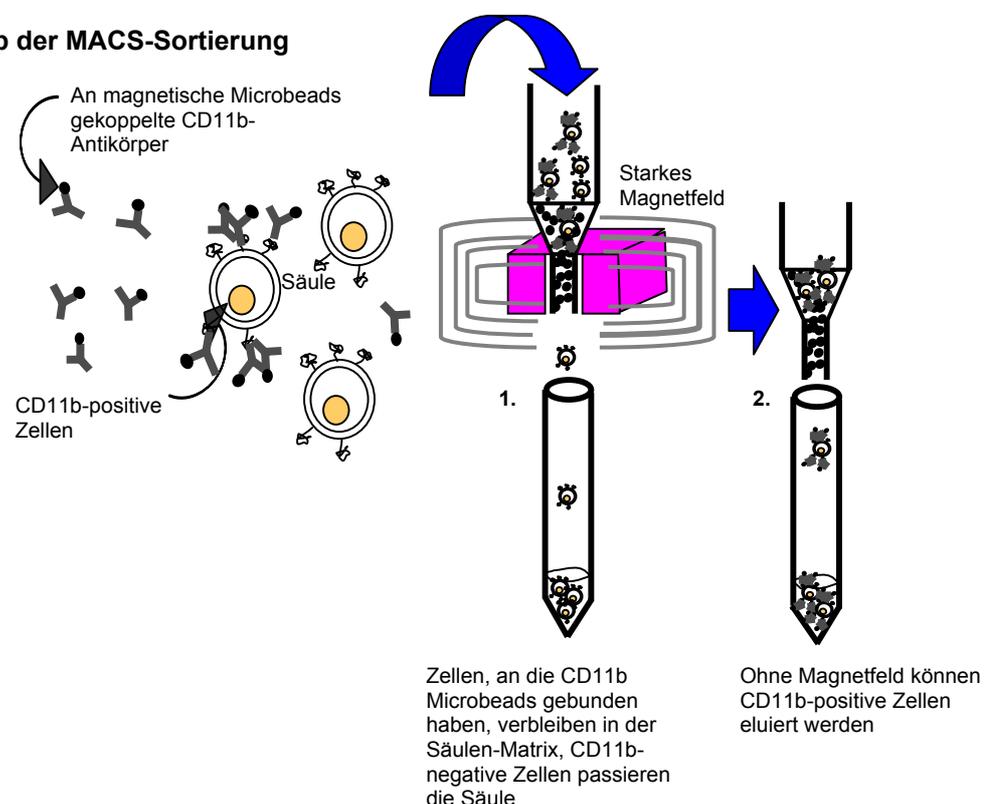
Hierzu wurden je Probe  $2 \times 10^5$  Knochenmarkstromazellen verschiedener Passagen in 200  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS, 2%FBS, 2mM EDTA, 0,1% Natrium-Azid) resuspendiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phenylephrin) oder Ampicillin-konjugierter Antikörper gegen die Oberflächenproteine CD11b, CD44, CD45, CD71, CD90 und Sca-1 wurden die Zellen 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Verdünnung mit 4ml Puffer wurden

die markierten Zellen bei 4°C und 260g 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in 200µl Puffer aufgenommen. Die Zugabe von Propidiumiodid ermöglichte die Färbung toter Zellen, die aus der späteren Analyse im Durchflußzytometer ausgeschlossen werden konnten. So wurden Artefakte durch unspezifische Bindung von Antikörpern an Zelltrümmer vermieden. Hierzu wurde ein Milliliter Propidiumiodid (1µl/ml FACS Puffer) zu den Proben gegeben, diese erneut zentrifugiert (5min, 260g, 4°C) und anschließend in FACS-Puffer für die Analyse resuspendiert. Bei jeder Untersuchung wurden  $10^4$  Zellen analysiert.

### 3.1.3 MACS-Sortierung

Mit höherer Passagenzahl wurde eine zunehmende morphologische Homogenität der Knochenmarkstromazellen beobachtet. Die FACS-Analyse zeigte jedoch, daß diese Kulturen höherer Passagen eine kleine (5-10%) Population enthielten, die den Makrophagen-Marker CD11b exprimiert (s. Abb. 4.2). Um diese aus der Kultur zu eliminieren, wurde die gesamte Population einer MACS-Sortierung (engl. „magnetic bead activated cell sorting“) unterzogen. Hierbei werden die Zellen mit Antikörpern gegen ein Oberflächenprotein, in diesem Fall CD11b, inkubiert, an die magnetische Nanopartikel (sog. „microbeads“) gebunden sind. Zellen, an welche die Antikörper gebunden haben, können somit über eine magnetische Säulenmatrix gebunden und von nicht markierten Zellen getrennt werden (s. Abb. 3.2)

**Abb. 3.2: Prinzip der MACS-Sortierung**



Hierzu wurden die Zellen durch drei- bis vierminütige Inkubation mit 0,25% Trypsin/1mM EDTA bei 37°C aus den Zellkulturflaschen gelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 800 U/min in der Tischzentrifuge, entsprechend etwa 140g) wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Entsprechend der Zellzahl (s.u.) wurden die Zellen in MACS-Puffer (PBS, 0,5% FBS, 2mM EDTA) aufgenommen (80µl pro 20µl eingesetzter Microbeads) und durch Inkubation an CD11b-spezifische Microbeads gebunden (bei 6°C für 20 Minuten). Je nach Zellzahl wurden unterschiedliche Volumina der Microbead-Lösung, und damit auch Puffer, verwendet. Das Verhältnis entsprach 100µl Microbeads auf  $1,5 \times 10^7$  Zellen. Dieser Wert liegt deutlich über den Empfehlungen des Herstellers (20µl/  $1 \times 10^7$  Zellen). Knochenmarkstromazellen sind jedoch recht groß (im Durchschnitt 23µm Ø), haben damit nicht nur eine größere Oberfläche, sondern sind vor allem in der angegebenen Menge an Puffer nicht zu resuspendieren. Sollte die erhöhte Menge an Antikörpern zu unspezifischen Bindungen führen, erhöht dies höchstens die Wahrscheinlichkeit, daß wirklich alle CD11b-positiven Zellen depletiert werden. Durch Zugabe von MACS-Puffer wurden ungebundene CD11b-Antikörper verdünnt, die Zellen anschließend erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 800U/min). Zur Separation wurden die Zellen in 2ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine Säule (Typ LD, Miltenyi Biotech) gegeben, die in einem sehr starken Magnetfeld stand. Die Säule wurde zweimal mit 2ml MACS-Puffer nachgespült, der Durchfluß ebenfalls aufgefangen. Alle CD11b-positiven Zellen sollen durch die magnetisch-gekoppelten Antikörper in der Säulenmatrix verbleiben, während CD11b-negative Zellen mit dem Puffer die Säule passieren. Wie FACS-Analysen mit gegen CD11b-sortierten Kulturen der Knochenmarkstromazellen zeigten, waren diese tatsächlich stabil, das heißt auch nach weiteren Passagen, befreit von CD11b-positiven Zellen (s. Abb. 4.2). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die von CD11b-positiven Zellen depletierte Kultur wurde unter denselben Bedingungen (DMEM, 15% FBS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM Glutamax; 37°C; 5% CO<sub>2</sub>) in Zellkulturflaschen weiter inkubiert.

### **3.2 Neuronale Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen**

Die Fähigkeit von Knochenmarkstromazellen, in Zellen mit einem neuronalen Phänotyp zu differenzieren, wurde zuvor *in vitro* insbesondere durch antioxidant wirkende Substanzen wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Retinsäure beschrieben (Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001). Während Retinsäure bei humanen Knochenmarkstromazellen nur zu einem relativ geringen Prozentsatz an zum Beispiel NeuN-positiven Zellen führt, beschrieben Woodbury et al. eine Differenzierungsrate bei humanen und Ratten-Knochenmarkstromazellen von nahezu 80%. Dies ist für die spätere Analyse der Expressionsänderungen von entscheidender Bedeutung, da die Ergebnisse umso eindeutiger werden, je höher die Zahl der differenzierenden Zellen ist (je geringer damit jede Form von „Hintergrundexpression“ nicht differenzierender Zellen). Insofern wurde zunächst entsprechend dem von Woodbury et al. (2000) beschriebenen Protokoll versucht, eine erfolgreiche neuronale Differenzierung der murinen Knochenmarkstromazellen zu erreichen. Die Zellen wurden über Nacht in serumfreiem DMEM mit 20% FBS und 10ng/ml bFGF inkubiert. Anschließend wurde durch Mediumwechsel (DMEM/ 2% DMSO/ 200mM BHA) die neuronale Differenzierung induziert. Die nach 5 Stunden fixierten Zellen zeigten verglichen mit undifferenzierten Zellen eine erhöhte Expression von Neurofilament-M und der Neuronen-spezifischen Enolase. Da die Expressionsanalysen jedoch einen längeren Zeitraum abdecken sollten, wurde die Differenzierung der murinen Knochenmarkstromazellen zunächst mit einem ebenfalls in der Veröffentlichung von Woodbury et al. (2000) für die Differenzierung über einen längeren Zeitraum angegebenen Protokoll durchgeführt. Hier hatte das Differenzierungsmedium folgende Zusammensetzung:

DMEM/ 2% DMSO/ 200mM BHA/ 25mM KCl/ 2mM Valprionsäure/ 10mM Forskolin/ 1mM Hydrocortison/ 5mg/ml Insulin.

Zwar zeigten die Zellen auch hier eine schnelle Änderung ihrer Morphologie, bereits nach einem Tag lösten sich jedoch viele Zellen vom Boden der Zellkulturschale und starben ab. Am zweiten Tag der Differenzierung waren fast keine vitalen Zellen mehr vorhanden. Für die Expressionsanalysen war damit auch dieses Differenzierungsmedium ungeeignet, da nicht zwischen Genexpressionsänderungen, die spezifisch für die Differenzierung und solchen, die spezifisch für die apoptotische oder nekrotische Reaktion waren, hätte unterschieden werden können. Daher musste ein Differenzierungsprotokoll mit dem Ziel entwickelt werden, daß

- a) ein hoher Prozentsatz an Zellen neuronal differenziert und
- b) eine hohe Zahl an vitalen Zellen erhalten bleibt.

### 3.2.1 Entwicklung eines geeigneten Differenzierungsmediums

Da das von Woodbury verwendete Medium für die Langzeitdifferenzierung mit Knochenmarkstromazellen von Mensch und Ratte immerhin eine Neuron-ähnliche Morphologie der murinen Zellen bewirkte, wurde dieses als Ausgangspunkt für die Etablierung eines Maus-spezifischen Differenzierungsprotokolls genommen. Die enthaltenen Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen getestet. Außerdem wurden verschiedene Medien und ein verschieden langes Verbleiben der Zellen im jeweiligen Medium verglichen. Ein Teil der getesteten Bedingungen ist in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

**Tab. 3.1:** Auswahl einiger getesteter Differenzierungsmethoden für murine KMSZ

<p><b>Tests einzelner Substanzen in DMEM (ohne Mediumwechsel):</b></p> <p>DMEM/ 10µM Forskolin  DMEM/ 1,5% DMSO  DMEM/ 150µM BHA  DMEM/ 1,5% DMSO/ 10µM Forskolin  DMEM/ 150µM BHA/ 10µM Forskolin  DMEM/ 1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 10µM Forskolin</p>
<p><b>Tests verschiedener Medien und Kulturbedingungen (mit Mediumwechsel):</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Neurobasal-Medium ohne B27/1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin/ 2mM Glutamin</li> <li>2. wie 1, nach 24h Medium erneuert</li> <li>3. wie 1, nach 48h Medium erneuert</li> <li>4. Neurobasal-Medium mit B27/1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin/ 2mM Glutamin</li> <li>5. wie 4, nach 24h Medium erneuert</li> <li>6. wie 4, nach 48h Medium erneuert</li> <li>7. DMEM/1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin nach 5h Neurobasal/B27/ 20ng/ml NGF/ 10ng/ml bFGF/ 1mM BME/ 0,3% Glucose/ 50% Pen/Strep / 5µM Forskolin/ 2mM Glutamin</li> <li>8. DMEM//1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin nach 24h Neurobasal/B27/ 20ng/ml NGF/ 10ng/ml bFGF/ 1mM BME/ 0,3% Glucose/ 50% Pen/Strep / 5µM Forskolin/ Glutamin</li> <li>9. DMEM//1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin nach 5h Neurobasal/B27/ 50ng/ml NGF/ 10ng/ml bFGF/ 1mM BME/ 0,3% Glucose/ 50% Pen/Strep / 5µM Forskolin/ Glutamin</li> <li>10. DMEM//1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 2mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin nach 24h Neurobasal/B27/ 50ng/ml NGF/ 10ng/ml bFGF/ 1mM BME/ 0,3% Glucose/ 50% Pen/Strep / 5µM Forskolin/ Glutamin</li> </ol>

Insgesamt wurden etwa hundert verschiedene Bedingungen getestet. Die im Lichtmikroskop zu erkennenden morphologischen Veränderungen wurden schriftlich festgehalten. Anhand von Kriterien wie der Ausbildung von Zellfortsätzen, Abrunden des Zellkörpers, der Stabilität der Veränderungen (das heißt liegt nur eine kurzfristige Reaktion auf den Mediumwechsel und die darin enthaltenen Substanzen vor oder eine dauerhafte Veränderung der Zellen) und Überleben der Zellen (das heißt, sie lösen sich nicht ab oder auf) wurden schließlich drei Protokolle ausgewählt. Mit diesen wurden die murinen Knochenmarkstromazellen differenziert, zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und immunzytochemisch mit verschiedenen Antikörpern untersucht (s. Abschnitt 3.2.3 Immunfärbung/-fluoreszenzmikroskopie).

**Tab. 3.2 :** Drei ausgewählte Medienbedingungen für eine erfolgreiche Differenzierung muriner KMSZ in einen neuronalen Phänotypen

1.	a) DMEM/1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 1mM Valproinsäure/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin b) <b>nach 5h</b> Neurobasal/ B27 ohne Antioxdantien/ 20ng/ml NGF/ 10ng/ml bFGF/ 2mM BME/ 50% Pen/Strep / 5µM Forskolin/ 2mM Glutamin
2.	Neurobasal /1,5%DMSO/ 150µM BHA/ 1mM Valproic Acid/ 10µM Forskolin/ 1µM Hydrocortison/ 5µg/ml Insulin/ 2mM Glutamin
3.	Neurobasal / B27 ohne Antioxidantien/ 2mM β-Mercaptoethanol/ /1mM Valproic Acid/ 5mM Forskolin/ 2mM Glutamin

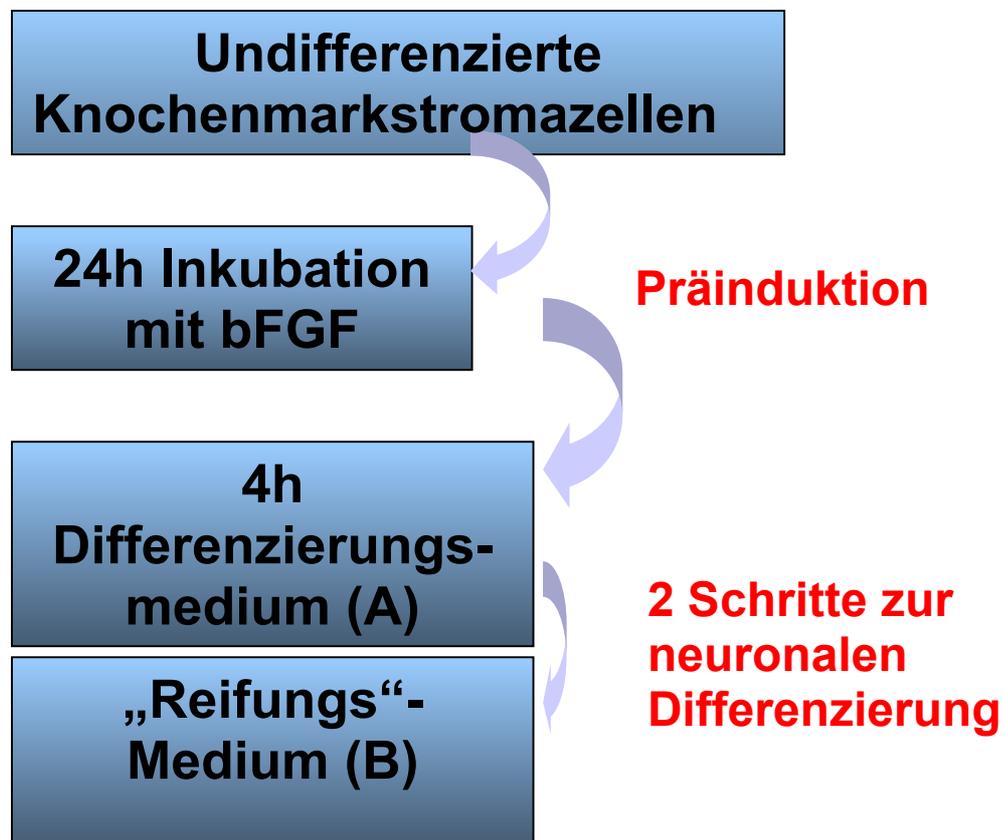
Die Differenzierung in zwei Schritten (Tab. 3.2 Punkt 1) erwies sich als die erfolgreichste. Nach weiteren Tests und Kontrollen durch immunzytochemische Färbung wurde schließlich folgendes Protokoll für alle weiteren Differenzierungen verwendet:

Zunächst wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/well in 6-well Zellkulturplatten in normalem Zellkulturmedium (DMEM/ 15%FBS/ 100U/ml Penicillin/ 100µg/ml Streptomycin) ausgesät. Nach einem Tag wurde das Medium entfernt und gegen DMEM/ 15%FBS/ 10ng/ml bFGF ohne Antibiotika gewechselt. Nach Inkubation über 24 Stunden in diesem Medium (Präinduktion) wurde durch erneuten Mediumwechsel (Medium A) die neuronale Differenzierung der Knochenmarkstromazellen induziert. Nach 3,5 bis 4 Stunden wurde zu einem speziell für neuronale Zellkulturen entwickelten Medium (Neurobasal™,

Invitrogen) gewechselt, welches neben Antioxidantien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol die Wachstumsfaktoren NGF (engl. „Nerve Growth Factor“) und bFGF (engl. “basic Fibroblast Growth Factor“) enthielt (s Abb. 2.3).

**Abb. 3.3:** Differenzierungsprotokoll zur neuronalen Differenzierung muriner KMSZ

- A)** DMEM/1,5%DMSO/ 150 $\mu$ M BHA/ 2mM Valproinsäure / 10 $\mu$ M Forskolin/  
1 $\mu$ M Hydrocortison/ 5 $\mu$ g/ml Insulin/ 2mM Glutamax
- B)** nach 3,5h-4h: Neurobasal-Medium/ B27 ohne Antioxidantien/ 50ng/ml NGF/  
10ng/ml bFGF/ 2mM BME/ 50% Pen-Strep / 5 $\mu$ M Forskolin/ 1mM  
Valproinsäure / 2mM Glutamax



### 3.2.2 Immunfärbung/ -fluoreszenzmikroskopie

Für die Charakterisierung der Zellen vor und während des Differenzierungsvorgangs wurden diese im undifferenzierten Zustand, nach der Präinduktion mit bFGF, einen Tag, zwei Tage und drei Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung fixiert. Hierzu wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen in 6-well Zellkulturschalen ausgesät, in die vorher sterile Glasdeckgläser von 12mm Durchmesser gegeben wurden. Die Fixierung erfolgte je nach Art des nachzuweisenden Proteins durch Tauchen der Deckgläser in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur oder Inkubation in kaltem ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) Methanol für 5 Minuten und kurzem Tauchen in Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ , ca. 30 Sekunden).

Zur Immunfärbung wurden die fixierten Zellen in PBS gewaschen oder in 0,1-0,4% Triton X getaucht (5min) und anschließend in PBS gewaschen (3x5min). Inkubation mit 5%igem Eselserum in PBS (30min) diente dem Blockieren unspezifischer Bindungen, nach kurzem Tauchen in PBS wurden die Zellen für 60 Minuten mit den spezifischen Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 2.3).

**Tab. 3.3:** Verwendete Antikörper/ - Konzentrationen

R = RABBIT (KANINCHEN)

G = GOAT (ZIEGE)

M = MOUSE (MAUS)

Antigen	Funktion/Expression	Erstantikörper/ Spezies	Konzentration 1.AK	Konzentration 2.AK
$\alpha$ -SMA	Zytoskelett, glatte Muskelzellen	Polyklonal/R	1 :100	1 :200
Desmin	Zytoskelett, glatte (u.a.) Muskelzellen	Polyklonal/R	1:100	1:300
GalC	Lysosomales Enzym, Oligodendrozyten	Monoklonal/M	1 :100	1 :200
GFAP	Intermediärfilament, Astrozyten	Monoklonal/M	1:200	1:200
GFAP	"	Polyklonal/G	1:50	1:150
HuC/HuD	RNS-bind. Protein, frühe Neuronen	Monoklonal/M	1:100	1:150
Ki67	Funkt. unbekannt, Zellzyklus	Monoklonal/Ratte	1:100	1:200
L1-CAM	Zelladhäsion im ZNS	Monoklonal/Ratte	1:100	1:150
Nestin	Intermediärfilament, Vorläuferzellen	Monoklonal/M	1 :100	1 :200
NF-M	Intermediärfilament, Neurone	Polyklonal/R	1 :150	1 :150
NSE	Glykolyt. Enzym, Neurone	Polyklonal/R	1 :2000	1 :100
O4	Oligodendrozyten	Monoklonal/M	1:100	1:200
Pleiotrophin	Neuritenwachstum fördernder Faktor	Polyklonal/G	1:50	1:200
RC2	Zytoskelett, Radiale Gliazellen	Monoklonal/M	6 $\mu\text{g/ml}$	1:50
Slug	Transkriptionsfaktor, EMT	Polyklonal/R	1:100	1:200, 1:300
TrkA	NGF-Rezeptor, Neurone	Polyklonal/R	1 :100	1 :100
VE-Cadherin	Zelladhäsion, Endothelzellen	Polyklonal/R	1 :200	1 :300
Vimentin	Intermediärfilament, breit exprimiert	Polyklonal/G	1:50	1 :300

Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten in PBS gewaschen und danach 30 Minuten mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gegen die Herkunftsspezies der jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (2 x 5min in PBS, 5min in H<sub>2</sub>O, 3min in 100% Ethanol) und Trocknen wurden die Deckgläser in 90% Glycerol, 0,1M Tris-HCl pH8 und 2,3% DABCO (1,4-diazobicyclo-2,3,3-octane) als DNA-Farbstoff auf Objektträger eingebettet.

Die Auswertung der Immunfärbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop 2 oder Leica DM IRE2), welches mit einem elektronischen Auswertesystem bestehend aus Kamera und entsprechendem Computerprogramm (IPLab oder Simple PCI Imaging Software 5.3) verbunden war. Die Belichtungszeiten und das Kontrastverhältnis wurden bei einer Serie von Immunfärbungen für ein bestimmtes Antigen jeweils konstant gehalten.

### **3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen differenzierter Knochenmarkstromazellen**

Um festzustellen ob neuronal differenzierte KMSZ aktiv Aktionspotentiale weiterleiten können oder ligandenabhängige Ionenkanäle entwickeln, wurden in Zusammenarbeit mit Kristin Hartmann (AG Prof. Andreas Draguhn, Charité, Berlin; jetzt Universität Heidelberg) Patch-Clamp-Ableitungen der Zellen durchgeführt. Hierzu wurden murine KMSZ auf Glasdeckgläsern (Ø 12mm) neuronal differenziert. Die Ableitungen erfolgten zwei Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung (Charité, Berlin). Für die Messungen wurden die Deckgläser aus dem Medium in eine Messkammer gelegt, die permanent von einer artifiziellen cerebrospinalen Lösung (bestehend aus (mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 MgSO<sub>2</sub>, CaCl, Glukose, gesättigt mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>; pH 7,3) durchspült wurde (bei Raumtemperatur). Borosilikatglas-Elektroden wurden mit einem Widerstand von 3-5 MW gezogen (Sutter Instruments, USA). Der Widerstand der Elektroden lag anschließend zwischen 4 und 14 MW und wurde während der Messungen permanent kontrolliert. Die Elektroden wurden mit einer intrazellulären Lösung (das heißt diese war kompatibel zum osmotischen Gleichgewicht des Inneren der gemessenen Zelle) gefüllt. Diese bestand aus K-Glukonat (140mM) und folgenden Bestandteilen (mM): 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 EGTA, 2 MgATP; pH 7.25). Die Ableitungen erfolgten an visuell ausgesuchten Zellen unter

einem DIC Videomikroskop (Zeiss Axioskop) und einem EPC-7 Verstärker. Die gemessenen Ströme wurden verstärkt (10mM/pA), bei 3kHz gefiltert und im Computer gespeichert. Zur Untersuchung ligandenabhängiger Ionenkanäle wurden Glutamat und GABA (Gamma-aminobutyric Acid) in der artifiziellen cerebrospinalen Lösung aufgenommen und in die Messkammer gegeben.

### **3.4 Expressionsanalysen muriner Knochenmarkstromazellen und ihrer neuronalen Differenzierung mit cDNS-Mikroarrays**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen muriner Knochenmarkstromazellen mit Maus-spezifischen cDNS-Mikroarrays teilen sich folgenderweise auf: zunächst wurde ein Expressionsprofil der undifferenzierten Zellen mit dem Ziel erstellt, mehr über die Natur dieser Zellen zu erfahren, die *in vitro* und *in vivo* ein erstaunliches Entwicklungspotential zeigen. Anschließend wurden Genexpressionsänderungen während der neuronalen Differenzierung über einen Zeitverlauf von fünf Tagen analysiert.

#### **3.4.1 Expressionsprofil undifferenzierter muriner Knochenmarkstromazellen**

Expressionsprofile dreier verschiedener undifferenzierter Kulturen von Knochenmarkstromazellen der Maus wurden erstellt. Diese waren frei von CD11b-positiven Zellen und befanden sich zwischen Passage 12 und 15.

##### **3.4.1.1 RNS-Isolierung und -Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Nukleotiden**

Die Zellen wurden in subkonfluentem Zustand mit 0,25% Trypsin/ 1mM EDTA aus den Kulturflaschen gelöst (3-4 min bei 37°C) und durch Zentrifugation (260g, 10min, 4°C) pelletiert. Die RNS-Isolierung erfolgte mittels TRIZOL™ nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene Menge an RNS wurde mittels eines UV-Spektrometers (Perkin Elmer λBIO 10) gemessen und zum Ausschluß RNase bedingter Degradation und Kontamination mit genomischer DNS durch Gelelektrophorese in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt.

Vor der Markierungsreaktion wurde die RNS mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden 2,5% Vol. Ethanol und 0,1 Vol. 3M NaAcetat (pH 5) zugegeben und für mindestens eine Stunde bei minus 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30min, 12.000g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, das RNS-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und bei 45°C in einer

Vakuumentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet. Die getrocknete RNS wurde in H<sub>2</sub>O aufgenommen (Volumen abhängig von der zuvor gemessenen Menge).

Für die Markierungsreaktion wurden jeweils 50µg RNS in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNS überschrieben. Oligo(dT) diente als Startermolekül, die Markierung erfolgte durch fluoreszenzgekoppelte (Cy3/Cy5) dUTP Nukleotide in folgendem Ansatz:

5x Erststrangsynthesepuffer	8µl	10x low dT dNTP-Mix
Oligo dT (500µg/µl)	2µl	0,5mM dGTP
10 lowdT dNTP-Mix	4µl	0,5mM dATP
Cy3/Cy5 (1mM)	4µl	0,5mM dCTP
0,1 M DTT	4µl	0,2mM dTTP
RNAse Inhibitor	1µl	
Gesamt RNS (50µg)	x	
H <sub>2</sub> O	Ad 40µl	

Der Markierungsansatz wurde zunächst für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, anschließend langsam auf 42°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2µl reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) wurde die Reaktion zunächst für 25 Minuten bei 42°C inkubiert, nach Zugabe weiterer 2µl Enzym nochmals für 35 Minuten. Die enzymatische Reaktion wurde durch 5µl 500mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde die RNS aus dem Reaktionsansatz nach Zugabe von 10µl 1M NaOH und 60-minütige Inkubation bei 65°C abgebaut, so daß nur noch die synthetisierte markierte cDNS enthalten war. Anschließend wurde die cDNS mit dem QIAquick PCR-purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 2x 30µl H<sub>2</sub>O eluiert.

Vor dem Aufnehmen in der Hybridisierungslösung wurde die Lösung der markierten cDNS in einer Vakuumentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) auf wenige Mikroliter (2-3) reduziert oder ganz eingetrocknet.

#### 3.4.1.2 Herstellung der cDNS-Mikroarrays

Der für die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit verwendete cDNS-Mikroarray bestand aus insgesamt 13.603 murinen cDNS-Klonen. 10.000 stammten von der Firma Lion Bioscience (arrayTAG clone collection™, Heidelberg), 3.603 Klone vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes (RZPD, Berlin). Diese cDNS-Klone entsprechen 8440 Gen-Clustern der UniGene Datenbank des NIH (National Institutes of Health, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>).

Die cDNS-Sequenzen der bakteriellen Klone wurden unter Standardbedingungen amplifiziert. Für die arrayTAG clone collection™ wurden folgende Startermoleküle verwendet: Lion 3' (TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T) und Lion 5' (AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT). Für die Klone des RZPD wurden M13-Standard-Startermoleküle verwendet: M13for (GTA AAA CGA CGG CCA G) and M13rev (CAG GAA ACA GCT ATG AC). Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese evaluiert.

Vor dem Aufbringen der PCR-Produkte auf die Glasobjektträger (Corning), wurden diese in Ethanol gefällt und getrocknet. Anschließend wurden sie in 8µl 3x SSC resuspendiert. Das Aufbringen der cDNS-Sonden erfolgte durch einen Robotor (SDDC-2 MicroArrayer, ESI, Toronto, Kanada).

#### 3.4.1.3 Mikroarray-Hybridisierung

Die eingetrockneten markierten cDNS Proben wurden in 35µl einer speziellen Hybridisierungslösung (HybA), bestehend aus 50% Formamid, 6xSSC, 0,5%Natrium Dodecylsulfat, 5x Denhardts-Lösung, aufgenommen. Zum Blockieren unspezifischer Bindung der markierten cDNS an repetitive Sequenzen der auf dem cDNS-Chip befindlichen Sonden wurden je ein Mikroliter Maus-Cot-1 DNA (20µg/µl) und poly(dA) (10µg/µl) dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde 3 Minuten bei 95°C denaturiert, danach direkt in Eis gekühlt, auf den Mikroarray gegeben und dieser mit einem Deckglas abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 Stunden bei 42°C.

Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Mikroarrays bei Raumtemperatur wie folgt gewaschen: 5 min in 0,2 x SSC/0,01%SDS und 2 x 5 min in 0,2 x SSC, gefolgt von einem kurzen Eintauchen (wenige Sekunden) in destilliertes H<sub>2</sub>O.

Eventuell auf den Objektträgern verbliebene Wassertropfen wurden durch kurze Zentrifugation entfernt.

#### 3.4.1.4 Auswertung der Mikroarray-Hybridisierung

Für die Analyse der Hybridisierungsergebnisse wurden die Fluoreszenzsignale der auf den Mikroarrays gebundenen markierten cDNS-Sequenzen mit einem Laserscanner (GenePix 4000B, Axon Instruments) gemessen. Je Hybridisierung wurden die Signalintensitäten der zwei unterschiedlich markierten Proben (Cy3/Cy5) gemessen. Die Anregungswellenlänge von Cy3 liegt bei 532nm, die von Cy5 bei 635nm. Die entstehenden monochromen 16-bit Bilder

wurden mit Hilfe einer Mikroarray-spezifischen Erweiterung des Bildverarbeitungsprogramms IPlab ausgewertet (Microarray suite image analysis software, Version 2.0, beide Programme von Scanalytics, Fairfax, Va., USA). Diese berechnet für jeden „Spot“ die Signal- und Hintergrundintensität (engl. „spot“- Punkt/Bereich, an dem eine cDNS-Sonde auf dem Mikroarray kovalent gebunden ist und markierte cDNS der jeweiligen Probe hybridisiert hat). Die Hintergrundintensität wird vom Signal abgezogen. Man erhält schließlich für alle cDNS-Sonden auf dem Mikroarray die Intensität aller Signale, die bei einer Wellenlänge von 532nm bzw. 635nm angeregt werden. Die Intensität wird in der digitalen Pixelskalierung von 1=schwarz bis 65535=weiß wiedergegeben. Für die Ermittlung des Expressionsprofils muriner Knochenmarkstromazellen wurde markierte cDNS derselben Proben kohybridisiert, um farbstoffspezifische Unterschiede bei der Markierungs- und Hybridisierungsreaktion auszuschließen.

Die weitere Datenanalyse und Normalisierung der Intensitäten wurde von Dr. Christine Steinhoff (Abteilung Prof. Vingron des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik) durchgeführt.

#### 3.4.1.5 Normalisierung

Die Signalintensitäten beider Wellenlängen wurden bereits durch die Microarray Suite hintergrundkorrigiert. Leere Spots - dort wo keine cDNS-Sonde vorhanden war - und solche mit pflanzlichen Kontrollgenen wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die logarithmischen Intensitäten wurden mittels der Loess-Funktion, implementiert in R, normalisiert. „R“ ist sowohl Programmiersprache als auch ein statistisches Programmpaket (<http://cran.R-project.org>). Die Mittelwerte der Signalintensitäten der drei Kohybridisierungen wurden für die weitere Analyse verwendet.

### 3.4.1.6 Identifizierung exprimierter Gene

Um über die in den Mikroarray-Experimenten erhaltenen Signalintensitäten das Genexpressionsniveau zu bestimmen, wurde ein Modell verschiedener Normalverteilungen auf die Verteilung der Intensitäten (bzw. deren logarithmische Werte) angewandt (EM-Algorithmus). Hierdurch wird eine exaktere Modellierung der Intensitätsverteilung (schwach => stark) möglich. Die Zahl der Normalverteilungen, welche die Verteilung der Signalintensitäten am besten beschreibt, wurde anhand des Bayes'schen Informationskriteriums (engl. BIC) geschätzt. Nicht exprimierte Gene und Hintergrund wurden durch die erste Normalverteilung beschrieben (Modus 1). Die Signalintensitäten der exprimierten Gene wurden von zwei weiteren Normalverteilungen beschrieben (Modus 2 und 3). Intensitäten über einem Schwellenwert von zwei Standardabweichungen über dem Mittel der ersten Normalverteilung wurden als Signale exprimierter Gene definiert. Signalintensitäten von zwei Standardabweichungen über dem Mittel der zweiten Verteilung wurden als hoch exprimierte Gene angesehen.

### 3.4.1.7 Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion

Zur Bestätigung der Expression einiger Gene, welche nach den Mikroarray-Daten in murinen Knochenmarkstromazellen exprimiert sind, wurden RT-PCRs durchgeführt:

Gesamt RNS von murinen Knochenmarkstromazellen wurde zunächst mit DNase (Promega) behandelt, um eventuell vorhandene genomische DNS zu entfernen:

	5µl	RNS (= 35µg)
+	3µl	10x DNase-Puffer (Promega)
+	5µl	DNase (1U/µl) (Promega)
+	1µl	RNAse Inhibitor (Amersham)
+	<u>16µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>
	30µl	total

Der DNS-Verdau wurde 30min bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C (10min) gestoppt.

Nach Ethanol-Fällung (s. 3.4.1.1) wurde die RNS in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 10µl wurden einmal mit, einmal ohne Enzym (als Negativkontrolle) in folgender Reaktion in cDNS umgeschrieben:

	10µl	RNS
+	7µl	H <sub>2</sub> O
+	2µl	OligodT (500ng/µl)
+	4µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
	<u>23µl</u>	

→ 10 min 65°C

→ 5 min auf Eis

+	8µl	Erststrangsynthesepuffer (Invitrogen)
+	4µl	0,1 M DTT (Invitrogen)
+	1µl	RNAsin (Amersham)
+	4µl	Superscript II ( 200U/µl) (Invitrogen)
	<u>40µl</u>	total

Die cDNS-Synthesereaktion wurde für 55 Minuten bei 42°C inkubiert. Zum Beenden des Reaktionsvorganges erfolgte anschließend eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C.

Der Nukleotid-Gehalt beider Ansätze wurden im UV-Spektrometer gemessen, für die anschließende PCR-Reaktion jeweils 200ng cDNS eingesetzt.

Reaktionsansatz der PCR-Reaktion:

	1,5 µl	cDNS (200ng)
+	10µl	dNTPs (1mM)
+	2,5µl	RT-Puffer
+	2 µl	Vorwärtsprimer (10pM)
+	2 µl	Rückwärtsprimer (10pM)
+	0,5 µl	Taq-Polymerase (Perkin Elmer)
+	<u>29µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>
	50µl	total

Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

94°C	3 min	
94°C	45 s	} 35x
55°C	1 min	
72°C	1,5 min	
72°C	7 min	

### 3.4.2 Expressionsprofil der Differenzierung muriner Knochenmarkstromazellen in Zellen mit neuronalen Eigenschaften

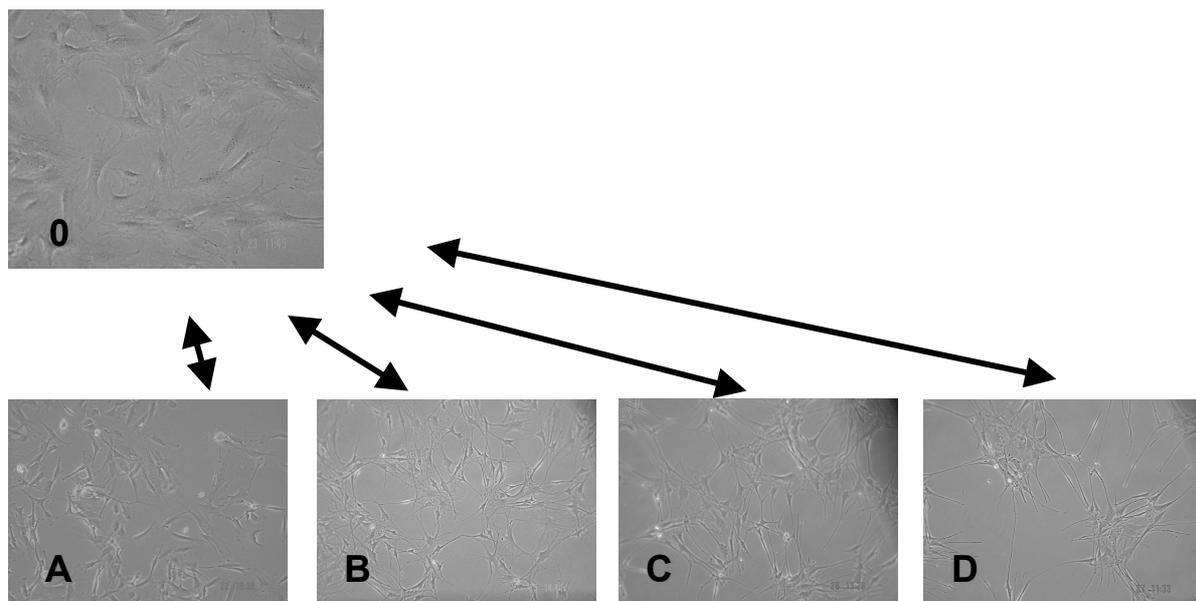
Für die Zeitreihen-Analyse der Expressionsänderungen während der neuronalen Differenzierung muriner KMSZ war zunächst eine Expansion der Zellen in Zellkultur notwendig, um genügend Zellmaterial je Zeitpunkt zu erhalten. Die vorangehenden Immunfärbungen hatten gezeigt, daß die Zellen auch nach bis zu 20 Passagen in Kultur ihre Differenzierungsfähigkeit behalten.

Vor der Induktion der neuronalen Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/150cm<sup>2</sup> (Fläche der Kulturflaschen) ausgesät, damit sie zum Zeitpunkt der Differenzierung zu ca. 50-60% konfluent waren.

Es wurden Kohybridisierungen zweier Differenzierungsreihen jeweils zwischen den undifferenzierten Zellen als Referenz und den Zellen nach (Prä-)Induktion der Differenzierung mit bFGF und bis zu drei Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung durchgeführt (s. Abb. 3.4).

**Abb. 3.4:** Schema der durchgeführten Zeitreihenanalysen zu Differenzierung muriner KMSZ in einen neuronalen Phänotyp

- 0 = UNDIFFERENZIERTE KMSZ
- A = ZELLEN NACH PRÄINDUKTION FÜR 24H MIT 10NG/ML bFGF
- B = ZELLEN 1 TAG NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- C = ZELLEN 2 TAGE NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG
- D = ZELLEN 3 TAGE NACH INDUKTION DER NEURONALEN DIFFERENZIERUNG



Die Markierungsreaktionen, Hybridisierungen und die primäre Datenanalyse entsprechen dem Vorgehen in 3.4.1.

### 3.4.2.1 Clusteranalyse

Die Daten der beiden Differenzierungsreihen wurden wie folgt einer Clusteranalyse unterzogen (durchgeführt von Dr. Christine Steinhoff, Abt. Vingron, MPI für Molekulare Genetik, Berlin): in die Clusteranalyse gingen Daten aller Klone ein, die eine mindestens zweifache Expressionsdifferenz an mindestens einem der vier untersuchten Zeitpunkte zeigen. Dies waren bei Serie 1 1227 Klone, bei Serie 2 2133. Eine Anzahl von fünf Clustern wurde definiert. Die Clusteranalyse erfolgte durch Anwendung des k-means Algorithmus unter Verwendung einer euklidischen Distanzmessung. Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten über die vier Zeitpunkte werden hierbei in einem Cluster zusammengefaßt.

Die Berechnungen und die anschließende graphische Visualisierung wurde mit dem MATLAB-Programm (Version 6.0.0.88, Release 12, MathWorks, Mass., USA) durchgeführt.

### 3.4.2.2 Semiquantitative RT-PCR

Die durch die Mikroarrayanalysen erhaltenen Expressionsänderungen ausgewählter Gene wurden durch eine semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) überprüft. Die sqRT-PCR ermöglicht die Feststellung des relativen Expressionsniveaus eines Gens während des Differenzierungsverlaufs. Hierzu wurde RNS aus Knochenmarkstromazellen der 5 verschiedenen Zeitpunkte gewonnen, welche den Zeitpunkten der Mikroarrayanalysen entsprachen:

1. aus undifferenzierten Zellen
2. nach 24-stündiger Präinkubation mit bFGF
3. 1 Tag nach Induktion der neuronalen Differenzierung
4. 2 Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung
5. 3 Tage nach Induktion der neuronalen Differenzierung

Die RNS-Proben wurden in cDNS überschrieben. Um genügend cDNS herzustellen und eine gleichmäßige RNS-Konzentration sowie cDNS-Synthese sicherzustellen, wurden die Reaktionen in doppelter Menge angesetzt und zur cDNS-Synthese wieder geteilt.

cDNS-Synthese:

	2,5µg	Gesamt RNS	}	x 2 = 68µl
+	5µl	dNTPs (je 10mM)		
+	2,5µl	Random Primer (500ng/µl, Promega)		
+	ad 34µl	H <sub>2</sub> O		

→ 70°C 5min

→ Eis 5min

+	10µl	M-MLV 5x Reaktionspuffer (Promega)	}	x 2 = 32µl, um gleiche Mengen an RNS und Enzym in den Ansätzen zu gewährleisten
+	2µl	RNAsin (Amersham)		
+	4µl	M-MLV Reverse Transkriptase		
	50µl	total		

RT-PCR:

	1µl	cDNS
+	2,5µl	dNTPs (je 2mM)
+	2,5µl	10x Reaktionspuffer (Sigma)
+	1,5µl	Vorwärtsprimer (10pmol/µl)
+	1,5µl	Rückwärtsprimer (10pmol/µl)
+	14µl	H <sub>2</sub> O
+	2µl	RedTaq™ (Sigma)
	25µl	total

Die (RT-) PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

94°C	3 min	}	x-Zyklen
94°C	45 s		
54°C	1 min		
72°C	1min		
72°C	7 min		

Die Zyklenzahl richtete sich nach dem Expressionsniveau des jeweiligen Gens und wurde individuell ausgetestet. Sie lag zwischen zum Beispiel 18 Zyklen für EF1-beta und 32 Zyklen für Wnt1.